

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
54 (12) :1471 – 1480; 4 December 2014  
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.12.010

## 好氧 – 厌氧混合污泥启动微生物燃料电池产电性能及微生物群落动态特征

尹亚琳<sup>1</sup>, 高崇洋<sup>2</sup>, 赵阳国<sup>1,3\*</sup>, 王爱杰<sup>2</sup>, 王敏<sup>1</sup>, 闫凯丽<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 中国海洋大学环境科学与工程学院, 山东 青岛 266100

<sup>2</sup> 哈尔滨工业大学市政环境工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150090

<sup>3</sup> 中国海洋大学海洋环境与生态教育部重点实验室, 山东 青岛 266100

**摘要:** 【目的】为探讨好氧 – 厌氧混合污泥启动微生物燃料电池 (Microbial fuel cell, MFC) 产电性能以及 MFC 对微生物群落的选择作用, 【方法】以乳酸为底物, 应用不依赖于培养的微生物分子生物学技术解析单室 MFC 启动过程中微生物群落的组成和结构动态学特征。【结果】结果表明, MFC 经过 3 个周期启动成功, 最高输出电压 230 mV。当 MFC 外电阻为 1656  $\Omega$  时, 最大功率密度 11.15 W/m<sup>3</sup>, 电池运行稳定。混合污泥启动 MFC 以后, 阳极生物膜微生物群落结构同种泥差异较大, 且多样性降低。生物膜中微生物类群按丰度依次为  $\beta$ -变形菌纲 (Betaproteobacteria) 24.90%、拟杆菌门 (Bacteroidetes) 21.30%、厚壁菌门 (Firmicutes) 9.70%、 $\gamma$ -变形菌纲 (Gammaproteobacteria) 8.50%、 $\delta$ -变形菌纲 (Deltaproteobacteria) 7.90%、绿弯菌门 (Chloroflexi) 4.20% 以及  $\alpha$ -变形菌纲 (Alphaproteobacteria) 3.60%。有利于生物膜形成与稳定的动胶菌属 (*Zoogloea*) 和不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 序列丰度分别占生物膜群落的 5.00% 和 3.90%, 与 MFC 产电能力直接相关的地杆菌属 (*Geobacter*) 序列由混合污泥中的 0.60% 上升至阳极生物膜中的 2.60%。【结论】本研究表明, MFC 阳极生物膜在驯化过程中对污泥中的微生物进行淘汰和选择, 最终驯化形成了有利于生物膜形成与稳定、有机物厌氧发酵与产电的微生物菌群。

**关键词:** 微生物燃料电池, 混合污泥, 变性梯度凝胶电泳, 高通量测序, 微生物群落

**中图分类号:** Q938, X703      **文章编号:** 0001-6209 (2014) 12-1471-10

微生物燃料电池 (Microbial fuel cells, MFCs) 是一种以微生物为催化剂, 在厌氧条件下将有机物中的化学能转化为电能的装置。在 MFC 中, 微生物氧化降解有机物, 有机物分解获得的电子通过电子传递链传递到细胞外, 直接或间接地将

电子传递到阳极上, 经过外电路产生电流<sup>[1]</sup>。MFC 具有燃烧效率高、燃料来源广泛、反应条件温和、环保无污染等优点, 有望成为提供清洁能源、实现资源可持续利用的重要手段, 已经成为近年来的研究热点<sup>[2]</sup>。

**基金项目:** 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金 (BS2011NJ018); 国家自然科学基金 (40801193); 中国海洋大学本科生研究发展计划 (1312011006)

\* 通信作者。Tel: +86-532-66786568; E-mail: ygzhao@ouc.edu.cn

**作者简介:** (1990-), 女, 山东临沂人, 硕士研究生, 主要从事废水处理资源化研究。E-mail: 504225199@qq.com

**收稿日期:** 2014-03-17; **修回日期:** 2014-06-13

MFC 的启动是 MFC 运行成败的关键,而污泥种类和来源对 MFC 启动速度和产电效果有显著影响。Lobato 等<sup>[3]</sup>研究表明,以厌氧污泥为种泥的 MFC 启动比好氧污泥大约快 10 d,且产电效能好于好氧污泥。Quan 等<sup>[4]</sup>用好氧活性污泥和厌氧污泥启动双室微生物燃料电池,发现厌氧污泥启动的 MFC 最高电压为 0.38 V,好氧污泥启动的 MFC 电压为 0.25 V;然而,当以乙醇为底物时,好氧污泥的功率密度比厌氧污泥的功率密度高,有研究也获得了类似结果<sup>[5]</sup>。实际上,好氧、厌氧污泥中均存在利于污水厌氧处理产电的微生物种群,若将两种污泥混合后启动厌氧反应器(或 MFC),或可能取得更好的效果。MFC 启动过程实际是在阳极富集有机物降解和电极活性菌的过程,阳极生物膜微生物群落的种类和组成是 MFC 效能的基础,为了提高 MFC 的产电效能,深入分析产电微生物的群落的组成、结构等动态学特征具有重要实践意义。

变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)和高通量测序技术(High-throughput sequencing, HTS)是近年来发展起来的不依赖于培养的微生物分子生态学技术,在揭示污染生境中微生物群落组成和结构、提高污染物的降解效率中表现出非常积极的作用。DGGE 技术在揭示各种生境中微生物群落的结构中广泛应用,已被用于水体、根际、土壤、动物消化道、热泉、湖泊、食品以及人工构筑物(反应器)等多种环境中微生物生态学研究<sup>[6-7]</sup>。将 DGGE 分析与反应器功能结合,能更准确揭示微生物在系统中的功能地位,以进一步优化系统运行,具有很好的发展前景<sup>[8]</sup>。2005 年,罗氏生物公司首先推出划时代的新型高通量测序平台,随后 Illumina、Roche、ABI 等公司先后推出新一代高通量测序平台和技术,高通量测序技术在微生物生态学领域得到了迅猛发展<sup>[9]</sup>。

