

1 株产电假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) RE7 的分离及特性研究

骆海萍¹, 刘广立¹, 张仁铎¹, 曹理想²

(1. 中山大学环境科学与工程学院, 广州 510275; 2. 中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘要: 微生物燃料电池(microbial fuel cell, MFC) 阳极微生物的种类和作用机制对 MFC 的产电性能有着重要的影响. 从已稳定运行 1 a 的 MFC 的阳极室分离得到 1 株电化学活性革兰氏阴性细菌——菌株 RE7, 其 16S rRNA 基因序列与 *Pseudomonas aeruginosa* strain CMG 587 有 99% 同源性, 属于假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.). 利用菌株 RE7 构建的 MFC 的稳定产电和循环伏安曲线测定结果都表明, 菌株 RE7 具有较强的电化学活性, 利用菌株 RE7 构建的 MFC 的最大输出电压为 352 mV, 相应的最大面积功率密度为 69.2 mW/m², 体积最大功率密度为 6.2 W/m³. 由不同稀释比例的 MFC 排出液的产电效果比较可知, 菌株 RE7 极有可能是通过自身分泌的氧化还原类物质进行电子传递.

关键词: MFC; 假单胞菌; 产电特性

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)07-2118-06

Isolation and Characterization of Electrochemical Active Bacterial *Pseudomonas aeruginosa* Strain RE7

LUO Hai-ping¹, LIU Guang-li¹, ZHANG Ren-duo¹, CAO Li-xiang²

(1. School of Environmental Science and Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China; 2. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Microbial components of the microbial fuel cells (MFCs), including species constitution and metabolic mechanism of the anodic microorganisms, are critical to the optimization of electricity generation. An electrogenesis bacterium strain (designated as RE7) was isolated from an MFC that had been running in a fed batch mode for over one year. The isolate was identified as a strain of *Pseudomonas aeruginosa* based on its physiological, morphological characteristics and 16S rRNA sequence analysis. Direct electron transfer from RE7 to an electrode was examined using cyclic voltammetry and MFC. Results of both methods showed the electrochemical activity of the bacterium without any electrochemical mediator. The *P. aeruginosa* strain RE7 was inoculated into the anode chamber of a packing-type MFC and the maximal voltage output was 352 mV with 1 500 mg/L glucose as the fuel. Correspondingly, the maximal area and volumetric power densities were 69.2 mW/m² and 6.2 W/m³, respectively. Bacteria-producing soluble redox mediators, such as phenazine derivatives, are possible mechanism to facilitate the direct electron transfer to the electrode from the bacterial cells.

Key words: microbial fuel cells (MFCs); *Pseudomonas*; electricity production

微生物燃料电池(microbial fuel cell, MFC) 利用微生物的氧化作用将有机物转化为电能, 影响其产能的因素很多, 如燃料的性质和浓度、阳极微生物构成、质子交换膜以及阴极催化剂的性能等, 其中产电细菌的活性被认为是最为关键的因素之一. 目前已分离到的产电细菌包括 *Shewanella putrefaciens*^[1]、*Geobacter metallireducens*^[2]、*Geobacter sulfurreducens*^[3]、*Rhodferax ferrireducens*^[4]、*Pseudomonas aeruginosa*^[5]、*Clostridium butyricum*^[6]、*Geothrix fermentans*^[7,8]、*Aeromonas hydrophila*^[9] 和 *Desulfitobacterium hafniense*^[10], 以产电纯菌种构建的 MFC 最大功率密度已达到 3 600 mW/m². 高效产电细菌的筛选对于提高 MFC 的产电性能具有重要的意义.

产电细菌的作用机制一直是 MFC 研究的重点

到目前为止, 一般认为产电细菌的电子传递有 3 种可能的方式: ①细菌通过其细胞膜外侧的细胞色素 C 将呼吸链中的电子直接传递到阳极, 如 *Shewanella*^[3]; ②细菌通过分泌吩嗪类衍生物和天青蛋白等物质, 这些物质可充当氧化还原介体将电子传递到阳极, 如 *Pseudomonas aeruginosa* 和 *Geothrix fermentans*^[5,7]; ③细胞通过其纤毛将电子传递到固体的三价铁氧化物, 如 *Shewanella* 和 *Geobacter* 菌能够产生高导电性的纳米纤毛^[11]. 研究产电细菌在

