

微生物燃料电池的基础研究

詹亚力, 王 琴, 王 靖, 闫光绪, 郭绍辉

(中国石油大学化学科学与工程学院, 北京 102249)

摘要:构建了一个无中间体、无膜的微生物燃料电池, 电池以生活污水为初始接种体, 以醋酸钠水溶液为原料, 考察了溶液浓度和电子受体等对电池性能的影响, 分析了电池中微生物的反应动力学特征, 并对电池中微生物的种属进行了鉴定。结果显示, 微生物燃料电池中电流的产生主要是依靠电极表面吸附微生物直接将代谢产生的电子传递给电极表面所致; 溶液 COD 的降解符合一级反应动力学特征; 当溶液中存在 O_2 和 NO_3^- 时溶液输出电压或电量均会降低, 前者主要是发生好氧呼吸, 后者主要是发生了反硝化作用。通过 16S rDNA 的基因分析, 确定了电池中的优势微生物为假单胞菌属。

关键词:微生物燃料电池; 醋酸钠; 动力学特征; 假单胞菌

中图分类号: TM911.45

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2008)06-0040-03

A fundamental study on microbial fuel cell

ZHAN Ya-li, WANG Qin, WANG Jing, YAN Guang-xu, GUO Shao-hui

(State Key Laboratory of Heavy Oil Processing, China University of Petroleum, Beijing 102249, China)

Abstract: The construction of a microbial fuel cell without any mediator and membrane is presented in this paper, and domestic wastewater is used as inoculants and sodium acetate as its fuel. The effects of acetate concentration, oxygen and nitrate on the cell are investigated with the kinetic characteristics of the microbial in the cell analyzed. The results show that: ① it is the microbial adsorbed on the anode, not the one which exists in the solution, that transfers the electron to anode; ② the COD degradation features a model of one-grade reaction; ③ oxygen and nitrate is adverse to voltage output because the former makes electron transfer to oxygen and the latter makes the nitrification occur during the course of metabolism; ④ the preferential microbe is judged as *Pseudomonas SP. partial* by 16S rDNA gene analysis.

Key words: microbial fuel cell; sodium acetate; kinetic characteristics; *Pseudomonas SP. partial*

微生物燃料电池(MFC)是一种以微生物为阳极催化剂, 将化学能直接转化成电能的装置, 基本结构为阴极池加阳极池。根据电池阴极池结构的不同, MFC可分为单池(空气作阴极)和双池型(水溶液作阴极); 根据电池中是否使用质子交换膜可分为有膜型和无膜型, 而根据阳极电解质中是否外加中间体则可将MFC分为直接MFC和间接MFC。随着研究的进展, 现在无中间体无质子交换膜MFC的电池输出功率可达几百 mW/m^2 ^[1-4]。在无中间体燃料电池的研究中, 接种体的选择是MFC成功启动的关键。目前使用的接种体大多为混合菌群, 如天然厌氧环境中的污泥、污水处理厂的厌氧段出水或活性污泥等, 这些混合菌体在电池中是否存在优势微生物, 微生物在电池中的作用机制是什么等, 均是MFC研究的核心问题。笔者直接以生活污水为接种体, 以醋酸钠为燃料, 构建了一个无中间体无膜微

生物燃料电池, 在对影响电池性能的因素进行考察的基础上, 分析了电池中微生物生化反应动力学特征, 并对电池中的优势微生物进行分离和16S rDNA分析, 以确定电池中的优势微生物种属。

1 实验部分

1.1 电池基本结构

电池反应室为圆筒形, 柱长4 cm, 内径3 cm, 材质为加厚的有机玻璃。圆筒的一端以盲板封闭, 圆筒与盲板之间夹着一张碳纸作为阳极, 另一端以载铂碳布(铂含量为0.35 mg/cm)封盖, 同时碳布作为阴极。

1.2 微生物驯化方法

直接将混有大粪滤液的校园生活污水(COD 800~1 000 mg/L, 本文中COD按国家标准重铬酸化法测定^[5])加入到电池中, 每2天更换一次溶液,

收稿日期: 2008-03-13

基金项目: 中国石油天然气集团公司石油科技中青年创新基金资助项目(05E7021)

