

DOI:10.3876/j.issn.1000-1980.2021.02.003

邻苯二甲酸二丁酯对电活性生物膜性能影响及机制

王沛芳^{1,2}, 张艺璇^{1,2}, 董跃^{1,2}, 张语航^{1,2}, 王超^{1,2}

(1. 河海大学浅水湖泊综合治理与资源开发教育部重点实验室, 江苏 南京 210098;
2. 河海大学环境学院, 江苏 南京 210098)

摘要:为进一步探究生物电化学系统(BES)处理市政污水的效能,研究了新兴污染物邻苯二甲酸二丁酯(DBP)对电活性生物膜(EAB)的影响和作用机制。采用电化学工作站、扫描电子显微镜、共聚焦激光扫描显微镜、高通量测序等方法,研究DBP质量浓度对EAB电化学活性、主要成分、微观形态、空间结构以及微生物群落结构的影响。结果表明:在高质量浓度DBP(10 mg/L)条件下,BES的最高输出电压和功率密度分别为0.24 V和113.34 mW/m²;较低质量浓度DBP(1 mg/L)条件下,BES的最高输出电压和功率密度分别下降33.33%和31.47%,两者均低于空白对照组。生物膜中的蛋白和多糖成分的测定结果表明,高质量浓度DBP会刺激β-多糖的分泌,并在激光共聚焦图像上表现出强烈的蓝色信号,而蛋白和α-多糖的含量没有显著变化。对不同DBP质量浓度下的EAB进行微生物群落分析的结果显示,*Petrimonas*和*Aquamicrobium*菌是高质量浓度DBP条件下的优势菌群,而DBP会降低EAB的电化学活性,在对照组的EAB中,典型的电活性菌*Rhodopseudomonas*和*Rhodococcus*占据主导地位。

关键词:邻苯二甲酸二丁酯;电活性生物膜;胞外聚合物;电化学性能;市政污水处理

中图分类号:X703 **文献标志码:**A **文章编号:**1000-1980(2021)02-0113-08

Effect and mechanism of dibutyl phthalate on performance of electroactive biofilm

WANG Peifang^{1,2}, ZHANG Yixuan^{1,2}, DONG Yue^{1,2}, ZHANG Yuhang^{1,2}, WANG Chao^{1,2}
(1. Key Laboratory of Integrated Regulation and Resource Development on Shallow Lake of Ministry of Education, Hohai University, Nanjing 210098, China;
2. College of Environment, Hohai University, Nanjing 210098, China)

Abstract:To further explore the usefulness of bioelectrochemical systems (BES) in promoting the municipal wastewater treatment, the influence and mechanism of the emerging pollutant dibutyl phthalate (DBP) on electroactive biofilms (EABs) were investigated. Using the electrochemical workstation, scanning electron microscope, confocal laser scanning microscope, high-throughput sequencing, and other methods, this study analyzed the effect of DBP concentration on the electrochemical activity, main components, microscopic morphology, spatial structure, and microbial community structure of EAB. The results showed that under the condition of high concentration DBP (10 mg/L), the maximum output voltage and power density of BES were 0.24 V and 113.34 mW/m², respectively, which were 33.33% and 31.47% lower than those under a low concentration DBP (1 mg/L). The measurement results of protein and polysaccharide in biofilms indicated that high concentrations of DBP stimulated the secretion of β-polysaccharide and showed a strong blue signal on the laser confocal image, while the contents of protein and α-polysaccharide did not change significantly. In addition, the microbial community analysis of EAB under different concentration DBP showed that *Petrimonas* and *Aquamicrobium* were the dominant genera under high concentration of DBP. This research also showed that DBP will inactive the electrochemical performance of EAB, and *Petrimonas* and *Aquamicrobium* play an important role in the process of biofilm against DBP toxicity.

Key words: dibutyl phthalate; electroactive biofilm; extracellular polymer substances; electrochemical performance; municipal wastewater treatment

基金项目: 国家自然科学基金创新研究群体项目(51421006); 国家自然科学基金(51909067); 中央高校基本科研业务费专项(2018B06514)

作者简介: 王沛芳(1973—),女,教授,博士,主要从事流域水环境综合治理研究。E-mail:pfwang2005@hhu.edu.cn

引用本文: 王沛芳,张艺璇,董跃,等. 邻苯二甲酸二丁酯对电活性生物膜性能影响及机制[J]. 河海大学学报(自然科学版),2021,49(2):113-120.

WANG Peifang, ZHANG Yixuan, DONG Yue, et al. Effect and mechanism of dibutyl phthalate on performance of electroactive biofilm [J]. Journal of Hohai University (Natural Sciences), 2021, 49(2): 113-120.

邻苯二甲酸二丁酯(dibutyl phthalate, DBP)属于邻苯二甲酸酯(phthalate esters, PAEs)中的一种,分子式为 $C_{16}H_{22}O_4$ ($C_6H_4(COOC_4H_9)_2$),是塑料制品中最常用的增塑剂^[1],广泛存在于水、空气和食物中^[2-3]。表1为我国部分地区地表水和市政污水处理厂进水中DBP平均质量浓度^[4-15]。可见,我国的地表水^[4-5]和市政污水^[6-7]中均含有不同浓度的DBP,且在人口密度和经济发展水平越高的地区,水体尤其是市政污水中的DBP污染负荷越高^[8-10]。

生物电化学系统(bioelectrochemical system, BES)是利用电活性菌的胞外电子传递能力回收生物质能源的装置。在BES中,阳极上生长着一层电活性生物膜(electroactive biofilm, EAB),主要由电活性菌群和微生物分泌的胞外聚合物(extracellular polymer substances, EPS)组成,能将有机污染物降解过程产生的氧化电子直接转移到阳极,并在外电路中形成电流。BES在市政污水可持续处理领域具有重要的应用价值,工程化的EAB性能受到污水中有机物类型和浓度的显著影响,对污水中的有毒有害物质十分敏感,并最终影响其污水处理能力^[16-17]。