收稿日期: 2008-08-26; 修订日期: 2008-11-19

基金项目: 广东省环境污染控制与修复技术重点实验室开放基金项目(2006K0007); 广东省自然科学基金项目(05300697, 05003338)

作者简介: 骆海萍(1982~), 女, 博士研究生, 主要研究方向为微生物燃料电池在污水处理中的应用, E-mail: luohaiping2004@126.com

MFC 中的电子传递机制对于改进 MFC 结构, 从根本上提高其输出功率具有重要的意义。

本研究通过鉴定 1 株产电细菌, 分析其产电性能, 探讨其产电过程中电子传递机制, 以期为进一步开展和提高 MFC 产电性能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌种的分离和纯化

菌源取自一个稳定运行了 1 a 的单极室型 MFC。取阳极液用液体稀释法分离。固体培养基: 4.089 6 g/L Na_2HPO_4 , 2.544 g/L NaH_2PO_4 , 0.31 g/L NH_4Cl , 0.13 g/L KCl 及少量维生素和微量元素^[11]; 另外加入 3 mmol/L 的葡萄糖作为电子供体, 5 mmol/L 柠檬酸铁作为电子受体, 1.5% ~ 2% 的琼脂, pH = 7.0。培养皿涂布后置于厌氧箱 (Don Whitley Scientific, DG250 workstation) 中恒温 (27 °C) 培养。培养 3 d 后, 将培养平板上的单菌落进行多次划线纯化。纯化得到的单一菌种在液体培养基中富集后移入经灭菌的 MFC 反应器的阳极室, 测定其产电性能。编号为 RE7 的菌株是筛选出来的电化学活性菌。

1.2 菌株 16S rDNA 序列分析

采用 SDS-蛋白酶 K 裂解细胞, 用十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 沉淀细胞碎片和多糖, 再用异丙醇沉淀提取总 DNA。采用细菌的 16S rDNA 通用引物: 上游引物 F27 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和下游引物 R1522 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCGCA-3')。PCR 扩增体系总体积为 50 μL : 超纯水 34.0 μL , 10 $\times$ PCR Buffer 5 μL , 2.5 mmol/L dNTP 4 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 上游引物 1 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 下游引物 1 μL , 25 mmol/L MgCl₂ 4 μL , 5 U/ μL *Taq* DNA Polymerase 0.5 μL , 模板 DNA 稀释至适当浓度 (0.01~1 ng) 后取 0.5 μL 。另用 0.5 μL 超纯水代替模板 DNA 进行空白试验。PCR 反应时, 94.0 °C 变性 5 min 后进入循环: 94.0 °C 变性 1 min, 56.0 °C 退火 1 min, 72.0 °C 延伸 1.5 min。30 个循环后延伸 10 min。采用 PCR 回收试剂盒回收 16S rRNA 的基因片段, 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物的大小后, 将其 TA 克隆后进行测序 (由广东微生物研究所完成)。测序结果通过在线分析 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 与 GenBank 中的 16S rRNA 基因序列进行相似性比较。

1.3 菌株生长曲线测定

取盛有 9 mL 无菌葡萄糖培养液的 15 mL 血清瓶 12 个, 分别编号为 0、1、5、12、15、18、21、24、28、32、36、48 h。在厌氧箱中, 用无菌移液管分别

准确吸取 1 mL 种子液加入已编号的 12 个血清瓶中, 于 30 °C 下振荡培养。然后分别按对应时间将血清瓶取出, 立即放冰箱中贮存, 待培养结束时一同测定光密度值。

1.4 产电性能测定

菌种的产电性能通过循环伏安法和 MFC 进行测定。

1.4.1 循环伏安法

为了研究厌氧培养的菌株 RE7 在溶液中的电化学活性, 取 10 mL 培养 48 h 的菌悬液 ($D_{600\text{nm}} = 0.625$), 经离心和清洗后重悬于含 50 mmol/L NaCl 的磷酸盐缓冲溶液中, 然后采用电化学工作站 (荷兰 Eco Chemie BV, PGSTAT302) 在高纯 N_2 保护下, 以 100 mV/s 的充/放电频率在 -450 ~ 900 mV 之间循环测试菌悬液的氧化还原特性^[6], 绘制循环伏安曲线。

