

接种量对 MEC 阳极生物膜氢气产率的影响

刘洪周, 杨思霞, 刘海波, 王楠, 李建昌*
(云南师范大学太阳能研究所, 云南昆明 650500)

摘要:以葡萄糖为底物,采用单池 MEC 反应器探究不同接种量下 MEC 阳极生物膜的氢气产率与阳极表面电活性微生物之间的关系。结果表明,无电解电压的对照组并未有阳极生物膜形成,对照组、20%、30%和40%接种量下产生的最大电流分别为0、7.5、13.6、0.7 mA,氢气产率分别为0.1、0.87、1.52、1.28 mol H₂/mol-G,其中,30%接种量下的阳极膜表现出较好的氢气产率和微生物多样性。16S rRNA 测序结果表明,各实验组阳极生物膜中占主导的产电菌均以 *Clostridium* 和 *Geobacter* 为主,30%接种量条件下阳极膜微生物种类、优势菌丰度及生物量都最丰富,其中电活性微生物丰度为64.9%,且相对丰度不受接种量的影响。

关键词:接种量;微生物电解池;阳极生物膜;产氢;电活性微生物

中图分类号:O646

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2022)06-0135-05

DOI:10.16606/j.cnki.issn0253-4320.2022.06.027

Influence of inoculation amount on hydrogen yield of MEC anode biofilm

LIU Hong-zhou, YANG Si-xia, LIU Hai-bo, WANG Nan, LI Jian-chang*

(Solar Energy Research Institute, Yunnan Normal University, Kunming 650500, China)

Abstract: Taking glucose as the substrate, a single-cell MEC reactor is used to explore the relationship between the hydrogen yield of MEC anode biofilm and the electroactive microorganisms on the anode surface under different inoculation amount. The results show that the control group without electrolysis voltage has not led to the formation of anode biofilm, and the maximum current values generated by the control group, 20%, 30%, and 40% inoculation amount groups are 0 mA, 7.5 mA, 13.6 mA, and 10.7 mA, respectively, and the hydrogen yields are 0.1 mol H₂/mol-G, 0.87 mol H₂/mol-G, 1.52 mol H₂/mol-G and 1.28 mol H₂/mol-G, respectively. Among them, the anode membrane under 30% inoculation amount group shows a higher hydrogen yield and a good microbial diversity. The results through 16S rRNA sequencing show that the dominant electricity-producing bacteria in the anode biofilms of each experimental group are mainly *Clostridium* and *Geobacter*. The types of anode membrane microorganisms, dominant bacteria abundance and biomass are the most abundant under the 30% inoculation amount. The abundance of active microorganisms is 64.9%, and the relative abundance is not affected by the inoculation amount.

Key words: inoculation amount; microbial electrolysis cell; anode biofilm; hydrogen production; electroactive microorganisms.

微生物电解池 (Microbial Electrolysis Cell, MEC) 是一种能够有效降解有机物并产生生物气的新技术,最初于2005年由Liu等^[1-2]研究团队发现,是发酵制氢领域的重大发现。与厌氧消化系统相比,MEC产氢有更高的能源转化率和适用范围广等优点^[3],目前关于MEC制氢技术得到了科研人员的广泛关注^[4-5]。

在MEC的产氢过程中,底物的分解和氢气的产生往往由微生物代谢主导,但电解电压、电极间距、pH和温度等是影响阳极生物膜形成的重要因素^[6-8]。Yang等^[9]研究不同阳极电位对MEC阳极生物膜的影响中发现,当阳极电位为0.4 V时,阳极

生物膜有较高的电活性和胞外电子传递效率。Nimje^[10]研究发现,pH可以影响MEC微生物的新陈代谢速率,从而可以影响MEC的性能。邵琼丽等^[11]在以乙酸钠为底物探究温度对MEC的影响中发现,35℃有利于形成电活性较好的阳极膜,电流密度高达12.25 A/m²。显然,阳极生物膜性能受多种因素影响^[12],但有关接种量对阳极生物膜形成和性能的影响报道的相对较少。

笔者以葡萄糖为底物、接种量为单一变量构建MEC实验组,以0.0 V电解电压和120 g接种物的MEC为对照组,探究MEC阳极生物膜的氢气产率与微生物群落的关系。

收稿日期:2021-06-28;修回日期:2022-03-28

基金项目:国家自然科学基金项目(21968038)

