

微生物燃料电池阳极生物膜微生物群落的 PCR-DGGE 分析

王华金¹, 朱能武^{1,2*}, 李 冲¹, 程 丹¹, 吴平霄^{1,2}

(1.华南理工大学环境科学与工程学院, 广州 510006; 2.工业聚集区污染控制与生态修复教育部重点实验室, 广州 510006)

摘 要:以养殖废水沼气池沼泥为接种物,构建了乙二胺、三氯化铁改性阳极的无介体单室微生物燃料电池(MFC)体系,均成功实现了连续产电,同时对废水中的污染物也具有很好的去除效果。为了更好地研究微生物燃料电池阳极生物膜的微生物多样性,分别采集了两种 MFC 阳极生物膜样品,采用 PCR-DGGE 法研究了一个完整产电周期的启动期(S)、葡萄糖产电稳定期(RG)和养殖废水原水稳定期(RS)的 MFC 阳极生物膜的微生物群落变化。结果表明,不同时期 MFC 阳极生物膜的微生物多样性存在明显差异,S-RG、S-RS、RG-RS 的微生物群落相似性分别为 70.1%、42.0%和 50.6%。两种不同阳极富集的生物膜微生物群落相似性仅为 48%,这表明不同改性方法所得的阳极对微生物具有选择性作用。对 DGGE 条带测序和比对发现,不同时期阳极生物膜上优势微生物包括 *Trichococcus* sp.、*Thauera* sp.、*Azoarcus* sp.、*Azospirillum* sp.、*Zobellella* sp.、*Pseudomonas* sp.、*Aeromonas* sp.、*Thiobacillus* sp.、*Desulfovibrio* sp.、*Thiomonas* sp.,其中 *Pseudomonas* sp.、*Aeromonas* sp.和 *Desulfovibrio* sp.与已报道的相关产电微生物具有较高的序列相似度,这些菌种可能是本 MFC 体系中的主要产电菌。

关键词:微生物燃料电池;养殖废水;改性阳极;PCR-DGGE;微生物群落结构

中图分类号:X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2012)07-1431-07

Microbial Community of Anodic Biofilm of Microbial Fuel Cells Revealed by PCR-DGGE Analysis

WANG Hua-jin¹, ZHU Neng-wu^{1,2*}, LI Chong¹, CHENG Dan¹, WU Ping-xiao^{1,2}

(1.College of Environmental Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China; 2.Key Laboratory of Pollution Control and Ecosystem Restoration in Industry Clusters, Ministry of Education, Guangzhou 510006, China)

Abstract:Two microbial fuel cells(MFCs) equipped with ethylenediamine and ferric trichloride modified anodes were operated continuously by using swine manure marsh-gas tank sludge as the inoculums. The MFCs could generate electricity from wastewater, and the pollutants could also be efficiently removed as well. In order to better understand microbial community of the anodic biofilm of the MFCs, the anodic biofilm samples of the MFCs including start-up phase(S), electricity-producing stationary phase(RG), and real wastewater electricity-producing stationary phase(RS) were collected and analyzed by using PCR-DGGE method. The results showed that the microbial diversity appeared significant differences among the different anodic biofilm samples. The microbial community similarity of S-RG, S-RS and RG-RS was 70.1 %, 42.0 % and 50.6 %, respectively. Besides, the microbial community similarity of the anodic biofilm of the two MFCs when fed with raw wastewater was only 48.0 %, which implied that the anodes modified with the two different methods had a selective effect on microbes. The sequencing and comparison of the DGGE bands revealed that the dominant bacteria of the anodic biofilm were *Trichococcus* sp., *Thauera* sp., *Azoarcus* sp., *Azospirillum* sp., *Zobellella* sp., *Pseudomonas* sp., *Aeromonas* sp., *Thiobacillus* sp., *Desulfovibrio* sp., and *Thiomonas* sp., respectively. Among them, *Pseudomonas* sp., *Aeromonas* sp. and *Desulfovibrio* sp. were the possible high electrochemically active bacteria in this study. It was indicated that the microbial community structures were significantly different among the different biofilm samples and the anodes modified by different methods. The results provide an academic basis for understanding the development of anodic biofilm of MFCs.

