



文章栏目：固体废物处理与资源化

DOI 10.12030/j.cjee.202201023 中图分类号 X705 文献标识码 A

马晶伟, 易可为, 何秋来, 等. 氧氟沙星与聚苯乙烯微塑料复合污染对剩余污泥厌氧消化的影响[J]. 环境工程学报, 2022, 16(7): 2335-2346. [MA Jingwei, YI Kewei, HE Qiulai, et al. Effects of combined ofloxacin and polystyrene microplastics on anaerobic digestion of waste activated sludge[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2022, 16(7): 2335-2346.]

氧氟沙星与聚苯乙烯微塑料复合污染对剩余污泥厌氧消化的影响

马晶伟, 易可为, 何秋来, 贺维鹏, 柯水洲[✉]

湖南大学土木工程学院, 长沙 410082

摘要 为探究抗生素与微塑料复合污染对厌氧消化的作用影响, 采用 BMP 实验考察了不同质量浓度氧氟沙星 (OFL)、聚苯乙烯 (PS) 微塑料对剩余污泥厌氧消化产甲烷的影响行为, 并通过分析溶解性有机物 (DOM)、胞外聚合物 (EPS) 变化规律、厌氧发酵 4 阶段代谢以及微生物群落探讨其影响机理。结果表明, 与对照组相比, 单一 OFL 和单一 PS 微塑料污染使甲烷累积产量分别下降了 15.95%~81.36%、4.25%~5.78%; 而在复合条件下, 两者表现出协同效应, 故导致产甲烷速率的进一步下降和有效产气时间的缩短, 其中 OFL 胁迫占主导。机理探究发现, 不论单一 OFL 还是复合污染, DOM 中腐殖质类物质均明显增加, EPS 组分结构趋于复杂化, 厌氧消化 4 阶段均受到明显抑制。单一 PS 微塑料污染在反应初期可提高产甲烷速率, 且对厌氧消化 4 阶段的影响相对较小。微生物群落分析发现, 复合组与单一 OFL 组群落分布更为相近, 产酸细菌与嗜乙酸产甲烷菌的相对丰度均明显下降, 这导致乙酸营养型产甲烷途径受到严重抑制。本研究结果可为复杂污染情况下剩余污泥资源化处理的工艺调控提供参考。

关键词 氧氟沙星; 微塑料; 聚苯乙烯; 厌氧消化; 微生物群落

污水处理厂的能耗问题已成为关注的焦点。目前, 众多研究都在优化污水处理厂的运行模式, 以期实现能源的循环利用。污水处理厂存在大量有机能源和生物质可以被利用和回收。剩余污泥作为一种重要的运行副产物, 具有污染物与可利用资源的双重特性。一方面, 剩余污泥中含有丰富的有机质和多样的微生物群落, 通过厌氧消化等处理可实现可再生清洁燃料的有效回收; 另一方面, 在污水处理阶段未能被清除从而迁移进入剩余污泥中的多种污染物, 如重金属、无机纳米颗粒、微塑料、抗生素等, 这些物质已被证实具有毒害性^[1]。厌氧消化作为一项依赖多级生化反应相互关联、相互协调进行的处理技术, 其发酵产能的高效性和稳定性离不开功能微生物的积极参与。研究发现, 在水处理阶段, 大量污染物会转移到剩余污泥中, 它们的存在会不可避免地干扰厌氧消化的正常运行^[2-4], 这给剩余污泥的处置带来了新的挑战。基于此, 部分研究探究了污染物对污泥厌氧消化的影响机制: 如在污泥厌氧消化过程中, 微塑料会释放浸出物以干扰系统正常运行^[5, 6]; 罗红霉素会降低产甲烷菌的丰度, 限制反应的进行^[2]。然而, 目前鲜有研究关注到抗生素与微塑料在剩余污泥中共存而导致的复合污染, 其对厌氧消化体系的影响机理有待进一步阐明。

收稿日期: 2022-01-10; 录用日期: 2022-03-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (52070076)