DBP会影响微生物的生长代谢。研究发现随着DBP质量浓度增大,生物膜中的微生物代谢活动变得缓慢^[18],暴露于DBP中的细菌细胞形状不规则,细胞壁破碎,细胞质出现空泡现象,细胞内物质含量减少,核糖体萎缩甚至消失^[19]。因此污水中广泛存在的DBP必然会对EAB性能产生影响,并最终影响EAB降解有机污染物的效能。目前,DBP对EAB性能的影响研究仍不多见,且研究对象局限于BES的电流产出,并未深入挖掘DBP对EAB在组成结构、群落演变等方面的影响,无法系统阐明其影响机制。

本文通过对不同质量浓度DBP条件下EAB输出电压和功率的监测,考察DBP对EAB产电活性的影响;通过对EAB外包裹EPS成分和含量的分析,揭示DBP刺激下EPS的变化规律,并对不同质量浓度DBP条件下EAB反馈和防御机制进行分析;通过分析EAB上微生物群落的组成和相对丰度的改变,找出DBP影响下的优势菌群。通过上述研究,最终明晰DBP对EAB性能的影响及机制,以期EAB用于市政污水处理的实践提供预测。

1 试验材料和方法

1.1 BES反应器构建和运行

试验所用的反应器为双室BES反应器(图1),该反应器由有机玻璃制成,分为阳极室和阴极室,阴极室和阳极室之间由阳离子交换膜(Nafion117,美国杜邦公司)分隔,并通过硅胶垫密封。反应器的阳极由平行并联的碳纤维刷(长8 cm、直径2 cm, T700SC-24000,日本东丽公司)组成,阳极室尺寸为长4 cm、宽4 cm、高12 cm;阴极为石墨片(长4 cm、高9 cm、厚1 cm, 99.9%,河北盛世达金属公司),阴极室尺寸为长4 cm、宽4 cm、高12 cm。阳极和阴极室顶部各设置两个直径为1 cm的孔,用于换液及取样分析。

接种菌来自实验室内已稳定运行1 a的BES出水。阳极液为人工合成废水,组成成分为质量浓度为1 g/L的 CH_3COONa 、质量浓度为0.31 g/L的 NH_4Cl 、质量浓度为0.13 g/L的 KCl 、质量浓度为10.32 g/L的 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 、质量浓度为3.32 g/L的 $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$;每升合成废水加入1 mL的微量元素和维生素溶液,其成分包括质量浓度为25 g/L的氨三乙酸、质量浓度为37.5 g/L的七水硫

表1 我国部分地区地表水和市政污水处理厂进水中DBP平均质量浓度

Table 1 Average DBP concentrations in surface water and municipal wastewater in some parts of China $\mu g/L$			
地 区	地表水	污水处理厂进水	文献
厦 门	2.07	8.55	[4]
赣 州	1.28		[5]
广 州	8.49	1.62	[6]
武 汉	1.29	8.79	[7]
哈 尔 滨	11.8	6.38	[8]
太 原	10.03		[9]
四 平	7.0		[10]
西 安	12.0	16.47	[11]
无 锡	5.99	14.7	[12]
杭 州		12	[12]
保 定		13.23	[13]
济 南		21.1	[13]
北 京	25.6	27.0	[14]
重 庆	3.07	1.3	[15]
贵 阳	7.24	10.0	[15]
甘 孜 州	1.77		[15]

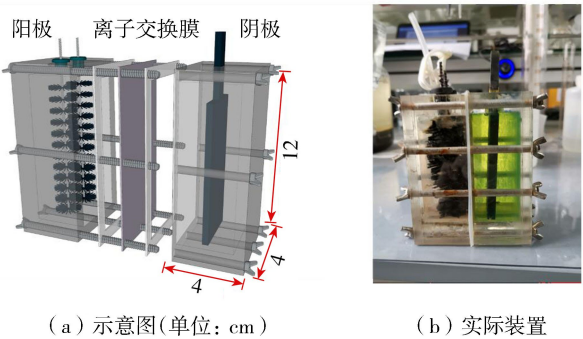


图1 反应器设计
Fig.1 Reactor design

酸镁、质量浓度为 6.25 g/L 的一水硫酸锰、质量浓度为 12.5 g/L 的氯化钠、质量浓度为 1.25 g/L 的七水硫酸亚铁、质量浓度为 1.25 g/L 的二水氯化钙、质量浓度为 1.25 g/L 的六水氯化钴、质量浓度为 1.625 g/L 的氯化锌、质量浓度为 0.125 g/L 的五水硫酸铜、质量浓度为 0.125 g/L 的十二水硫酸铝钾、质量浓度为 0.125 g/L 的硼酸、质量浓度为 0.3125 g/L 的二水钼酸钠、质量浓度为 0.3125 g/L 的六水氯化镍、质量浓度为 0.3125 g/L 的二水钨酸钠、质量浓度为 10 g/L 的生物素(维生素 H)、质量浓度为 10 g/L 的叶酸(维生素 B9)、质量浓度为 50 g/L 的维生素 B6、质量浓度为 25 g/L 的核黄素(维生素 B2)、质量浓度为 25 g/L 的硫胺(维生素 B1)、质量浓度为 25 g/L 的烟碱酸(维生素 B3)、质量浓度为 25 g/L 的泛酸(维生素 B5)、质量浓度为 0.5 g/L 的维生素 B12、质量浓度为 25 g/L 的 P-氨基苯酸、质量浓度为 25 g/L 的硫辛酸;控制 DBP 的质量浓度分别为 0、1 mg/L、10 mg/L。阴极液为铁氰化钾溶液,组成成分为质量浓度为 16.462 g/L 的 $K_3[Fe(CN)_6]$ 、质量浓度为 3.725 g/L 的 KCl。在 30℃ 的恒温箱内,同步启动 3 组 BES 反应器,每组设定 3 个平行,阴极和阳极之间连接 200 Ω 电阻,当输出电压小于 60 mV 时更换底物。系统稳定运行 6 个月。