Keywords:microbial fuel cell; swine wastewater; modified anode; PCR-DGGE; microbial community structure

收稿日期:2012-01-13

基金项目:国家自然科学基金项目(30800796);教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-11-0166);教育部高校博士点专项基金项目(20070561082);广东省科技计划项目(2007A020100001)

作者简介:王华金(1986—),男,湖北人,硕士研究生,主要从事水污染控制与环境生物技术研究。E-mail:haoo1212@163.com

* 通讯作者:朱能武 E-mail:nwzhu@scut.edu.cn

微生物燃料电池(Microbial Fuel Cell, MFC)是以微生物为生物催化剂,燃料(底物)中有机物或无机物能在阳极区被氧化成二氧化碳,产生的电子和质子被转移到阴极区后与氧气反应生产水,最终将燃料(底物)中有机物或无机物的化学能转化为电能^[1]。与其他燃料电池相比,MFC 技术具有无污染、污泥产生量小的特点,并且在处理污水的同时,还能获得清洁的电能。近年来,MFC 的应用范围得到大大拓宽,从最初以葡萄糖、醋酸钠、甲醇、乙醇等纯净物为燃料,到以生活污水、食品加工废水^[2]、填埋场垃圾渗滤液^[3]、畜禽废水^[4-5]等现实废弃物为燃料,不仅达到净化水质的效果,同时获得了清洁的电能。自从微生物燃料电池得到广泛应用以来,产电微生物的多样性一直是该领域的研究热点,多国研究人员分别针对葡萄糖^[6]、河水和人工废水^[7]、半胱氨酸^[8]、酒精^[9]等为燃料的 MFC 体系微生物多样性展开了研究,为产电微生物的发现提供了理论依据。

自 1993 年 Muyzer 等^[10]将 PCR-DGGE 应用在微生物分子生态学研究以来,该技术在环境样品领域得到了广泛的应用^[11-15]。PCR-DGGE 具有可靠、可重复、快速、容易操作等特点,能直接显示微生物群落中优势组成成分并可以同时多个环境样品进行分析,非常适合调查环境微生物群落的时空变化,还可以通过序列分析鉴定群落成员。因而,该技术已成为分析复杂环境中微生物群落的多样性及动态变化的主要指纹技术。

本实验在运行两种不同改性阳极 MFC 的基础上,考察了一个完整产电周期,包括葡萄糖启动期、葡萄糖稳定期、原水(养殖废水)稳定期在内的 MFC 阳极生物膜微生物群落结构的变化。首先从长期稳定运行的 MFC 中采集阳极生物膜样品,提取微生物总 DNA,应用 PCR-DGGE、DNA 测序以及系统发育分析等分子生物学技术,对不同时期和不同改性阳极生物膜的微生物群落进行研究,以期获得改性阳极生物膜上微生物组成和功能以及动态变化规律,从而为产电微生物的研究提供思路和依据。

1 材料与方法

1.1 MFC 结构、启动及运行

MFC 为长方体(长×宽×高=8.5 cm×7 cm×6.5 cm,有效容积 200 mL),材质为 0.5 cm 的有机玻璃,一端以盲板封闭,另一端用夹板放置阴极。空气阴极为载铂碳纸(0.5 mg·m⁻²),阳极分别为本实验室采用乙二

胺和三氯化铁改性过的碳毡(BET 1 200 m²·g⁻¹, 2 mm),电极间距为 3.5 cm。

MFC 的启动与运行参照 Logan 实验室的接种方法^[16],采用序批式方式运行,设置 3 个重复。取接种污泥悬浮液和 1 g·L⁻¹ 葡萄糖营养液(人工废水),按 1:1 体积比混合后,接种 MFC。接种后,采用 Keithley 2700 采集 MFC 的输出电压。启动期间,将外回路电阻调为 1 000 Ω,当输出电压降低到 5 mV 左右时,更换接种液。依此步骤,直到获得稳定的输出电压,并达到 100 mV 以上。此后,以 1 g·L⁻¹ 葡萄糖营养液进行培养,当接种 MFC 获得稳定重复的输出电压时,视为启动成功,并将外电阻调为 500 Ω。然后,逐步降低葡萄糖营养液用量、加大养殖废水原水比例,直至完全为养殖废水原水。实验在 30 ℃恒温条件下运行。

MFC 反应器进水和出水的 COD_{Cr}、氨氮和臭味的度量分别采用纳氏试剂比色法(GB 7479—1987)、重铬酸氧化法(GB 11914—1989)和臭气定性描述法,设置 3 个重复,取均值报道。

1.2 样品 DNA 的制备

采集 4 种阳极生物膜样品,分别为乙二胺改性阳极 MFC 葡萄糖启动期、葡萄糖稳定期、原水稳定期的样品,以及三氯化铁改性阳极 MFC 原水稳定期的样品,与重复实验相应样品混合后,分别标记为 MF-1、MF-2、MF-3 和 MF-4。

生物膜总 DNA 的提取与纯化采用修改后的杨朝晖等^[17]的方法。采集的生物膜样品解冻后,剪部分样品,溶于 5 mL 提取缓冲液(100 mmol·L⁻¹ Tris·Cl, 100 mmol·L⁻¹ EDTA-Na₂, 200 mmol·L⁻¹ NaCl, 2% CTAB, pH=8.0) 中,37 ℃振荡 45 min。加入 0.75 mL 20% SDS,65 ℃水浴 1 h。12 000 r·min⁻¹, 10 min 离心,收集上清液。上清液用等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提 2 次,加入终浓度 0.3 mol·L⁻¹ 的 NaAc(pH=5.2)及 2 倍体积的无水乙醇,室温静置沉淀 1 h。在 4 ℃、12 000 r·min⁻¹ 离心 20 min,收集沉淀,并用 70%乙醇漂洗 2 次,晾干后溶于 50 μL TE 中。

