

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55(11):1495-1504; 4 November 2015
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20150106

微生物燃料电池阳极微生物群落对乳酸-丙酸-乳酸底物转换的响应特征

高崇洋¹, 吴唯民², 赵艳辉³, 王爱杰^{1*}, 任南琪¹, 王敏³, 赵阳国³

¹ 哈尔滨工业大学, 市政环境工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150090

² 斯坦福大学, 市政环境工程系, Stanford, CA 94305-4020, USA

³ 中国海洋大学, 环境科学与工程学院, 山东 青岛 266100

摘要:【目的】为探讨底物波动对微生物燃料电池(MFC)产电效能和阳极微生物群落的影响,【方法】依次以乳酸-丙酸-乳酸为底物,应用不依赖于培养的微生物分子生态学技术,解析单室MFC启动及底物替换过程中阳极微生物群落的动态学响应特征。【结果】底物的更换过程降低了MFC的产电效能,当改变为新底物后,MFC需要较长的产电恢复期。同时,底物的转换改变了阳极微生物群落结构,*Anaeromusa* spp.、*Pseudomonas* spp. 以及 *Thiobacillus thioparus* 对乳酸底物具有很好的响应,随着乳酸底物的投加而富集;丙酸底物对 *Dechloromonas* spp. 和 *Comamonas testosteroni* 等类群表现出较强的选择作用;而产电微生物 *Geobacter* spp. 由于利用乳酸、丙酸的共同代谢产物乙酸为底物而被逐渐富集,是多种底物替换过程的重叠种群。【结论】本研究表明,MFC的阳极微生物群落组成与投加的底物有较强的对应性,为了减缓底物波动对MFC产电过程的影响,应尽量采用混合有机底物,以提供宽泛的营养生态位,提高种群的功能重叠性。

关键词:底物替换,种群重叠,微生物燃料电池,变性梯度凝胶电泳,高通量测序

中图分类号:X703,Q938 **文章编号:**0001-6209(2015)11-1495-10

微生物燃料电池(Microbial Fuel Cell, MFC)是一种特殊的污水生物处理工艺形式,主要利用微生物的催化活性,在厌氧或缺氧条件下,在降解有机污染物的同时,将部分电子通过外电路进行传递,进而产生电能^[1]。作为一种新型的生物能利用、污染物去除形式,MFC因其无污染、可产电能的特点,目前在其理论研究和工艺开发中受到广泛的关注。

MFC阳极生物膜中富集的产电微生物群落具有很大的多样性,其种群不仅有经典的电化活性

细菌,如 *Geobacter* 属微生物,还包括 α -、 β -、 γ -、 δ -变形细菌纲(Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta-Proteobacteria),厚壁菌门(Firmicutes),放线菌门(Actinobacteria)以及酸杆菌门(Acidobacteria)中的多种细菌^[2]。现已发现,绝大多数产电微生物对系统的操作条件都是极为敏感的,外部环境的改变往往引起微生物群落结构、组成和丰度的很大变化^[3],这种变化会进一步影响到MFC运行效率。如果MFC用作生产装置,由于自然或人为因素的影

基金项目:国家自然科学基金(40801193)

* 通信作者。Tel: +86-451-86282195; E-mail: waj0578@hit.edu.cn

作者简介:高崇洋(1979-),女,黑龙江省双城市人,博士研究生,主要从事废水处理资源化研究。E-mail: cygao@ouc.edu.cn

收稿日期:2015-03-11;修回日期:2015-04-17

响,污水处理厂或工业生产的实际废水成分会一直处于波动中,这种底物条件的变化可能会改变 MFC 阳极微生物群落,从而影响到 MFC 的正常运行。因此,探讨废水成分的变化对 MFC 运行效率以及阳极功能微生物群落的影响具有重要的实际意义。

有研究表明,MFC 底物碳源的变化能够改变微生物群落的图谱结构并进一步影响 MFC 的运行效率^[4-5]。Chae 等^[4]发现以葡萄糖为底物的 MFC 具有很高的微生物群落多样性,当底物更换为其它底物时能够迅速适应产电,几乎没有迟滞时间出现。Zhang 等^[5]也得到了类似的结果。他们发现,当乙酸底物更换为葡萄糖时,MFC 需要很长的适应期,但如果把葡萄糖底物更换为乙酸或丁酸时,MFC 能快速产电。我们需要清楚的是,这些反应器运行效率的改变是由于底物的替换导致微生物群落发生变化而导致的,阳极微生物群落对底物的响应是决定反应器效率的关键。因此,在实际废水处理中,由于 MFC 阳极微生物群落的重要性,特异的微生物群落图谱是我们需要参考的重要依据之一^[6]。而且,微生物群落对进水碳源改变的响应特征也能够帮助我们更好的运行和操控废水处理 MFC。

本研究以发酵工业废水中常见的三碳有机酸,即乳酸和丙酸为底物,探讨底物的波动,即由乳酸转换为结构相似的丙酸,再恢复为乳酸的过程对 MFC 效能的影响;同时,应用变性梯度凝胶电泳技术(DGGE)和高通量测序技术对 MFC 阳极生物膜内的微生物群落响应特征进行解析,以期为废水的 MFC 处理产电提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验装置:采用单室空气阴极 MFC,主体由有机玻璃构成,内部为圆柱体结构,有效容积 28 mL。阳极为碳刷,阴极按照 Cheng 等^[7]的方法制作碳布。正常产电情况下,外电阻 1000 Ω ,用钛丝作为连接导线,用环氧树脂密封隔水。

1.1.2 阳极模拟废水组成:基本成分(L):0.31 g/L NH_4Cl ,0.13 g/L KCl ,2 mL/L 微量元素,100 mL 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.4),0.2 mL/L 维生素溶液,0.2 mL/L 氨基酸溶液^[8]。除基本成分外,根据试验需要添加 500 mg/L COD 的乳酸钠或丙酸钠

