

兼性厌氧海洋细菌 *Shewanella* sp. N3B_R 的分离鉴定及产电性能分析研究*

王再明 王健鑫 苑文凤 李 鹏^①

(浙江海洋大学海洋科学与技术学院 舟山 316022)

摘要 本研究的目的是利用聚苯胺修饰双室微生物燃料电池(MFC),从海水养殖废水中分离筛选阳极海洋产电菌,并利用响应面 Box-Behnken 设计优化各产电因子,提高产电性能。从海水养殖池塘的废水和污泥中分离出一株兼性厌氧海洋菌株,利用 16S rRNA 基因序列和 API 20NE 生化分析进行鉴定,采用扫描电镜进行菌株形态的观察。采用循环伏安法(CV)和电化学阻抗谱法(EIS)研究了不同阳极电极在 MFC 中的性能。采用 Box-Behnken 设计(BBD)对复合模式进行优化。结果显示:分离到的阳极海洋产电菌株鉴定为希瓦氏菌 *Shewanella* sp. N3B_R,聚苯胺修饰阳极可以减少 MFC 的电荷转移电阻,输出电压和功率密度比未经修改的碳布电极分别提高了 3 倍和 10 倍。BBD 结果表明,最适温度为 35°C,NaCl 和苯胺浓度分别为 5 g/L 和 0.15 mol/L,得到的功率密度最高产率为 522.1 mW/m²。

关键词 兼性厌氧海洋细菌;微生物燃料电池(MFC);16S rRNA;Box-Behnken;希瓦氏菌(*Shewanella* sp.)

中图分类号 O646;X172 **doi:** 10.11693/hyhz20200500143

产电菌是能将电子传递给最终电子受体,并产生电流的一类微生物。这类微生物具备电化学活性,因此常被用来作为微生物燃料电池(MFCs)的阳极菌进行研究(Logan, 2009)。大多数产电微生物是厌氧或兼性厌氧细菌,由于某些厌氧菌株具有致病性,兼性厌氧细菌更适合在 MFC 中应用。常见的产电微生物主要有希瓦氏属 *Shewanella* (Ringeisen *et al.*, 2006)、地杆菌属 *Geobacter* (Bond *et al.*, 2003)、红育菌属 *Rhodospirillum rubrum* (Chaudhuri *et al.*, 2003)、芽孢杆菌属 *Bacillus* (Nimje *et al.*, 2009)、绿弯菌属 *Chloroflexus*、根瘤菌属 *Rhizobium*、甲烷杆菌属 *Methanobacterium* 等也有报道(Rezaei *et al.*, 2007; Rismani-Yazdi *et al.*, 2007; Ishii *et al.*, 2008)。Takeuchi 等(2017)利用 *Cellulomonas* spp.作为产电菌,以纤维素作为营养基

质应用于 MFC。Dai 等(2017)利用厚壁菌门菌作为阳极产电菌,研究发现其 MFC 开路电位约为 650 mV,最大功率密度为 437 mW/m²。Nor 等(2015)从好氧棕榈油厂废水中分离出铜绿假单胞菌株(*Pseudomonas aeruginosa*)ZH1,结果显示其最大功率密度为 85.11 mW/m²,电流密度为 91.12 mA/m²。阳极液和阳极材料的选择也影响产电细菌的性能。Zhang 等(2017a)研究发现,在阳极液中添加富马酸盐后,阳极电极表面细菌增多,功率密度是不添加富马酸盐的 2.41 倍。Chen 等(2015)通过共聚焦扫描激光显微镜和循环伏安实验证明石墨烯修饰的阳极对希瓦氏菌 MR 生物膜的生长具有明显的抗菌作用。

海水养殖逐渐规模化,高度密集化,在带来经济效益的同时,对海洋环境的影响也随之增加,如近海

* 国家重点研发项目“蓝色粮仓科技创新”重点专项,2019YFD0901305 号;舟山市科技局项目,2019C21011 号;舟山市科技局项目,2016C41001 号;2019 年福建省海洋生物增殖与高值化利用重点实验室开放课题基金项目,2019fjscq04 号。王再明,硕士研究生, E-mail: 18368098976@163.com

① 通信作者: 李 鹏, E-mail: lpqp3818081@163.com

收稿日期: 2020-05-21, 收修改稿日期: 2020-06-28

海水的氨氮含量增加、重金属含量增加,甚至产生海水酸化现象(刘晓辉等, 2017)。MFCs 是一种很有前途的从废水或污染物中获取能量的技术(Watanabe, 2008), 它能将化学能转化为电能(Samsudeen *et al*, 2016)。双室 MFC 采用中间的阳离子交换膜 Nafion(美国杜邦公司)将阳极和阴极进行分隔(Esfandyari *et al*, 2017; Zhang *et al*, 2017b)。产电菌附着在阳极表面, 而阳极材料往往是影响产电菌生长和产电性能的重要因素。碳布因其良好的导电性而被用作 MFCs 的阳极材料, 但其较差的生物相容性限制了其应用。通过选择合适的改性碳布阳极材料, 能够有效提高 MFCs 的性能(Quan *et al*, 2015; Huang *et al*, 2016; Zhang *et al*, 2017c)。聚苯胺(PANI)具有良好的导电性、生物相容性和环境稳定性(Hou *et al*, 2013; Cao *et al*, 2017), 可以改善细菌附着, 增强细胞外电子转移(Mashkour *et al*, 2016), 用聚苯胺等材料改性的碳布阳极可以增大产电菌接触面表面积, 提高输出电压(Zhang *et al*, 2014)。

近年来, 不断有各种导电性能良好的新材料被应用于阳极的改性。Hidalgo 等(2016)用四个月时间来测试三种不同的阳极材料的 MFC 电池性能, 结果表明, 阳极电极改性碳涂层鞍形填料提供优秀的高导电性。Liu 等(2017)研究表明, 具有良好电化学活性的 PANI 纳米可以降低电荷转移电阻。然而, 由于材料成本高, 大规模的应用在 MFCs 仍是有限的。

本研究分离鉴定了 1 株来源于海水养殖场的海洋产电菌, 经过鉴定为希瓦氏菌。初步的发电实验表明, 希瓦氏菌 N3B_R 的输出电压是其他菌的 2—3 倍。*Shewanella* sp. N3B_R 是一种从海水养殖池塘中分离到的兼性厌氧海洋细菌, 具有独特的优势和研究前景。利用响应面法(RSM)来提高阳极室在 MFC 运行过程中的功率密度。很少有研究报道使用 RSM 的 BBD 来改善 MFC 的性能。此研究为处理海水污染和人工养殖废水提供了新的途径, 期望实现资源的循环利用。