本研究以好氧-厌氧混合污泥为种泥,以乳酸为主要碳源,探讨单室 MFC 反应器的产电效能,同时,利用 PCR-DGGE 和高通量测序技术对 MFC 阳极生物膜微生物群落结构和组成进行解析,以揭示 MFC 对产电微生物的选择作用以及 MFC 产电的微生物群落特征。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验装置:**本研究采用单室空气阴极微生物燃料电池,主体由有机玻璃构成,正方体结构,有效容积 28 mL。阳极为碳刷,阴极按照 Cheng 等<sup>[10]</sup>的方法制作碳布。正常产电情况下,外电阻 1000  $\Omega$ ,用钛丝作为连接导线,连接点用环氧树脂密封隔水。实验装置在 20-25 $^{\circ}\text{C}$  条件下启动和运行。

**1.1.2 电极液组成<sup>[11]</sup>:**阳极室(L):0.31 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.13 g  $\text{KCl}$ , 2 mL 微量元素, 100 mL 磷酸盐缓冲液, 0.2 mL 维生素溶液, 0.2 mL 氨基酸溶液, 500 mg 乳酸(COD)。阴极室:1 $\times$ 磷酸盐缓冲液。

**1.1.3 种泥:**MFC 种泥为好氧污泥和厌氧污泥按照 1:1 (V/V) 的比例混合而成,其中厌氧污泥取自本实验室稳定运行的厌氧折流反应器(ABR),好氧污泥取自青岛市李村河污水处理厂的好氧曝气池。

**1.1.4 主要试剂和仪器:**土壤 DNA 提取试剂盒(Mobio, CA USA), Ex Taq DNA 聚合酶、dNTP、pMD19-T 载体、PCR 产物回收试剂盒(TaKaRa, 大连),数据采集卡(PISO-813, 台湾泓格科技),电泳系统 Power Pac1000、CFX96 PCR 仪、突变检测系统(DGGE)(Bio-Rad, 美国),LK2005B 电化学工作站(兰力科化学电子,天津)。

### 1.2 MFC 的启动与运行

吸取混合污泥置于单室反应器中,加入培养液,静置以使阳极挂膜,每 48 h 换水 1 次,直至反应器电压输出稳定。分别取好氧污泥、厌氧污泥、二者混合污泥、反应器完成启动的阳极生物膜、反应器启动后运行稳定的阳极生物膜、反应器启动后的悬浮液,预处理后用于扫描电镜观察、PCR-DGGE 分析和基于 16S rDNA 的微生物群落高通量测序分析。

### 1.3 监测分析

**1.3.1 电压测量及分析:**输出电压( $U$ )通过数据采集卡进行在线纪录。电路中的电流( $I$ )用欧姆定律计算: $I = U/R$ 。电流密度  $j = I/V$ ,  $V$  为单室反应器体积。电池的功率输出  $P = U^2/R$ , 功率密度  $q = P/V$ 。

**1.3.2 伏安曲线的监测:**循环伏安实验在电化学工作站上进行。所有实验均采用三电极体系,以 MFC 阳极作为工作电极,甘汞电极为参比电极,铂片电极为辅助电极。电化学测试在室温下进行。

## 1.4 微生物群落分析

使用电子扫描电镜对产电稳定期间的电极表面微生物进行观测。将 MFC 阳极切下一小块, 使用磷酸盐缓冲液清洗 2 次后, 用 2.5% 戊二醛固定, 用于扫描电镜观察。

采用土壤 DNA 提取试剂盒提取生物膜微生物总 DNA。对于微生物群落的结构分析, 以总 DNA 为模板, 根据文献 [12] 的方法, 采用细菌 16S rDNA 通用引物 BA101F/BA534R, 进行 PCR 扩增及 PCR 产物的 DGGE 分析。将 DGGE 图中条带回收并测序 (委托南京金斯瑞完成), 之后采用 RDP 数据库 (<http://rdp.cme.msu.edu/>) 中的 SeqMatch 程序进行分类并下载相似典型菌株序列, 以 Mega 4.0 [13] 构建系统发育树, 测序获得的条带已经递交至 GenBank, 登录号为 KJ730213-KJ730234。

对于微生物群落的组成分析, 采用基于 Illumina 公司 Miseq 平台的高通量测序技术进行 (委托北京诺禾致源完成)。参考文献 [14] 的方法, PCR 扩增应用细菌 16S rDNA V4 区保守引物 515f/806r。测得的序列通过拼接及筛选后, 以相似性 97% 为标准获得操作分类单元 (OTU), OTU 通过 RDP 数据库 (<http://rdp.cme.msu.edu/>) 中的 Classifier 程序进行检索分类, 按文献 [14] 的方法分析微生物群落的 Shannon 多样性指数、种类组成、相对丰度, 对群落的差异进行主成分分析。

## 2 结果和讨论

### 2.1 混合污泥启动 MFC 及产电效率

以好氧-厌氧混合污泥为种泥、乳酸为底物启动单室空气阴极 MFC 反应器, 每 48 h 更换一次阳极溶液, 以维持微生物燃料电池的运行, MFC 输出电压随时间的变化如图 1。MFC 启动后电压缓慢上升, 在启动运行第 2 个周期, MFC 的输出电压上升到 114 mV; 在第 3 个周期时, 电压输出最高达到 230 mV, 又运行 5 个周期, 输出电压无明显波动, 表明 MFC 启动成功。

通过连续改变外电阻 ( $3600 \Omega \square 24 \Omega$ ), 获得 MFC 的功率密度曲线 (图 2-A)。随着电阻的减小, 电流密度逐渐增大。当外电路的电流密度为  $29.14 \text{ A/m}^3$  时, MFC 的功率密度为  $8.56 \text{ W/m}^3$ ; 而后随着电流密度逐渐升高到  $40.12 \text{ A/m}^3$ , 功率密度

达到  $10.32 \text{ W/m}^3$ ; 当电流密度为  $49.02 \text{ A/m}^3$ , MFC 的功率密度达到最大值  $11.15 \text{ W/m}^3$ , 此时对应外电阻为  $1656 \Omega$ 。图 2-B 是微生物燃料电池启动成功以后, 在扫描速度  $5 \text{ mV/s}$ ,  $(-0.4) - (+0.3) \text{ V}$  范围内 1 次循环条件下循环伏安曲线。由图可知, 该 MFC 的循环伏安曲线没有明显的氧化还原峰, 表明微生物燃料电池在整个循环伏安测试过程中均以恒定速度进行充放电, 电池的性能较为稳定。

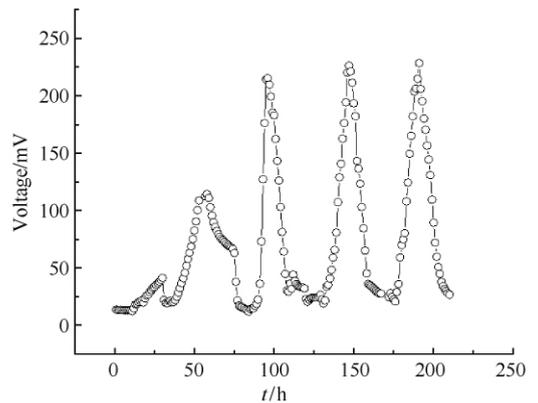


图 1. MFC 启动、运行的电压-时间图

Figure 1. Electricity production of MFC incubated with mixed sludge.