第一作者: 马晶伟 (1980 —), 男, 博士, 副教授, jma@hnu.edu.cn; ✉通信作者: 柯水洲 (1964 —), 男, 硕士, 教授, ksz@hnu.edu.cn

根据剩余污泥复杂的污染现状,多种污染物将于同一时间集中在污泥中。氧氟沙星(OFL)因其具有的特殊官能团,表现出与污泥较好的亲和力,通常是剩余污泥中检出浓度最高的抗生素^[7]。与此同时,微塑料以其强大的吸附力,被证实可与环境中其他难降解污染物结合形成危害性更高的团聚体^[8,9]。本研究拟探究2种新型污染物对厌氧产甲烷系统的联合影响。选用聚苯乙烯(PS)微塑料和OFL为目标污染物,在考察其单一抑制作用的基础上,进一步考察在二者耦合影响下的复合作用,以了解复合污染负荷下厌氧消化的性能。本研究可为剩余污泥资源化过程的污染调控提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料

实验底泥取自长沙市某污水处理厂,过筛处理除去大颗粒固体杂质,提高污泥均质性。实验接种污泥为实验室厌氧发酵装置长期驯化的种泥,装置以剩余污泥为底物,培养温度为37℃,pH控制在7.00±0.10,实验开始前,装置运行已达稳定。实验底泥及接种污泥的各项理化性质如表1所示。PS微塑料外观为白色粉末,平均粒径为50 μm;OFL化学式为C₁₈H₂₀FN₃O₄,纯度>98%,使用前储存于2~8℃条件下。

表1 实验底泥及接种污泥的理化性质

Table 1 Physicochemical properties of substrate sludge and inoculum sludge

污泥类型	pH	TS/(g·L ⁻¹)	VS/(g·L ⁻¹)	COD/(g·L ⁻¹)	SCOD/(g·L ⁻¹)
实验底泥	7.20±0.01	38.08±0.23	14.75±0.11	30.74±0.02	1.76±0.04
接种污泥	6.75±0.02	18.12±0.54	5.95±0.25	16.11±0.06	1.82±0.03

1.2 实验设计

1) 生化甲烷势(BMP)实验。为分别考察PS微塑料及OFL的单一污染和复合污染2种条件下对污泥厌氧消化的影响,本研究设置单一OFL组、单一PS微塑料组以及复合组3种实验条件。单一OFL组仅投加OFL作为污染物,OFL质量浓度分别为50与500 mg·L⁻¹,即R1(OFL50)、R2(OFL500)组;单一PS微塑料组仅投加PS微塑料作为污染物,PS微塑料质量浓度分别为50与100 mg·L⁻¹,即R3(PS50)、R4(PS100)组;复合组内同时投加PS微塑料与OFL,其中PS微塑料质量浓度固定为100 mg·L⁻¹,而OFL质量浓度分别为50与500 mg·L⁻¹,即R5(OFL50-PS100)、R6(OFL500-PS100)组。另设未添加污染物的对照组,即R0组。生化甲烷势(Biochemical Methane Potential, BMP)批式实验在全自动甲烷潜力测定仪(AMPTS II, Bioprocess Control)中开展。AMPTS II提供的厌氧培养瓶有效容积为400 mL,实验底泥和接种污泥投加量分别为75和225 mL。反应开始前,将污泥与污染物充分混合后,加入PBS缓冲液。通入氮气5 min排除顶空空气,创造无氧环境。实验过程中采用水浴装置全程控制温度在(37±1)℃,搅拌器持续工作保持物料均匀混合。产气终点以反应器连续3 d日产量不足累积产量的1%作为指示^[10]。