1.2 电化学数据采集

BES 的输出电压由安捷伦数据采集器连续采集,测得的数据每 30 min 记录 1 次。以运行时间 t 为横坐标,输出电压 U 为纵坐标作图可得输出电压曲线。在 BES 输出功率测试前,首先保持开路 12 h 以达到稳态,并逐渐连接阻值 1000 Ω 至 10 Ω 的电阻,每个阻值稳定 30 min,获得 BES 的功率密度曲线。

利用循环伏安法(cyclic voltammetry, CV)表征不同 DBP 质量浓度下 EAB 电化学活性的差异。CV 的测定通过电化学工作站(CHI660, 上海辰华)来完成,采用三电极体系,工作电极与阳极相连,参比电极连接饱和 Ag/AgCl 电极,辅助电极连接阴极。扫描电压为-0.6 ~ 0.4 V,扫描速率为 1 mV/s。

1.3 EAB 微观形貌观察

通过扫描电子显微镜(scanning electron microscope, 简称 SEM, JSM-7001F, 日本电子株式会社)对阳极表面附着的 EAB 进行微观形貌观察, EAB 预处理流程为: 先以 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)清洗 3 次后加入 2.5% 的戊二醛溶液, 在 4℃ 冰箱中固定 12 h 使微生物细胞形态保持完好; 然后以 50%、70%、90% 及 100% 的乙醇溶液逐级梯度脱水, 每种溶液下脱水 5 min, 最后用氮气彻底吹脱; 放入冷冻干燥机中干燥 12 h, 观测前将生物膜样品进行喷金处理, 使样品表面镀上高导电的金属膜, 最后放入真空样品室进行观测。

通过共聚焦激光扫描显微镜(confocal laser scanning microscopy, 简称 CLSM, CarlZeissLSM880, 德国蔡司公司)来观测 EAB 表面 EPS 中蛋白质和多糖的分布状况。EAB 样品的预处理过程为: 首先用 30 μ L 浓度为 0.1 mol/L 的 $NaHCO_3$ 溶液覆盖生物膜, 使胺基处于去质子化状态; 然后依次使用 10 μ L 质量浓度为 1 g/L 的异硫氰酸荧光素(fluorescein-isothiocyanate, FITC)、20 μ L 质量浓度为 0.25 g/L 刀豆蛋白 A(concanavalin A, Con A)、20 μ L 质量浓度为 0.30 g/L 荧光增白剂(calcofluor white, CW)溶液进行避光染色, 每种染色剂染色时间分别为 1 h、0.5 h、0.5 h; 染色完成后用 PBS 缓冲液清洗多余染料, 进行观测。

1.4 EPS 的提取和测量

使用包括离心、超声处理和热提取的方法提取松散结合型 EPS(loosely bound EPS, LB-EPS)和紧密结合型 EPS(tightly bound EPS, TB-EPS)。提取步骤为: 首先取 1 cm^2 生物膜用蒸馏水配制成 10 mL 混合液, 3000 g 离心 10 min 以除去黏液; 其次将沉淀物依次重悬在 0.05 g/L 的 NaCl 溶液, 20 kHz 超声处理 2 min, 150 r/min 水平振动 15 min, 8000 g 离心 10 min 后, 通过 0.22 μ m 醋酸纤维素膜过滤, 得到 LB-EPS; 再次使用 0.05 g/L 的 NaCl 溶液将残留的沉淀物重悬至初始体积, 并在 20 kHz 下超声处理 2 min, 随后 60℃ 加热 30 min, 最后 12000 g 离心 20 min, 通过 0.22 μ m 醋酸纤维素膜过滤, 得到 TB-EPS。分析 LB-EPS 和 TB-EPS 的组分, 使用 TOC 分析仪(Liqui TOC II, 德国元素公司)测定总有机碳(total organic carbon, TOC), 利用单位质量挥发性悬浮固体中含有的 TOC 质量来反映 LB-EPS 和 TB-EPS 含量; 用葡萄糖配制标准液, 使用蒽酮-硫酸法测量多糖(polysaccharide, PS)含量^[20]; 用牛血清白蛋白配制标准液, 使用改良的 Lowry 方法测量蛋白质(protein, PRO)含量^[21]。

1.5 微生物群落分析

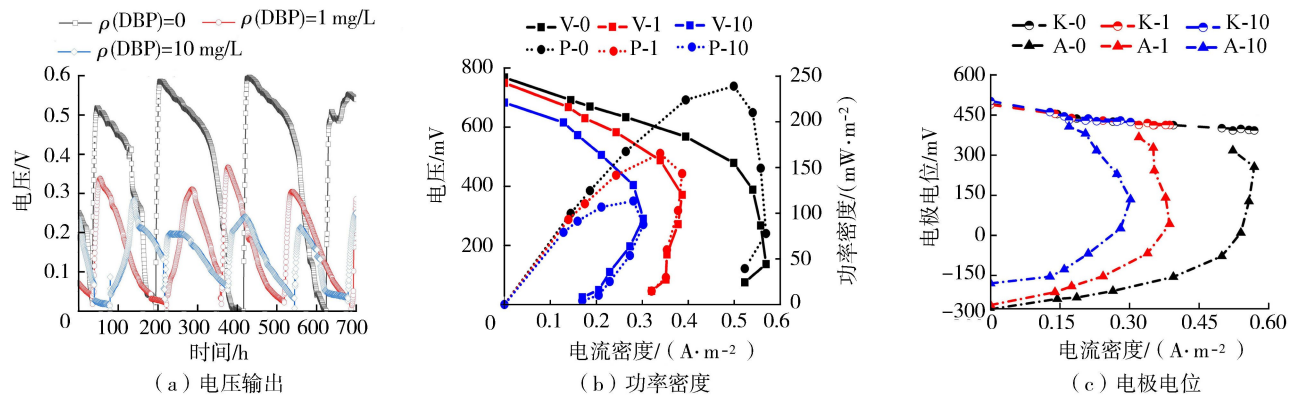
BES 运行 6 个月后收集生物膜样品, 用土壤 DNA 提取试剂盒(power soil DNA isolation kit, 美国 Mobio 公司)提取总 DNA。以微生物总 DNA 为模板, 以细菌 16S rDNA V4 区为目的扩增区域, 引物为 515F (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) 和 909R (CCCCGYCAATTCMTTTRAGT)。对扩增子进行高通量测序(基于上

