克雷伯氏菌燃料电池的电子穿梭机制研究

邓丽芳, 李芳柏, 周顺桂*, 黄德银, 倪晋仁

① 广东省生态环境与土壤研究所, 广州 510650;

② 北京大学环境工程系, 北京 100871

* 联系人, E-mail: sgzhou@soil.gd.cn

2009-01-16 收稿, 2009-07-13 接受

国家自然科学基金(批准号: 20777013)、广东省自然科学基金(批准号: 07006759)和广东省科学院科技创新引导项目(编号: CX200704)资助

摘要 微生物燃料电池(microbial fuel cell, MFC)中阳极电子传递过程是决定 MFC 产电的关键因素与限速步骤. 以肺炎克雷伯氏菌 L17 菌株为催化剂, 构建了阳极包裹型 MFC 反应器, 对其阳极电子传递机制进行了探讨. 结果显示, 碳毡阳极经 0.22 μm 微孔滤膜包裹后, 尽管排除了 L17 菌株与阳极直接接触 (即生物膜产电途径) 的可能性, 包裹型 MFC 仍能成功启动, 但其启动时间相对延长(270 h, 120 h)、输出电压降低(350.0 mV, 420.0 mV); 阳极液更换试验发现, 未包裹 MFC 电压可在 48 h 内恢复, 而包裹型 MFC 则约需要 120 h, 暗示除生物膜机制以外, 克雷伯氏 MFC 中还存在电子穿梭机制, 即 L17 菌体生长过程中可产生某种具有电化学活性的电子穿梭体, 穿梭于菌体和阳极间传送电子. 循环伏安扫描进一步证实电子穿梭体的存在; GC-MS 检测表明它为 2,6-二叔丁基苯醌(2,6-DTBBQ). 据此, 提出了克雷伯氏菌 MFC 中的 2,6-DTBBQ 穿梭产电机理.

关键词

微生物燃料电池
电子穿梭体
循环伏安法
肺炎克雷伯氏菌

微生物燃料电池(microbial fuel cell, MFC)是以微生物为催化剂将有机物中的化学能直接转化成电能的装置, 具有产电与有机废弃物处置的双重功效^[1,2]. MFC 产电过程包括: 底物(燃料)生物氧化、阳极还原、外电路电子传输、质子迁移与阴极氧还原等 5 个步骤, 其中阳极还原机制, 即底物氧化过程中产生的电子如何通过非导电性的细胞壁/膜传递至阳极表面, 是决定 MFC 产电性能的关键因素与限速步骤.

目前, 已证实的阳极电子传递方式有: (1)生物膜机制, 即产电微生物附着在电极表面形成生物膜, 通过细胞外膜上的细胞色素或导电菌毛(也称纳米导线)将呼吸链中的电子直接传递到电极表面的过程. 如 *Geobacter sulfurreducens*^[3], *Rhodospirillum rubrum*^[4], *Shewanella oneidensis* 等^[5]; (2)电子穿梭体机制, 即微生物可自身分泌一些小分子、可溶性的氧化还原活性物质(如 phenazine, quinones 等), 它们在菌体与电极之

间充当电子穿梭的介体. 电子穿梭体的研究, 不仅有助于了解 MFC 中混合菌群中协同互作机制, 而且为强化 MFC 产电性能提供了一条较现实的途径^[6]. 产电机理的研究需要以产电细菌纯培养物为前提. 目前, 只有 10 多株纯培养物被证实具有产电活性, 主要集中在 *Geobacter* 属与 *Shewanella* 属^[7]; 也只有少数几株纯培养物分泌的电子穿梭体被发现, 如 *Pseudomonas aeruginosa* KRP1 菌株^[8,9]产生的绿脓菌素(pyocyanine), *S. oneidensis* MR-1^[10]产生的核黄素等.