作者简介:刘洪周(1997-),男,硕士研究生,研究方向为微生物电解池制氢,1827181806@qq.com;李建昌(1966-),男,博士,教授,研究方向为微生物电解池技术,通讯联系人,691045922@qq.com。

1 材料与方法

1.1 接种物

接种物采用以猪粪为底物驯化后的厌氧活性污泥,经测定 pH 为 7.9, TS 为 15.04%, VS 为 8.14%。

1.2 实验装置

实验采用有机玻璃单池 MEC 反应器,有效容积为 400 mL,主要由发酵瓶、排水集气装置、电极、电源、磁力搅拌器和电流电压记录仪等部分组成,具体构造如图 1 所示。阳极为石墨电极(3 cm×3 cm×0.2 cm),阴极为铂电极(3 cm×3 cm×0.2 cm),电极间的垂直距离为 3.0 cm。阴极和阳极浸没于发酵液中并与宽屏无纸记录仪相连,阳极、阴极和参比电极(Ag/AgCl)构成三电极测试体系。

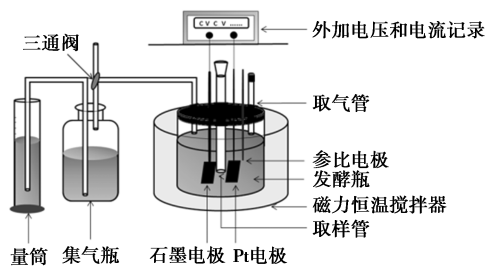


图 1 MEC 单池反应器

1.3 实验设计

(1) 阳极生物膜培养阶段:以接种量为单一变量设置 3 个水平为实验组,接种量质量分数分别为 20%、30%、40%,每组 3 个平行实验。对照组接种量为 30% 和 0.0 V 电压的 MEC。实验前在反应器中加入接种物(80、120、160 g)、10 mL 微量元素液、150 mL 缓冲营养液(微量元素液和缓冲营养液配比如文献[13]所述)和去离子水至反应体系的总质量为 400 g,随后在发酵瓶中通入氮气 10 min 使之迅速处于厌氧状态。启动时底物葡萄糖(G)加入质量为 1.0 g,控制质量浓度为 2.5 g/L。通过水浴加热实现实验过程中温度为 35℃,另外实验组电解电压均在 1.0 V 条件下运行。

(2) 阳极生物膜产氢阶段:当发现阳极生物膜形成后,取出发酵瓶中阳极生物膜并转移到高温灭菌的培养基中进行阳极生物膜产氢,特殊地是此时培养基中仅有质量浓度为 2.5 g/L 的葡萄糖溶液,且运行温度和电解电压与培养阶段相同。

1.4 分析方法

(1) 采用宽屏无纸记录仪(浙江 SIN-R7000A)每 24 h 记录 1 次电流值。

(2) 采用排水集气法收集气体,日产气量由量筒刻度直接读取。

(3) 采用电化学工作站(CHI660E,中国上海)测试循环伏曲线用于分析阳极膜电化学活性。测试条件为:扫描范围为 -0.8 ~ 0.8 V,扫描速率为 10 mV/s。

(4) 采用气相色谱仪(GC9790 II,浙江)测量气体样品的组成,色谱柱使用不锈钢填充柱,检测器为热导检测器(TCD)。

(5) 采用磷脂法测定生物量,实验通过磷钼蓝分光光度法测量磷脂含量。

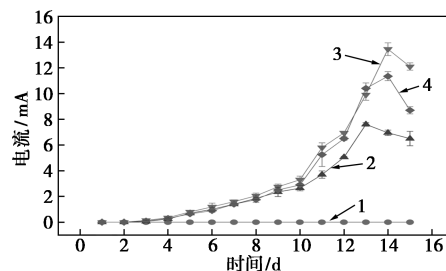
(6) 采用高通量基因测序分析微生物群落结构,待实验结束后取出微生物样品保存于 -80℃ 的超低温冰箱中。微生物样品委托诺禾致源基因公司进行高通量测序及数据优化分析。在微生物测试结果中按 97% 的相似度进行聚类,同时对各个微生物样品的物种注释信息进行丰度统计,并选取丰度排名前列的物种注释信息。