作者简介: 詹亚力(1970-), 男, 博士生, 副教授, 主要从事“三废”处理与综合利用研究, wylzhan@cup.edu.cn; 郭绍辉(1958-), 男, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为“三废”处理与综合利用, 通讯联系人, 010-89733316。

经6次更换后,电池电压输出达到了383 mV左右(外电阻500 Ω)。然后将生活污水与醋酸钠溶液(500 mg/L)按1:5的比例混合后置于MFC的阳极池中,2天后更新溶液,更新2次后直接以混有无机营养盐的醋酸钠溶液加入到MFC中,直到电池输出最大电压达到稳定。无机营养液按文献[6]配制,在加入到电池以前通入N₂以置换出溶液中的溶氧。

1.3 16S rDNA的提取及PCR扩增方法

16S rDNA的提取及PCR(polymerase chain reaction)扩增方法为:将电池中的微生物分离纯化后提取单个细菌的16S rDNA后,对细菌16S rDNA V6-V8区进行PCR扩增,扩增后的DNA样品用琼脂糖凝胶电泳检查扩增结果。扩增以埃希杆菌属大肠杆菌(*Escherichia coli*)16Sr DNA序列960到1392核苷酸片段为引物。正向引物为5'-(GC clamp 1)-AAC GCG AAG AAC CTT AC-3',反向引物为1392r 5'-ACG GGC GGT GTG TAC A-3',引物均由北京三博远志生物技术有限责任公司合成。

1.4 DNA测序及同源性比较

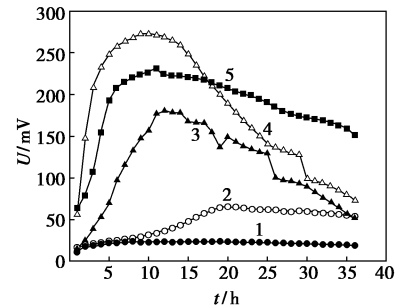
PCR扩增产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳检测合格后委托北京英俊生物公司进行DNA测序。DNA测序结果提交NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)用BLAST进行检索和同源性比较,得到细菌菌属。

2 结果与讨论

2.1 微生物驯化过程的输出电压变化及特征分析

图1为以生活污水作为营养液时,电池分批换水过程中输出电压随时间变化曲线。每次换水后,电池电压均随时间变化,在达到峰值并维持一段时间后下降;在首次加入营养液时电池输出电压很低(不到20 mV,外接电阻500 Ω),经多次换水后,电压峰值逐步增大,电压上升到峰值所需的时间缩短,峰值延续时间延长。以上现象说明:①电池阳极电势的产生主要是由于微生物吸附在电极表面而致,而不是由于悬浮在溶液中的微生物或者化学物质所产生的;②电池的输出电压与电极表面的微生物数量有关,在电池微生物驯化的初期,吸附在电极表面的

微生物数量较少,因此能够传递给电极的电子数量较少,输出电压较低;而经多次换水后,电池表面吸附的微生物达到饱和,因此电压输出随时间的变化曲线基本稳定。



曲线标号即为次数

图1 驯化培养阶段电池电压随时间的变化图

2.2 电池性能随时间的变化

当电池输出性能稳定后,考察电池各种性能(外接电阻500 Ω)随时间的变化,结果见表1。前12 h内,电池产生的库仑量随时间呈直线增长,12 h后输出电量增长幅度减小。初始阶段电池库仑转化率较低,而随时间变化,电池库仑转化率逐步升高,到12 h时,最大升高到46.9%,到24 h时略微下降,但仍维持在40%以上。初始阶段转化率较低的主要原因可能是溶液中还有少量残余的O₂存在,而电池运行足够长时间后,库仑效率略微下降主要有2方面原因:一是电池中底物浓度的降低导致微生物的代谢活性降低,二是溶液中悬浮微生物增多,不能转移到电极上的电子增多。其 $\ln(C/C_0)$ 与时间 t 之间成直线关系, $\ln(C/C_0) = -0.06716 t$, $r = 0.9923$ 。可见溶液中醋酸钠的总生化降解动力学过程属于一级反应。