我们前期研究发现, 一种常见的兼性厌氧菌——肺炎克雷伯氏菌中的 L17 菌株(*Klebsiella pneumoniae* L17), 能够在阳极上形成生物膜, 直接催化氧化多种有机物产电^[11,12], 具有底物利用广泛、产电性能好、启动快速等优点. 尽管前期研究已经证实, *K. pneumoniae* L17 可利用生物膜机制产电, 但是除此以外, 是否存在其他胞外电子传递途径强化产电, 还需要

引用格式: 邓丽芳, 李芳柏, 周顺桂, 等. 克雷伯氏菌燃料电池的电子穿梭机制研究. 科学通报, 2009, 54: 2983~2987

Deng L F, Li F B, Zhou S G, et al. A study of electron-shuttle mechanism in *Klebsiella pneumoniae* based-microbial fuel cells. Chinese Sci Bull, 2009, 54, doi: 10.1007/s11434-009-0563-y

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2009-54-19-2983>

进一步研究. 为此, 本文以 *K. pneumoniae* L17 为 MFC 催化剂, 通过构建阳极包裹型(防止在阳极表面形成生物膜, 以消除生物膜机制的影响)MFC 反应器, 研究阳极还原过程中的电子穿梭体产电机理.

1 材料与方法

1.1 产电菌株及培养基质

肺炎克雷伯氏菌(*K. pneumoniae* L17, 保藏号为: CCTCC AB208106), 为革兰氏阴性、兼性厌氧的铁还原菌, 它在厌氧环境下能以柠檬酸、丙三醇、葡萄糖、蔗糖等作为电子供体, 同时还原水铁矿、针铁矿、纤铁矿、赤铁矿等 Fe(III)氧化物^[12].

采用 Luria-Bertani (LB)培养基 30 ℃ 恒温振荡培养 16 h, 收集菌体, 洗涤两次后, 悬浮于 0.85% 的无菌生理盐水, 即制成菌悬液, 浓度约 1×10^8 CFU/mL. MFC 阳极液(基质): 0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0), 3.0 g/L 葡萄糖, 0.25 g/L 氯化铵、0.1 g/L 氯化钾、5.85 g/L 氯化钠以及 10.0 mL/L 矿物质和 10.0 mL/L 维生素溶液^[13].

1.2 电池构型

构建阳极包裹型和未包裹型两种空气阴极 MFC 装置(见图 1), 阳极室尺寸为 3 cm×10 cm×10 cm, 阳极电极为 7 cm×10 cm×0.5 cm 碳毡, 膜阴极为热压在阳离子交换膜一侧的载二氧化锰碳布(电解二氧化锰, 属于 γ -晶形, 载量约为 (12 ± 0.05) mg/cm²). 其中, 包裹型 MFC 的阳极碳毡用 0.22 μ m 微孔滤膜(北化黎明膜分离技术有限责任公司)包裹, 目的是防止菌体细胞与阳极的直接接触, 排除生物膜产电机理. 反应器及阳极液使用前灭菌, 包裹和未包裹碳毡阳极均采

用 121 ℃ 湿热灭菌后装入反应器, MFC 在 (30 ± 1) 条件下运行.

1.3 测定项目与方法

输出电压由 16 通道信号采集器(AD8223, 北京瑞博华)自动采集存储, 每 2 min 记录 1 次. 电流 I 由欧姆定律 $I = U/R$ 计算, R 为外电阻, 除绘制极化曲线外 $R=1000 \Omega$. 电压输出达到峰值且稳定时, 由变阻箱改变外电阻(0~10000 Ω), 测得 MFC 不同外电阻时的输出电压, 根据 $P = U^2/R$, $P = IU/A$ 和 $i = I/A$ (其中 A 为阳极面积)分别求得输出功率、功率密度及电流密度, 绘制极化曲线. 由欧姆定律知, 输出功率最大时内阻等于外电阻, 因此电池内阻可通过极化曲线进行估算.

循环伏安扫描(CV, 上海辰华仪器公司): 以玻碳电极为工作电极, Ag/AgCl 电极 (饱和 KCl, 222 mV, SHE)为参比电极, 铂电极为辅助电极. 反应器阳极液换成不含维生素培养基(防止杂质干扰), 取 0 h 和 150 h 的 MFC 阳极液于 5 ℃, 8000 r/min 高速冷冻离心 20 min, 上清液经 0.22 μ m 滤头过滤除菌, 曝 N₂ 20 min 后进行循环伏安扫描, 扫描范围为 -0.7 ~ -0.2 V, 扫描速率为 50 mV/s.