2) 厌氧消化阶段模拟实验。本研究设置4组模拟实验以考察在污染物介入下厌氧消化增溶、水解、产酸、产甲烷4个代谢过程的变化。增溶实验以新鲜污泥为消化底物,通过溶解性化学需氧量(SCOD)的质量浓度考察有机物的溶出程度;水解实验以含牛血清蛋白(BSA)的合成废水为底物,等量代替BMP实验中的实验底泥,观察3 d后BSA降解率;产酸实验通过投加定量谷氨酸、葡萄糖分别模拟蛋白和糖类底物,测定其产物即挥发性脂肪酸(VFAs)产量;产甲烷实验采用乙酸钠作为底物,测定甲烷产量。为保持微生物的正常代谢,合成废水成分主要有:1.0 g·L⁻¹ KH₂PO₄、0.6 g·L⁻¹ MgCl₂·6H₂O、0.4 g·L⁻¹ CaCl₂以及1.0 mL·L⁻¹微量元素储备液(含Fe²⁺、Co²⁺、Zn²⁺等)。除产甲烷实验外,其余3组实验均添加10 g·L⁻¹甲烷抑制剂2-溴乙烷磺酸钠,阻断有机物向甲烷的转

化, 其余操作与 BMP 实验保持一致。

1.3 测定指标与方法

BMP 实验产气量由 AMPTS II 仪器自动进行计量。实验进程中定期取样, 对样品做 $8\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心、 $0.45\ \mu\text{m}$ 过滤处理后, 测定其相关理化指标。COD 采用消解分光光度法^[11]测定; 可溶性蛋白和多糖的测定方法分别为 Folin-Lowry 法^[12]和 蒽酮硫酸法^[13]; VFAs 的测定采用气相色谱法 (7820A, Agilent Technologies)^[14]; 胞外聚合物 (EPS) 采用热提取法^[15]; 溶解性有机物 (DOM) 及 EPS 组分结构的测定采用三维荧光法 (Horiba Aqualog, HORIBA Scientific)。

1.4 动力学模拟

采用修正 Gompertz 模型^[16]评估厌氧消化性能, 进一步讨论 2 类污染物的作用机制。BMP 实验结束后, 将采集到的产甲烷数据导入 Origin 软件进行拟合。修正 Gompertz 模型如式 (1) 所示。

$$P = P_m \times \exp \left\{ -\exp \left[\frac{R_m \times e}{P_m} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (1)$$

式中: P 为累积甲烷产量, $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ (以单位 VS 的产量计); P_m 为最大产甲烷潜力, $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$; R_m 为最大产甲烷速率, $\text{mL}\cdot(\text{g}\cdot\text{d})^{-1}$ (以单位 VS 在单位时间内的产量计); λ 为滞后期, d ; t 为反应时间, d ; e 取 2.718 3。

1.5 微生物群落结构分析

16S rRNA 测序工作委托第三方进行, 细菌与古菌的测序引物分别为 338F-806R 与 524F10extF-Arch958RmodR。BMP 实验结束后, 采集 R0、R2、R4 及 R6 组的样品, 考察其细菌与古菌群落变化。

2 结果与讨论

2.1 OFL 与 PS 微塑料单一及复合污染对甲烷产量的影响

1) 单一污染对累积甲烷产量的影响。图 1(a) 所示为 R0、R1、R2 的累积甲烷产量 (以单位 VS 的甲烷产量计)。运行初期, 各组立即表现出不同的增长速率。 $50\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ OFL 反应初期对产气量影响较小, 后期抑制作用逐渐增强, 而 $500\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ OFL 条件下自初期就呈现出较强的抑制。至反应结束时, R1 累积产量较对照组降低了 15.95% ($P < 0.05$), R2 产气量于第 18 d 不再显著增加, 最终产量与对照组相比显著降低了 81.36% ($P < 0.05$)。可见, OFL 抑制了甲烷产量, 且随着 OFL 质量浓度的提升, 抑制逐渐增强。

由图 1(b) 中甲烷累积产量增长趋势可以发现, 反应初期 PS 微塑料的存在会提升甲烷产生速率, 而运行 20 d 后甲烷产量增长趋势逐渐平缓。反应结束时, R3 和 R4 甲烷累积产量较对照组分别降低了 5.78% 和 4.25%。可见, PS 微塑料在一定程度上会造成产甲烷能力的下降, 但其胁迫作用未随投量的增加而明显增强。在厌氧消化进程中, 一些尺寸微小的污染物, 如 PVC 微塑料^[5]、