1.4.2 MFC 产电性能测试

采用双极室型 MFC, 50 mmol/L 铁氰化钾作为电子的受体, 质子交换膜 (Dupont, 211 型) 隔开; 阳极室和阴极室的体积均为 36 cm³ (9 cm $\times$ 2 cm $\times$ 2 cm), 分别填充颗粒石墨 (16~20 目, 平均孔隙率 10%), 阳极室和阴极室填充颗粒石墨后的有效体积均为 20 mL。外电阻为 1 000 Ω 。

阳极液由 1 000 mg/L 的葡萄糖和无机盐组成, 无机盐的主要成分为: 4.089 6 g/L Na_2HPO_4 , 2.544 g/L NaH_2PO_4 , 0.310 g/L NH_4Cl , 0.130 g/L KCl 及少量维生素和微量元素, pH = 7.0。MFC 反应器先经过灭菌, 在阳极室添加经 121 °C 灭菌 15 min 的阳极液, 并接种菌株 RE7 后, 开始运行并记录输出电压 (PCI1713 型数据采集卡, 深圳研华), 记录频率为 1 次/min。当输出电压降低到 35 mV 以下时, 更换燃料, 温度控制在 30 °C $\pm$ 1 °C。

1.5 测试和计算方法

电流通过 $I = U/R$ 计算, 功率通过 $P = U^2/R$ 计算。最大面积功率密度和最大体积功率密度分别通过 $P_{\text{An}} = P_{\text{max}}/A$ 和 $P_{\text{V}} = P_{\text{max}}/V$ 计算, 其中 P_{max} 为 MFC 可获得的最大功率 (通过测定极化曲线可得到, 单位为 W), A 为阴极的有效面积 (m²), V 为阳极室的有效体积 (L)。

库仑量 E 按照下面公式^[13] 计算:

$$E = \frac{\sum_{i=1}^n U_i t_i}{R} \quad (1)$$

式中, U_i 为 t_i 时刻 MFC 输出电压, R 为外电阻。

为了进一步探讨 RE7 菌株是否通过产生吩嗪

和天青蛋白等电子介体来辅助自身的产能, 本研究将填充型 MFC 的周期运行结束的阳极室排出液做了不同比例的稀释, 然后添加葡萄糖使其最终 COD 浓度均为1 000 mg/L, 高温灭菌后作为燃料依次测定 MFC 的产能.

2 结果与分析

2.1 菌种的分离和鉴定结果

菌株 RE7 菌落淡黄色, 为革兰氏阴性细菌. 对菌株 RE7 的 16S rRNA 进行 PCR 扩增并对扩增 DNA 测序, 结果显示该菌株的 16S rRNA 序列与菌株 *Pseudomonas aeruginosa* CMG 587 的 16S rRNA 序列的相似性为 99%, 故将该菌鉴定为假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.) (图 1).

由图 2 可见, 菌株 RE7 在 22 h 达到最大生长量.

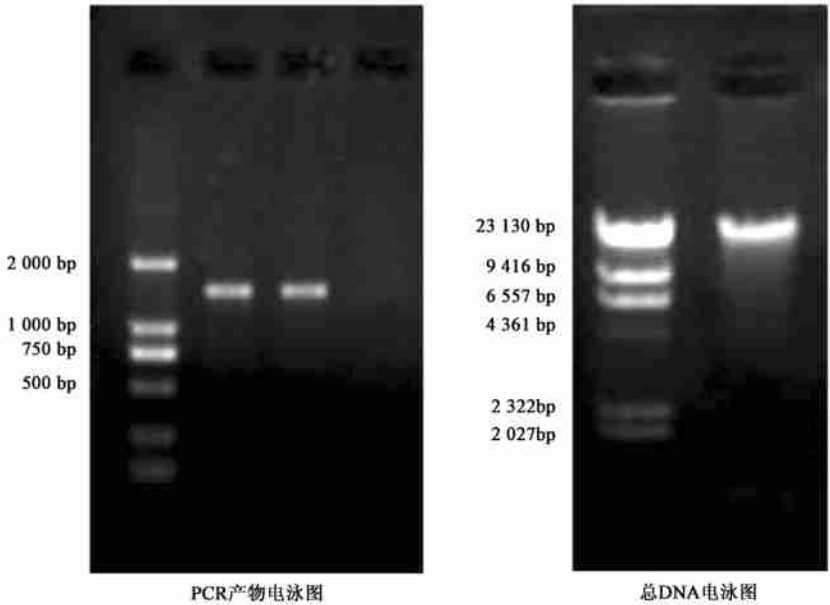


图 1 菌株 RE7 的 16S rDNA PCR 产物琼脂糖凝胶电泳分析

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis analysis of 16S rDNA PCR product of strain RE7

