

2008-08-28

## Electricity Generation in Microbial Fuel Cells Catalyzed by Mixed Culture and Pure Culture

Chen-dong SHUANG

En-ren ZHANG

Guo-wang DIAO

Fang-fang FAN

jie YUAN

---

### Recommended Citation

Chen-dong SHUANG, En-ren ZHANG, Guo-wang DIAO, Fang-fang FAN, jie YUAN. Electricity Generation in Microbial Fuel Cells Catalyzed by Mixed Culture and Pure Culture[J]. *Journal of Electrochemistry*, 2008 , 14(3): 313-318.

DOI: 10.61558/2993-074X.1913

Available at: <https://jelectrochem.xmu.edu.cn/journal/vol14/iss3/17>

This Article is brought to you for free and open access by Journal of Electrochemistry. It has been accepted for inclusion in Journal of Electrochemistry by an authorized editor of Journal of Electrochemistry.

# 复合菌体及单一菌体催化的微生物燃料电池 产电机理初步研究

双陈冬, 张恩仁\*, 刁国旺, 范芳芳, 袁杰

(扬州大学化学化工学院, 江苏 扬州 225002)

**摘要:** 利用淡水沉积物作为接种源构建了微生物燃料电池, 考察苯酚对该微生物燃料电池性能的影响. 结果表明, 在淡水沉积物接种的微生物燃料电池中, 电流的产生是由富集在电极表面的细菌引起的. 苯酚降低了细菌消耗葡萄糖的速率, 并在加入相同量葡萄糖的情况下, 延长了产电时间. 另一方面, 实验还研究了一株从沉积物微生物燃料电池中分离出的单菌株的产电情况. 该菌株在微生物燃料电池中需要借助自身代谢产生有电极反应活性的中间产物才能产电. GC-MS 分析表明, 中间产物中有吩嗪类物质, 该类物质可在该细菌细胞与石墨电极之间充当电子传递介体, 实现电子从细胞向电极的传递.

**关键词:** 微生物燃料电池; 淡水沉积物; 苯酚; 假单胞菌; 电子介体

**中图分类号:** O646

**文献标识码:** A

微生物燃料电池 (MFCs) 是利用微生物作为催化剂实现化学能向电能转化的装置. 近年来, 微生物燃料电池作为一种环境友好的产能装置受到许多研究者的关注. 对常见的 H 型微生物燃料电池, 细菌作为催化剂安置于电池的阳极室, 在理想的情况下, 将有机底物完全降解并产生  $\text{CO}_2$  和  $\text{H}^+$ . 释放出的电子和质子分别通过外部电路和质子交换膜到达阴极, 并与  $\text{O}_2$  结合生成水. 由于细菌具有很强的适应性、种类的多样性, 广泛用于微生物燃料电池. 目前, 已被用作微生物燃料电池的物质有各种糖类、有机酸等纯净物, 也有一些混合物, 如动物排泄物, 废水等<sup>[1-5]</sup>.

微生物燃料电池性能受诸多因素的影响, 包括底物的转化速率、阳极超电势、阴极超电势, 质子交换膜的性能以及电池内阻<sup>[6]</sup>. 以 Logan B. E. 为代表的研究者在微生物燃料电池影响因素和优化电池性能上做了许多有意义的工作, 有效地提高了微生物燃料电池的输出功率<sup>[7-11]</sup>. 电池的输出功率由不足  $1\text{mW} \cdot \text{m}^{-2}$  提高到数千  $\text{mW} \cdot \text{m}^{-2}$ . 随着微

生物燃料电池装置结构的不断优化, 内阻的大幅降低, 微生物催化电极反应的效率便成为该燃料电池发展的限制因素. 在早期的研究中, 人们常常借助硫堇、中性红等电子介体来实现或加快电子从细胞到电极的转移<sup>[12-13]</sup>, 但这些电子介体的毒性对环境和生物不利. 在无介体的微生物燃料电池中, 有些微生物能够通过细胞的某些附器或细胞膜上存在的氧化还原酶直接将电子传递给电极<sup>[14-16]</sup>, 或者自身代谢出电子介体来完成电子的转移<sup>[17]</sup>.