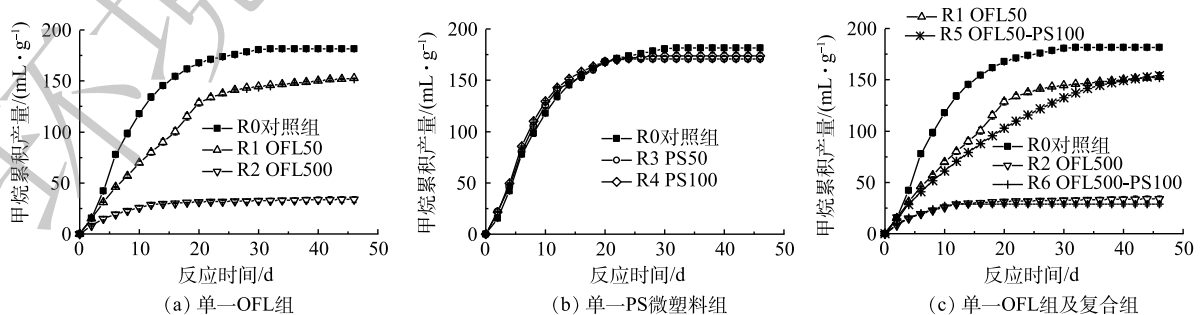


图 1 不同条件下甲烷累积产量

Fig. 1 Cumulative methane production under different conditions

纳米零价铁^[17]等, 被证实可有效促进污泥的增溶或水解, 以缓解限速步骤对产气的影响, 这也可能是 PS 微塑料对初期产气量具有轻微促进作用的原因。然而, PS 微塑料的毒性也不可忽视。有研究发现, PS 微塑料会刺激 EPS 的蛋白二级结构和表面官能团发生改变^[18,19], 也会引起微生物群落的变化^[3]。如图 1(b) 所示, 实验后期 PS 微塑料的生物毒性逐渐占主导地位, 故导致了产气量增长的滞缓以及累积产量的降低。

2) 复合污染对累积甲烷产量的影响。图 1(c) 为 PS 微塑料与不同质量浓度 OFL 复合污染下甲烷产量随反应时间的变化。至反应结束时, R5 与 R6 的总产气量较对照组均显著降低 ($P < 0.05$)。将 R5 与 R1 的甲烷产量增长趋势进行对比发现, 加入 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PS 微塑料后甲烷产量增速有所变缓; $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PS 微塑料与 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ OFL 复合作用时, R6 产气量自第 11 d 起未见明显增长, 与其对应单一条件组 R2 与 R4 对比, 产气停止时间有所提前。上述实验结果表明, 在厌氧消化产甲烷过程中 2 种污染物具有联合胁迫作用, 但在不同复合条件下, 协同抑制作用具体表现略有不同: 低浓度抗生素复合 PS 微塑料主要会引起产气速率的降低, 而高浓度抗生素与 PS 微塑料的复合则会导致反应提前终止。

3) 厌氧消化产甲烷动力学分析。通过数据拟合可获得最大产甲烷潜力 (P_m), 最大产甲烷速率 (R_m) 和滞后期 (λ) 3 个重要参数, 拟合结果如表 2 所示。在所有条件下, 滞后期 λ 值均为 0 d, 这说明实验接种的微生物性能良好, 能迅速适应环境并利用有机质^[20]。在不同质量浓度 OFL 的作用下, R1 和 R2 组的 P_m 和 R_m 较对照组均有所降低, 进一步说明 OFL 会抑制厌氧消化产甲烷。投加 PS 微塑料后, R_m 拟合值较对照组有所增长, 符合 R3 与 R4 前期产甲烷速率略高于对照的结果。与此同时, 相比于 R1, R5 组的 R_m 下降了 27.5%。这与图 1(c) 中 R1 与 R5 组产气量增长趋势的差异相一致。