2 结果与讨论

2.1 接种量对 MEC 阳极生物膜形成的影响

2.1.1 MEC 阳极生物膜培养阶段的电流及循环伏安(CV)曲线

当向 MEC 施加电压时,所获得的电流被认为是生物电化学反应发生的指标,且电流越大,电活性微生物数量越多,电活性也越强^[14],其原因是适当的电压促使电活性微生物在阳极表面富集所致^[15]。因此,为讨论阳极生物膜的形成状态,实验监测了 MEC 阳极生物培养阶段的电流,结果如图 2 所示。对照组未施加电压,因此并未产生电流,实验组施加 1.0 V 电压条件下第 3 d 后逐渐产生电流,表明电活性微生物在电极表面开始生长富集^[16]。随培养的进程,电流变化在第 12 d 趋于稳定,接种量为 20%、30% 和 40% 的实验组中最大电流分别为 7.5、

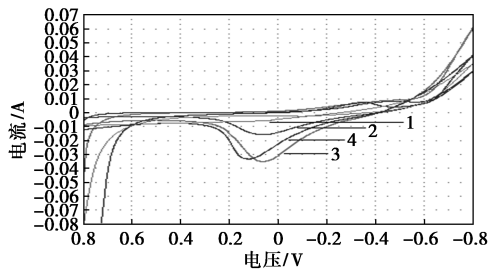


1—对照组;2—20%;3—30%;4—40%

图 2 不同接种量条件下电流随时间变化情况

13.6 mA 和 10.7 mA,表明大量电活性微生物已富集在电极表面,且接种量为 30% 的实验组形成的阳极生物膜电活性微生物数量最多,其原因是电活性微生物富集在电极表面降低了反应发生的过电位,同时良好的生物膜促进电子转移所导致的^[15]。

CV 曲线中氧化还原峰表征阳极生物膜的电活性^[8],扫描结果如图 3 所示。由图 3 中可以看出,实验组中均有氧化还原峰,表明阳极生物膜形成状态良好,但接种量会不同程度地影响阳极生物膜的形成。接种量为 20%、30% 和 40% 实验组的峰值大小顺序为:30% > 40% > 20%,表明接种量为 30% 时,阳极生物膜的电活性最高,电极表面的电活性微生物较活跃^[17]。



1—对照组;2—20%;3—30%;4—40%

图 3 不同接种量下 MEC 阳极膜的 CV 曲线

2.1.2 MEC 阳极生物膜形成阶段产气量变化特征

产气量和气体成分是 MEC 运行状态的最直观的表现,不同接种量条件下 MEC 体系的产气特征如表 1 所示。

表 1 阳极膜培养过程的气体产量

阳极膜	累积产气量/mL	累积产甲烷量/mL	累积产氢量/mL
对照组	1610	517	38
20%	1294	452	61
30%	1998	755	97
40%	2380	878	82

由表 1 中可以看出,接种为 30% 的实验组较对照组的累积产气量、累积产甲烷量和累积产氢量均有所提升,二者的区别仅是有无电解电压,因此电解协助促进了厌氧消化的产气性能。此外,在不同接种量条件下,接种量越大,累积产气量越高,说明适量的接种物促进底物的降解产气,且 CH_4 产量随着接种量的增加而提高,其原因是微生物作用下部分 H_2 还原 CO_2 形成甲烷^[18],也有研究表明,电活性微生物促进产甲烷菌消耗乙酸产甲烷^[19-20],所以各实验组表现出良好的产甲烷特征。

电流、循环伏安曲线及产气量的变化特征共同说明 MEC 在培养阶段已形成运行稳定的阳极生物膜。为进一步讨论阳极生物膜的产氢性能,将培养好的阳极膜转移到高温灭菌的培养基中进行阳极生物膜产氢实验,此时培养基中仅只有质量浓度为 2.5 g/L 的葡萄糖溶液,且运行温度和电解电压与培养阶段相同。

2.2 接种量对 MEC 阳极生物膜氢气产率的影响

2.2.1 MEC 阳极生物膜的氢气产率

氢气产率为每摩尔葡萄糖能产生氢气的物质的量,各实验组培养的阳极膜的氢气产率如表 2 所示。

表 2 各实验组培养的阳极膜的氢气产率

阳极膜	对照组	实验组		
		20%	30%	40%
氢气产率/ $[\text{mol} \cdot (\text{mol-G})^{-1}]$	0.1	0.87	1.52	1.28