由于多种细菌存在下的电子传递过程十分复杂, 考察单一菌株在微生物燃料电池中电子传递的机理, 就成为进一步提高微生物燃料电池性能的关键问题. 本文利用淡水沉积物作为接种源, 在成功构建微生物燃料电池的基础上, 考察了苯酚对电池性能的影响, 为微生物燃料电池利用含酚废水作为燃料的应用提供了依据. 同时, 初步探讨了单一菌种催化电极反应的机理.

## 1 实验部分

收稿日期: 2007-12-24, 修订日期: 2008-03-17 \* 通讯作者, Tel (86-514)87975568, E-mail yzerzhang@yahoo.com.cn

扬州大学自然科学基金 (HK0410188), 江苏省物理化学重点学科开放基金、江苏省环境材料与环境工程重点实验室开放基金资助

## 1.1 培养基

实验使用 3 种培养基, 成分如下:

培养基 I  $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaHCO}_3$ ,  $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{KCl}$ ,  $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $0.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaCl}$ ,  $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $0.005 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $0.001 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  D 葡萄糖;

培养基 II  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  蛋白胨,  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  酵母浸出汁,  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaCl}$

培养基 III  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  D 葡萄糖,  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  蛋白胨,  $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  酵母浸出汁,  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaCl}$

各培养基 pH 调至中性, 经微孔滤膜 ( $\varnothing 0.20 \mu\text{m}$ ) 过滤灭菌后使用.

培养基 I 用于复合菌体接种的微生物燃料电池. 为考察苯酚对该电池放电性能的影响, 以培养基 I 配制苯酚浓度分别为 0.0、0.5、0.8 和  $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的溶液; 培养基 II 为 LB 培养基, 用于单一细菌的分离与培养; 培养基 III 用于单一细菌催化电极反应实验.

## 1.2 装置及操作

微生物燃料电池模拟装置采用传统的 H 型电池, 阴、阳两电极均用石墨纤维布 ( $4 \text{ cm} \times 5 \text{ cm}$ ). 阴极室与阳极室容积各为 200 mL, 中间用阳离子交换膜相隔. 阴极室的电解液均为  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  和  $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4$  的混合溶液 180 mL, pH 调至中性. 在放电过程中, 阴极室持续通入经微孔滤膜 ( $\varnothing 0.22 \mu\text{m}$ ) 过滤的空气.

复合细菌催化的微生物燃料电池阳极室盛 180 mL 培养基 I 用 10 mL 淡水沉积物接种, 持续通高纯氮气 2 h 严格密封保持阳极室为厌氧环境, 在  $500 \Omega$  外接电阻下进行放电. 放电结束后, 取出阳极并于厌氧条件下保存, 阳极室经清洗、灭菌后重新加入 180 mL 新鲜含酚培养基. 此时, 不再作沉积物接种, 以考察电极表面细菌的活性, 并于再次除氧后密封放电. 记录放电曲线, 放电结束后, 按上述操作更换不同苯酚浓度的培养基 I.

单一菌种接种的微生物燃料电池阳极室盛 180 mL 培养基 III 持续通高纯氮气 2 h 严格密封, 记录电流. 此外, 为考察细菌代谢产物对电池性能的影响, 取细菌在培养基 II 中培养 22 h 后的 40 mL 残留液, 离心除去细胞得上清液, 加入接种后阳

极室中, 记录其放电曲线, 与未加代谢产物的放电过程形成对比. 放电结束后, 阳极溶液更换新鲜培养基 III 不再进行接种以考察电极表面细菌的作用.

## 1.3 细菌

淡水沉积物取自扬州大学瘦西湖校区半塘 1.5 m 深池底, 密封保存, 短期内使用.