1 材料与方法

1.1 菌株的分离

该菌株是从舟山海水养殖池塘的废水和污泥中分离得到。样本富集培养基在厌氧环境中。富集培养基配方如下(每升海水): 蛋白胨(8.0 g/L), 酵母提取物(1.0 g/L), 醋酸钠(16.0 g/L), 氯化钠(5.0 g/L), 氯化钙(0.1 g/L), 氯化镁(0.1 g/L), 磷酸钾(1.2 g/L), 半胱氨酸(1.0 g/L), 柠檬酸铁(4.8 g/L)。培养基初始 pH 值调整为 7.0±0.2, 高压蒸汽灭菌 20 min。1 mL 已处理

污泥和废水接种于适量富集培养基厌氧管中, 30℃ 培养 3 周, 直到培养基颜色从棕色改变到黑色, 富集培养后, 用平板法分离得到分离菌株。

1.2 菌株的鉴定

利用试剂盒提取染色体 DNA 后, 使用通用 16S rDNA 引物扩增分离株的 16S rDNA 基因, 并在 PCR 扩增仪(TaKaRa Thermal Cycler Dice TP600, TaKaRa Biomedical Technology (Beijing) Co., Ltd.)进行 PCR 扩增。PCR 混合物包含 25 μ L PCR 预混料、0.5 μ L 底物和反向引物(20 pmol/ μ L)和 23 个 μ L 16s-free H₂O。使用 DNA 片段 PCR 试剂盒进行提纯(TaKaRa, 大连, 中国)。菌株 N3B_R 的 586 bp 16S rRNA 基因序列由大连 TaKaRa 生物技术有限公司鉴定。利用 BLAST 程序将获得的基因序列与 GenBank 中的序列进行比对。采用 MEGA 7.0 的邻接方法构建系统发育树(Kimura, 1980; Felsenstein, 1985; Tamura *et al*, 2007)。采用 API 20NE 进行标准生化分析。用扫描电镜(SEM, ZEISS, EVO MA10)观察了阳极电极表面的菌株形态。

1.3 阳极电极的修饰

在修饰之前, 碳布(W0S1002, 中国台湾)电极(碳布块大小 0.9 cm×1.4 cm)浸泡在丙酮试剂中 10 h 去除杂质和油脂, 后用去离子水冲洗, 并在 65℃ 干燥 10 h。将 3 个碳布电极分别浸泡在 0.05 mol/L、0.15 mol/L、0.2 mol/L 的苯胺单体(阿拉丁, 上海)溶液中(用 1.0 mol/L 盐酸调节 pH 至 1.0), 以铂电极作为对电极, 饱和甘汞电极作为参比电极。利用循环伏安法电沉积聚苯胺, 采用电化学工作站(Bio-Logic, sp-300, 法国), 扫描频率为-0.1—1.0 V, 频率为 20 mV/s(30), 循环指数为 10。沉积后的电极用去离子水洗涤, 在 65℃ 下干燥 10 h。并以未修饰的碳布电极作为对照。四组不同阳极电极的燃料电池反应器分别记为 R0(未修饰)、R1(0.05 mol/L)、R2(0.2 mol/L)、R3(0.15 mol/L)。

1.4 MFC 的组装

MFC 由阳极室和阴极室(每个室 100 mL)组成, 阳极室和阴极室之间用质子交换膜 Nafion117 隔开(有效面积约为 12.56 cm²)。阳极和阴极电极由铜导线连接并外接电阻为 1000 Ω , 输出电压的数据采集由与计算机相连的数据采集系统(上海 U00249)完成。阳极和阴极室分别填充了 60 mL 的 LB 肉汤培养基(pH 调节至 7.0±0.2)和 50 mm 的铁氰化钾。海洋产电细菌在 30℃ LB 培养基中培养, 于振荡培养箱中培养至光密度 1.5 (OD₆₀₀)。在 MFCs 开始工作之前, 将 0.1 mL 菌悬液接种到阳极液中, 运行 MFC 以获得稳定的电

位生成, 获得稳定电位后, 测量极化、功率密度。阴极电极均为未修饰的碳布。

1.5 双室燃料电池电化学性能测试

阳极和阴极室分别填充了 60 mL 的 LB 肉汤培养基和 50 mm 的铁氰化钾。将阳极溶液 pH 调节至 7.0 ± 0.2 。海洋产电细菌在 30°C LB 培养基中, 在振荡培养箱中培养至光密度 1.5 (OD_{600})。在 MFCs 开始工作之前, 将 0.1 mL 菌悬液接种到阳极液中。运行 MFC 以获得稳定的电位生成。获得稳定电位后测量极化、功率密度。

电压变化记录每 30 min 使用数据采集系统在外接电阻 1000 Ω 下进行记录采集。极化曲线利用外接电阻变化法测试, 外部电阻从 10 k Ω —100 Ω 通过测量稳定电压生成, 其中每个电阻测 30 min。电流密度和功率密度是电流和功率除以阳极面积, 电流密度 $I(\text{A}/\text{m}^2) = V/P(RA)$ 和功率密度 $(\text{W}/\text{m}^2) = V^2/(RA)$, 其中 R 是外部阻力(Ω), V 是测量电压(mV), A 是阳极电极的面积(m^2)。

为了测定阳极菌的电化学活性, 在电化学工作站(Bio-Logic, SP-300, 法国)进行了循环伏安(CV)分析。分别以四个 MFC 中的阳极电极作为工作电极, 以银电极(Ag/AgCl)作为参比电极, 铂电极为对电极。CV 实验在接种阳极菌的液体培养基中以 100 mV/s 的扫描速率进行, 扫描范围为-1 V 到 1 V。

采用传统三电极系统分析 MFC 系统的电化学阻抗谱(EIS), 阳极与工作电极连接, 参比电极与铂对电极分别与参比电极、对电极连接。EIS 测试是在扫描频率为 1.0—100 kHz, 0.005 V 的情况下使用恒电位器进行的。

1.6 响应面分析

响应面法(Response surface method, RSM)是一种减少研究工作量的统计方法。本研究采用 RSM 的 Box-Behnken Design (Design-expert 8.05 USA)设计确定了阳极室阳极菌输出电流功率密度的最佳条件, 以提高 MFCs 系统的输出功率。

2 结果与分析

2.1 菌株的鉴定

对 PCR 扩增产物进行 16S rDNA 序列分析 (586 bp), 鉴定菌株由上海美吉生物制药科技有限公司进行。该菌株已在 CGMCC (CGMCC1.16968)中保藏。分离菌株的生化特征为革兰氏阴性, 具有杆状结构。API (API 20NE)的结果如表 1 所示。表 1 中, NO_3