为底物。

1.1.3 种泥:接种污泥取自青岛市李村河污水处理厂的好氧曝气池,在无氧条件下密闭处理约一周,以富集兼性厌氧微生物用于接种。

1.1.4 主要试剂和仪器:土壤 DNA 提取试剂盒(Mobio,美国),Ex Taq DNA 聚合酶、dNTPs、pMD19-T 载体(TaKaRa,大连),PCR 产物回收试剂盒(Macherey-Nagel,德国);数据采集卡(PISO-813 型,泓格,台湾),电泳系统 Power Pac1000(Bio-Rad,美国),PCR 仪(9700 型,Applied Biosystems,美国),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)。

1.1.5 引物:细菌群落 DGGE 分析引物为 BA101F:5'-TGGCGGACGGGTGAGTAA-3' 和 BA534R:5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3',对应于 *E. coli* 16S rRNA 基因的 101-534 bp;其中引物 BA101F 的 5'端带有 GC 夹,所有引物购自哈尔滨博仕生物。

1.2 MFC 的启动与运行

MFC 反应器的启动与运行采用批式培养方式,在 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下启动和运行。反应器启动成功后,当电压低于 10 mV 时即更换新的模拟废水,两次更新模拟废水之间的运行过程,计为一个周期。MFC 试验共分 3 个阶段:(1)阶段 1,MFC 反应器以乳酸为底物启动。取 10 mL 污泥置于单室 MFC 反应器中,加满 500 mg/L COD 的乳酸模拟废水,每 48 h 换水 1 次,静置以使 MFC 阳极挂膜并富集产电微生物,直至反应器电压输出稳定达 2 个周期以上;(2)阶段 2,将模拟废水的底物乳酸更换为 500 mg/L COD 的丙酸模拟废水。更换后,MFC 反应器稳定运行 2 个周期以上;(3)阶段 3,MFC 的底物恢复为乳酸,反应器稳定运行 2 个周期以上。各个阶段稳定运行时,分别取 MFC 阳极生物膜样品,提取总 DNA 用于微生物群落 PCR-DGGE 和高通量测序分析。

1.3 监测分析

1.3.1 化学指标监测:对于模拟废水中 COD 测试,在反应器运行的 3 个阶段中,各选择一个周期,每间隔一定时间获取 MFC 阳极室溶液,采用重铬酸钾氧化法进行 COD 检测。

1.3.2 电化学监测:(1)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: $I = U/R$, R 为外电阻。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 $q = P/V$ 。(2)极化曲线通过电化学工作站依次改变外电阻,记录每个阻值对应的电压,并计算出电流值。绘制功率密度 q 随电流密度 j 变化的曲线。(3)库伦效率(CE): $CE = (QEX/QTH) \times 100\%$,式中 QEX 为实际通过外电路的电量(C); QTH 为氧化有机物后产生的理论电量(C)。

1.4 微生物群落分析

采用土壤 DNA 提取试剂盒提取生物膜样品的总 DNA。对于微生物群落的结构分析,以总 DNA 为模板,根据文献[9],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。DGGE 图谱中条带回收后,委托南京金斯瑞生物技术有限公司进行测序。数据采用 RDP 数据库 (<http://rdp.cme.msu.edu/>) 中的 SeqMatch 程序检索并下载相似典型菌株序列,以 MEGA 4.0^[10] 构建系统发育树。测序获得的条带已经递交至 GenBank,登录号为 KP274081 - KP274099。

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,对细菌 16S rDNA V4 区进行测序,委托北京诺禾致源公司完成。参考文献[11]的方法,对测得的序列筛选后,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 程序进行分类,按文献[11]对微生物群落的 Shannon 多样性指数、种类组成、相对丰度等

进行分析。获得的 16S rDNA 高通量测序结果已经提交至 MG-RAST 数据库,登录号 4614370.3 - 4614372.3。

2 结果和分析

2.1 MFC 的启动与运行

以乳酸为底物成功启动 MFC 后,将底物更换为相同浓度 COD 的丙酸,待 MFC 运行稳定后,又更换为乳酸,以上 3 个阶段的电压变化曲线、最大功率密度如图 1。以乳酸为底物启动 MFC(即阶段 1),反应器经过约 260 h 后,最高电压达到 220 mV,后续循环中最高电压不再上升,MFC 启动成功。此时 MFC 最大功率密度为 1.85 W/m^3 ,相应内阻为 21Ω 。当反应器中底物由乳酸更换为丙酸后(即阶段 2),MFC 有了明显的响应,电压迅速上升至 150 mV,然后缓慢下降,约 200 h 后开始快速下降,整个过程持续 300 h。在后续以丙酸为底物的运行周期中,持续时间与乳酸接近,约 80 h。在该阶段,最高电压为 180 mV,功率密度也下降至 1.65 W/m^3 ,MFC 的内阻有所升高。在 MFC 阶段 3,底物又重新更换为相同浓度的乳酸,观察到与第二阶段开始时类似的现象,即在第一个周期内,电压迅速上升至 150 mV 后,然后缓慢下降,整个下降时间持续了 240 h,后续周期约 80 h。在该阶段,最高电压为 150 mV,最大功率密度又有所下降,为 1.62 W/m^3 。

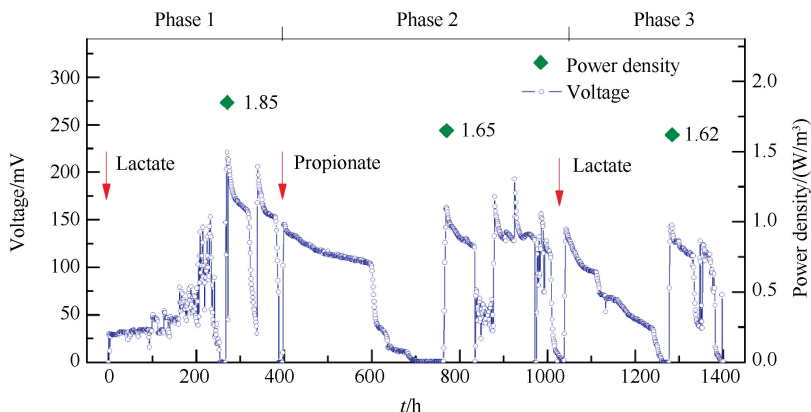


图 1. MFC 反应器电压随底物变化趋势

Figure 1. Voltage profiles of MFCs when substrates changed. Phase 1: MFC starting up with lactate; Phase 2: Substrate lactate changed to propionate; Phase 3: Substrate changed to lactate.