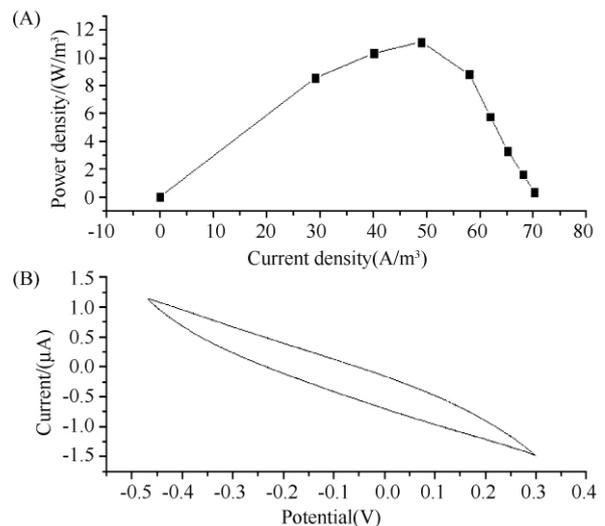


图 2. MFC 的功率密度曲线 (A) 与循环伏安特性曲线 (B)

Figure 2. Power density curve (A) and cyclic voltammogram scanning (B) of MFC at steady state.

本研究采用好氧-混合厌氧污泥启动的 MFC 经过 3 个运行周期, 电压即达到 230 mV, 后续的运行

行过程中电压无明显波动, 这比本研究前期实验中单独利用好氧活性污泥或厌氧污泥为种泥的 MFC 启动要快(图未给出)。在本研究前期实验中, 应用同样的厌氧污泥成功启动 MFC 需要 400 h, 好氧污泥启动也需要 100 h 以上。Xiao 等<sup>[5]</sup> 研究也表明应用混合污泥启动 MFC 的时间可以大大缩短; Rodrigo 等<sup>[15]</sup> 指出, 为了加快反应器启动, 可将曝气池中的好氧活性污泥置于封闭的容器中 5 d, 以形成好氧-厌氧混合污泥。混合污泥启动 MFC 更快的原因, 一方面可能因为混合污泥比好氧污泥或厌氧污泥种群多样性更高, 这一点将在微生物群落结构分析中得到进一步证实, 而丰富的微生物种类可以为 MFC 选择适合的产电微生物提供更多可能<sup>[16]</sup>。另一方面, 混合污泥兼具好氧污泥和厌氧污泥的优点, 好氧微生物能够快速消耗掉系统中氧气进而为产电菌创制环境条件, 同时这些微生物在代谢大分子有机物时

也能够为产电菌提供更多的有利底物<sup>[17]</sup>。Chae 等<sup>[17]</sup> 认为, 混合培养环境与单一培养环境相比, 由于多种菌群对底物的协同代谢作用, 产电菌更有利于获得小分子有机物产电。然而, 复杂环境中微生物群落之间协同作用的机制尚不明确, 需要进一步探究。

## 2.2 MFC 启动过程中微生物群落结构动态变化

为研究 MFC 启动引起的微生物种群变化, 分别取好氧活性污泥、厌氧污泥以及二者混合后并启动 MFC 后的阳极生物膜, 进行扫描电镜观察。发现三者微生物均为杆状菌, 附着于载体表面, 好氧污泥中的微生物更为密集, 数量较多, 而厌氧污泥生物量较少。