海美吉公司 Illumina Hiseq 平台),以相似性 97% 为标准获得操作分类单元 (operational taxonomic units, OTU),并对微生物群落的多样性、种类组成和相对丰度、群落在属水平的主成分进行分析^[22]。

2 结果与分析

2.1 不同 DBP 质量浓度对 BES 电化学性能和 EAB 电化学活性的影响

为了考察投加 DBP 对 BES 产电性能的影响,对 BES 输出电压进行记录。图 2(a)为不同 DBP 质量浓度下 BES 反应器的电压输出情况,可以看出,未投加 DBP 的对照组的输出电压有较长的平台期(106 h),且在更换底物后,电压上升到峰值的时间较短,而随着 DBP 质量浓度增大,BES 最大输出电压逐渐下降。对照组的反应器产电性能最好,电压上升快,在约 210 h 的产电周期内最大电压可达 0.60 V,并相对稳定地维持 50 h。而加入 1 mg/L 和 10 mg/L DBP 的反应器产电性能显著下降。DBP 质量浓度为 1 mg/L 时,最大电压输出为 0.36 V 且没有显著的平台期,产电周期缩短到约 140 h。当 DBP 质量浓度为 10 mg/L 时,反应器产电性能最差,最大输出电压仅为 0.24 V,产电周期进一步缩短至 128 h 左右。



注: V-0、V-1、V-10 分别为 $\rho(\text{DBP})$ 为 0、1 mg/L、10 mg/L 时的电压; P-0、P-1、P-10 分别为 $\rho(\text{DBP})$ 为 0、1 mg/L、10 mg/L 时的功率密度; K-0、K-1、K-10 分别为 $\rho(\text{DBP})$ 为 0、1 mg/L、10 mg/L 时阴极电位; A-0、A-1、A-10 分别为 $\rho(\text{DBP})$ 为 0、1 mg/L、10 mg/L 时阳极电位。

图2 BES 在不同 DBP 质量浓度下的产电性能

Fig.2 Electricity generation performance of BES under different DBP concentrations

同时,研究了不同 DBP 质量浓度下的系统输出功率变化。由图 2(b)可见,随着 DBP 质量浓度增大,系统最大输出功率下降。DBP 质量浓度从 0 增到 10 mg/L,BES 的输出功率减少了 52.7%,内阻从 200 Ω 增大到了 400 Ω 左右,产电性能明显受到抑制。以 Ag/AgCl 电极作参比电极(下同),通过对阳极和阴极的电位进行监测(图 2(c)),表明阳极电位是造成 BES 输出功率下降的主要因素,而阴极电位保持相对恒定。研究表明,EAB 是影响 BES 产电性能的关键因素^[23],当 EAB 厚度逐渐增加时,膜内的电子传递能力的变化会导致系统产电性能的下降,电子传递性能主要是由于细胞间或细胞与电极间的电子转移效率决定^[24-25]。因此由产电数据可以推断,高质量浓度 DBP 抑制了 EAB 内的电子转移活性,导致 BES 内阻增大,输出功率降低。

为了验证上述推断,明确不同 DBP 质量浓度对 EAB 电化学活性的影响,对 EAB 的 CV 曲线(图 3(a))进行分析,可以看出,随着 DBP 质量浓度增大,CV 曲线内包围的面积逐渐缩小,表明基质减少,氧化还原反应越发微弱,体系的电化学活性降低。其中,对照组峰值电流为 0.018 A,明显大于 DBP 质量浓度为 1 mg/L 和 10 mg/L 时的峰值电流(0.012 V 和 0.008 V),这也说明未投加 DBP 条件下的 EAB 产电性能最好,电子转移能力最强。在此基础上,绘制不同 DBP 质量浓度下 CV 的一阶导数(DCV)曲线,通过变化速度进一步分析 CV 的变化规律(图 3(b))。可以看出,对照组的 CV 一阶导数中出现了 3 个峰,峰 1 代表 CV 曲线开始产生峰的电位,而随着 DBP 质量浓度增大,峰的数目减少,且开始产生峰的电位逐渐下降,表明 EAB 氧化还原活性位点的丰富度降低^[26],生物膜电导率及电化学活性减弱,与上述 CV 分析以及通过最高输出电压和功率密度得出的结论一致。

c 型细胞色素蛋白分布在菌体的内膜、外膜和周质空间中,在电子转移过程中,作为电子传递载体或末端还原酶发挥关键作用^[27]。结合图 3,可以看出对照组主要氧化峰出现在 -0.04 V,这与 *Rhodopseudomonas* 等硫酸盐还原细菌属所特有的一种低电位细胞色素 c_3 的氧化还原中点电位相近(-0.044 V)^[28]。1 mg/L