气相色谱-质谱联用(GC-MS, 型号为 TRACE DSQ Thermo Fisher): 反应器阳极液换成不含维生素培养基(防止杂质干扰), 运行 150 h 后取样. 将所取阳极液于 5 ℃, 8000 r/min 高速冷冻离心 20 min, 上清液经 0.22 μ m 滤头过滤; 然后, 按 1:1 体积用正己烷萃取溶液中有有机物, 加冰超声 5 min, 待分层后取上层正己烷溶液, 重复操作 3 次; 将所得正己烷萃取液经过 450 ℃ 煅烧 3 h 的无水硫酸钠干燥; 最后旋转蒸发, 上机测试.

色谱测试条件: DB-5(60 m×0.25 mm×0.25 μ m) 毛细管柱; 载气为高纯 He 气, 恒流, 流量为 1 mL/min; 无分流进样, 进样量为 1 μ L; 进样口温度 230 ℃; 升温程序: 开始温度为 40 ℃ (2 min), 以 10 ℃/min 升至 150 ℃, 5 ℃/min 升至 200 ℃, 3 ℃/min 升至 270 ℃ (15 min); 离子源温度: 250 ℃; EI 源: 70 eV.

K. pneumoniae L17 产生的氧化还原电子穿梭体的种类和结构鉴定: 首先将明显出峰物质质谱图和 GC-MS 自带标准质谱图库中质谱图对比, 进行初步定性, 再通过保留时间及标准品质谱图对比分析, 进一步确认.

图1 两种 MFC 装置示意图

2 结果与讨论

2.1 电子穿梭机制的初步证据

图2为阳极包裹型和未包裹型MFC输出电压随时间的动态变化。如图所示,未包裹型MFC启动迅速,120 h后输出电压即可达423.5 mV($R=1000\ \Omega$),而包裹型MFC在启动后270 h左右才开始有明显的电压输出,约需370 h左右才达到其较高输出电压(316.2 mV)。推测原因可能是,包裹型MFC中产电微生物无法透过滤膜在电极上形成生物膜,无法利用生物膜产电途径产电,导致电池启动时间延长。后期输出电压缓慢上升,可能是菌体在生长过程中逐渐产生并分泌某种可溶性电子穿梭体,它穿梭于菌体和阳极间以传递电子。

图2 阳极包裹对MFC启动的影响

阳极液更换试验表明,在输出电压处于高值时更换阳极液后,未包裹型MFC输出电压在短时间(32 h)内稍有降低,在16 h后迅速恢复(图2)。这是由于*K. pneumoniae* L17在阳极碳毡上大量黏着,形成生物膜,阳极液更换后,生物膜继续产电。但包裹型MFC中,随着阳极液的更换,阳极液中的大部分电子穿梭体流失,输出电压显著下降,然后随着菌体的生长不断有新电子穿梭体产生,输出电压才得以缓慢恢复(约需120 h)。

表1显示,包裹型MFC最大输出功率密度为 $20.4\ \text{mW}/\text{m}^2$,仅为未包裹型的一半左右,但开路电压(546.8 mV)只比未包裹型低60.0 mV。且阳极碳毡经微孔滤膜包裹后,MFC的内阻显著增大,电池性能显著下降。分析原因是:1)微孔滤膜的包裹排除了*K. pneumoniae* L17的生物膜途径,胞外电子传递受到一

定程度的抑制;2)微孔滤膜的存在阻碍了基质或离子传递速率,导致电池极化严重。

表1 不同阳极处理MFCs性能比较

MFCs 型号	阳极处理	内阻/ Ω	最大功率密度/ $\text{mW} \cdot \text{m}^{-2}$	开路电压/ mV	电流密度/ $\text{mA} \cdot \text{m}^{-2}$
A	未包裹	50	41.7	604.8	199.2
B	微孔滤膜包裹	600	20.4	546.8	69.7

2.2 电子穿梭机制的电化学证据

包裹型MFC运行150 h后,取阳极液冷冻离心、过滤除去菌体细胞,除菌阳极液采用循环伏法扫描。图3比较了无维生素的原始阳极液(0 h)与150 h除菌阳极液的CV扫描图谱,结果表明,150 h的除菌阳极液在-0.45和-0.50 V左右的位置出现一对氧化还原对峰,0 h阳极液扫描未检测到氧化还原峰,说明*K. pneumoniae* L17菌株在生长过程中产生某种具有电化学活性的物质。阳极液除去菌体后仍可产生氧化还原峰,说明这种物质可被菌体分泌至胞外阳极液中起作用。2005年,Rabaey等人^[8,9]首次用CV法检测到绿脓杆菌KRP1(*Pseudomonas aeruginosa*)向培养液中分泌的绿脓菌素的氧化还原峰,并且发现,阳极的存在可促进绿脓菌素分泌; Marsili等人^[10](2008年)发现,*Shewanella*经96 h培养后,阳极液(除菌)在0.1和-0.21 V的位置有一对氧化还原对峰,联合LC-MS检测证实此峰为*Shewanella*所分泌的电子穿梭体核黄素。