1.3 16S rDNA 基因 V3 区扩增

扩增反应参照 Niemi 等^[18]的方法。16S rDNA 基因 V3 区的引物选用对大多数细菌与古菌的 16S rDNA 基因 V3 区具有特异性的引物对 F₃₅₇GC 与 R₅₁₈^[11],分别为 F₃₅₇: (5'-CCCTACGGGAGGCAGCAG-3'); R₅₁₈: (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3');GC 发卡结构:(5'-CGCCCGCCGCGCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGG-3')。反应体系为 50 μL 总体积, H₂O 41.25

μL , $10\times\text{Buffer}$ (含 $2.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ MgCl}_2$) $5\text{ }\mu\text{L}$, dNTP ($10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) $1\text{ }\mu\text{L}$, $\text{F}_{357}\text{-GC}$ ($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) $1\text{ }\mu\text{L}$, R_{518} ($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) $1\text{ }\mu\text{L}$, Taq 酶 ($5\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) $0.25\text{ }\mu\text{L}$, 模板 DNA $0.5\text{ }\mu\text{L}$ 。设置阴性对照。反应程序: $94\text{ }^\circ\text{C}$ 4 min 预变性; $94\text{ }^\circ\text{C}$ 0.5 min ; $58\text{ }^\circ\text{C}$ 1 min ; $72\text{ }^\circ\text{C}$ 30 s ; 30 Cycles , $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 7 min 。取 PCR 产物各 $3\text{ }\mu\text{L}$, 1.5% 琼脂糖凝胶加 5% Goldview 染液, $1\times\text{TAE}$ 缓冲液, 120 V 稳压电泳 30 min , 用 GE Health 凝胶成像系统拍照。

提取的生物膜基因组 DNA 样品, 经过琼脂糖凝胶电泳进行检测, 得到的片断约为 23 kb (如图 1); 对 PCR 产物的检测结果显示, 16S rDNA V3 扩增效果好且基因片段大小在 250 bp 左右 (如图 2), 适于后续的 DGGE 电泳分析。

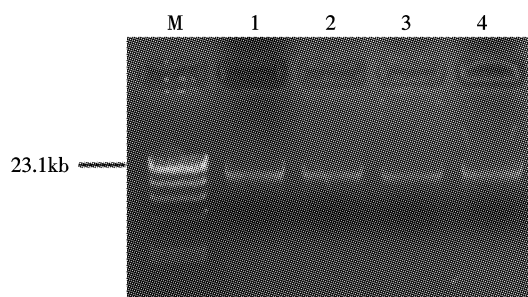


图1 样品 DNA 电泳图

Figure 1 The picture of extracted DNA

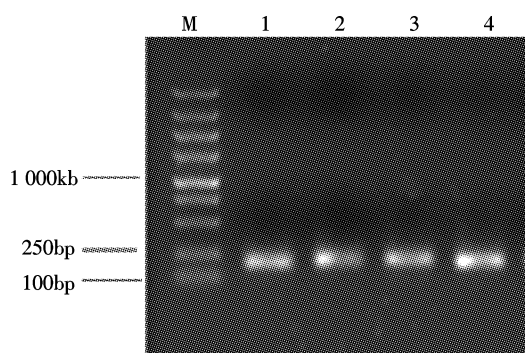


图2 PCR 产物电泳图

Figure 2 The picture of PCR products

1.4 变性梯度凝胶电泳 DGGE

取 400 ng 的 V3 区 PCR 产物, 采用 D-Code 突变检测系统对样品进行无重复 DGGE 分析。所用的聚丙烯酰胺凝胶浓度为 8% (丙稀酰胺: 双丙稀酰胺 = $37.5:1$), 变性剂浓度从 $30\%\sim 60\%$ (100% 的变性剂为 $7\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素, 40% 甲酰胺)。在 60 V 电压下, $60\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温, $1\times\text{TAE}$ 中电泳 16 h 。电泳完毕后, 用超纯水冲洗胶, 然后将胶放进含 5% Goldview 的染液中, 置于摇床上染色 30 min 后, 在 GE Health 成像系统拍照。