表1 电池输出电量和溶液COD随时间的变化

时间/h	0	2	5	8	12	24
出水 COD/mg·L ⁻¹	394	346	279	215	203	75
COD降解率/%	0	12.2	29.2	45.4	48.5	81.0
库仑转化率/%	0	31.8	32.5	33.5	46.9	41.9
电量/C	0	5.1	12.6	20.2	30.3	45.1

(上接第39页)

- [15] Ohta Y, Sumida K, Nakada Y. Purification and properties of a sulfide-oxidizing enzyme from *Streptomyces* sp. strain SH91[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1997, 43: 1097 - 1101.
- [16] Nakada Y, Ohta Y. Purification and properties of hydrogen sulfide oxidase from *Bacillus* sp BN53-1[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 1999, 87(4): 452 - 455.

- [17] Mohapatra B R, Goud W D, Dinardo O, et al. Optimization of culture conditions and properties of immobilized sulfide oxidase from *Arthrobacter* species[J]. Journal of Biotechnology, 2006, 124(3): 523 - 531.
- [18] 栾兴社, 王桂宏, 黄俊, 等. 链霉菌 LD048 硫化物氧化酶的催化机理及酶学特征[J]. 现代化工, 2006, 26(z2): 88 - 91, 93.
- [19] 栾兴社, 黄俊, 张克峰, 等. 链霉菌 LD048 硫化物氧化酶的提取及毒理特征研究[J]. 科学月刊, 2007, 27(3): 42 - 44. ■

2.3 醋酸钠初始浓度对电池性能的影响及电池生化反应动力学分析

从表 2 可见, 电池最大输出电压、电流密度和功率密度随醋酸钠浓度提高而增大, 但醋酸钠质量浓度高于 400 mg/L 以后, 增长速率趋缓。文献[7]认为, 无中间体微生物燃料电池中, 微生物向电极表面传递电子主要依靠微生物细胞膜上的细胞色素 C 进行, 因此微生物与电极表面的紧密接触是电池运行的必要条件, 而电池经过长期运行后, 微生物在电极表面的吸附达到饱和, 因此电池输出功率仅与电极表面吸附微生物的代谢反应速率相关, 而微生物代谢反应速率又决定于醋酸钠浓度的高低, 当醋酸钠浓度低时, 底物醋酸钠的浓度增加使微生物代谢反应速率迅速增大, 但醋酸钠浓度高于某一限值后, 电极表面的微生物代谢反应速率达到峰值, 单位时间内转移到电极表面的电子数量达到峰值, 因此继续增大醋酸钠浓度, 电池输出功率增长较小。

表 2 醋酸钠浓度改变时 MFC 的性能参数

醋酸钠质量 浓度/mg·L ⁻¹	V _{max} / mV	I _{max} / mA	W _{max} / mW·m ⁻²	库仑 效率/%	COD 去 除率/%
100	119.11	0.24	40.16	89.23	21.53
200	158.59	0.32	71.20	76.47	36.09
300	236.02	0.47	157.69	40.42	65.72
400	304.20	0.61	261.96	39.09	76.05
500	317.65	0.64	285.64	42.27	80.81
600	328.67	0.65	305.80	37.82	83.57
700	320.90	0.64	291.51	28.65	87.02
800	349.18	0.69	345.16	27.43	86.50

电池更新溶液 36 h 后的 COD 去除率随醋酸钠浓度的增大而提高, 但库仑效率下降。这可能是由于电极上微生物降解醋酸钠的速率是确定的, 因此随醋酸钠浓度的增加, 使其完全降解所需的时间相应地延长, 而随时间延长, 溶液中游离微生物的数量增多。游离微生物降解醋酸钠时, 电子传递不能转化为电流, 相应导致库仑效率下降。

2.4 电子接收剂对电池性能的影响

当电池换上含有饱和氧的醋酸钠溶液时, 则在维持较长时间的低电压后, 电压才开始缓慢升高, 而电池中换上通氮气的溶液则电池电压能迅速提高到最大电压。这说明电池电压的输出与溶液中氧气的含量有密切关系, 高含量的氧气不利于电池输出电能; 电池中能够向电极输送电子的微生物属于兼性