将培养基 II 制成平板, 在复合菌体催化的微生物燃料电池放电结束后的阳极表面分离出多种细菌, 取最大菌落数的细菌在培养基 II 中进行扩大培养, 分光光度计测定  $\text{OD}_{600}$  值, 以观察培养基中的细菌生长状况. 扩大培养 22 h 后, 取 10 mL 培养液于 2500 g 条件下离心 15 min 后得下层细胞与上层清液. 该细菌细胞经无菌培养基 III 再悬浮、离心去除残余代谢产物后, 用于构建单一细菌微生物燃料电池. 上层清液则作为代谢产物进行分析, 并加入到单一细菌催化的电池阳极室, 考察其对该电池放电性能的影响.

## 1.4 化学分析与电化学分析

葡萄糖浓度由苯酚 硫酸法测定, 重铬酸钾氧化法测 COD. 采用 4 氨基安替比林直接光度法测定苯酚. 取样后, 样品用直径为  $0.22 \mu\text{m}$  的微孔滤膜过滤后立即进行成分分析. 细菌代谢产物分析使用 GCMS (Trace DSQ, FINNIGAN, America). 单一细菌代谢产物以及细胞的电化学活性分析使用 CHI660b (上海辰华仪器有限公司), 其工作电极为直径为 3 mm 的玻碳电极, 参比为饱和甘汞电极, 对电极为铂片电极.

## 1.5 细菌观察

取出阳极 (约  $1 \text{ cm}^2$ ) 经无菌生理盐水轻轻冲洗后, 依次放入不同浓度 (25%, 50%, 70%, 85%, 95%, 100%) 的乙醇溶液脱水. 将脱水后的电极样品固定在铜靶上喷金 (PolaronE-5100 Sputter Coater) 后, 其表面形貌由扫描电镜观察 (Philips XL-30ESEM). 悬浮于阳极室溶液中的细菌用普通光学显微镜观察.

## 2 结果与讨论

### 2.1 苯酚对微生物燃料电池的影响

图 1 为微生物燃料电池的放电曲线. 如图所示, 放电结束后的微生物燃料电池经更换含不同苯酚浓度的培养基后, 还能够迅速产生电流. 由于每

次培养基的更换都去除阳极室中的悬浮细菌和代谢产物,所以电流的产生应当是由附着在电极表面的细菌引起的.而电流的下降则与培养基中不利于细菌生长的因素有关,如有机物的减少, pH 值的降低,有毒代谢产物的产生等等.

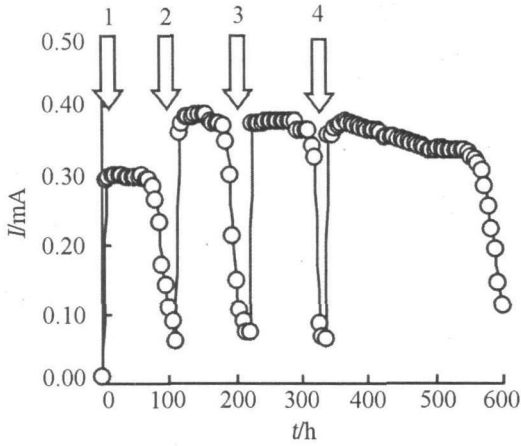


图 1 淡水沉积物接种的微生物燃料电池放电曲线  
箭头表示培养基的更换,培养基中苯酚浓度 /g · L<sup>-1</sup>: 1)0.0; 2)0.5; 3)0.8; 4)1.0

Fig 1 Current generation by MFC inoculated by fresh waer sediment  
amount of phenol(g · L<sup>-1</sup>) in fresh medium: 1)0.0, 2)0.5, 3)0.8, 4)1.0, and arrows indicate medium replacement

图 2 给出了沉积物接种的微生物燃料电池阳极室中葡萄糖和苯酚浓度随着放电过程的变化.对比图 1 可以看出,虽然放电电流的增大主要是因为更换新鲜培养基补充了充足的葡萄糖(图 1),但