表示硝酸盐反应, TRP 表示色氨酸反应, GLU 表示葡萄糖产酸, ADH 表示乙醇脱氢酶反应, URE 表示尿素反应, GEL 表示凝胶酶反应, MAN 表示甘露醇产酸试验, ESC 表示七叶灵反应, PNG 表示对硝基半乳糖反应, ARA 表示阿拉伯糖反应, MNE 表示甘露糖反应, NAG 表示 N-乙酰-葡萄糖胺反应, MAL 表示麦芽糖反应, GNT 表示葡萄糖酸盐反应, CAP 表示葵酸反应, ADI 表示乙二酸反应, MLT 表示苹果酸反应, CIT 表示柠檬酸反应, PAC 表示苯乙酸反应, OX 表示细胞色素氧化酶反应。

表 1 菌株 N3B_R 的 API 20NE 结果
Tab.1 Characterization of the strain *Shewanella* sp. N3B_R using API 20NE

项目	结果	项目	结果
NO_3	+	<u>MAN</u>	-
TRP	-	<u>NAG</u>	+
<u>GLU</u>	-	<u>MAL</u>	-
<u>ADH</u>	-	<u>GNT</u>	-
<u>URE</u>	±	<u>CAP</u>	+
ESC	+	<u>ADI</u>	-
GEL	-	<u>MLT</u>	+
PNG	-	<u>CIT</u>	+
GLU	-	<u>PAC</u>	-
<u>ARA</u>	-	OX	+
<u>MNE</u>	-		

注: 下划线表示该反应需要液体石蜡封口

由表 1 可知, 该菌株对可利用 D-葡萄糖、D-果糖、D-甘露糖、D-核糖、D-半乳糖、L-阿拉伯糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖、海藻糖、蜜二糖 melibiose、纤维二糖 cellobiose、棉子糖、甘露醇、esculin、水杨酸、苦杏仁苷(单一碳源试验)。API 鉴定结果显示, 该菌属于 *Shewanella* 属的可信度达到了 97%。

该基因序列已上传至 NCBI 的 GenBank, 获取的登录号为 MK053884。利用 Clustalx1.83 软件进行序列比对, 将比对后结果利用 MEGA 7.0 的邻接方法, 基于 16S rRNA 序列构建了系统发育树, 如图 1 所示。系统进化树结果显示, 该菌株在进化地位上与 *Shewanella algae* hiro1、*Shewanella algae* PSB-05 和 *Shewanella* sp. EM0501 密切相关, 与该两株菌的相似性达到 99%以上, 鉴定结果该菌株为 *Shewanella* 属, 命名为 *Shewanella* sp. N3B_R。

利用戊二醛对产电菌吸附的阳极电极进行固定, 送上海皓扬生物有限公司进行扫描电镜(SEM)扫描, 图 2 表征了聚苯胺修饰电极海洋产电菌吸附形态和未修饰电极表面的形貌。从图中可以清晰看到经过聚

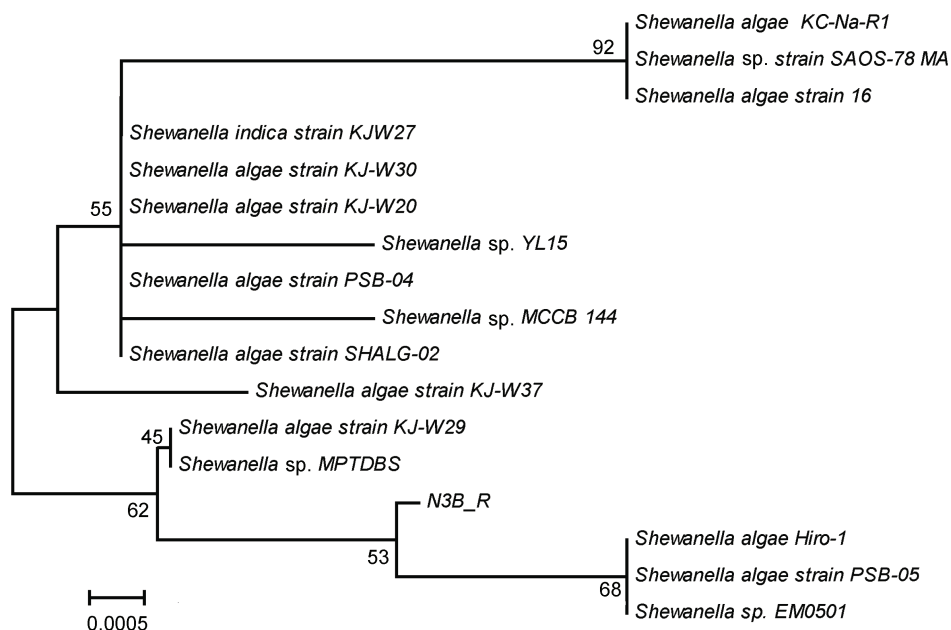


图 1 菌株 N3B_R 的系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequencing

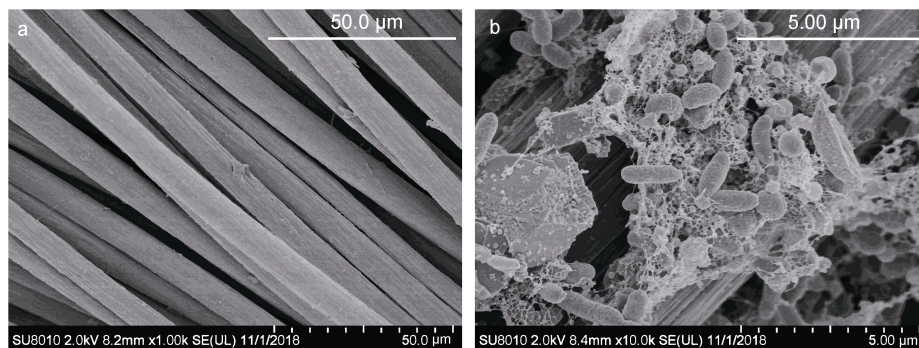


图 2 未修饰电极表面和聚苯胺修饰电极表面电镜扫描图

Fig.2 SEM images of carbon cloth, showing the surface of the polyaniline-modified electrode and unmodified electrode
注: a. 空白碳布电极(未接种产电菌 N3B_R 的阳极碳布电极); b. 接种产电菌 N3B_R 后, 输出电压稳定后的阳极碳布电极

苯胺修饰电极的阳极表面, 吸附较多的希瓦氏 *Shewanella* sp. N3B_R, 该菌呈现明显的杆状、短杆状形态, 还可观察到形成的生物膜, 以及丝状物质、颗粒状物, 该物质很可能是聚苯胺与菌株代谢物结合产生, 起到一定的固定细胞、增加吸附力以及产电输出的作用。未经修饰的碳布表面则无物质吸附, 呈条状结果, 符合碳布的结构组分特点。