由表 2 中可以看出,对照组中氢气产率为 0.1 mol H_2 /mol-G。接种量为 20%、30% 和 40% 的实验组中氢气产率分别为 0.87、1.52 mol H_2 /mol-G 和 1.28 mol H_2 /mol-G。接种量为 30% 的实验组的氢气产率是对照组和接种量为 20% 和 40% 的实验组的 15.2 倍、1.74 倍和 1.19 倍。同时单因素方差分析 ($\alpha=0.05$) 发现电压及接种量对氢气产率有显著影响。接种量为 30% 时,形成的阳极生物膜有较好的产氢能力,其原因与生物膜量、微生物种类、丰度及电活性有关,因此将进一步从微生物群落结构讨论 MEC 阳极生物膜的产氢性能。

2.2.2 MEC 阳极生物膜的生物量

通过磷钼蓝分光光度法测定 MEC 阳极膜上的生物量,取石墨阳极经处理后测得的数据如表 3 所示。

表 3 阳极膜上磷质量浓度对应的吸光度

阳极膜	对照组	实验组		
		20%	30%	40%
吸光度/A	0.001	0.072	0.126	0.085
磷质量浓度/ $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	0.021	1.98	3.84	2.43

MEC 阳极膜上的生物量可以由磷质量浓度大小来反应,从表 3 中可以看出,各实验组的电极表面都有生物膜形成,而对照组膜生物量最小,实验组的膜生物量大小为 20% < 40% < 30%,单因素方差分析 ($\alpha=0.05$) 表明接种量对阳极生物膜量有显著影响,但 MEC 阳极膜上的生物量并没有随着接种量的

增大而增大,其原因是生物膜量不仅受接种量的影响,还受反应器微环境的影响^[21]。

2.2.3 OTU 聚类分析

实验中对照组未形成生物膜,故不考虑对照组的微生物分析。通过比较各实验组阳极膜微生物群落,获得通用和唯一的 OTU,每个 OUT 表示 1 种菌株,结果如图 4 所示。3 个水平的 MEC 阳极生物膜的 OTU 数分别为 549、838、372,当接种量为 30% 时,OTU 最大,表明该条件下的微生物群落比其余实验组丰富。在 20% 和 30% 接种量、40% 和 30% 接种量及 20% 和 40% 接种量条件下阳极生物膜的共有 OUT 分别为 228、300 和 160,分别占两者总数的 18.84%、21.63% 和 17.37%。表明 30% 和 40% 的接种量条件下形成的生物膜具有较高的菌株相似性。此外,微生物种类对 MEC 阳极生物膜产氢性能有显著影响。

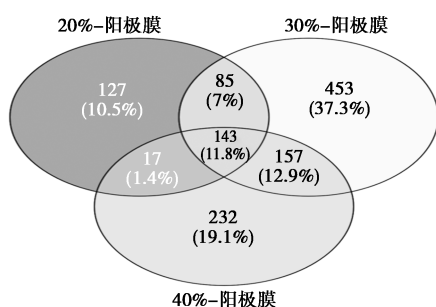


图 4 不同实验组微生物 OUT 比较

2.2.4 MEC 阳极膜微生物的多样性分析

根据 OTU 列表中的各样品物种丰度情况计算 Alpha 多样性指数,结果如表 4 所示。

表 4 Alpha 多样性指数

接种量/%	ace	Chao1	Observed-otus	shannon	simpson
20	526.10	563.05	372	4.30	0.88
30	1269.99	1311.67	838	3.78	0.65
40	753.74	748.75	549	4.30	0.29

多样性分析(Alpha 多样性)反映微生物群落的丰富度和多样性。由表 4 中可以看出,菌种丰度指数(ace、chao1)随着接种量的增多先增大后减小,而菌种多样性指数(shannon、simpson)变化不明显,30% 接种量条件下 ace 指数和 chao1 指数高达 12 369.99 和 1 311.67,其氢气产率也最大为 1.52 mol H₂/mol-G,表明菌种丰度与产氢性能相关。