利用 PCR-DGGE 技术对污泥和阳极膜进行 DGGE 群落结构变化的分析, 并对 DGGE 图谱各泳道进行聚类比较, 结果如图 3。

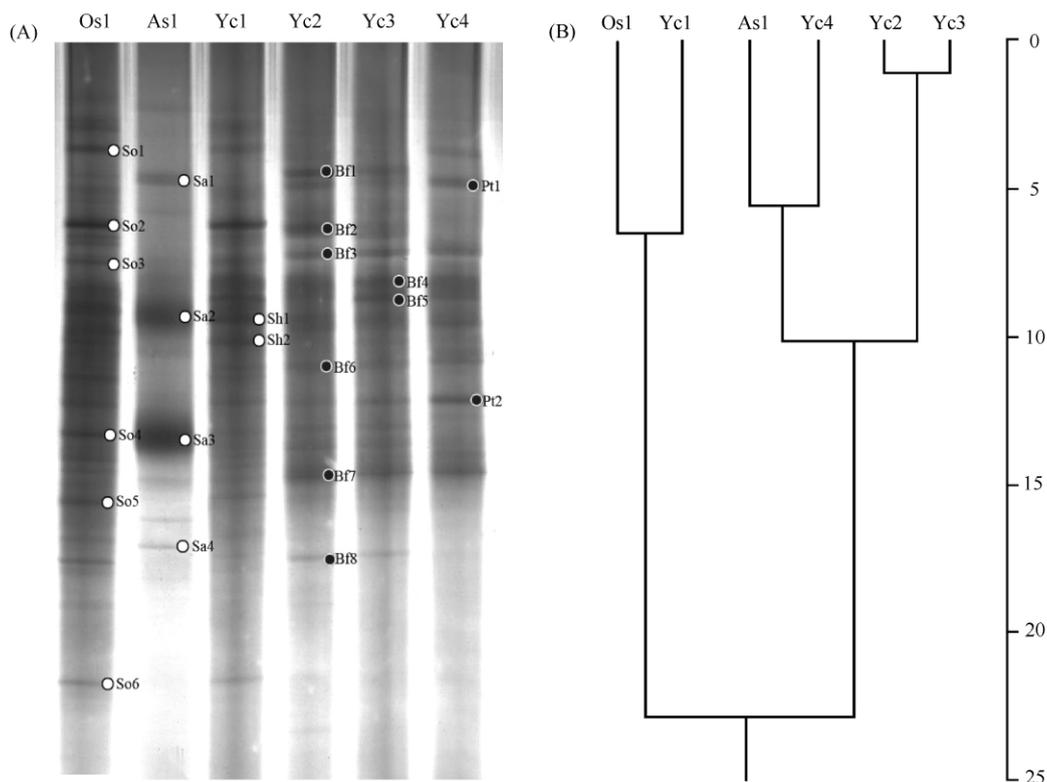


图 3. 细菌群落的 DGGE 图谱 (A) 及聚类分析 (B)

Figure 3. DGGE profiles of bacterial communities (A) and cluster analysis for DGGE profiles (B). Os1, aerobic activated sludge; As1, anaerobic sludge; Yc1, mixture of aerobic and anaerobic sludges; Yc2, anodic biofilm of the started-up MFC; Yc3, anodic biofilm of steady-running MFC; Yc4, planktobacteria in anodic chamber of steady-running MFC. The marks beside the bands of panel A indicate the bands are following sequenced; the scale on the right of panel B is the divergence distance (%).

根据 DGGE 图谱发现, 各个微生物群落中均存在明显的特征条带。在污泥中, 好氧活性污泥的 DGGE 条带较多, 微生物种类丰富, 而厌氧污泥的条带比较稀疏, 微生物种类组成有限。混合污泥的条带兼具二者的条带, 但更接近好氧活性污泥。好氧污泥的微生物群落多样性丰富, 而厌氧污泥的微生物群落多样性低, 主要是特定环境条件长期驯化的结果; 厌氧微生物能够利用的底物比较有限, 一般在同样的底物条件下, 可以支持生长的好氧微生物种类远远高于厌氧微生物<sup>[18]</sup>。对于以混合污泥启动的 MFC 而言, 反应器刚完成启动的阳极生物膜、反应器启动后运行稳定的阳极生物膜微生物群落结构特征相近, 表明 MFC 启动成功以后, 微生物群落结构在一定程度上处于稳定状态。反应器启动后的悬浮液中的微生物群落结构与原始的厌氧污泥相似性较高, 主要是悬浮液中的微生物也经历了厌氧的选择作用, 生存条件与厌氧污泥类似, 生存条件的相似决定了微生物群落结构的一致<sup>[19]</sup>。将 MFC 启动成功后的阳极生物膜以及悬浮液的 DGGE 条带与启动前混合污泥的 DGGE 条带相比, 微生物丰度降低, 微生物条带减少, 且优势种群发生了变化, 这些均表明 MFC 运行过程对混合污泥的微生物起到了明显的选择作用。

选取优势菌群的条带进行克隆测序, 将所得序列在 RDP 数据库进行检索和同源性分析, 与相似序列构建进化树如图 4。条带 Sh2 在混合污泥群落中所占比例较高, 在 MFC 稳定运行的阳极生物膜中也占有一定比例。序列比对发现其与地杆菌属 (*Geobacter*) 中的 *G. psychrophilus* 相似最高 (98%)。 *G. psychrophilus* 为分离自沉积物上覆水中的铁还原菌, 能够氧化多种有机物还原三价铁离子<sup>[20]</sup>, 据信是 MFC 阳极生物膜中的典型产电细菌, 该微生物的富集对 MFC 的高效产电可能具有重要贡献。另外, 阳极膜中条带 Bf5 序列最相似菌株为 *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC23270 (T) (AF465604, 相似性 100%), 该菌株能够在 MFC 阴极中氧化铁离子<sup>[21]</sup>, 这表明在 MFC 阳极表面仍存在大量未被认知的电极活性微生物, 占优势的微生物种群并非传统的产电微生物。

### 2.3 MFC 对微生物种群的选择作用

由微生物群落多样性 Shannon 指数 (图 5-A) 可知, 厌氧污泥 (As1) 的微生物多样性最低, Shannon

指数为 7 左右, 而好氧污泥 (Os1) 与 MFC 启动后运行稳定的阳极生物膜 (Yc3) 的微生物群落多样性接近, Shannon 指数为 10, 这与 DGGE 分析结果一致。而由好氧-厌氧污泥混合后的污泥 (Yc1) 微生物群落多样性最高, Shannon 指数达 11, 这表明好氧活性污泥与厌氧污泥既有相同的微生物种类, 又存在差异的类群, 二者的叠加使微生物种类丰富度增加。由微生物群落的 PCA 分析 (图 5-B) 可见, 3 种污泥在 PC1 水平上的分离距离均较大, 而在 PC2 水平上好氧活性污泥 (Os1) 和混合后的污泥 (Yc1) 距离较近, 这与 DGGE 及其聚类分析结果基本一致。MFC 运行稳定的阳极生物膜 (Yc3) 微生物种类与初始污泥在 PC2 方向上分离距离非常大, 这进一步验证了 MFC 的启动过程对微生物的种类起到了显著的选择作用, 这是采用有限的底物 (如乳酸) 对种泥长时间驯化的结果, 导致微生物多样性的降低<sup>[22]</sup>。Rabary 等<sup>[23]</sup> 也得出的类似结论, 他们认为 MFC 对微生物有强烈的选择作用, 适应 MFC 环境的微生物能够在电极上大量富集, 进而影响 MFC 的产电性能, MFC 产电与微生物富集生长之间存在相互促进的关系。