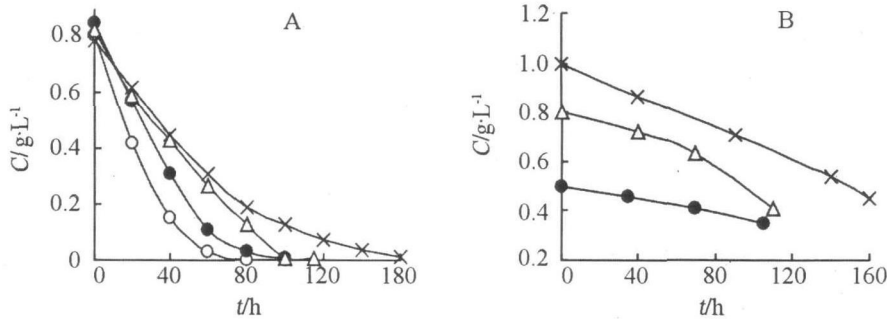


图 2 淡水沉积物接种的微生物燃料电池放电过程葡萄糖浓度(A)和苯酚浓度(B)随放电时间的变化  
初始培养基所含苯酚 /g · L<sup>-1</sup>: ○) 0, ●) 0.5, △) 0.8, ×) 1.0

Fig 2 Variations of the glucose (A) and phenol (B) concentrations with discharge time for the MFC in discharge process  
initial concentration of the phenol/g · L<sup>-1</sup>: ○) 0, ●) 0.5, △) 0.8, ×) 1.0

葡萄糖的消耗速率却因苯酚的加入而减慢(图 2A),这可能是因为苯酚在一定程度上抑制了阳极室中细菌的某些生理过程.实验表明,逐次更换培养基使苯酚对细菌起到了一定的驯化作用.例如,在苯酚浓度分别为 0.5、0.8、1.0 g · L<sup>-1</sup>的细菌阳极电解液中,放电过程对应的苯酚消耗量依次为 0.15、0.40、0.46 g · L<sup>-1</sup>.可见,苯酚对细菌催化的放电过程没有抑制作用,而是抑制细菌对葡萄糖的消耗,这可能也是放电时间随苯酚浓度增加而延长的原因之一.

从阳极室电解液中可观察到一些球菌及杆状细菌,说明其培养基的细菌种类是多样的.多种微生物降解有机物过程的复杂性及相关电子传递机理有待进一步研究.总之,以淡水沉积物作为接种源而构建的微生物燃料电池可以利用含苯酚浓度高达 1g · L<sup>-1</sup>的葡萄糖溶液作为燃料,苯酚不仅没有抑制细菌的产电过程,反而在一定程度上优化了电池的性能,使放电电流有所增大,放电时间有所延长.

## 2.2 单一细菌微生物燃料电池

以革兰氏阴性、杆状细菌作单一菌株构建单一细菌微生物燃料电池.该细菌在好氧条件下生长旺盛,消耗有机物迅速.20 h内,其生长使培养基 III 的 COD 值从 1900 ± 100 mg · L<sup>-1</sup>降低到 780 ± 40 mg · L<sup>-1</sup>,并在培养基 II 和培养基 III 中都能够代谢出蓝绿色吩嗪类物质.过氧化氢酶实验显示阳性.据此,似可初步判断该菌当为假单胞菌(Pseudomonas).图 3 表明,该细菌在生长过程中能

够产生具有电化学活性的代谢产物,而其细胞不具有化学活性.