DBP 条件下的主要氧化峰出现在 0.05 ~ 0.25 V 之间,与细胞色素 c_2 (0.052 ~ 0.252 V) 范围相似^[29]。而 10 mg/L DBP 条件下氧化峰出现在 -0.315 V,与周质细胞色素 PpcA (-0.356 V) 相近,该细胞色素是外膜细胞色素与电极之间交换电子的通道^[30]。故推测细胞色素 c_3 对 DBP 敏感,而细胞色素 c_2 与 PpcA 可能参与了 DBP 刺激下的胞外电子传递。

2.2 不同 DBP 质量浓度下 EAB 微形态观察与表征

通过 SEM 观察 EAB 的微观形态,结果见图 4。由图 4(a)(b)(c) 可见,对照组 EAB 中菌落外形较为明显,而添加了 1 mg/L 和 10 mg/L DBP 的生物膜表面被一层黏性物质包裹,细菌外形不明显。通过多重染色和 CLSM 获得生物膜的空间组成和结构见图 4(d)(e)(f),可见,EAB 中蛋白质和 α -多糖的含量很高并且分散在整个视野中,对照组中的 β -多糖的含量最小,分散在视野的局部位置。当 DBP 质量浓度逐渐增大到 10 mg/L 时, β -多糖含量显著增加,并从局部视野位置扩散到整个视野中。总的来说,EAB 中蛋白质和 α -多糖的比例相对稳定,而 β -多糖的含量随 DBP 质量浓度的增加而显著增加。为了进一步分析 DBP 对 EAB 中胞外蛋白质和多糖分泌的影响,对这 2 种成分进行定量分析。

生物膜的 EPS 主要由蛋白质和多糖类物质组成,EPS 对细菌在电极表面的固定和生长,以及胞外电子转移至关重要^[31]。检测数据显示,投加了 1 mg/L 和 10 mg/L DBP 的反应器中 EPS 含量逐渐提高,较于对照组分别增大了 6.90% 和 17.70%。值得注意的是,随着 DBP 质量浓度增大,LB-EPS 的含量逐渐从 (12.46±1.19) mg/g 下降到 (9.98±0.49) mg/g ,TB-EPS 从 (47.1±2.46) mg/g 显著提高到 (60.12±1.30) mg/g,增加了 27.64%。结构上 TB-EPS 紧密附着在细胞壁上,具有一定外形,而 LB-EPS 流变性强,没有明显边缘,这说明 DBP 引起了 EAB 结构上的变化。

为进一步表征 DBP 对 EAB 分泌 EPS 的影响,对组成 EPS 的 2 种主要成分:PRO 和 PS 的质量浓度进行检测。结果表明,当 DBP 质量浓度为 1 mg/L 时,LB-EPS 和 TB-EPS 中的 PRO 和 PS 总质量浓度较对照组均有所提高,在 LB-EPS 中从 (65.82±5.26) mg/L 增加 16.12% 到 (76.43±3.07) mg/L,TB-EPS 中从 (194.97±10.17) mg/L 增加 13.26% 至 (220.83±10.61) mg/L。当 DBP 质量浓度扩大到 10 mg/L 时,除了 LB-EPS 中的 PS 仍略有增加之外,LB-EPS 中的 PRO 以及 TB-EPS 中的 PRO 和 PS 的质量浓度均有所下降。上述结果表明,在一定质量浓度 DBP 刺激下,EAB 通过分泌更多的 PRO 和 PS 类物质作为保护屏障对抗 DBP 的生态毒性。而当 DBP 质量浓度过高时,TB-EPS 中的 PRO 和 PS 质量浓度下降,可能是由于过高质量浓度 DBP 的生态毒性,影响了 EPS 合成代谢的速率。

2.3 EAB 中微生物群落结构在不同 DBP 质量浓度下的演变

利用 Illumina 高通量测序 16S rRNA 基因分析不同质量浓度 DBP 下 EAB 上微生物群落的组成丰度和多样性。结果显示,DBP 质量浓度为 1 mg/L 和 10 mg/L 的 Ace 值(186.84 和 194.11)均小于对照组(197.90),表明投加 DBP 降低了 EAB 上的微生物丰富度,种类减少;随着 DBP 质量浓度由 1 mg/L 增加到 10 mg/L,Shannon 值逐渐从 3.04 增大到 3.34,表明微生物群落多样性提高,群落均匀度增加。同时从图 5(a)来看,3 组 EAB 共有 OTU 数目为 127,随着 DBP 质量浓度增加,3 组 EAB 中所独有的物种数目先减少后增大,即组成相似性逐渐降低。

为进一步了解 DBP 对 EAB 中微生物群落的影响,在属水平上检测了不同 DBP 质量浓度下微生物群落的组成和相对丰度。由图 5(b)可以看出,对照组的主要产电菌为 *Rhodospseudomonas* (31.66%) 和 *Rhodococcus* (14.30%),该结果与曹效鑫^[32]对其 BES 阳极生物膜中的优势菌分析结果相同。其中,*Rhodospseudomonas* 属于 α -变形菌门,能利用多种底物产电,特别是乙酸盐,功率输出密度高达 (2720±60) mW/m²,主要产电机制为 EAB 的直接电子传递^[33],与上述 CV 曲线分析结果吻合。随着 DBP 质量浓度增加,优势产电菌 *Rhodospseudomonas* 和 *Rhodococcus* 迅速减少,*Rhodospseudomonas* 在 1 mg/L 和 10 mg/L DBP 条件下分别只占