1.5 DGGE 图谱分析

观察各样品的 PCR 产物经 DGGE 分离后的电泳图谱, 用 Quantity One 分析软件对 DGGE 图谱泳道和条带进行自动识别。用 Sorenson 配对比较相似性系数 (Pairwise similarity coefficient, C_s), 比较不同样品 DGGE 指纹图谱的相似性, 计算公式为:

$$C_s = 2j/(a+b)$$

式中: a 、 b 表示两个比较对象中的 DNA 条带数目, j 表示 a 和 b 中相同的条带数量。

多样性指数 (H)、物种丰度 (S) 指标被用来比较各个样品的细菌多样性。公式为:

$$H = -\sum_{i=1}^S p_i \ln p_i = -\sum_{i=1}^S (N_i/N) \ln (N_i/N)$$

式中: p_i 是某个样品中单一条带的强度在该样品中的所有条带总强度中所占的比率, S 是某个样品中所有条带数目总和。

1.6 条带的回收测序和系统发育分析

选取较有代表性的条带, 用洁净的手术刀片将目标 DGGE 条带完整的切下, 并装入 1.5 mL 离心管中, 备用。回收 DGGE 条带中的目标 DNA。分别取以上模板梯度稀释后作 PCR, 引物序列为 F_{338} ($5'\text{-ACTCC-TACGGGAGGCAGCAG-3'}$)、 R_{518} : ($5'\text{-ATTACCG CG-GCTGCTGG-3'}$)。反应体系为 $50\text{ }\mu\text{L}$ 总体积, ddH_2O $40.75\text{ }\mu\text{L}$; $10\times\text{Buffer}$ (含 $2.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ MgCl}_2$) $5\text{ }\mu\text{L}$; dNTP ($10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) $1.0\text{ }\mu\text{L}$; 338f ($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) $1.0\text{ }\mu\text{L}$; 518r ($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) $1.0\text{ }\mu\text{L}$; Taq ($5\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) $0.25\text{ }\mu\text{L}$; 模板 DNA $1.0\text{ }\mu\text{L}$ 。反应程序: $94\text{ }^\circ\text{C}$ 4 min 预变性; $94\text{ }^\circ\text{C}$ 0.5 min ; $58\text{ }^\circ\text{C}$ 1 min ; $72\text{ }^\circ\text{C}$ 0.5 min ; 30 Cycles , $72\text{ }^\circ\text{C}$ 7 min 。 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

检测到明亮的目标 DNA 扩增条带后, 将产物送 Invitrogen 上海分公司完成测序, 使用 GenBank 的 Sequin win32 提交序列, $\text{M1}\sim\text{M17}$ 的登录号为 JQ771693~JQ771709。

使用 GenBank 的 BLAST 程序, 将目标序列与数据库中的序列进行比对, 获得各条序列的同源性信息, 然后利用 GenBank 中得到与其最大同源性序列, 采用 Neighbor-Joining 法和 MEGA4.1 软件构建无树根系统发育树。

2 结果与讨论

2.1 MFC 的产电和水质净化效果

接种后, MFC1 (乙二胺改性阳极) 在启动 20 d 后稳定输出电压达到 0.514 V , 对应输出功率密度为

332 $\text{mW} \cdot \text{m}^{-2}$, MFC2(三氯化铁改性阳极)在启动 22 d 后稳定输出电压达到 0.527 V, 对应输出功率密度为 349 $\text{mW} \cdot \text{m}^{-2}$ (外阻 500 Ω)。同时,分别采用稳态放电法测量两个 MFC 利用养殖废水原水产电稳定期的内阻, MFC1 和 MFC2 的内阻分别为 169 Ω 和 178 Ω , 对应最大功率密度分别为 208 $\text{mW} \cdot \text{m}^{-2}$ 和 158 $\text{mW} \cdot \text{m}^{-2}$ 。

水质分析结果表明, 经过一个运行周期(4 d), MFC1 和 MFC2 对养殖废水原水的 COD_Cr 平均去除率分别为 85% 和 78%, 氨氮平均去除率分别为 52% 和 45%。MFC1 的 COD_Cr 和氨氮日平均去除量分别约为 0.43 $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$ 和 0.08 $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$, MFC2 的 COD_Cr 和氨氮日平均去除量分别约为 0.39 $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$ 和 0.07 $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$ 。同时, 两个 MFC 都具有良好的除臭能力。

2.2 微生物类群的差异

取样品各 400 ng 的 V3 区 PCR 产物, 用 D-Code 突变检测系统进行 DGGE 分析, DGGE 图谱如图 3 所示。经 Quantity one 软件分析, 有关微生物多样性指数(H)、物种丰度(S)和各样品的条带相对丰度如图 4 和图 5 所示。

从图 3 和图 4 可以看出, 各样品中的条带都较多, 表现为含有 32~41 条条带, 其中 MF-2 总条带数最多, MF-4 总条带数最少, 说明有多种微生物富集生长在阳极生物膜上, 但不同样品的微生物相又存在明显的差异。对比前 3 个样品, 可以明显看出明暗条带的不同, 说明不同时期都有各自不同的优势菌(较亮条带)。对比后两个样品可知, 同时期阳极生物膜上总的微生物相也存在一定的差异性, 其中 M1、M2 存