2.2 MFC 的电化学性能

将电沉积后的阳极电极分别组装与 MFC 中, 接种产电菌, 20 h 后进行电压数据收集, 结果显示用 0.15 mol/L 苯胺修饰的碳布电极具有最大的电压输出, 最大电压为 140 mV, 为其他三组电极的 2—6 倍。

为了测试阳极产电菌的最大输出功率, 当 MFC

时达到稳定状态时, 功率密度测量的通过改变外接电阻(10 k Ω —100 Ω)进行, 如图 3 所示, 当达到稳定时, 最大的输出功率密度为反应器 R3, 达到 517.5 mW/m², 该结果与电压输出结果吻合较好, 这有力地说明导电聚苯胺在本研究中使 MFC 输出具有优越的性能。根据公式计算, 测得 R3 反应器的内电阻为 34.5 Ω 。

为了探讨四种不同电极的电子转移性能, 采用循环伏安法分别对四个电极进行 CV 测试, 来观察不同阳极电极上的氧化还原反应。四种不同阳极电极的 MFCs 的 CV 曲线如图 4 所示。0.15 mol/L 聚苯胺修饰电极的 MFC 具有更显著的氧化还原峰, 其氧化峰为(0.58 mA/0.35 V)。与其他三种表现出亚峰(尤其是未修饰电极)的 MFC 相比, R3 电极表现出明显的氧化还原

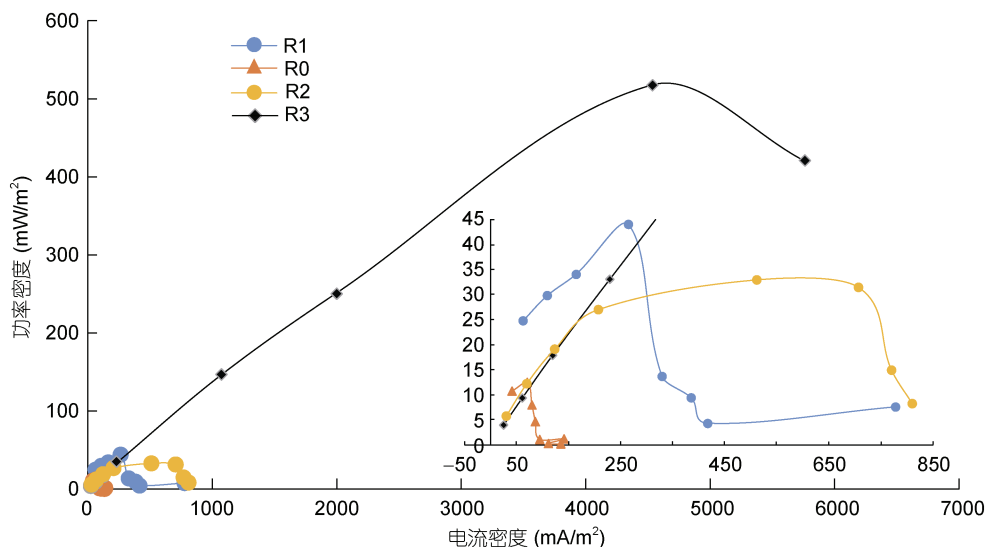


图3 四组 MFC 的功率密度曲线

Fig.3 The power density curve of microbial fuel cell (MFC)

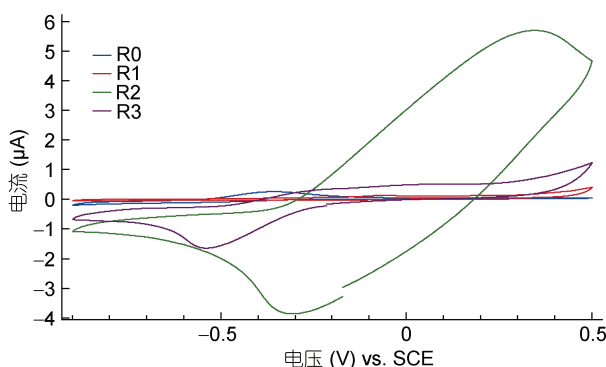


图4 四种阳极电极的 CV 曲线图

Fig.4 The cyclic voltammetry of four anode electrodes

注: SCE 指饱和甘汞电极

峰, 且明显 CV 曲线包含的面积更大, 说明 R3 电极作为一个电容器具有很好的应用价值。对照未经修饰的碳布电极, 几乎观察不到明显的氧化还原峰, 说明碳布电极上的电子转移较少, 在电极两端施加电压后, 电极表面无明显的氧化还原现象。图像表明 0.15 mol/L 浓度的聚苯胺很大程度地影响了 MFC 中电流产生的性能。

电化学阻抗谱 EIS, 也称交流阻抗法, 是指给电化学系统施加一个频率不同的小振幅的交流电势波, 测量交流电势与电流信号的比值(此比值即为系统的阻抗)随正弦波频率 ω 的变化利用, 主要用于研究研究电极材料的扩散、内阻、电容、腐蚀等。本项目也通过测试阻抗谱, 研究了不同电极的 MFC 系统在电化学反应中的内阻。

图 5 为不同阳极 MFC 的 Nyquist 图。0.15 mol/L 浓度聚苯胺修饰电极 MFC 高频区域的半圆直径是四

个 MFC 中最小的, 这表面该电极的内阻越小。

低频区倾斜的直线代表的是扩散阻抗, 理论上斜率应该为 1(也就是倾角为 45°)。若倾角小于 45° , 说明存在一定的弥散效应; 若倾角大于 45° , 则说明存在一定的电容行为。

实验结果显示, 四个电极在低频区域的趋势线基本相同, 其中 R0 的斜率最大, 说明其扩散阻抗最小, 也一定程度证明, 碳布材料作为电容的可行性。R3 反应器的电荷转移电阻比其他阳极的电荷转移电阻小。通过电极修饰可以明显改变高频区半圆直径, 减少电极材料的内阻, 提高电荷转移效率, 从而提升产电性能。利用 0.15 mol/L 聚苯胺改性碳布阳极的内阻最低, 而其他三种 MFC 的内阻较高。

2.3 响应面设计(BBD)

为了优化阳极室条件对产电菌输出功率的影响, 参考温度、苯胺单体浓度、和氯化钠浓度三个因素, 使用 Box-Behnken 设计的响应面方法对其进行最优化设计。设计如表 2 所示。输出功率密度的响应值选输出电压保持稳定在 10 d 后。

多项式表达式得到如下: $Y = 520.34 - 63.57A + 4.33B - 37.00C + 3.35AB - 3.00AC + 6.00BC - 71.10A^2 - 3.1B^2 - 43.24C^2$