微生物。发生这种现象的原因在于, 在有氧条件下优先发生好氧生物的降解, 微生物好氧降解醋酸钠过程中, 电子最后传递给氧气分子, 使氧气分子被还原, 当溶液中氧气含量降低到足够低的水平后才发生厌氧降解, 厌氧降解过程中产生的电子才能传递到电极表面, 进而通过外电路到达阴极, 这与 O₂ 对用 *Shewanella putrefaciens* 接种的电池的影响是类似的^[7]。

在醋酸钠溶液中分别加入不同浓度的 KNO₃, 考察 KNO₃ 浓度对电池 24 h 输出电量的影响, 结果见图 2。随着溶液中 KNO₃ 浓度的增加, 电池输出电量逐渐下降。这可能是由于电池中的细菌在代谢过程中 NO₃⁻ 成为了最终电子受体而发生反硝化作用, 因此代谢过程中传递到电极表面的电子减少, 外输电量降低。通过离子色谱分析可知, 电池运行 2 h 后, 就未能检出溶液中的 NO₃⁻, 这也进一步说明溶液中发生了反硝化作用。

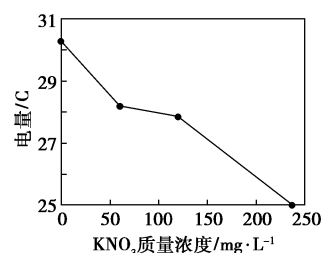


图 2 电池 24 h 输出电量与 KNO₃ 质量浓度的关系

2.5 电池中优势微生物的分离和鉴定

经分离纯化, 以醋酸钠为唯一碳源的 MFC 阳极和阴极上中均仅分离出一种细菌, 经形态对比, 2 种菌为同一细菌; 将该细菌进行 16S rDNA 提取、PCR 扩增、DNA 测序后, 得到 16S rDNA 系列如下:

```
CGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGA
GTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTT
TATGGGATTAGCTCCACCTCGCGCTTGGCAAC
CCTTTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGC
CCTGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCA
TCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTC
TCCTTAGAGTGCCACCCGAGGTGCTGGTAACT
AAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAA
CCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCC
ATGCAGCACCTGTGTCTGAGTTCCTCCGAAGGCAC
CAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCAGCATGTCAA
GGCCAGGTAAGGTTTTTCGCGATAA
```

(下转第 44 页)

入约 30 kg 16% 质量分数的氢氧化钠水溶液;加热至沸腾 1 min,冷却、结晶、离心过滤、蒸馏水洗涤、烘干得 12.63 kg 浅黄色结晶体,产率 87.1%,熔点 197 ~ 198℃(文献[9]数据为 196 ~ 197℃)。吡啶-3-甲醛的结构经由元素分析、红外(IR)和核磁共振氢谱($^1\text{H-NMR}$)证实。元素分析,实验值(理论值)/%: C 74.71(74.47), H 4.80(4.86), N 9.56(9.65)。IR (KBr), γ/cm^{-1} : 3 171, 3 043, 2 932, 2 821, 2 712, 1 635, 1 573, 1 520, 1 444, 1 390。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6), δ : 7.19 ~ 8.26(m, 5H, ArH), 9.93(s, 1H, CHO), 12.10(s, 1H, NH)。

1.2.2 吡啶-3-甲醛的合成

在 300 L 搪瓷反应釜中加入 8.7 kg 吡啶-3-甲醛、145 kg 甲苯、6.48 kg 硼氢化钾, 48 kg 蒸馏水, 加热, 维持反应温度 50 ~ 60℃ 5 h, 冷却至 15 ~ 20℃, 加 50 kg 蒸馏水处理, 离心过滤、蒸馏水洗涤、烘干得 6.09 kg 灰白色片状晶体, 产率 69.0%, 熔点 98 ~ 100℃(文献 99 ~ 100℃^[10])。元素分析, 实验值(理论值)/%: C 73.58(73.45), H 6.20(6.16), N 9.42(9.52)。IR (KBr), γ/cm^{-1} : 3 380, 3 052, 2 927, 2 865, 1 543, 1 455, 1 420, 1 356。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6), δ : 4.67(d, $J = 5.3$ Hz, 2H, CH_2), 4.71(dd, $J = 6.0, 4.7$ Hz, 1H, OH), 6.96 ~ 7.63(m, 5H, ArH), 10.83(s, 1H, NH)。