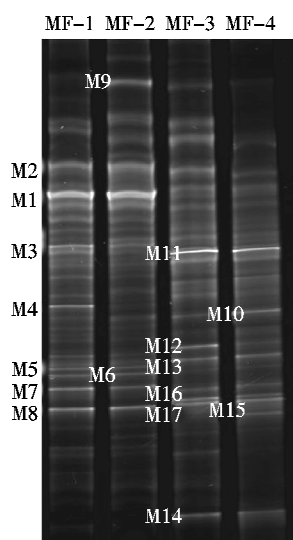


图 3 样品的 DGGE 图谱

Figure 3 The picture of DGGE

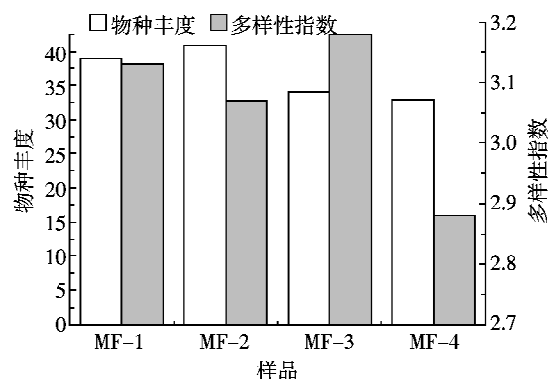


图 4 不同样品中细菌多样性指数(H)和物种丰度(S)

Figure 4 The picture of diversity index and species abundance

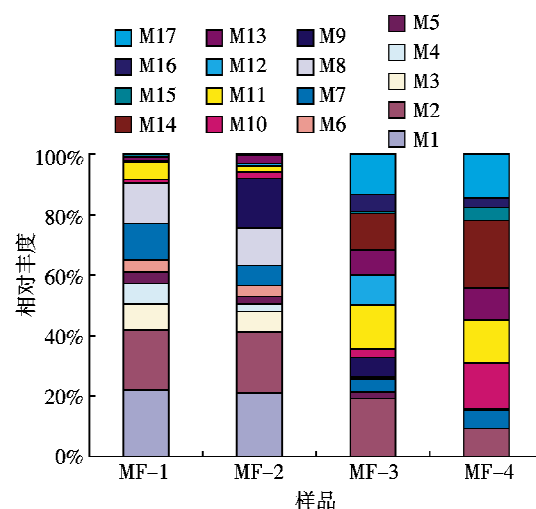


图 5 样品 DGGE 条带相对丰度变化

Figure 5 Variations of the relative DGGE band abundance

在于 MF-3 中, 但在 MF-4 中并没有相应的条带, 说明不同改性方法对阳极生物膜表面的微生物具有选择性作用。从图 5 可以看出, M9、M10、M11、M12、M13、M14、M16、M17 在后两个样品中存在的比例相对较多, 说明这些微生物都能适应 MFC 环境。

2.3 微生物群落相似性分析

依据建立的条带识别系统, 比对各个泳道拥有的总条带, 从而计算出各个样品间的相似性系数 C_s 。从表 1 可以看出, MFC1 在 3 个时期的微生物存在差异性, 葡萄糖启动期和葡萄糖稳定期相似性系数为 72.0%, 葡萄糖稳定期和原水稳定期相似性系数为 45.7%。而 MFC1 和 MFC2 在原水稳定期时微生物同样存在明显的差异, 其相似性系数仅为 48.0%。

2.4 同源性比较和系统发育分析

选取图 3 中有编号的条带进行测序, 将所得到的序列片段在 GeneBank 数据库中用 Blast 进行检索和同源性分析, 构建了系统发育树(图 6)。如图 6 所示,

表 1 不同微生物群落样品相似性系数 C_s (%)				
Table 1 The coefficient of similarity of different microbial community samples(%)				
样品	MF-1	MF-2	MF-3	MF-4
MF-1	100.0	72.0	40.6	37.3
MF-2		100.0	45.7	27.5
MF-3			100.0	48.0
MF-4				100.0

系统发育树中 M1~M17 表示明亮的目标 DNA 扩增条带对应种属的微生物，分别与 *Trichococcus* sp.(束毛

球菌属)、*Thauera* sp.(陶厄氏菌属,β-变形菌纲)、*Azoarcus* sp.(固氮弓菌属,β-变形菌纲)、*Azospirillum* sp.(固氮螺菌属,α-变形菌纲)、*Zobellella* sp.(气单胞菌属,γ-变形菌纲)、*Pseudomonas* sp.(假单胞菌属,γ-变形菌纲)、*Aeromonas* sp.(气单胞菌属,γ-变形菌纲)、*Thiobacillus* sp.(硫杆状菌属,β-变形菌纲)、*Desulfovibrio* sp.(脱硫弧菌属,δ-变形菌纲)、*Thiomonas* sp.(硫单胞菌属,β-变形菌纲)以及未培养微生物具有较高的序列相似度。