其中, A、B、C 分别表示温度、苯胺浓度、NaCl 浓度。利用公式的功率密度预测水平与实验数据如表 2 所示。

方差分析结果(ANOVA)见表 3。实验重复三次。 P 值表示各参数的相互作用强度。 P 值的模型 < 0.0001 ,

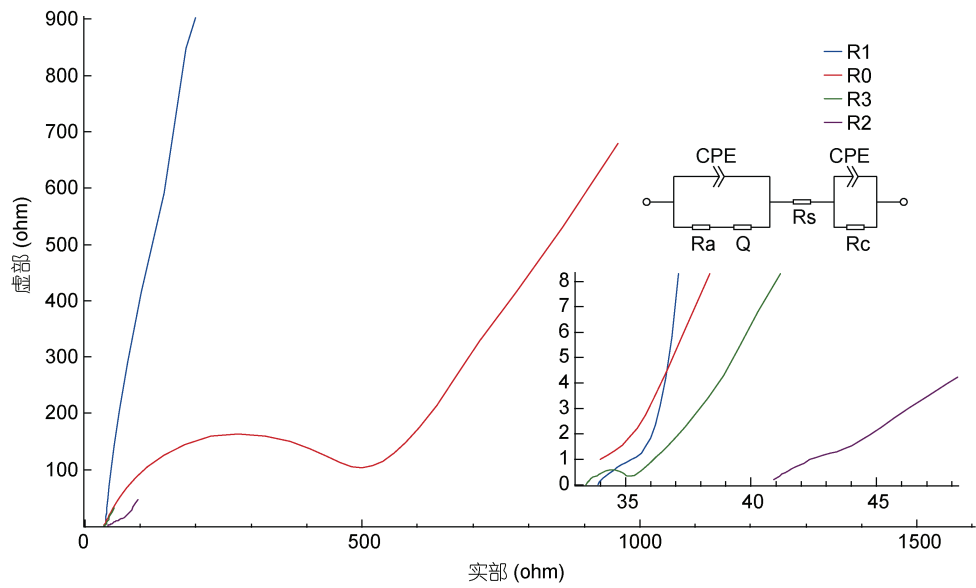


图 5 四种不同阳极电池的阻抗图

Fig.5 The EIS (electrochemical impedance spectroscopy) of the four MFCs using a Bio-Logic SP-300

表 2 三因素水平设计表(BBD 设计)

Tab.2 Three-factor Box-Behnken design and predicted responses of the dependent variables for output power density in MFC

实验	因素 1	因素 2	因素 3	响应值功率密度 (mW/m ²)
	A: 温度(°C)	B: 苯胺(mol/L)	C: NaCl(g/L)	
1	45.00	0.225	5.00	389.00
2	25.00	0.150	9.00	433.00
3	35.00	0.075	1.00	510.00
4	35.00	0.225	1.00	508.00
5	25.00	0.150	1.00	505.00
6	45.00	0.100	5.00	375.00
7	25.00	0.225	5.00	510.60
8	35.00	0.150	5.00	518.20
9	35.00	0.150	5.00	520.70
10	35.00	0.150	5.00	519.80
11	35.00	0.100	9.00	428.00
12	35.00	0.150	5.00	522.10
13	35.00	0.225	9.00	450.00
14	35.00	0.150	5.00	520.90
15	45.00	0.150	9.00	301.00
16	25.00	0.100	5.00	510.00
17	45.00	0.200	1.00	385.00

说明该模型意义重大, 适合当前的实验。“Prob>F”的值小于 0.0500 表明模型项是显著的。在这种情况下, A、B、C(线性模型项)、AB、BC(交互模型项)和 A2、B2、C2(二次模型项)是重要的模型项。大于 0.1000 的值表示模型项不显著。6.07 的“缺拟合 f 值”意味着相对于纯误差拟合不显著, 二阶模型适用。

预测 R^2 为 0.9916, 调整 R^2 为 0.9986, 表明两者

之间是合理一致的。Adeq 精度测量的是信噪比, 110.000 表示信号充足。低的 C.V.值 0.56%表明了实验的高可靠性, 参见表 4。

图 6 显示了模型的良好拟合性以及实际值与预测值之间的一致相关性。由图 6 可知, 预测值与真实值基本都位于一条直线上, 从此图也进一步验证了模型的可信度。

表 3 功率密度的方差分析
Tab.3 Analysis of variance (ANOVA) of the quadratic model for power density

来源	平方和	df	均方和	F 值	P 值(prob>F)	
模型	74642.55	9	8293.62	1243.10	< 0.0001	显著
A-温度	32334.24	1	32334.24	4846.47	< 0.0001	
B-苯胺	149.64	1	149.64	22.43	0.0021	
C-NaCl	10952.00	1	10952.00	1641.56	< 0.0001	
AB	44.89	1	44.89	6.73	0.0357	
AC	36.00	1	36.00	5.40	0.0532	
BC	144.00	1	144.00	21.58	0.0024	
A ²	21282.10	1	21282.10	3189.90	< 0.0001	
B ²	40.33	1	40.33	6.05	0.0435	
C ²	7874.23	1	7874.23	1180.24	< 0.0001	
残差	46.70	7	6.67			
失拟项	38.29	3	12.76	6.07	0.0570	不显著
纯误差	8.41	4	2.10			
总离差	74689.25	16				

表 4 二次模型的回归分析
Tab.4 Regression results of the quadratic model for power density

标准差	平均值	变异系数 C.V.(%)	压力
2.58	465.80	0.56	625.78
<i>R</i> ²	调整 <i>R</i> ²	预测 <i>R</i> ²	Adeq 精度
0.9994	0.9986	0.9916	110.0000

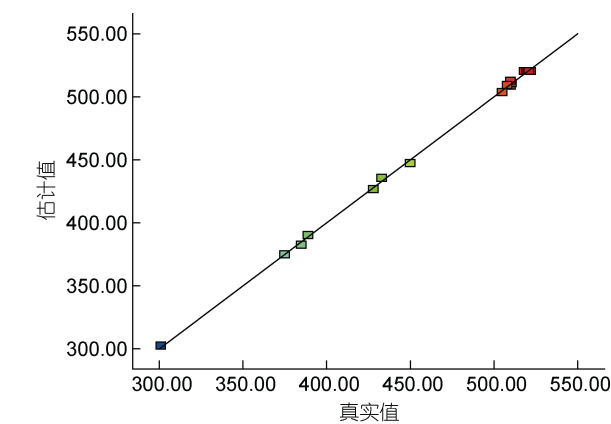


图 6 真实值与估计值的误差分析
Fig.6 Plot of the predicted vs. the actual obtained by the Box-Behnken design

3D 模型图如图 7、图 8、图 9 所示。其中图 7 显示苯胺浓度和温度交互作用的影响。当保持盐度不变时,随着温度增加,输出功率先逐渐上升,后降低,且超过 40℃ 后下降速度明显增加。