对每个阶段,我们选择代表性的第二个周期,监测了一个周期内 COD 的去除率变化(图 2)。结果

发现,在第一阶段中 COD 去除速度快而且较彻底,将近 70% 的乳酸(330 mg/L)是在最初的 9 h 内去

除的。反应器在 24 h 内将 COD 浓度降至 70 mg/L, COD 去除效率达到 86%。计算发现,反应器的库仑效率 (Columbia efficiency) 约为 9%。与之相比,在第二阶段中,丙酸去除较慢,48 h 去除率为 73%;而第三阶段时,反应器需要 70 h 才可将 COD 去除 78%。且相比前两阶段,库仑效率更有所下降。

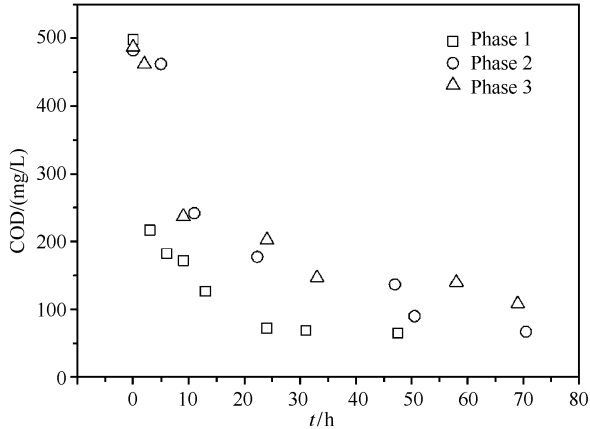


图 2. MFC 在不同运行阶段中 COD 去除效率

Figure 2. COD removal efficiencies of MFCs in different phases.

2.2 阳极微生物群落的 DGGE 分析

采用 DGGE 技术对底物更换后的阳极微生物群落结构进行分析,结果如图 3。对 DGGE 图谱中部分优势条带进行克隆和测序,序列与 RDP 中的相似序列一起构建系统发育树,结果如图 4。

通过对 DGGE 图谱的多样性分析,发现以乳酸为底物时的微生物群落多样性比丙酸底物时要稍高。第一阶段阳极微生物群落的多样性指数为 2.23,第二阶段以丙酸为底物的群落多样性指数下降为 1.97,群落结构与改变前的第一阶段相似性为 75%。当底物恢复为乳酸后,群落多样性指数又上升为 2.54,群落结构与第一阶段群落相似性达到 95%以上。在底物更换过程中,许多新的条带出现或富集(如条带 3 和 6),而有些条带却逐渐消失(如条带 4)。其中,由于底物更换为丙酸而富集的条带 3 其序列为 *Comamonas testosteroni* (T) (GenBank 登录号: M11224) (相似性 99%),条带 6 的序列与 *Quatrionicoccus australiensis* (T) (AY007722) 相似性较高;逐渐消失的条带 4 与 *Thiobacillus thioarvus* (T) (M79426) 具有较高的相似性(96%)。

2.3 MFC 阳极微生物群落的高通量测序分析

采用以 16S rDNA 为基础的高通量测序技术对阳极微生物群落组成与丰度进行了分析(图 5),并

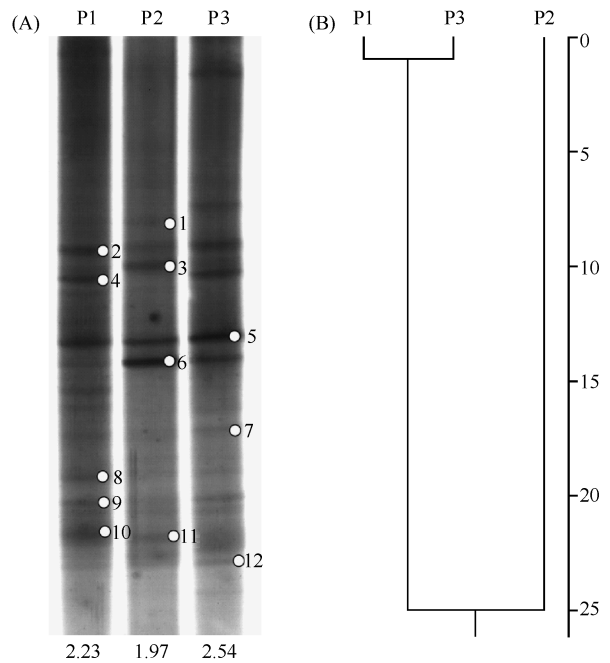


图 3. 不同阶段 MFC 阳极微生物群落 DGGE 图谱 (A) 及聚类分析 (B)

Figure 3. DGGE profile of anodic microbial communities in MFC with substrates changing (A) clustering analysis for DGGE profiles (B) P1, P2 and P3 refer to the three phases of MFC; numbers 1 to 12 in pattern A are the bands to be excised and sequenced, and the Shannon indices for communities are shown below; scale on the right of pattern B indicates the divergence distance (%).