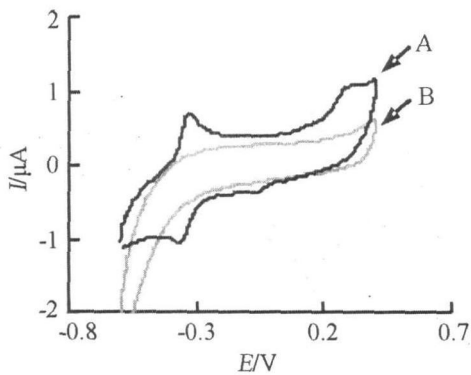


图 3 假单胞菌代谢产物循环伏安曲线 A)细菌生长 22h 后的培养基Ⅲ; B)新鲜培养基Ⅲ

Fig 3 Cyclic voltammograms of metabolic products produced by pure culture A) medium Ⅲ culture after 22h bacterial growth B) fresh medium Ⅲ

图 4表明,用处于生长旺盛期的革兰氏阴性细菌接种后,50 h内,未见电池电流明显增大.重新接种时,加入代谢产物,电流则由  $0.02 \pm 0.01$  mA 增大到  $0.27 \pm 0.02$  mA.然而,仅由代谢产物在电极上的反应并不会出现电流逐渐增大的现象.这一结果表明该细菌在其阳极催化反应中,电流是由细菌在好氧条件下产生的溶解在培养基中的代谢产物,如一些吩嗪类物质,经过氧化还原态的转化而

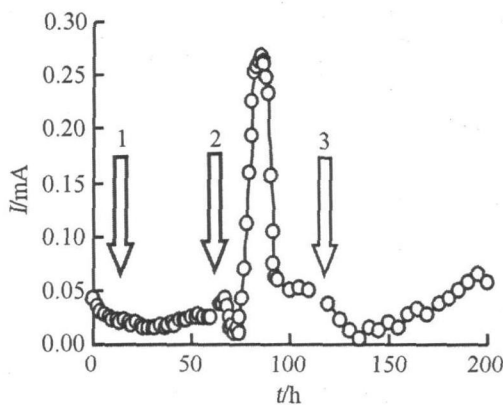


图 4 单一细菌催化的微生物燃料电池放电曲线 1)细菌细胞接种;2)部分代谢产物和细菌细胞接种;3)培养基的更换

Fig 4 Current generation by a MFC catalyzed by pure culture 1) inoculating with bacterial cells 2) with bacterial cells and metabolic products 3) with growth medium replacement

产生的,或者说,电子从细胞到电极的传递是由其代谢产物作为电子介体完成的.所以,更换培养基后,电流没有迅速恢复;这与使用沉积物接种的微生物燃料电池的现象并不一致(见 2.1).

图 5表明,仅当阳极室中存在代谢产物时,细菌才有明显生长.这是因为该细菌借助代谢产物之存在,可以利用电极作为电子受体,在电子传递的同时获得了部分能量而进行生长.细菌的生长可能使阳极区产生更多的代谢产物,并促进代谢产物转移电子效率增大,从而使该微生物燃料电池产生的电流有所增加.但如作为电子介体的代谢产物不存在时,细菌不能直接利用电极作为电子受体,无法生长.

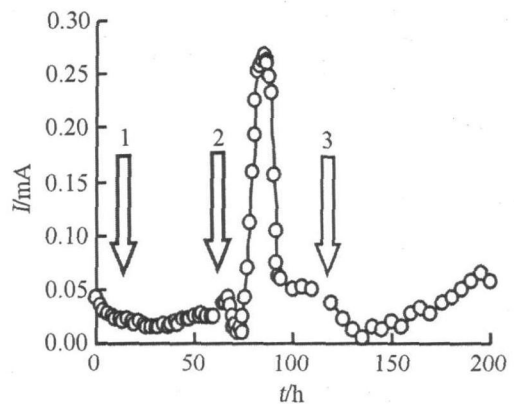


图 5 单一细菌催化的微生物燃料电池中细菌的生长曲线 ○)细菌细胞接种后的阳极室,△)部分代谢产物和细菌细胞接种后的阳极室,×)培养基的更换后的阳极室

Fig 5 Growth of bacteria in MFC catalyzed by pure culture ○) MFC inoculated by bacterial cells △) bacterial cells and metabolic products ×) medium replacement

图 6为上述两种微生物燃料电池阳极表面的 SEM 照片.如图所示,在以葡萄糖为电子供体的电池阳极表面(A)存在着大量球形细菌构成的生物膜,而在以假单胞菌接种的电池阳极表面(B),只有少量的细菌,未形成致密的生物膜.由此可见,在对应的微生物燃料电池中,后者的电流产生机理与前者可能有所不同.然而,由于在电极表面附近,其氧化态电子介体的产生为细菌提供了较为合适生长环境,可能也是引起假单胞菌在电极表面有一定富集(B)的原因.