为分析*K. pneumoniae* L17产生的氧化还原电子穿梭体的可能种类和结构,用GC-MS检测150 h除菌阳极液中可能存在的电化学活性物质,结果如图4所示。在色谱图上,出峰时间为19.11, 20.61, 21.10, 21.30和23.13 min的位置各有一个明显的峰,经GC-MS测试分析,推测其分别为2,6,7-三甲基十烷、

图3 MFC阳极液循环伏安曲线

图4 2,6-二叔丁基苯醌(2,6-DTBBQ)样品色谱图(a); 样品质谱图(b)和标样质谱图(c)

2,6-二叔丁基苯醌、四十四正构烷烃、2,4-二叔丁基苯酚和四甲基十七烷等。

已有研究表明,许多醌类化合物具有电子穿梭功能^[12,14~17]。例如,Keck等人^[16](2002年)发现,*Sphingomonas xenophaga* BN6能合成并分泌一种醌型化合物(1,2-dihydroxynaphthalene)作为电子穿梭体传送电子;2003年,Dos Santos等人^[17]发现,蒽醌-2,6-二磺酸盐(AQDS)可作为电子穿梭体加速偶氮染料的还原脱色,其作用机制为: AQDS中的苯醌结构从微生物细胞中获得电子还原成对苯二酚,对苯二酚将电子交给偶

氮染料后重新氧化变回苯醌结构,起到电子穿梭体的作用;我们的研究也证明,*K. pneumoniae* L17可利用AQDS作为电子穿梭体,在不溶性铁氧化物和菌体间反复穿梭传送电子,低浓度AQDS(0.1 mmol/L)的存在即可将水铁矿的还原溶解速率提高7.9倍^[12]。因此,通过和仪器标准质谱图库中质谱图对比,本文重点对推测含有醌类结构的化合物进行定性分析,而未对不含醌类结构的化合物一一进行标样质谱图定性分析。样品中检测出含醌类结构的2,6-DTBBQ,其结构式、质谱图及标准物质的质谱图见图4,仪器检出限为5 μg/L(3倍信噪比,2,6-DTBBQ标准品购自美国Sigma-Aldrich公司)。

由图4结构式可知,2,6-DTBBQ含有醌基结构,因此可以推测,在*K. pneumoniae* L17催化微生物燃料电池中,2,6-DTBBQ可作为电子穿梭体强化MFC产电。

综上所述,*K. pneumoniae* L17菌MFC中除生物膜产电机理外,还存在电子穿梭体产电机理。即*K. pneumoniae* L17在代谢过程中可产生2,6-DTBBQ作为电子穿梭体,它穿梭于菌体和阳极之间传送电子。

2.3 电子穿梭产电机理

图5提出了克雷伯氏菌电子穿梭产电机理。克雷伯氏菌L17菌株所产生的电子穿梭体传递电子的过程为:氧化态的2,6-二叔丁基苯醌(2,6-DTBBQ)进入微生物细胞内接收电子,转变成还原态的2,6-二叔丁基对苯二酚(2,6-DTBHQ),然后由2,6-DTBHQ将电子传递给阳极,自身失去电子被氧化再生成为2,6-DTBBQ,进入下一氧化还原过程。简单地说,就是2,6-DTBBQ穿梭于菌体与阳极间传送电子,达到胞外电子传递的功效。

图5 克雷伯氏菌燃料电池电子穿梭产电机理

作为一种胞外电子传递方式,微生物自身分泌电子穿梭体介导阳极还原,具有重要的理论意义与应用前景。它为降低电池内阻、提高 MFC 功率密度提供了一条有潜力的途径。但迄今为止,在 MFC 中只有绿脓菌素、核黄素等少数几种电子穿梭体被证实参与阳极还原。本文首次发现肺炎克雷伯氏菌 L17 菌株可产生与分泌 2,6-二叔丁基苯醌(2,6-DTBBQ),提出了 2,6-DTBBQ 介导的电子穿梭产电机理,但对其合成途径、产生条件、作用范围、贡献大小等方面均尚未涉及,今后需做更深入研究。