对微生物群落的多样性以及演替方向进行了比较(图 6)。

根据对微生物群落的高通量分析,以乳酸为底物启动 MFC 后,MFC 阳极生物膜微生物群落丰度超过 10% 的类群依次分别为 Firmicutes (43.60%)、Gammaproteobacteria (21.60%) 和 Betaproteobacteria (10.10%);更换为丙酸后富集的新群落中优势的微生物类群分别是 Betaproteobacteria (45.90%), Alphaproteobacteria (占 11.60%), Deltaproteobacteria (11.30%);阶段 3 中的优势微生物与阶段 1 相似,优势类群依次为 Betaproteobacteria (26.20%), Firmicutes (17.80%), Gammaproteobacteria (11.80%), Deltaproteobacteria (11.90%),可见,以相同底物富集的 MFC,阳极微生物群落组成相近。由于底物均相对简单,微生物群落的系统分布范围较窄,优势类群局限于 Proteobacteria 门和 Firmicutes 门。

通过对微生物群落多样性分析,发现微生物群落的多样性指数随着反应器的运行和底物的更换,

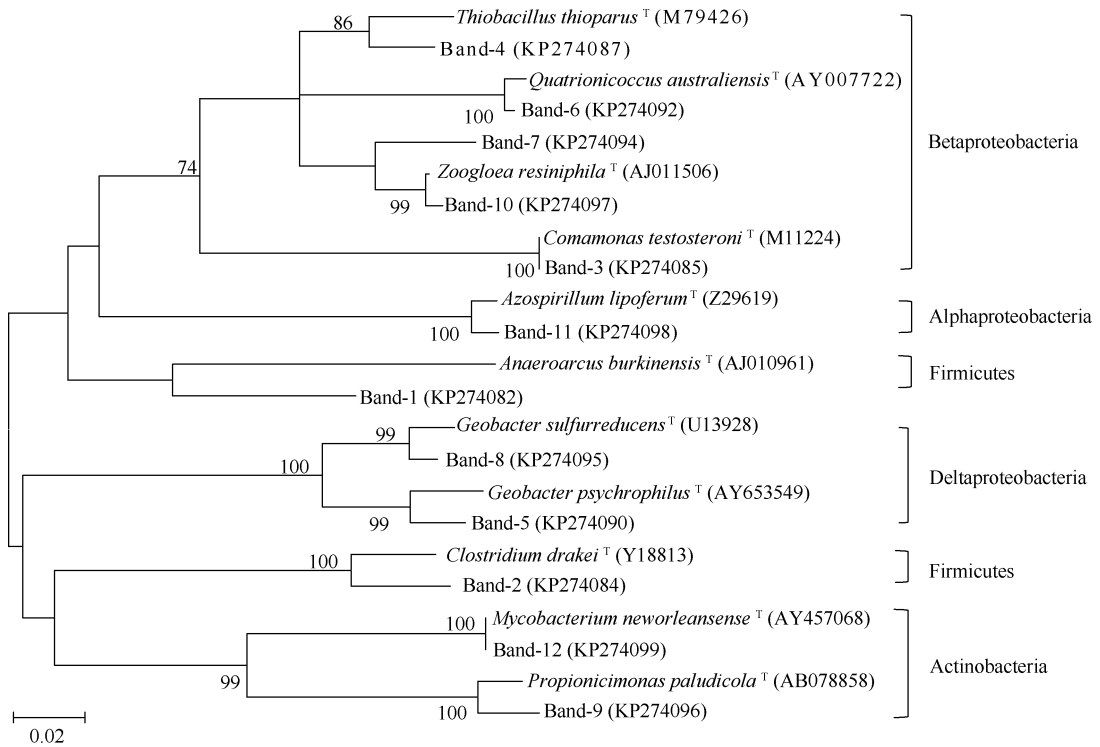


图 4. DGGE 图谱中优势条带序列与相似序列构建的系统发育树

Figure 4. Phylogenetic tree based on bacterial 16S rDNA sequences from DGGE profiles with the closest matches and representative sequences. Band 1 to 12 refer to the bands No. 1 to 12 in DGGE profiles Figure 3. Bacteria are typical bacterial strain sequences obtained from GenBank database. Numbers in parentheses are accession number in GenBank. 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 tree is the divergence distance (2%).

是持续上升的。最初以乳酸为底物富集的阳极微生物群落多样性最低, Shannon 指数为 4.26, 当丙酸替换乳酸后, Shannon 多样性指数上升为 5.0, 当再次以乳酸作为底物时, 阳极微生物群落的 Shannon 多样性指数进一步提升至 5.4。从主成分分析结果来看, 阶段 2 中的微生物群落沿 PC1 方向与阶段 1 具有较大的分离, 分离度达到 0.6; 而在阶段 3 中, 微生物群落则沿 PC1 方向折返, 与阶段 1 逐渐靠近, 分离度减小为 0.35。

3 讨论

3.1 底物变化对 MFC 运行效率的影响

在本研究中, MFC 的启动以及更换底物后, MFC 产电的恢复过程均需要较长的时间。这表明, 底物更换后, 其微生物的富集过程类似于启动过程, MFC 均需要重新建立新的微生物群落来利用新的底物^[5]。在实际废水处理中, 水质的波动是常见现

象, 许多学者观察到在水质波动过程中, MFC 需要较长的适应期, 如 Chae 等^[4] 和 Zhang 等^[5] 在将 MFC 中乙酸底物替换为葡萄糖后, 发现大约需要 3 d 左右的适应期, 在此期间电压较低, 类似于 MFC 的启动过程; 但将葡萄糖启动的 MFC, 底物更换为乙酸后, MFC 却能够快速适应产电, 这表明能够利用乙酸产电的微生物类群在葡萄糖启动的 MFC 中已经大量存在, 当更换为乙酸后, 相当于越过了葡萄糖发酵过程, 提供了更直接的产电底物^[4]。