2.2.5 MEC 阳极生物膜群落结构特征

以丰度>1%为阈值,筛选出各实验组中的 6 个

优势菌门和 10 个优势菌属,结果如图 5 和图 6 所示。

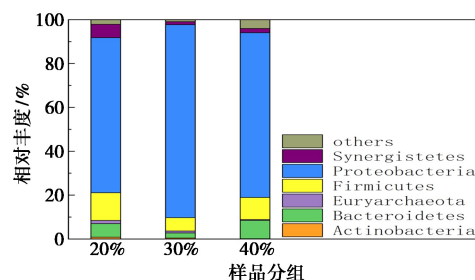


图 5 门水平下的优势菌群相对丰度叠图

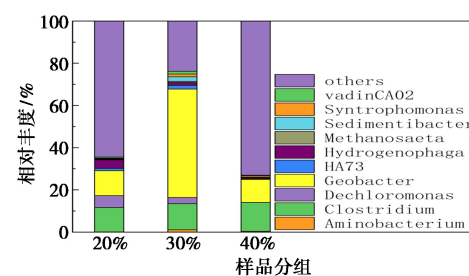


图 6 属水平下优势菌群相对丰度叠图

从图 5 中可以看出,接种量为 20%、30% 和 40% 实验组的 MEC 阳极生物膜中 Proteobacteria 菌门最丰富,相对丰度分别为 70.7%、88%、75.1%,其次是 Firmicutes 菌门,相对丰度分别为 10.1%、6%、12.6%。据研究报告,Proteobacteria、Firmicutes 菌门的多数微生物具有产电活性^[22],因此,MEC 阳极膜上存在大量电活性微生物,说明电活性微生物的丰度与氢气产率直接相关,且接种量的变化并没有影响优势电活性微生物的主导作用。

从图 6 中可以看出, *Sedimentibacter*、*Syntrophomonas* 为水解性细菌对底物进行初步降解,在各实验组中相对丰度为 2%~7%。水解产物为电活性微生物提供合适的基质^[16],因此水解性微生物共生也可提高 MEC 产氢产率和能量效率^[23]。在优势菌属中 *Clostridium* (接种量为 20%、30% 和 40% 时的相对丰度分别为 11.5%、13.6%、12.9%, 30% > 40% > 20%) 和 *Geobacter* (接种量为 20%、30% 和 40% 时的相对丰度分别为 11.7%、51.3%、10.8%, 30% > 20% > 40%) 为电活性微生物,各实验组中的优势电活性微生物均以 *Clostridium* 和 *Geobacter* 为主。研究表明,MEC 可以为 *Geobacter* 和 *Clostridium* 菌属提供良好的生长代谢环境^[9,24-25],因此,接种量为 30% 实验组的产电微生物最丰富,其氢气产率也最高,其原因是大量的电活性微生物促进电子由微生物到阳极表面的传递效率致使大量的氢离子在阴极表面被

还原^[24],从而提高了氢气产率。

3 结论

探究了微生物电解池促进厌氧消化的氢气产率和电活性微生物的富集作用,结果表明:

(1) MEC 技术的介入促进 H₂ 还原 CO₂, 显著提高了厌氧消化的氢气产率,接种量为 30% 的实验组相比其余实验组表现出最佳的氢气产率,为 1.52 mol H₂/mol-G。

(2) 通过单因素方差分析表明,接种量对 MEC 阳极生物膜的氢气产率有显著影响,但不呈特定规律变化。

(3) MEC 阳极生物膜上的优势产电菌以 *Clostridium* 和 *Geobacter* 为主,其中接种量为 30% 实验组中 *Clostridium* 和 *Geobacter* 的相对丰度最大,分别为 13.6% 和 51.3%,氢气产率也最大,表明电活性微生物的相对丰度直接影响氢气产率,但接种量对相对丰度无显著影响。