表 2 修正 Gompertz 动力学模型拟合参数

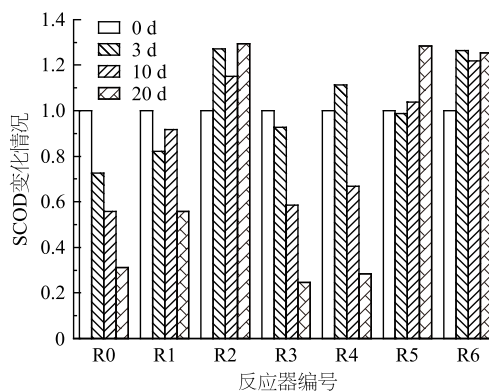
Table 2 Modified Gompertz kinetic model fitting parameters

反应器	$P_m/(\text{mL} \cdot \text{g}^{-1})$	$R_m/(\text{mL} \cdot (\text{g} \cdot \text{d})^{-1})$	λ/d	R^2
R0	181.07±0.66	11.78±0.15	0	0.994 3
R1	151.92±0.18	7.49±0.03	0	0.999 9
R2	31.15±0.11	3.29±0.10	0	0.989 0
R3	169.06±3.66	12.76±0.32	0	0.980 5
R4	175.26±0.72	13.32±0.21	0	0.996 5
R5	158.86±0.76	5.43±0.01	0	0.996 6
R6	28.34±0.35	5.27±0.13	0	0.988 2

2.2 OFL 与 PS 微塑料单一及复合污染对溶解性有机物的影响

厌氧消化过程中 SCOD 的变化是溶出与消耗 2 个进程共同进行的动态结果。如图 2 所示, R0 的 SCOD 持续降低。可见, 微生物能迅速参与污泥分解和有机物降解, 保证了甲烷化过程的稳定性。R1 和 R2 中出现了 SCOD 升高的现象。这表明, OFL 的存在不利于消化过程中有机物的降解。R4 组 SCOD 在第 3 d 有所升高, 随后迅速降低。这说明, R4 前期有机物溶出速率大于消耗速率。将各组反应后期的 SCOD 进行对比可以发现, 单一 OFL 组 (R1 与 R2) 有机物降解的能力明显弱于单一 PS 微塑料组 (R3 与 R4)。此外, 复合组在 10 d 到 20 d 内 SCOD 积累效应加剧。这意味着, 复合条件下有机物转化利用效率较单一组进一步降低, 对消化过程产生不良影响。