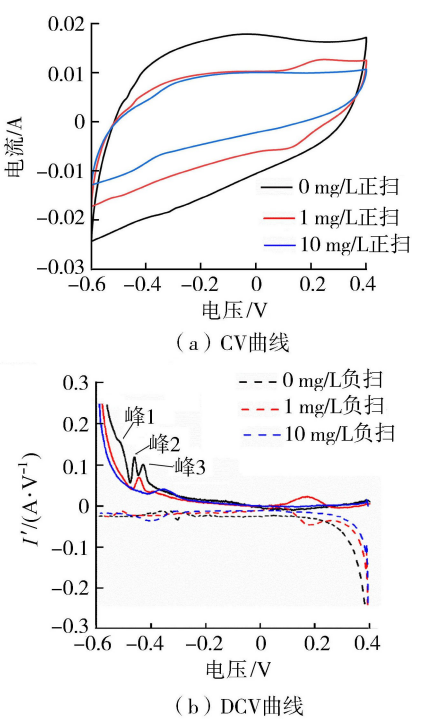
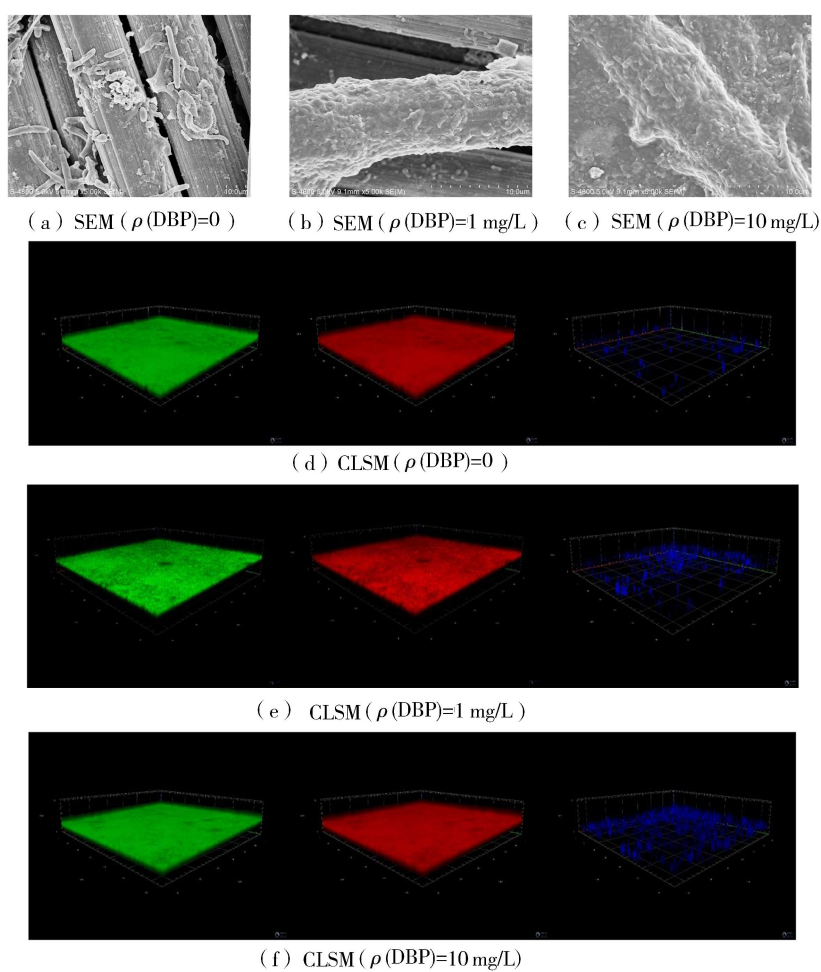


图 3 不同 DBP 质量浓度下的 CV 曲线及 DCV 曲线
Fig. 3 CV curve and its first derivative DCV curve under different DBP concentrations



注:SEM 图标尺为 10 μm ,CLSM 图中绿色代表 PRO,红色代表 α -D-PS,蓝色代表 β -D-PS。

图 4 在不同 DBP 质量浓度下 EAB 的 SEM 和 CLSM

Fig. 4 SEM and CLSM of EAB under different DBP concentrations

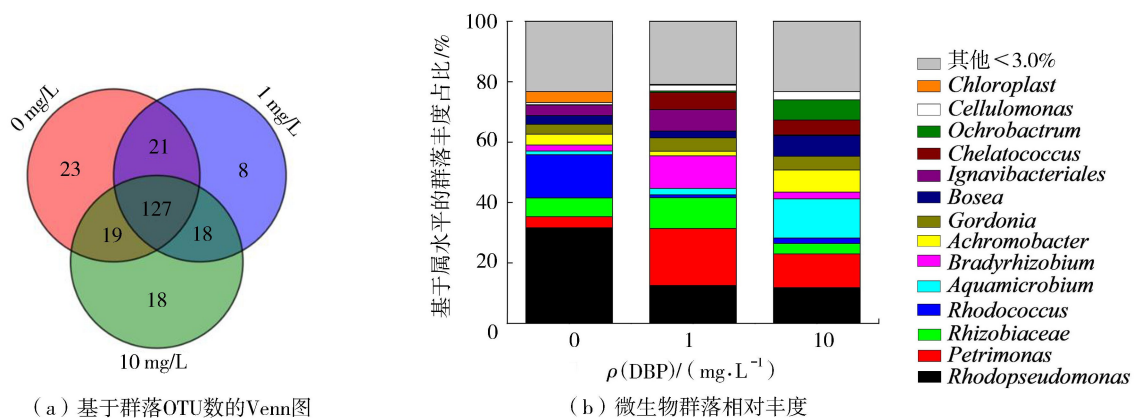


图 5 不同 DBP 质量浓度下 EAB 的微生物群落分析结果

Fig. 5 Microbial community analysis result of EAB under different DBP concentrations

12.53% 和 11.87% ,而 *Rhodococcus* 几乎消失,分别只占 0.97% 和 1.76% ,表明这些产电菌的代谢受到明显抑制。

同时注意到,在加入 DBP 后 *Petrimonas* 成为优势菌,*Petrimonas* 属于中温发酵细菌,能将复杂的有机物转化为乙酸,氢和二氧化碳^[34]。Zhao 等^[35] 研究发现,*Petrimonas* 具有与其他物种进行直接种间电子转移来代谢有机底物的潜力。当 DBP 质量浓度增大,*Petrimonas* 的相对丰度先增加(3.6% 至 18.86%) 后减少(18.86% 至 11.15%)。这表明,*Petrimonas* 在较低质量浓度的 DBP 下可以维持正常的增殖,随着浓度增加,