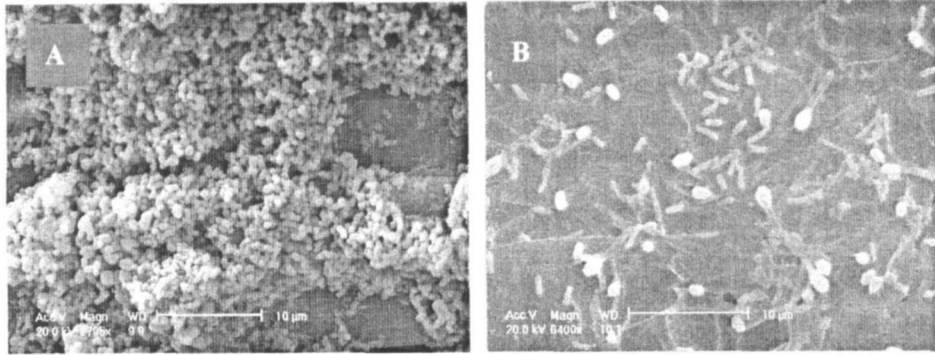


图 6 两种微生物燃料电池阳极表面 SEM 照片

Fig 6 SEM images of the anodes surface for two types of MFCs

A)MFC inoculated by fresh water sediment B)MFC inoculated by pseudomonas

### 3 结 论

淡水沉积物接种的微生物电子转移机理十分复杂,首先体现在沉积物中细菌的多样性. 本文利用淡水沉积物接种,不考虑细菌的种类,得到了由细菌富集的电极. 该电极能够迅速对底物响应,产生电流;而从淡水沉积物中分离的假单胞菌接种时,电流的响应却依赖于溶解态的代谢产物. 实验结果表明:

1) 以淡水沉积物接种、葡萄糖作为电子供体的微生物燃料电池,能够在苯酚高达  $1\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的浓度下较好地工作. 在完全更换新鲜培养基后电流迅速增大主要是由富集在电极表面细菌构成的“生物膜”引起的. 苯酚对细菌代谢起到抑制作用,使葡萄糖的消耗速率降低,但在一定程度上使放电电流有所增加,延长了放电时间.

2) 从淡水沉积物中分离出的假单胞菌株可以利用其在好氧条件下的代谢产物作为电子介体,在厌氧条件下实现电子从细胞到电极的转移,同时得到生长,以该假单胞菌接种的微生物燃料电池体系,其电流的增大与附着在电极表面的细菌无直接关系,确证了该菌株是利用其自身代谢出的溶解态电子介体进行电子转移的机制.