Logan 等^[19]认为产电微生物广泛存在于自然环

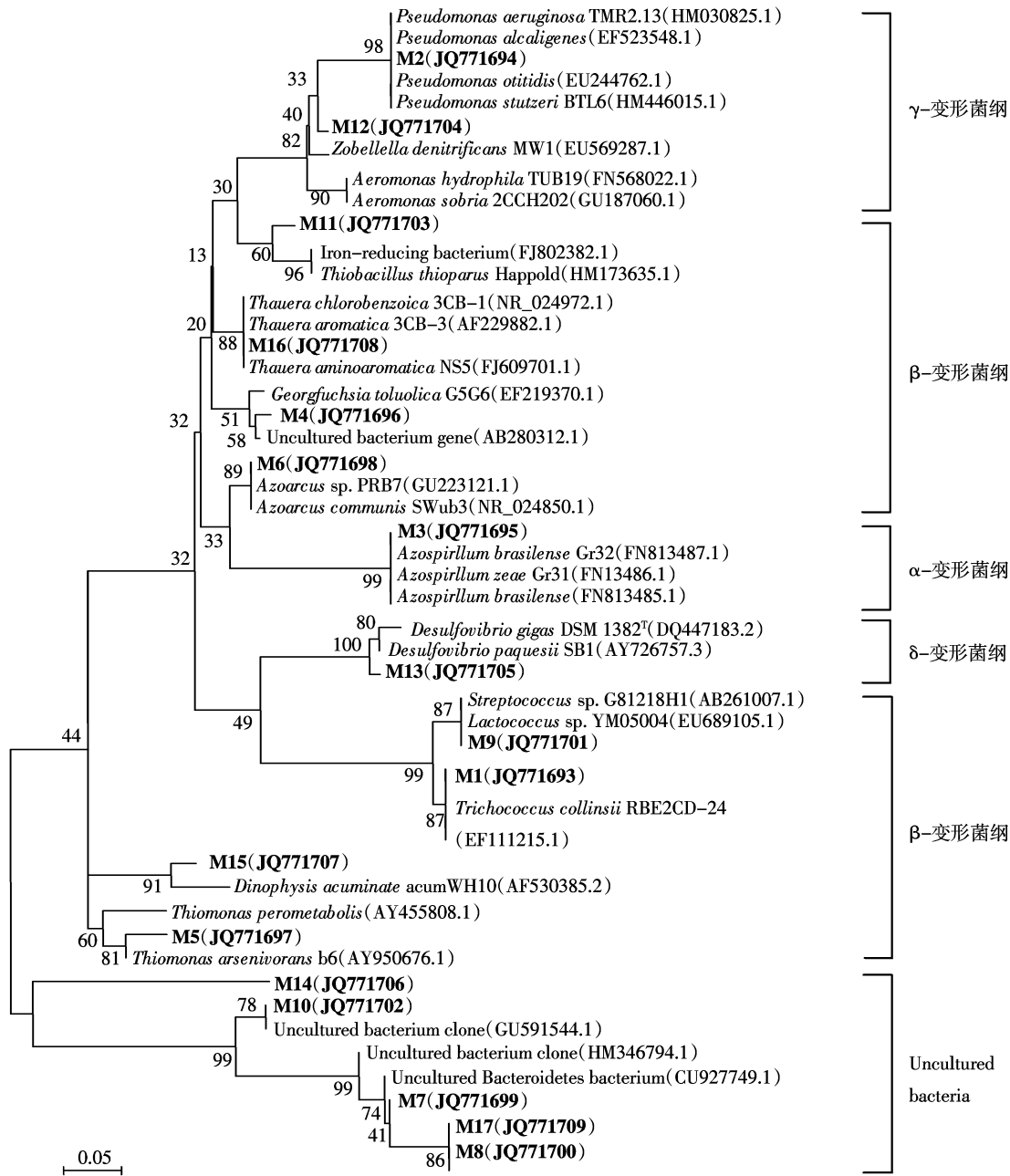


图 6 系统发育树
Figure 6 Phylogenetic tree

境中,大致来自于细菌域的 3 个分支:变形菌、厚壁菌和目前还没被发现的菌种。常见的产电微生物为 *Geobacter* sp.^[20]、*Shewanella* sp.^[21]、*Klebsiella* sp.^[22]、*Corynebacterium* sp.^[23]、*Pseudomonas* sp.^[24]、*Aeromonas* sp.^[25]、*Desulfovibrio* sp.^[26]、*Clostridium* sp.^[27]、*Enterobacter* sp.^[28]、*Lactococcus* sp.^[29]等。本研究中 MFC 阳极生物膜以 *Proteobacteria* 为主,这与很多文献所报道的一致, *Proteobacteria* 菌广泛存在于 MFC 阳极生物膜中^[7,30]。本研究中的 *Pseudomonas* sp.、*Aeromonas* sp.、*Desulfovibrio* sp.与已报道的产电微生物具有较高的系列相似度,这些菌种可能为本实验 MFC 中主要的产电菌。Rabaey 等^[24]发现在 MFC 中分离出的 *Pseudomonas aeruginosa* 能代谢产生绿脓菌素作为电子传递介体。Pham 等^[25]发现从 MFC 阳极膜上分离的 *Aeromonas hydrophila* 具有电化学活性,属于铁还原菌属,该菌种还能利用废水中的硝酸盐和硫酸盐。