为进一步探讨 DOM 的组分变化, 通过三维荧光技术对 R0、R2、R4、R6 反应器内第 3 d

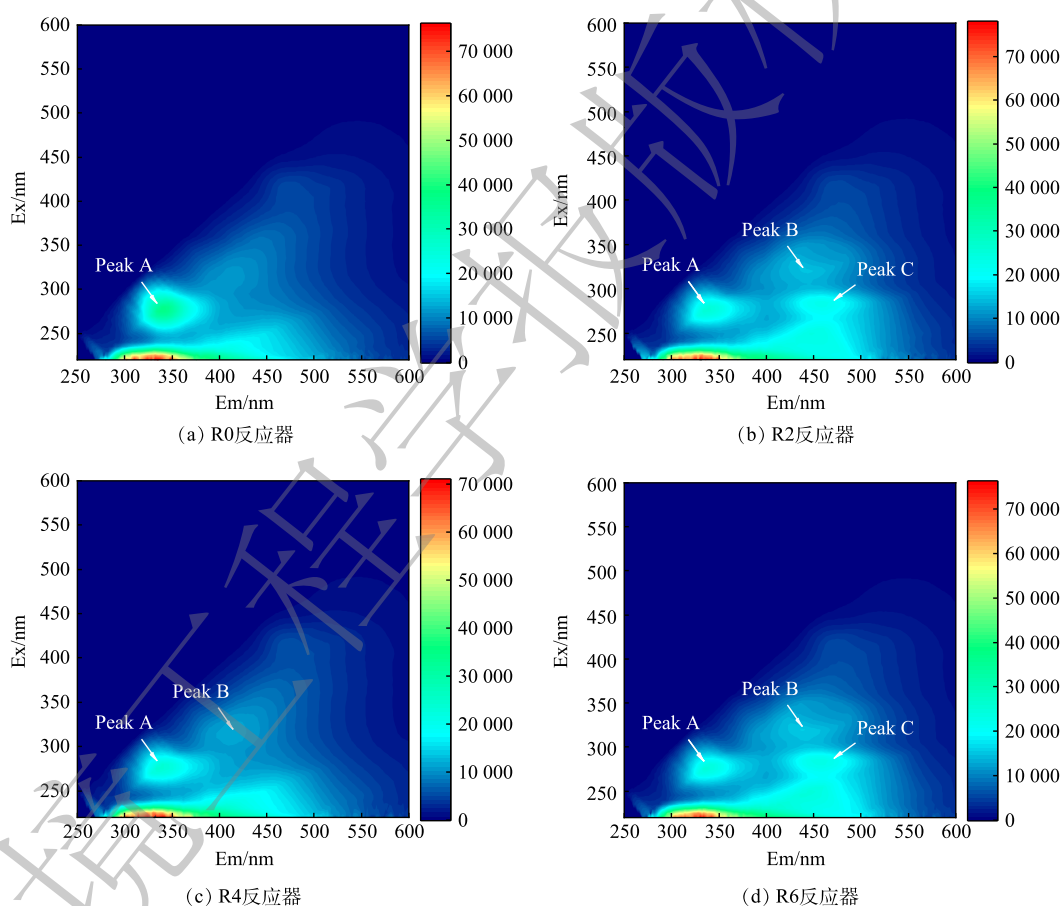


注: SCOD 的变化情况以各组不同反应时间的 SCOD 与各组初始 SCOD 的比值表示。

图 2 不同条件下 SCOD 的变化情况

Fig. 2 SCOD variation under different conditions

样品进行了测定。采用 Chen 提出的区域积分法 (FRI)^[21], 将三维荧光区域分为 5 个区, 分别表示不同类型的有机物: 区域 I (Ex/Em=200-250/250-330) 表征酪氨酸类物质、区域 II (Ex/Em=200-250/330-380) 表征色氨酸类物质、区域 III (Ex/Em=200-250/380-600) 表征富里酸类物质、区域 IV (Ex/Em=250-600/250-380) 表征溶解性微生物代谢产物、区域 V (Ex/Em=250-600/380-600) 表征腐殖质类物质, 并根据分区计算不同类型物质荧光响应百分比 $P_{i,n}$ 值。如图 3 所示, R0 中峰 A 的荧光强度最高, 而在 R2、R4、R6 中荧光强度均有所下降, 各污染组中区域 IV 的 $P_{i,n}$ 也呈现出降低趋势 (表 3)。这说明, 2 种污染物会降低微生物可利用的有机物的相对含量。相较 R0, R2 与 R6 中新增峰 B 与峰 C, 且区域 III、V 的 $P_{i,n}$ 随污染物的添加同步增长。此外 R6 中峰 B 和峰 C 的荧光强度在 R2 基础上有所增强, 且 R6 中峰 C 在 Em 方向上出现红移。这表示, R6 中腐殖质类物质的荧光团浓度及其特定官能团有所增加^[22], 而富里酸与腐殖质类物质的积累不利于生物降解^[23]。可见, 在复合条件下溶解性有机物在结构上明显趋于难降解, 这也是造成产甲烷性能低下的潜在原因之一。