### 参考文献 (References) :

- [1] Liu H, Cheng S, Logan B E. Production of electricity from acetate or butyrate in a single chamber microbial fuel cell [J]. *Environ Sci Technol* 2005, 39, 658-662.
- [2] Min B, Kim J, Oh S E, et al. Electricity generation from swine wastewater using microbial fuel cells [J]. *Water Res* 2005, 39, 4961-4968.
- [3] Oh S E, Logan B E. Hydrogen and electricity production from a food processing wastewater using fermentation and microbial fuel cell technologies [J]. *Water Res* 2005, 39, 4673-4682.
- [4] Heilmann J, Logan B E. Production of electricity from proteins using a single chamber microbial fuel cell [J]. *Water Environ Res* 2006, 78, 531-537.
- [5] Zhang E, Xu W, Diao G, et al. Electricity generation from acetate and glucose by sedimentary bacterium attached to electrode in microbial anode fuel cells [J]. *Journal of Power Sources* 2006, 161, 820-825.
- [6] Logan B E, Regan J M. Electricity producing bacterial communities in microbial fuel cells [J]. *Trends in Microbiology* 2006, 14, 512-518.
- [6] Rabaey Komeel, Verstraete Willy. Microbial fuel cells, novel biotechnology for energy generation [J]. *Trends in Biotechnology* 2005, 23, 291-298.
- [7] Cheng S, Liu H, Logan B E. Increased power generation in a continuous flow MFC with advective flow through the porous anode and reduced electrode spacing [J]. *Environ Sci Technol* 2006, 40, 2426-2432.
- [8] Min B, Cheng S, Logan B E. Electricity generation using membrane and salt bridge microbial fuel cells [J]. *Water Res* 2005, 39, 1675-1686.
- [9] Cheng S, Liu H, Logan B E. Power densities using different cathode catalysts (Pt and CoTMPP) and polymer binders (Nafion and PTFE) in single chamber microbial fuel cells [J]. *Environ Sci Technol* 2006, 40, 364-369.
- [10] Zhao F, Hamisch F, Uwe Schröder, et al. Application of pyrolysed iron (III) phthalocyanine and CoTMPP based oxygen reduction catalysts as cathode materials

- in microbial fuel cells [J]. *Electrochemistry Communications* 2005, 7, 1405-1410.
- [11] Rabaey K, Clauwaert P, Aelteman P, et al. Tubular microbial fuel cells for efficient electricity generation [J]. *Environ Sci Technol* 2005, 39, 8077-8082.
- [12] Kazuko Tanaka, Camen A Vega, Reita Tamamushi. Thionine and ferric chelate compounds as coupled mediators in microbial fuel cells [J]. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 1983, 11, 289-297.
- [13] Park D H, Zeikus J G. Electricity generation in microbial fuel cells using neutral red as an electronophore [J]. *Appl Environ Microbiol* 2000, 66, 1292-1297.
- [14] Reguera G, McCarthy K D, Mehta T, et al. Extracellular electron transfer via microbial nanowires [J]. *Nature* 2005, 435, 1098-1101.
- [15] Bond D R, Lovley D R. Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes [J]. *Appl Environ Microbiol* 2003, 69, 1548-1555.
- [16] Prasad D, Arun S, Munugesan M, et al. Direct electron transfer with yeast cells and construction of a mediatorless microbial fuel cell [J]. *Biosensors and Bioelectronics* 2007, 12, 2604-2610.
- [17] Rabaey K, Boon N, Höfte M, et al. Microbial phenazine production enhances electron transfer in biofuel cells [J]. *Environ Sci Technol* 2005, 39, 3401-3408.

## Electricity Generation in Microbial Fuel Cells Catalyzed by Mixed Culture and Pure Culture

SHUANG Chen-dong ZHANG En-ren\*, DIAO Guo-wang FAN Fang-fang YUAN jie

(Department of Chemistry and Chemical Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225002, Jiangsu, China)

**Abstract:** Microbial fuel cells (MFCs) were constructed by inoculating fresh sedimentary microorganisms. Effect of phenol on performance of MFCs was investigated. The results showed that the generation of electrical current was induced by bacteria attached on the surface of the anode. Presence of phenol reduced the rate of glucose consumption and extended the duration of electricity generation with the same addition of glucose. In addition, the electricity generation by a single strain (belonging to *Pseudomonas* species) separated from the sedimentary MFC was also investigated. The experimental results indicated that the presence of metabolic intermediates which exhibited electrochemical activity was necessary for the electricity production. Analysis of GC/MS showed that the metabolic intermediates included phenazine derivatives which can function as electron shuttles between the bacteria cells and the anode, realizing the electron transfer from the cells to the electrode.

**Key words:** microbial fuel cells, fresh water sediment, phenol, *Pseudomonas*, electron mediator