高通量测序获得的微生物群落组成如图 6。由图可知, 好氧污泥、混合污泥以及 MFC 运行稳定后的微生物群落组成类似, 而厌氧污泥微生物群落组成相对单一, 这进一步验证了 DGGE 的分析结果。在厌氧污泥中, 优势的微生物类群为:  $\delta$ -变形菌纲 (Deltaproteobacteria) 占 30.40%,  $\gamma$ -变形菌纲 (Gammaproteobacteria) 占 29.50%, 厚壁菌门 (Firmicutes) 占 19.60%, 三者合计占整个群落的 80%, 具有绝对优势, 同时也说明厌氧污泥中微生物多样性非常单一; 而好氧污泥、混合污泥以及 MFC 运行稳定后的微生物群落多样性明显较高, 其中 MFC 运行稳定后的微生物群落中占优势的类群 (丰度 > 2%) 依次为  $\beta$ -变形菌纲 (Betaproteobacteria) 24.90%, 拟杆菌门 (Bacteroidetes) 21.30%, 厚壁菌门 (Firmicutes) 9.70%,  $\gamma$ -变形菌纲 (Gammaproteobacteria) 8.50%,  $\delta$ -变形菌纲 (Deltaproteobacteria) 7.90%, 绿弯菌门 (Chloroflexi) 4.20% 以及  $\alpha$ -变形菌纲 (Alphaproteobacteria) 3.60%。

进一步分析混合污泥 (Yc1) 和 MFC 启动后运行稳定的阳极生物膜 (Yc3) 微生物群落在属级水平

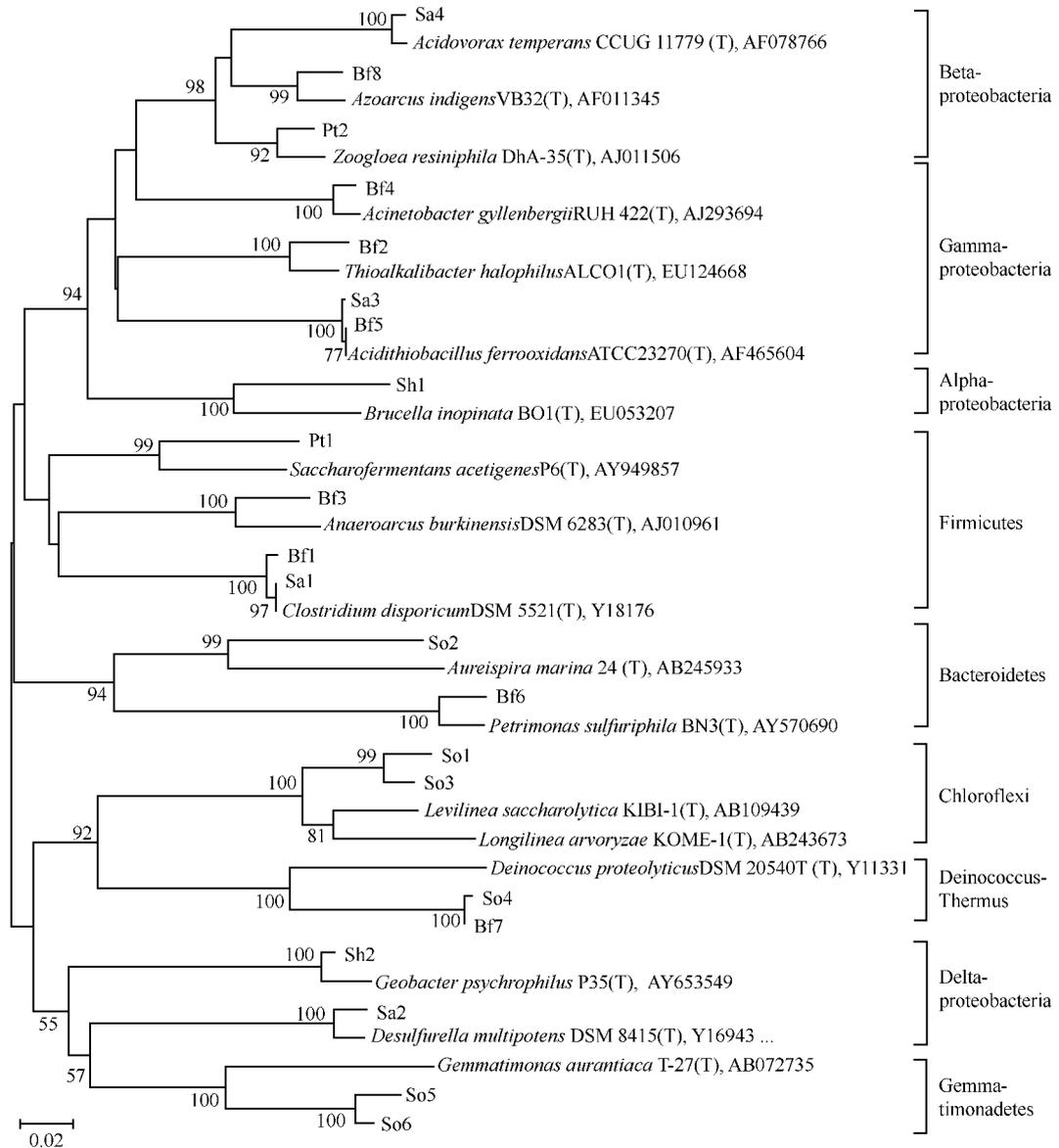


图 4. 污泥样品和 MFC 阳极生物膜中部分优势菌群系统发育树

Figure 4. Phylogenetic tree based on bacterial 16S rRNA gene sequences from DGGE profiles with the closest matches and representative sequences of the GenBank database. The tree was generated using the neighbor-joining method with 1000 bootstrap replicates. The numbers on the branches are their bootstrap values, bootstrap values lower than 50% are not shown. The scale under the picture is the divergence distance (2%).