(上接第 42 页)

基于 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库, 对测序结果进行同源性检索和分析, 发现电池中分离出的微生物属于 *Pseudomonas Sp. partial 16S rRNA gene train KY(AG278108.1)* (假单胞菌属) 的一种。

3 结语

在微生物驯化过程中, 醋酸钠浓度较高, 电池性能主要决定于阳极表面吸附的微生物数量, 而经过长期驯化, 电极表面吸附微生物达到饱和后, 微生物活性取决于醋酸钠浓度的大小; 溶液中存在 O_2 时, 会使电池输出电压明显降低, 但随着电池中 O_2 含量降低, 电池性能可以逐步恢复; 溶液中存在 NO_3^- 时, 会发生反硝化作用, 并相应降低电池的电量输出。溶液 COD 的降解符合一级反应动力学方程。通过 16S rRNA 的基因分析, 电池中的优势微生物为假单胞菌属的一种。

2 结果与讨论

2.1 吡啶-3-甲醛的合成

吡啶具有弱酸性, 其亲电取代反应在杂环上进行, 取代基主要进入 β -位。因为进入 β -位后形成的中间体正离子保留了苯环结构, 电荷可向苯环上离域而趋于稳定。通过 Vilsmeier-Haack 反应在杂环上引入甲酰基, 在这里甲酰基主要进入吡啶环的 β -位。其反应机理为 N -取代的甲酰胺先与氧氯化磷生成配合物, 然后进一步解离为具有正碳离子的活性中间体, 再对芳核进行亲电取代反应, 生成 α -氯胺后很快水解成醛^[11]。

N, N -二甲基甲酰胺与氧氯化磷反应生成配合物是放热反应, 须在冰水浴中进行, 并严格控制反应温度, 否则会影响产品的色泽; C -甲酰化反应是吸热反应, 需要加热。所用的氧氯化磷是催化剂, 作用是促进二甲胺的脱落并与其结合, 其纯度会影响产品的收率, 所以使用前需重新蒸馏。

吡啶环是亲电杂环, 在酸性条件下尤其不稳定, 可能发生吡啶环的自聚和氧化反应, 反应后期氢氧化钠的加入可以中和反应生成的磷酸和盐酸。

2.2 吡啶-3-甲醛的合成

笔者选用硼氢化钾作还原剂, 因与硼氢化钠比较, 硼氢化钾无吸湿性。还考察了以甲醇、乙醇、

参考文献

- [1] Kim B H, Kim H J, Hyun M S, et al. Direct electrode reaction of Fe (III)-reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens* [J]. J Microbiol. Biotechnol, 1999, 9(2): 127 - 131.
- [2] Jang J K, Pham T H, Chang I S, et al. Construction and operation of a novel mediator- and membrane-less microbial fuel cell [J]. Process Biochemistry, 2004, 39: 1007 - 1012.
- [3] Liu H, Logan B E. Electricity generation using an air-cathode single chamber microbial fuel cell in the presence and absence of a proton exchange membrane [J]. Environ Sci Technol, 2004, 38(14): 4040 - 4046.
- [4] 詹亚力, 张佩佩, 闫光绪, 等. 微生物燃料电池及其应用研究进展 [J]. 现代化工, 2007, 27(1): 13 - 17.
- [5] 国家环境保护局. 水和废水监测分析方法 [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [6] Ghangrekar M M, Asolekar S R, Joshi S G. Characteristics of sludge developed under different loading conditions during UASB reactor start-up and granulation [J]. Water Research, 2005, 39: 1123 - 1133.
- [7] Kim H J, Park H S, Hyun M S, et al. A mediatorless microbial fuel cell using a metal reducing bacterium [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002(30): 145 - 152. ■