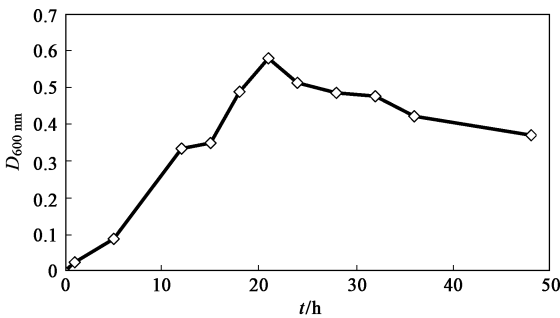


图 2 菌株 RE7 利用1 000 mg/L葡萄糖的生长曲线

Fig. 2 Growth curve of strain RE7 using glucose with concentration of 1 000 mg/L

图 3 为菌株 RE7 纯培养及其在 MFC 阳极附着进行产能后的电极扫描电镜图. 从中可明显看到, 将呈杆状的菌株 RE7[见图3(a)] 接种到 MFC 反应器的阳极室中进行为期 30 d 的产能后, 菌株 RE7 明显附着在电极上且细胞间出现类似丝状的连接物质[图3(b)], 其具体作用还有待进一步的研究.

2.2 产电特性

2.2.1 循环伏安曲线

循环伏安法能够测定电解液中所含物质的氧化还原特性. 如图 4 所示, 厌氧培养条件下的菌株 RE7 的循环伏安曲线分别在- 200 mV 和+ 180 mV 左右均出现一个峰, 其中+ 180 mV 处出现的电流峰的高度> - 220 mV 的峰.

2.2.2 菌株 RE7 的 MFC 产电性能

以葡萄糖为基质, 将菌株 RE7 接种到阳极室启动 MFC, 启动期电压为 20 mV. MFC 在运行时间超过 80 h 后, 外电路输出电压开始升高. MFC 达到稳定产能后, 以1 500 mg/L葡萄糖为燃料时, MFC 的最大输出电压达到 352 mV (见图 5), 相应的最大功率密度达到 69.2 mW/m², 体积最大功率密度为 6.2 W/m³. 如图 5 所示, 每次更换新的基质后, MFC 的输出电压都迅速提升到一个高度, 保持稳定一段时间 (6~ 10 h) 后才再次上升到周期运行的最大值; 而且 MFC 运行的时间越长, 平台值与峰值之差越小. 这

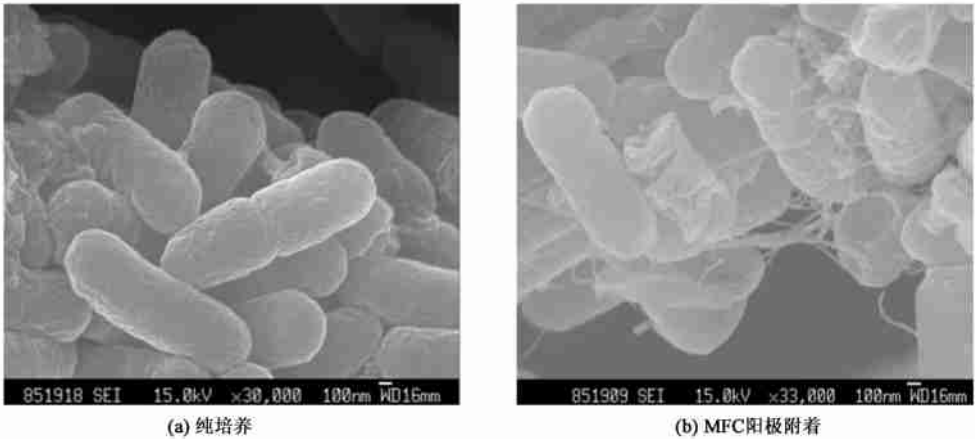


图 3 菌株 RE7 纯培养及其在 MFC 阳极附着电镜扫描结果

Fig.3 Transmission electron micrograph of strain RE7 and it's on the anode surface in MFC reactors fed with 1 000 mg/L glucose as the electron donor