丰度的差异(表 1),表明在丰度  $\geq 0.2\%$  的 24 个属中,丰度下降的属仅有 5 个。其中硝化螺菌属丰度由初始污泥中的 14.60% 下降至 1.60%。硝化螺菌属是重要的硝化细菌类群,在废水处理过程中广泛存在,它可在好氧状态下以丙酮酸为碳源完成硝化过程<sup>[24]</sup>,或通过固定  $\text{CO}_2$  营自营养生长,溶解氧浓度对这类微生物具有重要影响,在初始污泥中的高丰度,表明水处理厂的曝气池中硝化过程活跃。硝化细菌的这种变化特征,是由于外界环境由好氧曝气

状态转为 MFC 厌氧状态导致的。脱氯单胞菌属 (*Dechloromonas*) 序列丰度由 1.70% 下降至 1.30%,变化较小。脱氯单胞菌属中某些菌种能够高效还原氯酸盐和硝酸盐,是重要的反硝化聚磷菌<sup>[25]</sup>。

丰度上升的主要是厌氧发酵、硫酸盐还原、反硝化等细菌,其中拟杆菌门 (Bacteroidetes)、厚壁菌门 (Firmicutes)、 $\beta$ - $\gamma$ - $\delta$ -变形杆菌纲中的微生物丰度逐渐增加,其变化结果与厌氧污泥组成逐渐接近,表明随着环境厌氧程度的增强,系统厌氧代谢功能逐

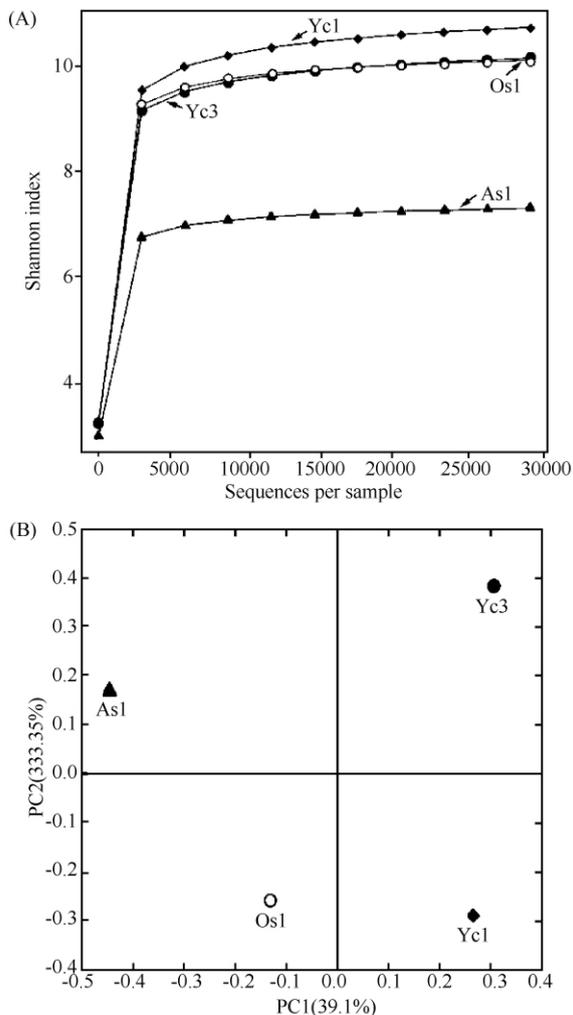


图 5. 微生物群落 Shannon 多样性指数 (A) 及群落组成主成分分析 (B)

Figure 5. Shannon diverse index (A) and principle component analysis for the bacterial populations (B) based the bacterial community 16S rDNA sequences. Os1, aerobic activated sludge; As1, anaerobic sludge; Yc1, mixture of aerobic and anaerobic sludges; Yc3, anodic biofilm of steady-running MFC.

渐显现。随着 MFC 生物膜驯化的进行,  $\delta$ -变形杆菌纲中地杆菌属 (*Geobacter*) 丰度显著增加, 由种泥中的 0.60% 上升至阳极生物膜中的 2.60%, 该属微生物同样也在 DGGE 监测到。地杆菌属微生物通常在厌氧条件下, 通过氧化有机物还原三价铁或四价锰, 同时在芳香烃的厌氧氧化中也具有重要作用, 被认为是目前有机废物和水体环境产电的主要菌群, 比其它微生物可产生更多的电能<sup>[26]</sup>。本属中的硫还原地杆菌 (*G. sulfurreducens*) 可以直接通过外膜或细胞色素与电极接触, 将电子传递给电极; 也能够

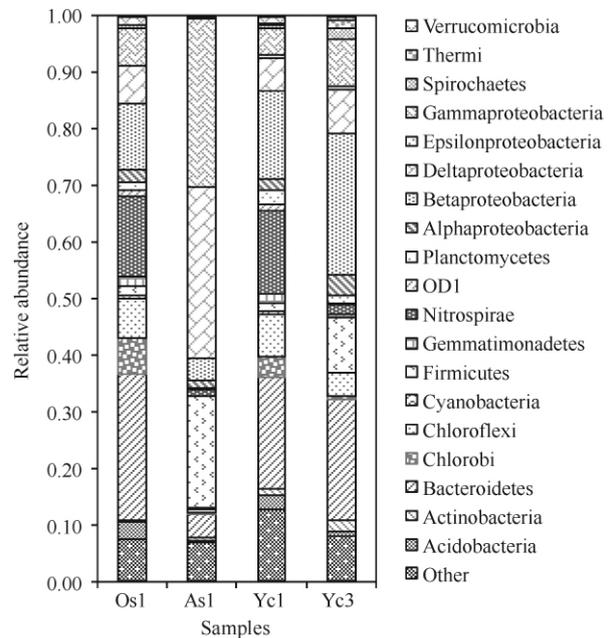


图 6. 微生物群落的种类组成及相对丰度

Figure 6. Composition and relative abundance of bacterial communities based 16S rDNA sequences. Os1, aerobic activated sludge; As1, anaerobic sludge; Yc1, mixture of aerobic and anaerobic sludges; Yc3, anodic biofilm of steady-running MFC.

通过纳米导线 (菌毛) 传递电子; 地杆菌属微生物的数量和活性与 MFC 的产电性能具有显著正相关性<sup>[27]</sup>。可见, 本研究中, 产电能力和效率的提高与地杆菌属丰度的提高是密不可分的。

$\delta$ -变形杆菌纲中其它菌属, 如 *Desulfobulbus*, *Desulfomicrobium* 和 *Desulfovibrio*, 主要为厌氧条件下的硫酸盐还原微生物, 能够在氧化有机物过程中将硫酸盐还原为硫化物, 有些菌株在 MFC 阳极生物膜中也表现出电极活性<sup>[8]</sup>。调查还发现,  $\beta$  变形菌纲中动胶菌属 (*Zoogloea*) 序列丰度由原来的 0.40% 上升至 5.0%, 研究表明, 该菌属在生物膜形成与维持中具有重要作用, 这类微生物的大量存在表明生物膜的稳定性<sup>[28]</sup>。与生物膜形成直接相关的还有  $\gamma$ -变形杆菌纲中不动杆菌属 (*Acinetobacter*), 其丰度由 0.20% 升至 3.90%, 它们的大量存在有利于生物膜的形成和稳定, 在医学中作为生物感染、生物膜形成的先锋菌群<sup>[29]</sup>。