在结构上, 丙酸与乳酸都是三个碳有机酸, 都含有羧基。然而, 乳酸更换为丙酸后, 反应器需要较长的时间才能够适应, 电压才能恢复到之前的状态。这是因为两者的厌氧降解途径巨大差异导致的^[12-13]。一般说来, 乳酸在厌氧条件下降解时, 首先被转化成丙酮酸, 丙酮酸再进一步降解成甲酸和乙酸^[13]; 然而, 丙酸则直接转化成乙酸和 CO₂^[12]。虽然二者厌氧降解均能够产生乙酸, 但由于代谢途径不同, 乳酸替换为丙酸后, 需要逐渐驯化阳极生物

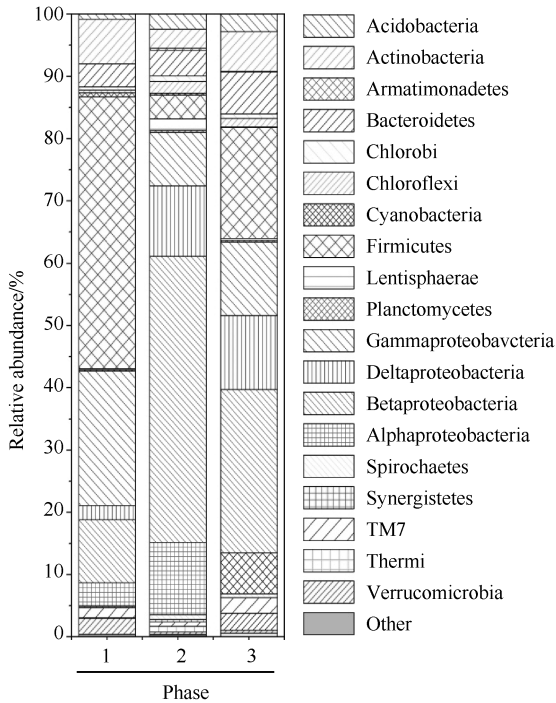


图 5. MFC 阳极微生物群落的组成与丰度

Figure 5. Composition and relative abundance of anodic microbial communities in MFCs.

膜,产生不同的微生物种群才能够降解丙酸。

乳酸和丙酸的厌氧降解都产生中间代谢产物乙酸,因此能够利用乙酸的微生物种群应该在阳极微生物群落中已经存在,两底物中能够利用乙酸的微生物存在重叠性。如果这种重叠性较大,反应器则不会由于富集新的微生物群落而出现较明显的停滞期。实际废水的成分比较复杂而且多变,需要多种的微生物类群相互作用才能完成降解过程,底物改

变而导致的阳极微生物群落变化及生态位空穴,可由其他功能相近的微生物类群进行补充^[14],从而缩短 MFC 的停滞期。当然,这也会由于发酵微生物的电子分流作用而导致库仑效率的降低^[15]。在本研究中,随着底物的更替,最高电压和最大功率密度持续下降,则极可能是由于微生物群落多样性持续上升、发酵微生物的贡献逐渐提高而产电微生物的作用相对下降导致的。

由此可见,底物改变对 MFC 运行效率的影响是显而易见的,针对新的底物,MFC 产电的恢复需要较长的适应期,而多样性较高的混合底物将会极大地缩短 MFC 的停滞时间。

3.2 微生物群落对底物变化的响应

从微生物群落多样性角度来看,底物更换提高了多样性(图 6-A)。而 DGGE 图谱显示丙酸底物降低了多样性,这可能是因为 DGGE 对微生物群落的多样性分析有限,某些丰度异常高的类群则会掩盖丰度较差类群的显示^[16],相比之下,高通量测序技术则可以获得较低丰度的微生物类群^[17],是对 DGGE 群落结构分析的有益补充。根据 DGGE 图谱及特异条带的测序分析,丙酸底物投加后引起 *Comamonas testosteroni* (条带 3) 的出现、*Quatrionicoccus australiensis* (条带 6) 的富集以及 *Thiobacillus thioparus* (条带 4) 的消亡。Juang 等^[18]研究发现,*C. testosteroni* 是一株具有较高产电能力的革兰氏阴性细菌,在许多 MFC 阳极生物膜中广泛存在,当将其纯菌接种到 MFC 反应器中以后,*C. testosteroni* 比其它革兰氏阴性细菌表现出更强的产电能力。因此,我们推断该菌株能在 MFC 阳极生物

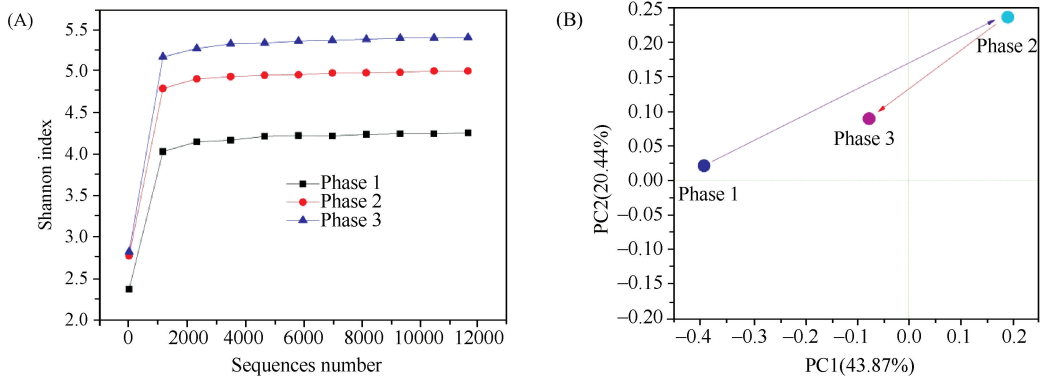


图 6. 微生物群落的多样性 (Shannon index) (A) 及主成分分析 (PCA) (B)

Figure 6. Shannon index (A) and principle component analysis (PCA) for the bacterial populations (B) based on the bacterial community 16S rDNA sequences.