然而,MFC 阳极生物膜表面占优势的细菌未必都是产电细菌,其中相对较多的是一些发酵细菌、产酸细菌等,它们起到初步降解水中有机物的作用,为产电细菌产电提供合适的基质。Mechichi 等^[31]认为 *Azoarcus* sp. 能利用硝酸盐作为电子受体来降解废水中的有机物。目前,在 MFC 中,还没有硝酸盐还原菌具有电化学活性的相关文献报道。但是, Kim 等^[21]已经证实 *Azoarcus* sp. 能够降解废水中硝酸盐和亚硝酸盐,而不是传输电子。本实验中 *Azospirillum* sp. 菌种主要为固氮菌^[32], *Trichococcus* sp. 为产酸细菌^[33]。

3 结论

以养殖废水沼气池沼泥为接种物,构建了乙二胺、三氯化铁改性阳极的空气阴极单室微生物燃料电池,均能利用养殖废水产电并能同时净化水质。

运用 PCR-DGGE 技术研究了 4 个样品中微生物的群落结构,生物膜微生物多样性丰富,微生物相复杂,有多种微生物富集生长在阳极生物膜上。

对 DGGE 条带测序和比对发现,不同时期和不同改性阳极的 MFC 阳极生物膜上的微生物群落存在明显差异,可能的主要产电菌为 *Pseudomonas* sp.、*Aeromonas* sp. 和 *Desulfovibrio* sp.。

参考文献:

- [1] Logan BE, Hamelers B, Rozendal R, et al. Microbial fuel cells: Methodology and technology[J]. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40:5181-5192.
- [2] Oh SE, Logan BE. Hydrogen and electricity production from a food processing wastewater using fermentation and microbial fuel cell technologies[J]. *Water Research*, 2005, 39:4673-4682.
- [3] You SJ, Zhao QL, Jiang JQ, et al. Sustainable approach for leachate treatment: electricity generation in microbial fuel cell[J]. *Journal of Environmental Science and Health (Part A)*, 2006, 41:2721-2734.
- [4] Min B, Kim J, Oh S, et al. Electricity generation from swine wastewater using microbial fuel cells[J]. *Water Research*, 2005, 39:4961-4968.
- [5] Yokoyama H, Ohmori H, Ishida M, et al. Treatment of cow-waste slurry by a microbial fuel cell and properties of the treated slurry as a liquid manure[J]. *Animal Science Journal*, 2006, 77:634-638.
- [6] Rabaey K, Boon N, Siciliano SD, et al. Biofuel cells select for microbial consortia that self-mediate electron transfer[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(9):5373-5382.
- [7] Phung NT, Lee J, Kang KH, et al. Analysis of microbial diversity in oligotrophic microbial fuel cells using 16S rDNA sequences[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 233(1):77-82.
- [8] Logan BE, Murano C, Scott K, et al. Electricity generation from cysteine in a microbial fuel cell[J]. *Water Research*, 2005, 39(5):942-952.
- [9] Kim JR, Jung SH, Regan JM, et al. Electricity and microbial community analysis of alcohol powered microbial fuel cells[J]. *Bioresource Technology*, 2007, 41(13):1004-1009.
- [10] Muyzer G, Ellen CW, Andre GU. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction genes coding for 16S rRNA[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59:695-700.
- [11] ZHAO Xing-qing, YANG Liu-yan, CHEN Can, et al. Study on the microbial diversity in lake sediments by the method of PCR-DGGE[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(11):3611-3616.
- [12] Foti MJ, Sorokin DY, Zacharova EE, et al. Bacterial diversity and activity along a salinity gradient in soda lakes of the Kulunda Steppe (Altai, Russia)[J]. *Extremophiles*, 2008, 12:133-145.
- [13] 王峰, 傅以钢, 夏四清, 等. PCR-DGGE 技术在城市污水化学生物絮凝处理中的特点[J]. *环境科学*, 2004, 25(6):74-79. WANG Feng, FU Yi-gang, XIA Si-qing, et al. Characteristics of municipal sewage chem-bioflocculation treatment process by using PCR-DGGE technology[J]. *Environmental Science*, 2004, 25(6):74-79.
- [14] Da Mota FF, Gomes EA, Marriel IE, et al. Bacterial and fungal communities in bulk soil and rhizospheres of aluminum tolerant and aluminum sensitive maize (*Zea mays* L.) lines cultivated in unlimed and limed Cerrado soil [J]. *Journal of Microbiology Biotechnology*, 2008, 18(5):805-814.
- [15] 吴利, 余育和, 冯伟松. PCR-DGGE 技术在环境微生物群落研究中的应用[J]. *合肥师范学院学报*, 2010, 28(6):103-108. WU Li, YU Yu-he, FENG Wei-song. Application of PCR-DGGE in study of microbial community[J]. *Journal of Hefei Normal University*, 2010, 28(6):103-108.
- [16] Logan BE. How to Inoculate your Cube MFC [EB/OL]. http://www.engr.psu.edu/ce/enve/logan/bioenergy/mfc_make_cell.htm, April 10th, 2011.
- [17] 杨朝晖, 肖勇, 曾光明, 等. 用于分子生态研究的堆肥 DNA 提