总之, MFC 生物膜在驯化过程中对污泥中的微生物进行淘汰和选择, 最终驯化形成了有利于 MFC 生物膜形成与稳定、有机物厌氧发酵与产电的微生物菌群。

表 1. 污泥中微生物种群(属水平)在 MFC 启动前后丰度的变化(%)

Table 1. Changes in abundance of the bacterial genera before and after MFC starting up

No.	affiliation	genus	seed sludge	biofilm
1	Bacteroidetes	<i>Parabacteroides</i>	0.00	0.70
2	Bacteroidetes	<i>Flavobacterium</i>	0.10	0.30
3	Bacteroidetes	<i>Gelidibacter</i>	0.00	0.50
4	Firmicutes	<i>Clostridium</i>	0.20	1.30
5	Firmicutes	<i>Fusibacter</i>	0.00	0.50
6	Firmicutes	<i>Anaeromusa</i>	0.00	3.30
7	Nitrospirae	<i>Nitrospira</i>	14.60	1.60
8	Betaproteobacteria	<i>Thiobacillus</i>	0.10	1.40
9	Betaproteobacteria	<i>Dechloromonas</i>	1.70	1.30
10	Betaproteobacteria	<i>Thauera</i>	0.30	1.20
11	Betaproteobacteria	<i>Zoogloea</i>	0.40	5.20
12	Deltaproteobacteria	<i>Bdellovibrio</i>	0.60	0.10
13	Deltaproteobacteria	<i>Desulfobulbus</i>	0.10	1.50
14	Deltaproteobacteria	<i>Desulfomicrobium</i>	0.10	0.40
15	Deltaproteobacteria	<i>Desulfovibrio</i>	0.00	0.40
16	Deltaproteobacteria	<i>Geobacter</i>	0.60	2.60
17	Deltaproteobacteria	<i>Anaeromyxobacter</i>	0.30	0.00
18	Gammaproteobacteria	<i>Halothiobacillus</i>	0.00	0.80
19	Gammaproteobacteria	<i>Acinetobacter</i>	0.20	3.90
20	Gammaproteobacteria	<i>Dokdonella</i>	0.40	0.10
21	Spirochaetes	<i>Sphaerochaeta</i>	0.00	0.90
22	Spirochaetes	<i>Treponema</i>	0.20	0.30
23	Thermi	<i>Deinococcus</i>	0.10	1.30

### 3 结论

本研究探讨了有氧-厌氧混合污泥启动 MFC 产电效能以及 MFC 对微生物群落的选择作用。研究表明,以有氧-厌氧混合污泥为种泥,可以较快启动 MFC,并获得较高的功率密度。MFC 在 3 个周期启动成功,最高输出电压 230 mV,最大功率密度 11.15 W/m<sup>3</sup>,电池运行稳定;混合污泥启动 MFC 以后,阳极生物膜微生物群落结构与种泥表现较大差异,多样性降低,群落结构中占优势种群(条带)均为非经典产电微生物,在 MFC 启动后阳极生物膜微生物群落结构稳定;有氧-厌氧混合污泥最终驯化形成了有利于 MFC 生物膜形成与稳定、有机物厌氧发酵与产电的微生物菌群,其中有利于生物膜形成与稳定的动胶菌属(*Zoogloea*)和不动杆菌属(*Acinetobacter*)以及与 MFC 产电能力直接相关的地杆菌属(*Geobacter*)富集并成为优势菌属。

### 参考文献

- [1] Logan BE, Hamelers B, Rozendal R, Schröder U, Keller J, Freguia S, Aelterman P, Verstraete W, Rabaey K. Microbial fuel cells: methodology and technology. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40 (17): 5181-5192.
- [2] Du Z, Li H, Gu T. A state of the art review on microbial fuel cells: a promising technology for wastewater treatment and bioenergy. *Biotechnology Advances*, 2007, 25 (5): 464-482.
- [3] Lobato J, Canizares P, Fernandez FJ, Rodrigo MA. An evaluation of aerobic and anaerobic sludges as start-up material for microbial fuel cell systems. *New Biotechnology*, 2012, 29(3): 415-420.
- [4] Quan XC, Quan YP, Tao K, Jiang XM. Comparative investigation on microbial community and electricity generation in aerobic and anaerobic enriched MFCs. *Bioresource Technology*, 2013, 128: 259-265.
- [5] Xiao B, Yang F, Liu J. Enhancing simultaneous electricity production and reduction of sewage sludge in two-chamber MFC by aerobic sludge digestion and sludge pretreatments. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 189 (1-2): 444-449.
- [6] Muyzer G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*,