细菌活性受到抑制,物种数目减少。此外,*Aquamicrobium* 在高质量浓度 DBP (10 mg/L) 下大幅增加至 12.96%,有研究表明,*Aquamicrobium* 的丰度在投加高毒性金属元素—铊的 BES 中从 0.01% 增加到 3.18%^[36],并被发现能够代谢具有强烈生态毒性的杂环化合物噻吩-2-甲酸叔丁酯^[37]、联苯和聚氯联苯等^[38],说明该菌对高毒性物质具有一定抗性。由于 *Petrimonas* 和 *Aquamicrobium* 在添加 DBP 条件下的丰度出现显著增加,故推测其在生物膜对抗 DBP 毒性过程中起到重要作用。

3 结 论

- a. 投加 DBP 会降低 EAB 的电化学活性,对 BES 的电化学性能有不利影响。随着 DBP 质量浓度增大,CV 曲线的峰强、BES 的最高输出电压和功率密度均显著下降。
- b. DBP 质量浓度增加导致 EAB 中 EPS 含量逐渐提高,尤其是 TB-EPS 含量显著提高,且高质量浓度 DBP 会刺激 β -PS 的分泌,用来抵抗 DBP 的生态毒性。
- c. 在 DBP 刺激下,EAB 中微生物群落丰富度降低,多样性提高,产电菌丰度下降,典型电话性菌 *Rhodopseudomonas* 和 *Rhodococcus* 对 DBP 敏感,代谢受到明显抑制,而 *Petrimonas* 和 *Aquamicrobium* 菌是高质量浓度 DBP 条件下的优势菌群,推测其在生物膜对抗 DBP 毒性过程中起重要作用。

参考文献:

[1] FIERENS T, SERVAES K, HOLDERBEKE M V, et al. Analysis of phthalates in food products and packaging materials sold on the Belgian market[J]. Food and Chemical Toxicology,2012, 50(7):2575-2583.

[2] KANG Y, MAN Y B, CHEUNG K C, et al. Risk assessment of human exposure to bioaccessible phthalate esters via indoor dust around the Pearl River Delta[J]. Environmental Science and Technology, 2012, 46(15):8422-8430.

[3] KOLPIN D W, FURLONG E T, MEYER M T, et al. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U. S. streams, 1999—2000: a national reconnaissance[J]. Environmental Science and Technology, 2002, 36(6):1202-1211.

[4] 张悦,袁骐,黄冬梅,等. 固相萃取-气相色谱法检测海水中邻苯二甲酸二丁酯[J]. 分析试验室, 2019, 38(6):660-664. (ZHANG Yue, YUAN Qi, HUANG Dongmei, et al. Determination of dibutyl phthalate in seawater by solid phase extraction and gas chromatography[J]. Analysis Laboratory, 2019, 38(6):660-664. (in Chinese))

[5] 张明. 章江水体中邻苯二甲酸酯的分布特征调查及纳滤去除研究[D]. 赣州:江西理工大学, 2018.

[6] 刘至能. 城市污水厂中芳香酸酯的分布特征及去除规律研究[D]. 广州:广州大学, 2018.

[7] 谢红艳. 大东湖水系半挥发性有机物的分布特征研究[D]. 武汉:武汉理工大学, 2009.

[8] 时瑶,马迎群,秦延文,等. 大辽河表层水中邻苯二甲酸酯分布特征及环境健康风险评价[J]. 生态毒理学报, 2016, 11(6):197-206. (SHI Yao, MA Yingqun, QIN Yanwen, et al. Distribution characteristics and environmental health risk assessment of phthalic acid esters in surface water of the Daliao River, China [J]. Journal of Ecotoxicology, 2016, 11(6):197-206. (in Chinese))

[9] 韩文辉,赵颖,党晋华,等. 汾河流域邻苯二甲酸酯的分布特征及生态风险评价[J]. 环境化学, 2017, 36(6):1377-1387. (HAN Wenhui, ZHAO Ying, DANG Jinhua, et al. Distribution and ecological risk evaluation of phthalate esters in Fenhe River Basin[J]. Environmental Chemistry, 2017, 36(6):1377-1387. (in Chinese))

[10] 纪美辰. 吉林省四平市二龙湖表层水体有色溶解性有机物(CDOM)光学特性及 PAEs 的健康风险评价[D]. 长春:东北师范大学, 2019.

[11] 林锋. 邻苯二甲酸酯类物质在西安地区地表水中的存赋规律及纳滤膜处理效果研究[D]. 西安:西安建筑科技大学, 2008.

[12] 朱冰清,高占啟,胡冠九,等. 太湖重点区域水环境中邻苯二甲酸酯的污染水平及生态风险评价[J]. 环境科学, 2018, 39(8):3614-3621. (ZHU Bingqing, GAO Zhanqi, HU Guanjiu, et al. Contamination levels and ecological risk assessment of phthalate esters (PAEs) in the aquatic environment of key areas of Taihu Lake[J]. Environmental Science, 2018, 39(8):3614-3621. (in Chinese))

[13] 李思敏. 污水厂二级出水深度处理 O₃+MBSF 工艺及微生物群落结构特性研究[D]. 太原:太原理工大学, 2016.