图 8 表示 NaCl 浓度和温度的交互作用,当保持苯胺浓度为 0.15 mol/L 不变时,随着 NaCl 浓度增加,温度升高,输出功率密度升高后逐渐下降。

图 9 表示 NaCl 浓度和苯胺浓度的交互作用,当

保持温度为 35℃ 不变。随着 NaCl 和苯胺浓度的增加,产率继续增加,后降低。

3 讨论

3.1 海洋产电菌多样性分析

从舟山海域海水养殖场中分离筛选到一株海洋兼性厌氧细菌,利用 16S rRNA 基因序列和 API 20NE 生化分析进行鉴定,采用扫描电镜进行菌株形态的观察,鉴定结果为 *Shewanella* sp. N3B_R,研究表明该菌株表现出较好的产电活性,输出的最大功率密度达到 517.5 mW/m²。电镜扫描显示该菌株在碳布表面具有较好的吸附性,电极材料对其生长未表现出明显的抑制作用。目前,对海洋产电菌产电性能研究的相关报道较少,希瓦氏菌是典型的海洋产电细菌,有部分来源深海及热泉附近(Wei *et al*, 2007)。王彪等(2010)从厦门白城海域的潮间带表面沉积物中筛选到一株海洋产电菌 *Shewanella* sp. S2,输出电压最高为 150 mV,相应的电流密度为 66.1 mA/m²。邹聪慧等(2011)发现海洋产电菌 *Shewanella marisflavi* EP1 在高盐度下具有优良的降解脱色特性,这为海洋产电菌在处理染料废水方面的研究提供了支持。海洋来源

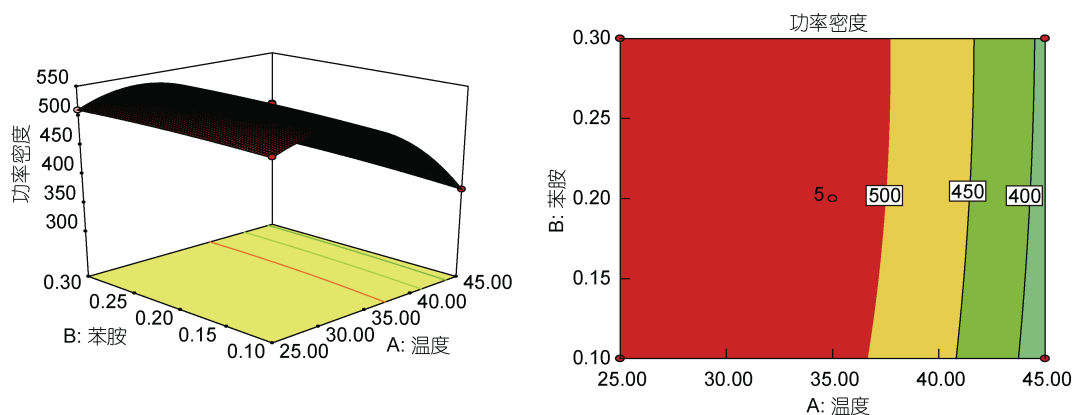


图 7 苯胺浓度与温度之间的功率密度的三维响应面和二维等值线图

Fig.7 The 3D-response surface and 2D-contour plots of power density (mW/m^2) between aniline and temperature

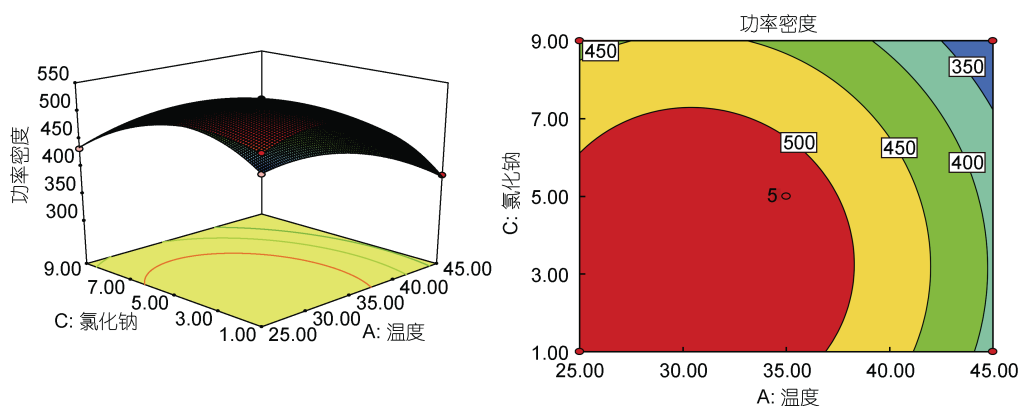


图 8 氯化钠浓度与温度之间的功率密度的三维响应面和二维等值线图

Fig.8 The 3D-response surface and 2D-contour plots of power density (mW/m^2) between NaCl and temperature

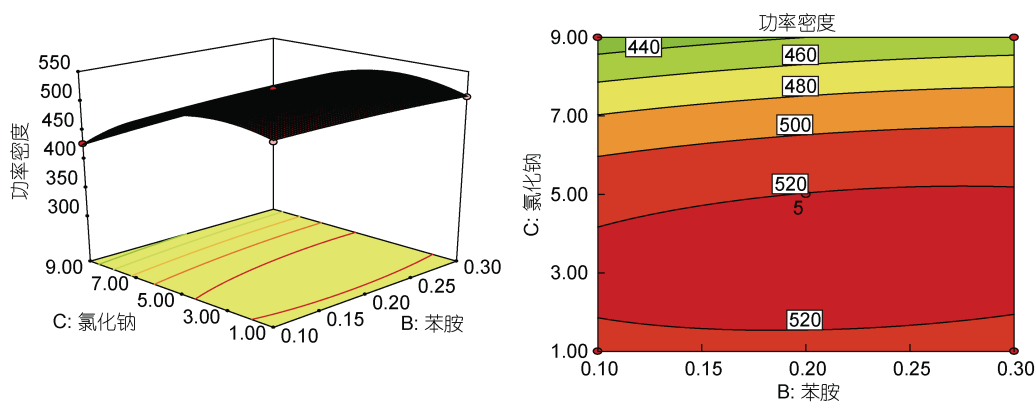


图 9 氯化钠浓度与苯胺浓度之间的功率密度的三维响应面和二维等值线图

Fig.9 The 3D response surface and 2D-contour plots of power density (mW/m^2) between aniline and NaCl

的产电菌具有耐高压、耐盐、耐渗透压等特点, 具有与陆生微生物不同的代谢途径, 这为海洋细菌的应用提供了更广的前景。

目前对污水的处理方法常见的有物理、化学以及生物法, 物理和化学方法很容易造成对环境的二次污染, 造成水体中有害物质含量升高, 且成本较高。

生物法(如活性污泥等方法)尽管不易造成二次污染, 但是处理的效率往往不高, 且后期对活性污泥的回收利用、处理堆放也是一个难题。尽管目前已可以利用处理过污水的活性污泥进行堆肥发酵后, 应用于种植, 但其中的部分有害物质去除较为困难, 易造成土壤的污染。