3 结论

(1) 以肺炎克雷伯氏菌 L17 菌株为阳极催化剂,

构建了阳极包裹型 MFC 反应器,对其阳极电子传递机制进行了探讨。结果表明, L17 菌体生长过程中可分泌某种具有电化学活性的电子穿梭体,穿梭于菌体和阳极间传送电子。

(2) 循环伏安扫描和 GC-MS 检测分析表明, *K. pneumoniae* L17 所产生的电子穿梭体为 2,6-二叔丁基苯醌。

(3) 提出了克雷伯氏菌的电子穿梭产电机理: 即克雷伯氏菌在 MFC 中生长过程中分泌 2,6-二叔丁基对苯醌(2,6-DTBBQ), 它进入微生物细胞内接收电子, 转变成还原态的 2,6-二叔丁基对苯二酚(2,6-DTBHQ), 然后由 2,6-DTBHQ 将电子传递给阳极, 自身失去电子被氧化再生, 进入下一氧化还原过程。

参考文献

- 1 Park D H, Zeikus J G. Improved fuel cell and electrode designs for producing electricity from microbial degradation. *Biotechnol Bioeng*, 2003, 81: 348—355[DOI]
- 2 Gil G C, Chang I S, Kim B H, et al. Operational parameters affecting the performance of a mediator-less microbial fuel cell. *Biosens Bioelectron*, 2003, 18: 327—334[DOI]
- 3 Bond D R, Lovley D R. Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69: 1548—1555[DOI]
- 4 Chaudhuri S K, Lovley D R. Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells. *Nat Biotechnol*, 2003, 21: 1229—1232[DOI]
- 5 Reguera G, Carthy K D, Mehta T, et al. Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature*, 2005, 435: 1098—1101[DOI]
- 6 卢娜, 周顺桂, 倪晋仁. 微生物燃料电池的产电机理研究进展. *化学进展*, 2008, 20: 1233—1240
- 7 Wrighton K C, Agbo P, Warnecke F, et al. A novel ecological role of the Firmicutes identified in thermophilic microbial fuel cells. *ISME J*, 2008, 2: 1146—1156[DOI]
- 8 Rabaey K, Boon N, Siciliano S D, et al. Biofuel cells select for microbial consortia that self-mediate electron transfer. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70: 5373—5382[DOI]
- 9 Rabaey K, Boon N, Hofte M, et al. Microbial phenazine production enhances electron transfer in biofuel cells. *Environ Sci Technol*, 2005, 39: 3401—3408[DOI]
- 10 Marsili E, Baron D B, Shikhar I D, et al. *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2008, 105: 3968—397[DOI]
- 11 Zhang L X, Zhou S G, Zhuang L, et al. Microbial fuel cell based on *Klebsiella pneumoniae* biofilm. *Electrochem Commun*, 2008, 10: 1641—1643[DOI]
- 12 Li X M, Zhou S G, Li F B, et al. Fe (III) oxides reduction and carbon tetrachloride dechlorination by a newly isolated *Klebsiella pneumoniae* strain L17. *J Appl Microbiol*, 2009, 106: 130—139[DOI]
- 13 Lovley D R, Phillips E J P. Novel mode of microbial energy metabolism: Organism carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron and manganese. *Appl Environ Microbiol*, 1988, 54: 1472—1480
- 14 Newman D K, Kotter R. A role for excreted quinones in extracellular electron transfer. *Nature*, 2000, 405: 94—97[DOI]
- 15 Rau J, Knackmuss HJ, Stolz A. Effects of different quinoide redox mediators on the anaerobic reduction of azo dyes by bacteria. *Environ Sci Technol*, 2002, 36: 1497—504[DOI]
- 16 Keck A, Rau J, Reemtsma T, et al. Identification of quinoide redox mediators that are formed during the degradation of naphthalene-2-sulfonate by *shingomonas xenophaga* BN6. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68: 4341—4349[DOI]
- 17 Dos Santos A B, Cervantes F J, Yaya-Beas R E, et al. Effect of redox mediator, AQDS, on the decolourisation of a reactive azo dye containing triazine group in a thermophilic anaerobic EGSB reactor. *Enzyme Microbiol Tech*, 2003, 33: 942—951[DOI]