- 取方法[J]. 环境科学, 2006, 27(8):1613-1617.
- YANG Zhao-hui, XIAO Yong, ZENG Guang-ming, et al. DNA Extraction methods of compost for molecular ecology analysis [J]. *Environmental Science*, 2006, 27(8):1613-1617.
- [18] Niemi RM, Heiskanen I, Wallenius K. Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia[J]. *Journal of Microbiological Method*, 2001, 45(3):155-165.
- [19] Logan BE, Regan JM. Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells[J]. *Trends in Microbiology*, 2006, 14(12):512-518.
- [20] Bond DR, Lovley DR. Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(3):1548-1555.
- [21] Kim B, Park H, Kim H, et al. Enrichment of microbial community generating electricity using a fuel-cell-type electrochemical cell[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 63(6):672-681.
- [22] Xia X, Cao XX, Liang P, et al. Electricity generation from glucose by a *Klebsiella* sp. in microbial fuel cells[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87(1):383-390.
- [23] Liu M, Yuan Y, Zhang LX, et al. Bioelectricity generation by a Gram-positive *Corynebacterium* sp. strain MFC03 under alkaline condition in microbial fuel cells[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(6):1807-1811.
- [24] Rabaey K, Boon N, Hofte M, et al. Microbial phenazine production enhances electron transfer in biofuel cells[J]. *Environmental Science & Technology*, 2005, 39(9):3401-3408.
- [25] Pham CA, Jung SJ, Phung NT, et al. A novel electrochemically active and Fe(III)-reducing bacterium phylogenetically related to *Aeromonas hydrophila*, isolated from a microbial fuel cell[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 223:129-134.
- [26] Zhao F, Rahunen N, John R, et al. Activated carbon cloth as anode for sulfate removal in a microbial fuel cell[J]. *Environmental Science & Technology*, 2008, 42:4971-4976.
- [27] Finch AS, Mackie TD, Sund CJ, et al. Metabolite analysis of *Clostridium acetobutylicum*: Fermentation in a microbial fuel cell[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(1):312-315.
- [28] Samrot AV, Senthikumar P, Pavankumar K, et al. Electricity generation by *Enterobacter cloacae* strain-1 in mediator less microbial fuel cell[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2010, 35(15):7723-7729.
- [29] Freguia S, Masuda M, Tsujimura S, et al. *Lactococcus lactis* catalyses electricity generation at microbial fuel cell anodes via excretion of a soluble quinone[J]. *Bioelectrochemistry*, 2009, 76(1-2):14-18.
- [30] Holmes D, Bond D, O'Neil R, et al. Microbial communities associated with electrodes harvesting electricity from a variety of aquatic sediments[J]. *Microbial Ecology*, 2004, 48(2):178-190.
- [31] Mechichi T, Stackebrandt E, Gad' on N, et al. Phylogenetic and metabolic diversity of bacteria degrading aromatic compounds under denitrifying conditions, and description of *Thauera phenylacetica* sp. nov., *Thauera aminoaromatica* sp. nov., and *Azoarcus buckelii* sp. nov [J]. *Archives of Microbiology*, 2002, 178(1):26-35.
- [32] Hartono, Widada J, Kabirun S. 16S rRNA sequence analysis and ammonium excretion ability of nitrogen fixing bacteria isolated from mineral acid soil[J]. *Indonesian Journal of Biotechnology*, 2009, 14(2):1179-1187.
- [33] 孙寓姣, 左剑恶, 崔龙涛, 等. 不同废水基质条件下微生物燃料电池中细菌群落解析[J]. 中国环境科学, 2008, 28(12):1068-1073.
- SUN Yu-jiao, ZUO Jian-e, CUI Long-tao, et al. Analysis of microbial diversity in microbial fuel cells under different wastewater[J]. *China Environmental Science*, 2008, 28(12):1068-1073.