参考文献

- [1] Liu H, Grot S, Logan B E. Electrochemically assisted microbial production of hydrogen from acetate [J]. *Environmental Science and Technology*, 2005, 39(11): 4317-4320.
- [2] Yu Z, Leng X, Zhao S, et al. A review on the applications of microbial electrolysis cells in anaerobic digestion [J]. *Bioresource Technology*, Elsevier, 2018, 255: 340-348.
- [3] 孙和临, 邵琼丽, 李建昌, 等. 温度对 MEC 阳极膜形成及胞外聚合物的影响 [J]. *化工进展*, 2019, 38(8): 3809-3815.
- [4] Cerrillo M, Vinas M, Bonmati A. Overcoming organic and nitrogen overload in thermophilic anaerobic digestion of pig slurry by coupling a microbial electrolysis cell [J]. *Bioresource Technology*, 2016, 216: 362-372.
- [5] Kadier A, Simayi Y, Abdeshahialan P, et al. A comprehensive review of microbial electrolysis cells (MEC) reactor designs and configurations for sustainable hydrogen gas production [J]. *Alexandria Engineering Journal*, Faculty of Engineering, Alexandria University, 2016, 55(1): 427-443.
- [6] Wang K, Sheng Y, Cao H, et al. Impact of applied current on sulfate-rich wastewater treatment and microbial biodiversity in the cathode chamber of microbial electrolysis cell (MEC) reactor [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2017, 307: 150-158.
- [7] Cheng S, Logan B E. High hydrogen production rate of microbial electrolysis cell (MEC) with reduced electrode spacing [J]. *Bioresource Technology*, Elsevier Ltd, 2011, 102(3): 3571-3574.
- [8] Choi K S, Kondaveeti S, Min B. Bioelectrochemical methane (CH₄) production in anaerobic digestion at different supplemental voltages [J]. *Bioresource Technology*, Elsevier, 2017, 245: 826-832.
- [9] Yang G, Huang L, Yu Z, et al. Anode potentials regulate *Geobacter* biofilms: New insights from the composition and spatial structure of extracellular polymeric substances [J]. *Water Research*, Elsevier Ltd, 2019, 159: 294-301.
- [10] Nimje V R, Chen C Y, Chen C C, et al. Glycerol degradation in single-chamber microbial fuel cells [J]. *Bioresource Technology*, Elsevier Ltd, 2011, 102(3): 2629-2634.
- [11] 邵琼丽, 李建昌, 邓盛娇, 等. 温度对形成 MEC 阳极膜的影响 [J]. *化学研究与应用*, 2018, 30(12): 2224-2230.
- [12] Zeppilli M, Chouchane H, Scardigno L, et al. Bioelectrochemical vs hydrogenophilic approach for CO₂ reduction into methane and acetate [J]. *Chemical Engineering Journal*, Elsevier, 2020, 396(April): 125243.
- [13] 许坤德, 李建昌, 邵琼丽, 等. 初始 pH 值对 MEC 阳极膜的产氢性能和微生物群落的影响 [J]. *化学研究与应用*, 2020, 32(12): 1004-1656.
- [14] Lu L, Ren Z J. Microbial electrolysis cells for waste biorefinery: A state of the art review [J]. *Bioresource Technology*, 2016, 215: 254-264.
- [15] Perez D, Lie T T, Weber C C. Operationalization of a microbial electrolysis cell: The interaction of the primary factors for energy storage efficiency [J]. *Bioresour Technol*, 2021, 326: 124788.
- [16] Dhar B R, Sim J, Ryu H, et al. Microbial activity influences electrical conductivity of biofilm anode [J]. *Water Research*, Elsevier Ltd, 2017, 127: 230-238.
- [17] 毛政中, 孙怡, 黄志鹏, 等. 微生物电解池产甲烷技术研究进展 [J]. *化工进展*, 2019, 70(7): 2411-2425.
- [18] Park J, Lee B, Tian D, et al. Bioelectrochemical enhancement of methane production from highly concentrated food waste in a combined anaerobic digester and microbial electrolysis cell [J]. *Bioresource Technology*, Elsevier Ltd, 2018, 247: 226-233.
- [19] 方晓瑜, 李家宝, 芮俊鹏, 等. 产甲烷生化代谢途径研究进展 [J]. *应用与环境生物学报*, 2020, 39(1): 1-9.
- [20] 张霞, 吴振斌, 肖莹, 等. 微生物燃料电池中产电微生物的研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2017, 37(3): 46-49.
- [21] Peng L, Zhang X T, Yin J, et al. *Geobacter sulfurreducens* adapts to low electrode potential for extracellular electron transfer [J]. *Electrochimica Acta*, Elsevier Ltd, 2016, 191: 743-749.
- [22] Koch, Harnisch F. Is there a Specific Ecological Niche for Electroactive Microorganisms? [J]. *ChemElectroChem*, 2016, 3(9): 1282-1295.
- [23] Liu W, Wang A, Sun D, et al. Characterization of microbial communities during anode biofilm reformation in a two-chambered microbial electrolysis cell (MEC) [J]. *Journal of Biotechnology*, Elsevier B.V., 2012, 157(4): 628-632.
- [24] Cheng H H, Whang L M, Lin C A, et al. Metabolic flux network analysis of fermentative hydrogen production: Using *Clostridium tyrobutyricum* as an example [J]. *Bioresource Technology*, Elsevier Ltd, 2013, 141: 233-239.
- [25] Lee B, Park J G, Shin W B, et al. Microbial communities change in an anaerobic digestion after application of microbial electrolysis cells [J]. *Bioresource Technology*, Elsevier Ltd, 2017, 234: 273-280. ■