膜中富集,能够促进 MFC 以丙酸为底物时的产电过程。*Q. australiensis* 是一株能够以丙酸为唯一碳源的革兰氏阴性好氧菌,与好氧活性污泥肿胀有关^[19]。该菌株的富集可能与 MFC 的阳室内存在氧气有关,它能够在好氧条件下降解利用丙酸,消除反应器的氧气,从而保证系统的缺氧特征,进而为其它厌氧微生物提供良好的生存环境^[20]。

Deltaproteobacteria 纲中 *Geobacter* 属的微生物是典型的产电微生物^[21]。它们能够在氧化有机物的同时,还原 Fe(III),从而占据厌氧微生物食物链中的特殊生态位,对 MFC 产电过程中具有重要意义。我们发现本研究中的条带 5 和 8 分别与 *Geobacter psychrophilus* P35 (T) (AY653549) 和 *Geobacter sulfurreducens* PCA(T) (U13928) 有较高的相似性。这些菌株是典型的铁还原菌,但在本研究的 MFC 中不存在 Fe(III),它们则可能通过氧化乙酸将电子传递到阳极获得能量^[22-23]。其实,在本研究中,无论其底物是乳酸还是丙酸,乙酸都是重要的中间产物^[12-13],因此,它们能够被乳酸底物富集,也能够被丙酸底物富集,并在 MFC 整个运行过程中一直存在,即使底物发生变化,对它们影响也较小(图 3)。这些微生物是 MFC 在不同底物时重叠的微生物种群,当底物发生变化时,底物代谢链中前端的微生物种群需要重新富集,而这些微生物则可保持相对稳定。在高通量测序结果中,我们在微生物属级水平上,比较了各个样品中微生物群落的组成和丰度(表 1),发现 *Geobacter* 属微生物被乳酸和丙酸逐渐富集,其丰度从阶段 1 的 1.62% 上升至阶段 2 中的 10.29% 以及阶段 3 中的 11.40%。由于 MFC 的功率密度与 *Geobacter* 属微生物的数量和丰度成正比^[24],因此这类微生物的高丰度对 MFC 的产电效率具有重要贡献,对 MFC 的成功启动和稳定运行具有重要作用。

根据表 1,我们发现被丙酸底物充分富集、而在乳酸底物丰度均较低的微生物还有 *Dechloromonas* (在丙酸底物下的丰度达到 22.46%)、*Novispirillum* (4.68%)、*Clostridium* (1.18%) 等。有研究表明,*Dechloromonas* 属中的有些种是重要的反硝化聚磷菌,它们能够在厌氧条件下完全降解芳香烃化合物产生二氧化碳;或者当硝酸盐存在时,将电子传递给硝酸盐^[25]。这类微生物在 MFC 阳极微生物群落中经常被检测到,而且一般丰度都很高,且能够以乙酸

和丙酸为唯一电子供体^[26],这意味着它们可能参与或协助 MFC 阳极的产电过程。

可见,底物的替换确实能够改变阳极微生物群落结构,*Dechloromonas* spp. 等表现出对丙酸底物的较强响应,而被进一步富集;产电微生物 *Geobacter* 属对 MFC 产电和稳定具有重要意义。

表 1. 底物发生改变时阳极微生物群落在属级水平的变化

Table 1. Changes in relative abundance of the bacterial genera with substrates switching

| Taxonomy | Abundance (above 0.1%) | | | |
|---------------------|-------------------------|--------|--------|--------|
| | Genus | Phase1 | Phase2 | Phase3 |
| Phylum or Class | | | | |
| Acidobacteria | <i>Geothrix</i> | 0.33 | 0.00 | 0.00 |
| Actinobacteria | <i>Gordonia</i> | 0.09 | 0.58 | 1.36 |
| | <i>Mycobacterium</i> | 0.19 | 0.67 | 1.13 |
| Firmicutes | <i>Propionimonas</i> | 0.03 | 0.21 | 0.44 |
| | <i>Lactobacillus</i> | 0.10 | 0.05 | 0.03 |
| | <i>Clostridium</i> | 0.14 | 1.18 | 0.69 |
| Alphaproteobacteria | <i>Anaeromusa</i> | 42.59 | 1.22 | 16.04 |
| | <i>Bosea</i> | 0.01 | 1.28 | 1.12 |
| | <i>Rhodoplanes</i> | 0.04 | 0.15 | 0.10 |
| | <i>Azospirillum</i> | 0.20 | 1.44 | 0.27 |
| | <i>Novispirillum</i> | 0.00 | 4.68 | 1.28 |
| Betaproteobacteria | <i>Kaistobacter</i> | 0.01 | 0.12 | 0.00 |
| | <i>Sphingomonas</i> | 0.02 | 0.07 | 0.34 |
| | <i>Thiobacillus</i> | 0.08 | 0.14 | 0.15 |
| | <i>Dechloromonas</i> | 3.30 | 22.46 | 6.26 |
| Deltaproteobacteria | <i>Zoogloea</i> | 0.39 | 0.26 | 0.23 |
| | <i>Desulfotribrio</i> | 0.17 | 0.46 | 0.21 |
| | <i>Geobacter</i> | 1.62 | 10.29 | 11.40 |
| Gammaproteobacteria | <i>Pseudomonas</i> | 4.16 | 0.15 | 0.42 |
| | <i>Halomonas</i> | 0.15 | 1.56 | 1.58 |
| | <i>Acinetobacter</i> | 4.36 | 0.46 | 1.54 |
| | <i>Pseudomonas</i> | 10.92 | 4.71 | 5.53 |
| | <i>Dokdonella</i> | 0.24 | 0.67 | 1.44 |
| | <i>Stenotrophomonas</i> | 0.13 | 0.23 | 0.26 |
| Spirochaetes | <i>Treponema</i> | 0.02 | 0.82 | 0.62 |
| Thermi | <i>Deinococcus</i> | 0.09 | 0.88 | 2.69 |
| Verrucomicrobia | <i>Rubritalea</i> | 2.36 | 0.11 | 0.17 |