注: 峰A为微生物代谢产物, 峰B与峰C为腐殖质类物质。

图 3 不同条件下 DOM 三维荧光光谱图

Fig. 3 EEM spectra of DOM under different conditions

2.3 OFL 与 PS 微塑料单一及复合污染对厌氧消化各阶段的影响

1) 对增溶阶段的影响。增溶阶段的代谢过程主要表现为有机物的溶出, 通过图 4(a) 中各组第 3 d SCOD 的质量浓度考察单一及复合污染对这一阶段的影响。如图 4(a) 所示, R1 与 R2 反应器 SCOD 质量浓度显著低于对照组 ($P < 0.05$)。可见, OFL 会降低可溶性有机质的释放。相比之下, PS 微塑料对增溶阶段的影响较弱, 与对照组相比, R3 与 R4 抑制率分别仅有 3.81% 和 8.37% ($P < 0.05$)。复合

污染情况下存在协同作用, R5与R6较对照组抑制率增加至44.36%和55.66%。基于2种污染物对增溶阶段的单一影响,可以看出,在复合污染下OFL的抑制作用处于主导地位,PS微塑料的加入强化了OFL在增溶阶段的抑制作用,对污泥结构的转化和可溶性物质的溶出造成影响,严重限制后续阶段的反应。

2)对水解阶段的影响。在水解阶段,微生物将大分子复杂底物分解成为小分子有机物,图4(b)显示了第3d各组牛血清蛋白(BSA)的降解率。OFL降低了BSA的降解率,且抑制作用随着投加量的增加而呈递增趋势。外源污染物的存在会造成微生物部分代谢功能(如水解酶代谢)紊乱^[6],或者酶与底物碰撞结合的概率降低^[24],从而抑制水解底物的降解。不同于单一OFL组,含PS微塑料的R3和R4组BSA降解率略高于对照组。基于OFL的强抑制作用,加入PS微塑料之后,R5的BSA降解率较R1降低了10.63%($P < 0.05$)。这表明,低浓度OFL与PS微塑料复合加强了OFL对水解的抑制效果。然而,相较R2,R6中BSA降解率提高了18.19%。其原因可能是,PS微塑料强大的吸附能力削弱了高浓度OFL在厌氧体系中的扩散与分布,减少OFL与微生物或水解酶之间的直接接触,一定程度上维持了水解过程的正常进行^[25]。

表3 DOM各区域荧光响应占比($P_{i,n}$)

Table 3 DOM fluorescence response percentages by region

编号	区域I	区域II	区域III	区域IV	区域V
R0	26.27	34.31	16.37	17.39	5.66
R2	26.30	34.06	19.23	13.36	7.05
R4	27.53	34.90	17.74	13.78	6.05
R6	26.17	33.33	19.99	13.01	7.50