在本研究中, 我们使用海洋兼性厌氧菌 *Shewanella* sp. N3B_R 通过双室 MFC 系统来研究其产电性能。检测不同浓度聚苯胺修饰碳布电极后对 MFC 反应系统的影响。研究表明海洋阳极产电菌及阳极电池的特性对 MFC 的性能有重要影响。功率密度曲线显示, 0.15 mol/L 浓度聚苯胺改性碳布阳极 MFC 的发电量明显最高(517.5 mW/m²)。通过循环伏安法和电化学阻抗谱分析表明, 与未修饰聚苯胺的阳极相比, 改善了 MFC 的性能。

3.2 响应面设计的应用

响应面分析法是一种常见的优化条件的方法(Myers, 2003), 软件选择 Design-Expert。当影响结果的因素较多时, 往往先采用 Plackett-Burman 法, 对各单因素进行考察, 获得影响因素最大的几个单因素, 按照中心组合设计原理进行响应面的分析, 常见的响应面分析方法有 CCD (central composite design)、BBD (Box-Behnken design) 及 HDD (historical data design) 等, 上述方法可以精确地表述因素和响应值之间的关系, 在确定实验因素及其交互作用对指标响应值的影响时, 几种方法各有特点。BBD 是体现各个因素和响应值之间非线性关系的一种试验方法, 相对于 CCD 来说, 该方法重复试验减少, 操作简便且更经济, 尤其适合影响因素较少(本实验研究的影响因素为 3 个)的优化设计。响应面 BBD 系统设计对开发低成本和合适的 MFC 应用程序非常有用。本项目研究的响应面分析结果显示, 当最佳温度分别为 35°C、5 g/L、0.15 mol/L NaCl 和苯胺浓度时, 得到的功率密度最高值为 522.1 mW/m²。

3.3 海洋微生物在 MFC 中应用的展望

微生物燃料电池技术可以从废水或污染物中获取能量, 阳极产电菌可以将废水或污染物中的化学能转变成电能, 并通过 MFC 装置进行输出, 达到处理废水循环利用, 产生清洁能源的目的。目前的海水养殖都是将养殖废水直接排入海水, 造成海洋环境的污染, 利用海水来源的阳极产电菌, 可以将养殖废水中存在的高浓度氮磷等有害物质, 通过 MFC 技术转变为电能, 实现污水的循环利用。

海洋环境的特殊性造就了海洋来源的微生物具有独特的代谢系统, 目前对于海洋微生物在 MFC 中的应用研究多集中于阳极产电菌。而阳极产电菌厌氧和兼性厌氧的特点使得菌株的筛选培养较为困难, 尤其大部分的厌氧菌都为致病菌, 使得实验室的进一步应用受到限制。

微生物燃料电池中对于微生物的研究基本集中在阳极产电菌的产电性能上, 近年来的研究也未发现新的具有高产电能力的产电菌菌株, 而产电菌的产电性能受阳极电极和 MFC 系统的影响较大, 因此, 很多学者逐渐转向对电极材料、阴极电解液等方面的研究, 而电极的性能受限于成本, 使得 MFC 的大规模应用受到了很大的限制。

微生物燃料电池的生物阴极研究已经成为热点, 生物阴极室利用微生物催化阴极反应, 与传统的阴极电极相比, 具有以下优点: (1) 微生物直接作为催化剂参与电子传递, 无需添加其他阴极催化剂, 节省大量成本, 简化 MFC 构造。(2) 微生物补充方便, 使 MFC 的运行更为稳定(Rabaey *et al*, 2005)。(3) 生物阴极进行的反应, 如反硝化细菌, 可以应用于污水处理, 达到除氮的目的, 盛建海等(2018)从凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)养殖水体的生物絮团中分离到一株具产絮能力的脱氮菌 xt1, 鉴定为短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*), 对氨氮、硝态氮去除率分别达 69.95%和 49.50%。Hasvold 等(1997)发现细菌在阴极上沉积并催化氧还原; Bergel 等(2005)报告了生物膜的存在, 使 MFCs 的阴极表面电流密度大幅提高。研究表明海洋藻类作为生物阴极, 经过连续光照 21 h, 开路电压为 0.96 V, 短路电流密度为 75 μ A/cm², 而这些电能的输出仅占藻类细胞吸收辐射能的 0.1%—0.2%, 如何提高海洋藻类将光能转化为电能的效率也是今后的研究方向。

4 结论

本研究从舟山海域养殖池中采用养殖污泥与废水, 利用富集后厌氧培养, 经分离纯化后获得一株高产电的海洋产电菌希瓦氏菌 *Shewanella* sp. N3B_R, 该菌株表现出良好的阳极产电活性。电镜扫描结果显示该菌在碳布表面呈现良好的吸附现象。通过阳极电极材料修饰, 再研究该菌株的产电性能, 结果显示, 0.15 mol/L 苯胺修饰的阳极电极, 在 MFC 体系中展现更好的产电性能, CV 以及 EIS 结果显示, 接种 *Shewanella* sp. N3B_R 的 MFC 体系具有更小的内阻以及更高的功率密度。利用 BBD 优化产电性能, 结果显示 BBD 响应面设计适用于 MFC 的因素优化。

参 考 文 献

- 王 彪, 黄杰勋, 章晓波等, 2010. 一株海洋产电菌 *Shewanella* sp. S2 的筛选和产电分析. 微生物学通报, 37(3): 342—348
刘晓辉, 孙丹青, 黄 备等, 2017. 东海沿岸海域表层海水酸