3.3 微生物群落恢复的可能性

当外界的环境又恢复到初始状态后,微生物群落能否随之恢复到原来的状态是当前人们非常关切的生态学问题。根据图 3 和图 6,当底物又重新更换为乳酸后,MFC 阳极生物膜样品中的微生物群落与最初的以乳酸为底物的微生物群落相似性达到 95% 以上,微生物群落的发展方向出现了折返的现象,即微生物群落有向原来微生物群落组成结构发展的趋势。

在 DGGE 图谱中,条带 4 表现为依赖乳酸底物,

它 2 次被乳酸底物富集。该条带最相似序列为 *Thiobacillus thioeparus* (T) (M79426, 相似性 96%)。 *T. thioeparus* 是能够氧化硫化物的化能自养型微生物, 在以硫化物为底物的 MFC 中广泛存在, 并负责硫化物的氧化和电的产生^[27]。同样, 根据表 1, 我们发现 *Anaeromusa* 和 *Pseudomonas* 两个属是比较典型的在阶段 1 和阶段 3 被富集类群。在 MFC 阶段 1 阳极微生物群落中, *Anaeromusa* 属的微生物被乳酸极大地富集, 丰度高达 42.59%, 然后在经历一次丙酸底物的驯化后(此时丰度仅为 1.22%), 该类群微生物又在阶段 3 中得以富集, 丰度又达到 16.04%。该属微生物的丰度随着乳酸的投加而再次出现, 表明它们在乳酸的降解和 MFC 运行过程中具有重要作用。该菌属最初被认为是能够利用氨基酸的类群, 但 Borole 等^[28]应用葡萄糖、乳酸和纤维素的混合碳源, 富集得到了具有很高产电能力的阳极微生物群落, 其中 *Anaeromusa* 属微生物的丰度高达 41%, 这与本研究非常相似。因此, 作者也认为该类微生物可能实际参与了 MFC 的产电过程。

同样, *Pseudomonas* 属微生物的丰度变化也呈现类似的趋势。它们被乳酸再次富集, 此时在阳极微生物群落中的丰度为 5.53%。该菌属是广泛分布的革兰氏阴性好氧菌, 但经常发现这类微生物在以乳酸为底物的厌氧反应器中存在^[29]。它们有可能实际参与乳酸的降解, 同时通过它们的呼吸作用消除反应器的氧气, 从而保证系统的缺氧特征, 进而为其它厌氧微生物提供良好的生存环境。因此, 它们的广泛存在对 MFC 的产电过程是极有利的^[20]。

本研究利用乳酸与丙酸的交替底物试验证实, 当底物条件恢复时, 微生物群落具有恢复到原来状态的趋势。但这种现象的普遍性, 仍有待于应用更多的底物试验进一步证实。

4 结论

本研究探讨了底物波动对 MFC 运行效率和阳极微生物群落的影响。发现更换底物对 MFC 产电的影响与 MFC 启动过程类似, 能够显著地影响 MFC 的产电效率, MFC 均需要较长的适应期。MFC 阳极微生物群落对底物依赖性很强, *Dechloromonas* spp. 和 *Comamonas testosteroni* 等类群对丙酸底物有较强

响应, 进而被富集; *Anaeromusa* spp.、*Pseudomonas* spp. 以及 *Thiobacillus thioeparus* 对乳酸底物具有强烈的响应, 随着乳酸底物的投加而富集; 产电微生物 *Geobacter* spp. 是各种底物的共有种群, 随着底物变化其丰度逐渐提高。以上这些微生物类群对 MFC 产电和稳定均具有重要作用。

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] Logan BE, Regan JM. Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells. *Trends in Microbiology*, 2006, 14(12): 512-518.
- [3] Zhou GY, Yokoyama N, Yoshino Y, Yamashita T, Kawagoshi Y. Comparative study on the performance of microbial fuel cells and bacterial community at different temperatures. *Journal of Water and Environment Technology*, 2013, 11(2): 71-79.
- [4] 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.
- [5] Zhang YF, Min B, Huang LP, Angelidaki I. Electricity generation and microbial community response to substrate changes in microbial fuel cell. *Bioresource Technology*, 2011, 102(2): 1166-1173.
- [6] Logan BE. Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. *Nature Reviews Microbiology*, 2009, 7(5): 375-381.
- [7] Cheng SA, Liu H, Logan BE. Increased performance of single-chamber microbial fuel cells using an improved cathode structure. *Electrochemistry Communications*, 2006, 8(3): 489-494.
- [8] Wu D, Xing DF, Lu L, Wei M, Liu BF, Ren NQ. Ferric iron enhances electricity generation by *Shewanella oneidensis* MR-1 in MFCs. *Bioresource Technology*, 2013, 135: 630-634.
- [9] Gao CY, Wang AJ, Wu WM, Yin YL, Zhao YG. Enrichment of anodic biofilm inoculated with anaerobic or aerobic sludge in single chambered air-cathode microbial fuel cells. *Bioresource Technology*, 2014, 167: 124-132.
- [10] Thygesen A, Poulsen FW, Min B, Angelidaki I,