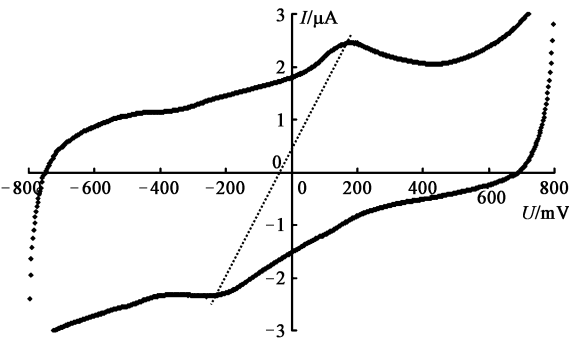


图 4 厌氧条件下培养的菌株 RE7 的循环伏安曲线

Fig.4 Cyclic voltammogram for strain RE7 under anaerobic condition

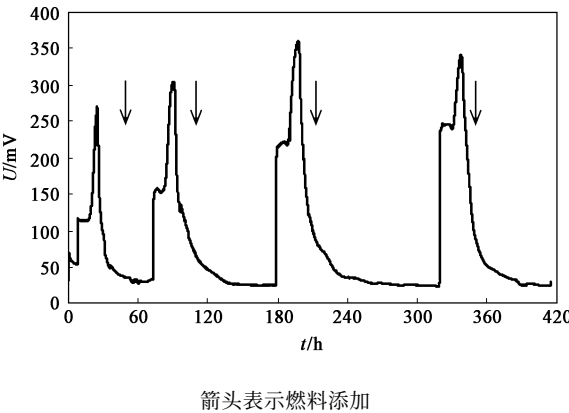


图 5 纯菌株 RE7 构建的 MFC 的连续产电特性

Fig.5 Changes in voltage from the microbial fuel cells containing *Pseudomonas aeruginosa* RE7 with a 1000 Ω of resistor

递速率, 因此每个周期添加新基质后, 产电曲线先出现一个平台然后才达到峰值.

2.3 产电机制

由于阳极细菌代谢产物的组成复杂, 本实验采取将阳极排出液逐级稀释的方法考察菌株 RE7 的代谢产物对 MFC 产能的影响. 实验结果表明, 更换燃料后 MFC 的输出电压均能立即达到最大值, 其中, MFC 的输出电压以无稀释的阳极液作为燃料时最高, 可达 195 mV; 以新配基质和经 8 倍稀释的阳极液为燃料时最低, 仅有约 150 mV(图 6). MFC 的周期运行的时间随着稀释倍数的增加而增加(数据未展示). 库仑量的计算结果表明, 经 4 倍稀释的阳极液为燃料时 MFC 产生的电量最高, 为 25.0 C; 而无稀释的阳极液作为燃料时最低, 仅有 9.2 C(图 7).

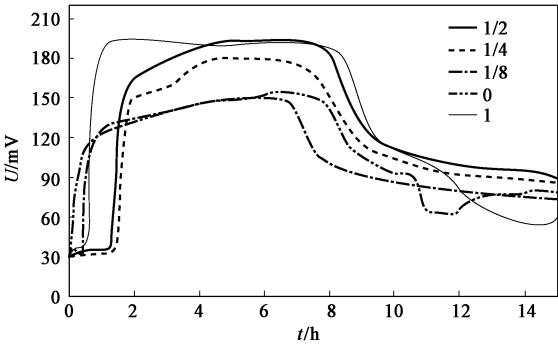
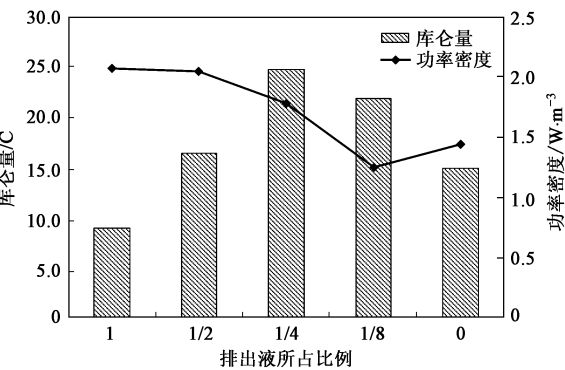