- 化趋势及影响因素研究. 海洋与湖沼, 48(2): 398—405
- 邹聪慧, 徐方成, 陈新华, 2011. 海洋产电菌 *Shewanella marisflavi* EP1 的脱色特性. 微生物学通报, 38(1): 2—7
- 盛建海, 韩 涛, 王骥腾等, 2018. 源自生物絮团产絮凝剂的异养硝化-好氧反硝化菌 *xt1* 的鉴定及其脱氮特性. 海洋与湖沼, 49(2): 375—383
- Bergel A, Féron D, Mollica A, 2005. Catalysis of oxygen reduction in PEM fuel cell by seawater biofilm. *Electrochemistry Communications*, 7(9): 900—904
- Bond D R, Lovley D R, 2003. Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3): 1548—1555
- Cao C, Wei L L, Wang G *et al*, 2017. In-situ growing NiCO_2O_4 nanoplatelets on carbon cloth as binder-free catalyst air-cathode for high-performance microbial fuel cells. *Electrochimica Acta*, 231: 609—616
- Chaudhuri S K, Lovley D R, 2003. Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells. *Nature Biotechnology*, 21(10): 1229—1232
- Chen J, Deng F, Hu Y Y *et al*, 2015. Antibacterial activity of graphene-modified anode on *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilm in microbial fuel cell. *Journal of Power Sources*, 290: 80—86
- Dai K, Wen J L, Zhang F *et al*, 2017. Electricity production and microbial characterization of thermophilic microbial fuel cells. *Bioresource Technology*, 243: 512—519
- Esfandyari M, Fanaei M A, Gheshlaghi R *et al*, 2017. Dynamic modeling of a continuous two-chamber microbial fuel cell with pure culture of *Shewanella*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(33): 21198—21202
- Felsenstein J, 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4): 783—791
- Hasvold Ø, Henriksen H, Melvill R E *et al*, 1997. Sea-water battery for subsea control systems. *Journal of Power Sources*, 65(1—2): 253—261
- Hidalgo D, Tommasi T, Velayutham K *et al*, 2016. Long term testing of Microbial Fuel Cells: Comparison of different anode materials. *Bioresource Technology*, 219: 37—44
- Hou J X, Liu Z L, Zhang P Y, 2013. A new method for fabrication of graphene/polyaniline nanocomplex modified microbial fuel cell anodes. *Journal of Power Sources*, 224: 139—144
- Huang L H, Li X F, Ren Y P *et al*, 2016. In-situ modified carbon cloth with polyaniline/graphene as anode to enhance performance of microbial fuel cell. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(26): 11369—11379
- Ishii S, Shimoyama T, Hotta Y, 2008. Characterization of a filamentous biofilm community established in a cellulose-fed microbial fuel cell. *BMC Microbiology*, 8: 6
- Kimura M, 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2): 111—120
- Liu X, Zhao X H, Yu Y Y *et al*, 2017. Facile fabrication of conductive polyaniline nanoflower modified electrode and its application for microbial energy harvesting. *Electrochimica Acta*, 255: 41—47
- Logan B E, 2009. Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. *Nature Reviews Microbiology*, 7(5): 375—381
- Mashkour M, Rahimnejad M, Mashkour M, 2016. Bacterial cellulose-polyaniline nano-biocomposite: A porous media hydrogel bioanode enhancing the performance of microbial fuel cell. *Journal of Power Sources*, 325: 322—328
- Myers W R, 2003. *Encycloedia of Biopharmaceutical Statistics*. New York: Marcel Dekker, 858—869
- Nimje V R, Chen C Y, Chen C C *et al*, 2009. Stable and high energy generation by a strain of *Bacillus subtilis* in a microbial fuel cell. *Journal of Power Sources*, 190(2): 258—263
- Nor M H M, Mubarak M F M, Elmi H S A *et al*, 2015. Bioelectricity generation in microbial fuel cell using natural microflora and isolated pure culture bacteria from anaerobic palm oil mill effluent sludge. *Bioresource Technology*, 190: 458—465
- Quan X C, Sun B, Xu H D, 2015. Anode decoration with biogenic Pd nanoparticles improved power generation in microbial fuel cells. *Electrochimica Acta*, 182: 815—820
- Rabaey K, Versterarte W, 2005. Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. *Trends in Biotechnology*, 23(6): 291—298
- Rezaei F, Richard T L, Brennan R A *et al*, 2007. Substrate-enhanced microbial fuel cells for improved remote power generation from sediment-based systems. *Environmental Science & Technology*, 41(11): 4053—4058
- Ringeisen B R, Henderson E, Wu P K *et al*, 2006. High power density from a miniature microbial fuel cell using *Shewanella oneidensis* DSP10. *Environmental Science & Technology*, 40(8): 2629—2634
- Rismani-Yazdi H, Christy A D, Dehority B A *et al*, 2007. Electricity generation from cellulose by rumen microorganisms in microbial fuel cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 97(6): 1398—1407
- Samsudeen N, Radhakrishnan T K, Matheswaran M, 2016. Effect of isolated bacterial strains from distillery wastewater on power generation in microbial fuel cell. *Process Biochemistry*, 51(11): 1876—1884
- Takeuchi Y, Khawdas W, Aso Y *et al*, 2017. Microbial fuel cells using *Cellulomonas* spp. with cellulose as fuel. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 123(3): 358—363
- Tamura K, Dudley J, Nei M *et al*, 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8): 1596—1599
- Watanabe K, 2008. Recent developments in microbial fuel cell technologies for sustainable bioenergy. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106(6): 528—536
- Wei D, Zhang X, 2007. Current production by a deep-sea strain *Shewanella* sp. DS1. *Current Microbiology*, 55(6): 497—500
- Zhang G D, Feng S S, Jiao Y *et al*, 2017a. Cathodic reducing bacteria of dual-chambered microbial fuel cell. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(45): 27607—27617
- Zhang H M, Zhang R, Zhang G Y *et al*, 2014. Modified graphite electrode by polyaniline/tourmaline improves the

performance of bio-cathode microbial fuel cell. International Journal of Hydrogen Energy, 39(21): 11250—11257
Zhang P, Liu J, Qu Y P *et al*, 2017b. Enhanced *Shewanella oneidensis* MR-1 anode performance by adding fumarate in microbial fuel cell. Chemical Engineering Journal, 328:

697—702

Zhang W Z, Xie B Z, Yang L G *et al*, 2017c. Brush-like polyaniline nanoarray modified anode for improvement of power output in microbial fuel cell. Bioresource Technology, 233: 291—295

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF FACULTATIVE ANAEROBIC MARINE BACTERIUM *SHEWANELLA* SP. N3B_R AND ANALYSIS OF ITS ELECTRICAL PERFORMANCE IN A TWO-COMPARTMENT MICROBIAL FUEL CELL

WANG Zai-Ming, WANG Jian-Xin, YUAN Wen-Feng, LI Peng

(School of Ocean Science and Technology, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China)

Abstract A strain was isolated from wastewater and sludge in mariculture ponds and identified using 16S rRNA gene sequences and API 20NE biochemical analysis. The isolated strain was identified as *Shewanella* sp. N3B_R and was used as a biocatalyst on an anode in a dual-chamber microbial fuel cell (MFC), and the electrochemical performance was investigated. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) analysis revealed that modifying an anode with polyaniline could reduce the charge transfer resistance in the MFC, resulting in 3 and 10 times higher output voltage and power density, respectively, than the corresponding MFC with an unmodified carbon cloth electrode. Optimization was achieved using Box-Behnken design of response surface method, from which the optimum conditions were: temperature of 35°C, 5 g/L of aniline, and 0.2 mol/L of NaCl in concentration, under which the maximum yield of power density obtained was 522.1 mW/m².

Key words facultative; microbial fuel cell (MFC); 16S rRNA; Box-Behnken; *Shewanella* sp.