- Thomsen AB. The effect of different substrates and humic acid on power generation in microbial fuel cell operation. *Bioresource Technology*, 2009, 100(3): 1186-1191.
- [11] Freguia S, Teh EH, Boon N, Leung KM, Keller J, Rabaey K. Microbial fuel cells operating on mixed fatty acids. *Bioresource Technology*, 2010, 101(4): 1233-1238.
- [12] Koch M, Dolfing J, Wuhrmann K, Zehnder AJB. Pathways of propionate degradation by enriched methanogenic cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 1983, 45(4): 1411-1414.
- [13] Lindgren SE, Axelsson LT, McFeeters RF. Anaerobic L-lactate degradation by *Lactobacillus plantarum*. *FEMS Microbiology Letters*, 1990, 66(1-3): 209-213.
- [14] Yuste JC, Fernandez-Gonzalez AJ, Fernandez-Lopez M, Ogaya R, Penuelas J, Lloret F. Functional diversification within bacterial lineages promotes wide functional overlapping between taxonomic groups in a Mediterranean forest soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 2014, 90(1): 54-67.
- [15] Kim KY, Chae KJ, Choi MJ, Ajayi FF, Jang A, Kim CW, Kim IS. Enhanced coulombic efficiency in glucose-fed microbial fuel cells by reducing metabolite electron losses using dual-anode electrodes. *Bioresource Technology*, 2011, 102(5): 4144-4149.
- [16] Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3): 695-700.
- [17] Vaz-Moreira I, Egas C, Nunes OC, Manaia CM. Culture-dependent and culture-independent diversity surveys target different bacteria: a case study in a freshwater sample. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2011, 100(2): 245-257.
- [18] Juang DF, Yang PC, Chou HY, Chiu LJ. Effects of microbial species, organic loading and substrate degradation rate on the power generation capability of microbial fuel cells. *Biotechnology Letters*, 2011, 33(11): 2147-2160.
- [19] Maszenan AM, Seviour RJ, Patel BK, Schumann P. *Quadricoccus australiensis* gen. nov., sp. nov., a beta-proteobacterium from activated sludge biomass. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, 52(Pt 1): 223-228.
- [20] Qu YP, Feng YJ, Wang X, Logan BE. Use of a coculture to enable current production by *Geobacter sulfurreducens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(9): 3484-3487.
- [21] 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.
- [22] Caccavo F, Jr., Lonergan DJ, Lovley DR, Davis M, Stolz JF, McInerney MJ. *Geobacter sulfurreducens* sp. nov., a hydrogen- and acetate-oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60(10): 3752-3759.
- [23] Nevin KP, Holmes DE, Woodard TL, Hinlein ES, Ostendorf DW, Lovley DR. *Geobacter bemidjensis* sp. nov. and *Geobacter psychrophilus* sp. nov., two novel Fe(III)-reducing subsurface isolates. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(Pt 4): 1667-1674.
- [24] Sun YM, Wei JC, Liang P, Huang X. Electricity generation and microbial community changes in microbial fuel cells packed with different anodic materials. *Bioresource Technology*, 2011, 102(23): 10886-10891.
- [25] Carosia MF, Okada DY, Sakamoto IK, Silva EL, Varesche MBA. Microbial characterization and degradation of linear alkylbenzene sulfonate in an anaerobic reactor treating wastewater containing soap powder. *Bioresource Technology*, 2014, 167: 316-323.
- [26] Kim JR, Jung SH, Regan JM, Logan BE. Electricity generation and microbial community analysis of alcohol powered microbial fuel cells. *Bioresource Technology*, 2007, 98(13): 2568-2577.
- [27] Cai J, Zheng P, Xing YJ, Qaisar M. Effect of electricity on microbial community of microbial fuel cell simultaneously treating sulfide and nitrate. *Journal of Power Sources*, 2015, 281: 27-33.
- [28] Borole AP, Hamilton CY, Vishnivetskaya TA, Leak D, Andras C, Morrell-Falvey J, Keller M, Davison B. Integrating engineering design improvements with exoelectrogen enrichment process to increase power output from microbial fuel cells. *Journal of Power Sources*, 2009, 191(2): 520-527.
- [29] Zhao YG, Ren NQ, Wang AJ. Contributions of fermentative acidogenic bacteria and sulfate-reducing bacteria to lactate degradation and sulfate reduction. *Chemosphere*, 2008, 72(2): 233-242.

Response of microbial fuel cell anodic microbial communities to substrate switch of lactate-propionate-lactate

Chongyang Gao¹, Weimin Wu², Yanhui Zhao³, Aijie Wang^{1*}, Nanqi Ren¹, Min Wang³, Yangguo Zhao³

¹ School of Environmental and Municipal Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, Heilongjiang Province, China

² Department of Civil and Environmental Engineering, Stanford University, Stanford, CA 94305-4020, USA

³ College of Environmental Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266100, Shandong Province, China

Abstract: [**Objective**] To study the effect of substrates variation on the electricity production of microbial fuel cell (MFC) and anodic microbial communities. [**Methods**] An MFC was started up and operated by feeding in turn with lactate, then with propionate and finally with lactate. The anodic microbial communities were monitored by using culture-independent microbial molecular ecological techniques. [**Results**] The switch of substrates markedly affected the power efficiency of MFC. It required relatively long time to recover the electricity generation capability as the substrate was switched. The substrates switch also changed the microbial community structure. *Anaeromusa* spp., *Pseudomonas* spp. and *Thiobacillus thioeparus* were dominated with lactate fed because they were enriched in the presence of lactate. When propionate was supplied as sole substrate, *Dechloromonas* spp. and *Comamonas testosteroni* were selected. The electricity-producing bacteria, *Geobacter* spp., were enriched by acetate from either lactate or propionate degradation. Hence, *Geobacter* spp. was an overlapping microbial population in the presence of the two different substrates. [**Conclusion**] A well correspondence between substrate and anodic microbial community was observed in MFC with switching substrates. To reduce the effect of substrate fluctuation on the MFC electricity production, more complex organic substrate should be provided as broader nutrients which could improve the functional overlap of populations and MFC stability.

Keywords: substrate switch, population overlap, microbial fuel cell, denaturing gradient gel electrophoresis, high throughput sequencing

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (40801193)

* Corresponding author. Tel: +86-451-86282195; E-mail: waj0578@hit.edu.cn

Received: 11 March 2015/Revised: 17 April 2015