图 6 灭菌后阳极排出液的投加量对 MFC 产电效果的影响

Fig.6 Voltage generations as a function of time for five sequential dilutions in MFC reactors with the same initial COD of 1000 mg/L

可能是因为在菌株 RE7 产电的过程中, 菌体自身代谢产生的某种分泌物的积累能够有效增加电子的传



阳极溶液初始 COD 均为 1 000 mg/L

图 7 不同阳极排出液的投加量(经灭菌)的 MFC 周期产电量和功率密度

Fig. 7 Electrical quantities and power densities for five sequential dilutions in MFC reactors with the same initial COD of 1 000 mg/L

3 讨论

循环伏安曲线的测定结果表明,假单胞菌属 RE7 具备较强的氧化还原活性,表现在氧化反应和还原反应曲线都出现 1 个较明显的峰值.本研究中菌株 RE7 的循环伏安曲线的形状与其他文献中报道的诸如 *S. putrfaciens* IR-1^[14] 所得到的曲线相似. MFC 的连续周期产电曲线表明,单一的菌株 RE7 构建的 MFC 能够利用葡萄糖进行稳定的产电,其最大

功率密度可达 6.2 W/m³.从表 1 可见,MFC 的产电性能与产电细菌的种类有着紧密的关系,同样利用乳酸作为燃料,*Shewanella putrfaciens* 和 *Shewanella oneidensis* 产生的功率密度相差很大.而同样利用 *Pseudomonas aeruginosa* 构建的 MFC,本研究获得的面积功率密度优于 Rabaey 等^[5] 报道的结果,但是体积功率密度相当,可见,尽可能详尽地报道 MFC 的结构参数对于不同研究之间 MFC 产电性能的比较尤为重要.

菌株 RE7 的产能机制实验结果表明,在 MFC 环境下,菌株 RE7 的代谢产物的确可以起到电子介体的作用,基质中添加这类产物有助于 MFC 输出电压的提升.假单胞菌属细菌在电极作为唯一电子受体时可产生吩嗪类衍生物和天青蛋白,这类物质不仅可充当假单胞菌与电极之间的电子传递介质,而且也可被阳极室的其他菌种利用进行电子的传递^[18],这与本研究结果一致.与 Pham 等^[18] 只利用提取到的单一代谢产物进行研究不同,本实验考虑了菌株 RE7 的综合代谢产物的电子传递辅助作用,实验结果证实,MFC 以 4 倍稀释的阳极液为燃料时获得的周期产电量最大,可见,电子介体的添加浓度与 MFC 的产电效率不是呈简单的正相关,可能代谢产物中还有其他的作用参与其中,具体的原因还有待进一步探讨.

表 1 MFC 利用不同燃料的产电性能比较

Table 1 Comparison of the MFC performance using different fuels between this study and typical literatures							
菌种类型	燃料	阳极材料	电子介体添加	U_{max}/mV	$P_{Ar}/mW\cdot m^{-2}$	$P_V/W\cdot m^{-3}$	文献
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	葡萄糖	碳布	无	352	69.2	6.2	本研究
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	葡萄糖	碳片	无	—	1.67	8.8	[5]
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	乙酸	碳片	无	200	355	60	[15]
<i>Rhodferax ferrireducens</i>	葡萄糖	碳布	无	620	17	1.7	[4]
<i>Shewanella putrfaciens</i>	乳酸	碳布	无	40	0.00032	0.08	[1]
<i>Aeromonas hydrophila</i>	酵母浸膏	—	无	150	—	—	[9]
<i>Desulfitobacterium hafniense</i>	甲酸	—	中性红/AQDS	300	400	56	[10]
<i>Geobacter metallireducens</i>	乙酸	碳纸	无	300	40	—	[16]
<i>Geothrix fermentans</i>	丙酸	—	无	155	—	—	[3]
<i>Shewanella oneidensis</i>	乳酸	石墨纤维	无	517	3.000	500	[17]

4 结论

(1)分离出 1 株产电细菌——菌株 RE7.由菌株长 1 445 bp 的 16S rRNA 基因序列与 GenBank 中已登录的基因序列进行比对分析得知,该菌株与 *Pseudomonas aeruginosa* strain CMG 587 有 99% 同源性,同时革兰氏检验呈阴性,故菌株 RE7 最有可能为假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.).