[14] 张璐璐,刘静玲,何建宗,等. 中国典型城市水环境中邻苯二甲酸酯类污染水平与生态风险评价[J]. 生态毒理学报, 2016, 11(2):421-435. (ZHANG Lulu, LIU Jingling, HE Jianzong, et al. The occurrence and ecological risk assessment of phthalate esters (PAEs) in urban aquatic environments of China[J]. Journal of Ecotoxicology, 2016, 11(2):421-435. (in Chinese))

[15] 蒲灵子. 遵义湘江河水源水及其出厂水邻苯二甲酸酯污染调查[D]. 遵义:遵义医学院, 2011.

- [16] DUTEANU N M, GHANGREKAR M M, ERABLE B, et al. Microbial fuel cells: an option for wastewater treatment[J]. Environmental Engineering and Management Journal, 2010, 9(8):1069-1087.
- [17] FORRESTAL C, XU P, REN Z. Sustainable desalination using a microbial capacitive desalination cell[J]. Energy & Environmental Science, 2012, 5(5):7161.
- [18] 余容. 废纸造纸废水中苯类有机物共代谢降解条件下丝状菌膨胀特性研究[D]. 广州:华南理工大学, 2010.
- [19] 陶月. 外源调控下 *Enterobacterium sp.* DNB-S2 降解邻苯二甲酸二丁酯的机理研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学, 2017.
- [20] HOU Jun, MIAO Lingzhan, WANG Chao, et al. Effect of CuO nanoparticles on the production and composition of extracellular polymeric substances and physicochemical stability of activated sludge flocs[J]. Bioresource Technology, 2015, 176:65-70.
- [21] LI X Y, YANG S F. Influence of loosely bound extracellular polymeric substances (EPS) on the flocculation, sedimentation and dewaterability of activated sludge[J]. Water Research, 2006, 41(5):1022-1030.
- [22] FREGUIA S, TEH E H, BOON N, et al. Microbial fuel cells operating on mixed fatty acids[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(4):1233-1238.
- [23] CHENG S, LIU H, LOGAN B E. Increased power generation in a continuous flow MFC with advective flow through the porous anode and reduced electrode spacing[J]. Environmental Science & Technology, 2006, 40(7):2426-2432.
- [24] 侯俊先, 刘中良, 李艳霞, 等. 电活性生物膜生长过程中电荷与传质阻抗的变化规律[J]. 科学通报, 2016, 61(33):3616-3622. (HOU Junxian, LIU Zhongliang, LI Yanxia, et al. Charge and mass transfer impedance through different growth phases of anode-respiring biofilm[J]. Chinese Science Bulletin, 2016, 61(33):3616-3622. (in Chinese))
- [25] 王沛芳, 娄明月, 钱进, 等. 农田退水净污湿地对污染物的净化效果及机理分析[J]. 水资源保护, 2020, 36(5):1-10. (WANG Peifang, LOU Mingyue, QIAN Jin, et al. Analysis of purification effect and mechanism of pollutant by the farmland drainage wetland[J]. Water Resources Protection, 2020, 36(5):1-10. (in Chinese))
- [26] GUO K, FREGUIA S, DENNIS P G, et al. Effects of surface charge and hydrophobicity on anodic biofilm formation, community composition, and current generation in bioelectrochemical systems[J]. Environmental Science & Technology, 2013, 47(13):7563-7570.
- [27] BREUER M, ROSSO K M, BLUMBERGER J, et al. Multi-haem cytochromes in *Shewanella oneidensis* MR-1: structures, functions and opportunities [J]. Journal of the Royal Society Interface, 2015, 12(102):115-123.
- [28] QUINTAS P O, OLIVEIRA M S, CATARINO T, et al. Electron transfer between multihaem cytochromes c_3 from *Desulfovibrio africanus*[J]. BBA Bioenergetics, 2013, 1827(4):502-506.
- [29] GIANPIERO G, SILVANO G, LUCIO R. Relationship between hydrogen-bonding network and reduction potential in c-type cytochromes[J]. FEBS Letters, 2002, 516(1):285-286.
- [30] PESSANHA M, MORGADO L, LOURO R O, et al. Thermodynamic characterization of triheme cytochrome PpcA from *Geobacter sulfurreducens*: evidence for a role played in e^-/H^+ energy transduction[J]. Biochemistry, 2006, 45(46):13910-13917.
- [31] JOOYOUN N, HYUN W K, KYEONG H L, et al. Electricity generation from MFCs using differently grown anode-attached bacteria[J]. Environmental Engineering Research, 2010, 15(2):71-78.
- [32] 曹效鑫. 微生物燃料电池中产电菌与电极的作用机制及其应用[D]. 北京:清华大学, 2009.
- [33] XING Defeng, ZUO Yi, CHENG Shaoan, et al. Electricity generation by *Rhodospseudomonas palustris* DX-1[J]. Environmental Science & Technology, 2008, 42(11):4146-4151.
- [34] GRABOWSKI A, TINDALL B J, BARDIN V, et al. *Petrimonassulfuriphila gen. nov. sp. nov.*, a mesophilic fermentative bacterium isolated from a biodegraded oil reservoir[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55(3):1113-1121.
- [35] ZHAO Zhiqian, ZHANG Yaobin. Application of ethanol-type fermentation in establishment of direct interspecies electron transfer: a practical engineering case study[J]. Renewable Energy, 2019, 136:846-855.
- [36] WANG Zhongli, ZHANG Baogan, JIANG Yufen, et al. Spontaneous thallium (I) oxidation with electricity generation in single-chamber microbial fuel cells[J]. Applied Energy, 2018, 209:33-42.
- [37] BAMBAUER A, RAINEY F A, STACKEBRANDT E, et al. Characterization of *Aquamicrobium defluvii gen. nov. sp. nov.*, a thiophene-2-carboxylate-metabolizing bacterium from activated sludge[J]. Archives of Microbiology, 1998, 169(4):293-302.
- [38] CHANG Y, TAKADA K, CHOI D, et al. Isolation of biphenyl and polychlorinated biphenyl-degrading bacteria and their degradation pathway[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2013, 170(2):381-398.