- 1999, 2(3): 317-322.
- [7] Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1998, 73(1): 127-141.
- [8] Rubaba O, Araki Y, Yamamoto S, Suzuki K, Sakamoto H, Matsuda A, Futamata H. Electricity producing property and bacterial community structure in microbial fuel cell equipped with membrane electrode assembly. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2013, 116(1): 106-113.
- [9] Metzker ML. Sequencing technologies—the next generation. *Nature Reviews Genetics*, 2010, 11(1): 31-46.
- [10] Cheng S, Liu H, Logan BE. Increased performance of single-chamber microbial fuel cells using an improved cathode structure. *Electrochemistry Communications*, 2006, 8(3): 489-494.
- [11] Wu D, Xing D, Lu L, Wei M, Liu B, Ren N. Ferric iron enhances electricity generation by *Shewanella oneidensis* MR-1 in MFCs. *Bioresource Technology*, 2013, 135: 630-634.
- [12] Liu R, Zhao YG, Lu SS, Huang Q. Electricity generation from lactate using microbial fuel cell and the distribution characteristics of anode microbial community. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(6): 744-752. (in Chinese)  
刘茹, 赵阳国, 卢珊珊, 黄庆. 微生物燃料电池利用乳酸产电性能与微生物群落分布特征. *微生物学报*, 2012, 52(6): 744-752.
- [13] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [14] Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 2010, 464(7285): 59-65.
- [15] Rodrigo M, Canizares P, Lobato J, Paz R, Sáez C, Linares J. Production of electricity from the treatment of urban waste water using a microbial fuel cell. *Journal of Power Sources*, 2007, 169(1): 198-204.
- [16] Logan BE, Regan JM. Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells. *Trends in Microbiology*, 2006, 14(12): 512-518.
- [17] Chae KJ, Choi MJ, Lee JW, Kim KY, Kim IS. Effect of different substrates on the performance, bacterial diversity, and bacterial viability in microbial fuel cells. *Bioresource Technology*, 2009, 100(14): 3518-3525.
- [18] Kristensen E, Ahmed SI, Devol AH. Aerobic and anaerobic decomposition of organic matter in marine sediment: which is fastest? *Limnology and Oceanography*, 1995, 40(8): 1430-1437.
- [19] Buckley D, Schmidt T. The structure of microbial communities in soil and the lasting impact of cultivation. *Microbial Ecology*, 2001, 42(1): 11-21.
- [20] Nevin KP, Holmes DE, Woodard TL, Hinlein ES, Ostendorf DW, Lovley DR. *Geobacter bemiidjensis* sp. nov. and *Geobacter psychrophilus* sp. nov., two novel Fe(III)-reducing subsurface isolates. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(4): 1667-1674.
- [21] Ter Heijne A, Hamelers HV, Buisman CJ. Microbial fuel cell operation with continuous biological ferrous iron oxidation of the catholyte. *Environmental Science & Technology*, 2007, 41(11): 4130-4134.
- [22] Zhao Y, Ren N, Wang A. Contributions of fermentative acidogenic bacteria and sulfate-reducing bacteria to lactate degradation and sulfate reduction. *Chemosphere*, 2008, 72(2): 233-242.
- [23] Rabaey K, Boon N, Siciliano SD, Verhaege M, Verstraete W. Biofuel cells select for microbial consortia that self-mediate electron transfer. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(9): 5373-5382.
- [24] Daims H, Nielsen JL, Nielsen PH, Schleifer KH, Wagner M. In situ characterization of Nitrospira-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(11): 5273-5284.
- [25] Achenbach LA, Michaelidou U, Bruce RA, Fryman J, Coates JD. *Dechloromonas agitata* gen. nov., sp. nov. and *Dechlorosoma suillum* gen. nov., sp. nov., two novel environmentally dominant (per) chlorate-reducing bacteria and their phylogenetic position. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, 51(Pt 2): 527-533.
- [26] Lovley DR, Ueki T, Zhang T, Malvankar NS, Shrestha PM, Flanagan KA, Aklujkar M, Butler JE, Giloteaux L, Rotaru AE, Holmes DE, Franks AE, Orellana R, Risso C, Nevin KP. *Geobacter*: the microbe electric's physiology, ecology, and practical applications. *Advances*

in *Microbial Physiology*, 2011, 59: 1-100.

- [27] Dunaj SJ, Vallino JJ, Hines ME, Gay M, Kobyljanec C, Rooney-Varga JN. Relationships between soil organic matter, nutrients, bacterial community structure, and the performance of microbial fuel cells. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46 (3) : 1914-1922.
- [28] Dugan PR, Stoner DL, Pickrum HM. The genus

*Zoogloeain*: The prokaryotes. Springer, 1992: 3952-3964.

- [29] Tomaras AP, Dorsey CW, Edelman RE, Actis LA. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology*, 2003, 149 (12) : 3473-3484

# Electricity generation and dynamics characteristics of microbial community of microbial fuel cells started up with mixture of aerobic/anaerobic sludge

Yalin Yin<sup>1</sup>, Chongyang Gao<sup>2</sup>, Yangguo Zhao<sup>1,3\*</sup>, Aijie Wang<sup>2</sup>, Min Wang<sup>1</sup>, Kaili Yan<sup>1</sup>

<sup>1</sup> College of Environmental Science, Ocean University of China, Qingdao 266100, Shandong Province, China

<sup>2</sup> School of Environmental and Municipal Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, Heilongjiang Province, China

<sup>3</sup> Key Laboratory of Marine Environment and Ecology, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266100, Shandong Province, China

**Abstract:** [Objective] To explore electricity generation and dynamic characteristics of microbial community of microbial fuel cells (MFC) started-up with mixed sludge of aerobic/anaerobic sludge. [Methods] single-chamber MFCs were constructed and characteristics of microbial community composition and structure were investigated by culture-independent microbial molecular techniques. [Results] MFC started up successfully after three cycles' operation, and the maximum output voltage was up to 230 mV. The maximum power density reached 11.15 W/m<sup>3</sup> at the outer resistance of 1656 Ω. The structure of microbial community on the anodic biofilm was different from that of seed sludge and microbial diversity reduced. The dominant microbial groups on anodic biofilm were Betaproteobacteria (24.90%), Bacteroidetes (21.30%), Firmicutes (9.70%), Gammaproteobacteria (8.50%), Deltaproteobacteria (7.90%), Chloroflexi (4.20%) and Alphaproteobacteria (3.60%). The biofilm-forming microbial genera *Zoogloea* and *Acinetobacter* accounted for 5.00% and 3.90% of total community. The abundance of electricity-producing bacteria *Geobacter* spp. increased from 0.60% in mixed sludge to 2.60% on the biofilm. [Conclusion] Dominant microbial populations in mixed sludge were selected by long-term acclimation and finally a beneficial microbial group was built on the anodic biofilm. The populations group was helpful to form a functional and active biofilm, which consequently benefited to produce electricity under anaerobic condition by fermenting organic matter.

**Keywords:** microbial fuel cell, mixed sludge, denaturing gradient gel electrophoresis, high throughput sequencing, microbial community

(本文责编: 张晓丽)

Supported by Scientific Research Foundation for the Excellent Middle-Aged and Youth Scientists of Shandong Province of China (BS2011NJ018), National Natural Science Foundation of China (40801193) and by the Undergraduate Research Program of Ocean University of China (1312011006)

\* Corresponding author. Tel: +86-532-66786568; E-mail: ygzhao@ouc.edu.cn

Received: 17 March 2014/ Revised: 13 June 2014