(2)循环伏安方法和 MFC 产电性能实验均证实了菌株 RE7 的电化学活性.利用菌株 RE7 构建的 MFC 的最大输出电压为 352 mV,相应的最大面积功率密度为 69.2 mW/m²,体积最大功率密度为 6.2 W/m³.

参考文献:

[1] Kim H J, Park H S, Hyun M S, et al. A mediator-less microbial fuel

- cell using a metal reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens* [J]. Enzyme Microb Tech, 2002, **30**: 145-152.
- [2] Bond D R, Holmes D E, Tender L M, *et al.* Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments [J]. Science, 2002, **295**(18): 483-485.
- [3] Bond D R, Lovley D R. Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, **69**: 1548-1555.
- [4] Chaudhuri S K, Lovley D R. Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells [J]. Nature Biotechnology, 2003, **21**(10): 1229-1232.
- [5] Rabaey K, Boon N, Hefte M, *et al.* Microbial phenazine production enhances electron transfer in biofuel cells [J]. Environ Sci Technol, 2005, **39**: 3401-3408.
- [6] Park H S, Kim B H, Kim H S, *et al.* A Novel Electrochemically Active and Fe(III)-reducing Bacterium Phylogenetically Related to *Clostridium butyricum* Isolated from a Microbial Fuel Cell [J]. Anaerobe, 2001, **7**: 297-306.
- [7] Nevin K P, Lovley D R. Mechanisms for accessing insoluble Fe(III) oxide during dissimilatory Fe(III) reduction by *Geothrix fermentans* [J]. Appl Environ Microbiol, 2002, **68**: 2294-2299.
- [8] Bond D R, Lovley D R. Evidence for involvement of an electron shuttle in electricity generation by *Geothrix fermentans* [J]. Appl Environ Microbiol, 2005, **71**: 2186-2189.
- [9] Pham C A, Jung S J, Phung N T, *et al.* A novel electrochemically active and Fe (III)-reducing bacterium phylogenetically related to *Aeromonas hydrophila*, isolated from a microbial fuel cell [J]. FEMS Microbiol Lett, 2003, **223**: 129-134.
- [10] Milliken C E, May H D. Sustained generation of electricity by the spore-forming, Gram-positive, *Desulfatobacterium hafniense* strain DCB2 [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, **73**: 1189-1189.
- [11] Lovley D R, Phillips E J P. Novel mode of microbial energy metabolism: organism carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron and manganese [J]. Appl Environ Microbiol, 1988, **54**: 1472-1480.
- [12] Reguera G, McCarthy K D, Mehta T, *et al.* Extracellular electron transfer via microbial nanowires [J]. Nature, 2005, **435**: 1098-1101.
- [13] Liu H, Cheng S, Logan B E, *et al.* Production of electricity from acetate or butyrate using a single-chamber microbial fuel cell [J]. Environ Sci Technol, 2005, **39**: 658-662.
- [14] Kim B H, Ikeda T, Park H S, *et al.* Electrochemical activity of an Fe (III)-reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens* IR-1, in the presence of alternative electron acceptors [J]. Biotechnology Techniques, 1999, **13**: 475-478.
- [15] Lovley D R. Bug juice: harvesting electricity with microorganisms [J]. Nature Reviews Microbiology, 2006, **4**: 497-508.
- [16] Min B, Cheng S, Logan B E. Electricity generation using membrane and salt bridge microbial fuel cells [J]. Water Res, 2005, **39**: 1675-1686.
- [17] Ringeisen B R, Henderson E, Wu P K, *et al.* High Power Density from a Miniature Microbial Fuel Cell Using *Shewanella oneidensis* DSP10 [J]. Environ Sci Technol, 2006, **40**: 2629-2634.
- [18] Phan T H, Boon N, Aelteman P, *et al.* Metabolites produced by *Pseudomonas* sp. enable a Gram-positive bacterium to achieve extracellular electron transfer [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2008, **77**: 1119-1129.