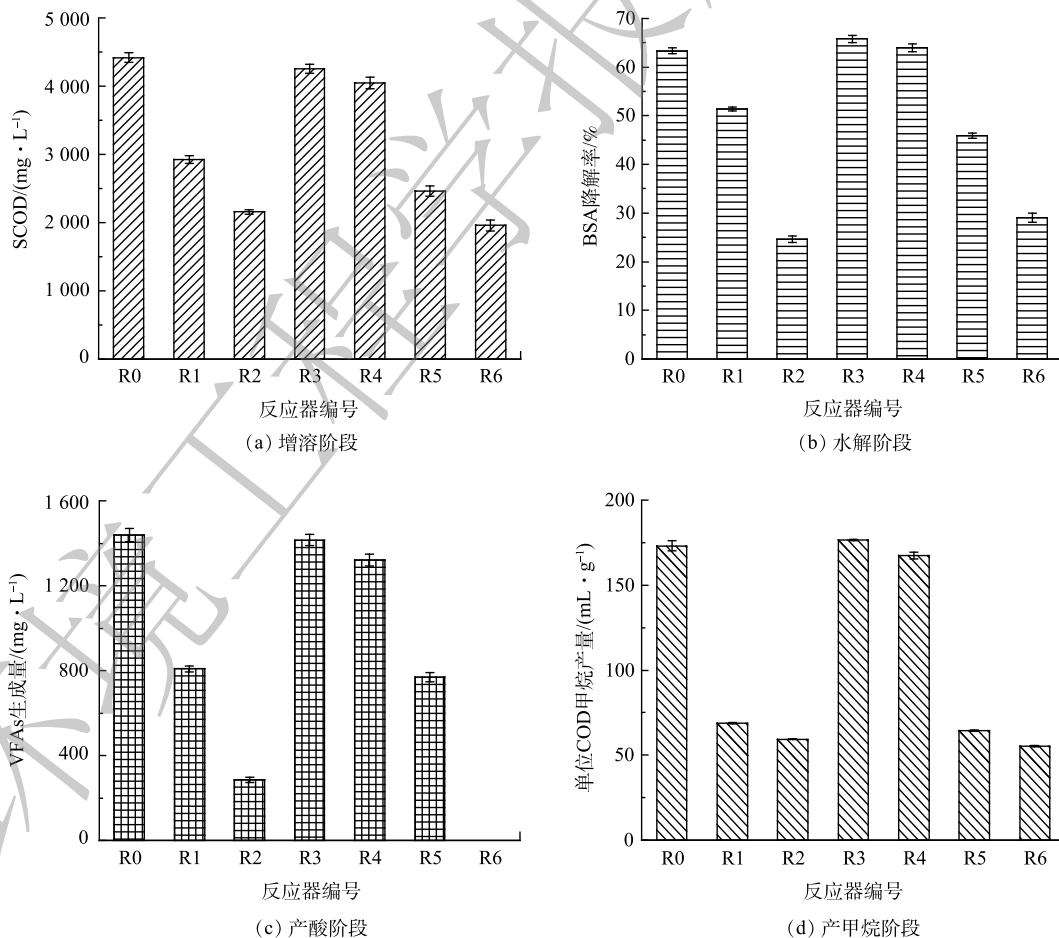


图4 不同污染条件对厌氧消化4阶段的影响

Fig. 4 Effect of different contamination conditions on four stages of anaerobic digestion

3) 对产酸阶段的影响。产酸模拟实验以谷氨酸、葡萄糖为底物, 考察了发酵 4 d 后系统内 VFAs 质量浓度的变化。乙酸、丙酸和丁酸等主要产物均按比例换算为单位体积的 COD 来计算总 VFAs 质量浓度, 以考量底物的转化情况。如图 4(c) 所示, VFAs 生成量随着 OFL 投加量逐渐增加而明显下降。这表明, OFL 对产酸阶段具有抑制作用。相较对照组, 50 和 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ PS 微塑料对产酸过程的抑制率分别为 1.68% ($P>0.05$) 和 8.18% ($P<0.05$)。ZHANG 等^[26] 统计了 5 μm PS 微塑料对葡萄糖降解率的影响, 发现 50~200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ PS 微塑料未显著影响产酸, 当质量浓度达 250 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 降解率较对照组下降了 3.81%。这表明, 较低剂量的 PS 微塑料可能不足以抑制产酸。此外, 复合污染对产酸活动的抑制更为明显, 尤其是 R6, 在第 4 d 仍然检测不到 VFAs 的生成。这表明, 复合条件下抑制程度加剧, 致使氨基酸、葡萄糖等小分子有机物无法有效转化成产甲烷菌可利用的底物, 从而影响体系的能源利用和转化效率。

4) 对产甲烷阶段的影响。如图 4(d) 所示, 产甲烷阶段模拟实验进行了 10 d。在提供充足乙酸钠为底物的情况下, R1 与 R2 甲烷产量较对照组显著下降 ($P<0.05$), 可见 OFL 会阻碍乙酸盐的转化。而在单一 PS 条件下, R3 与 R4 甲烷产量与对照组相比未见显著性差异 ($P>0.05$)。这说明, 产甲烷微生物受 PS 微塑料的影响相对较小。在复合条件下, R5 组产甲烷阶段的效率较 R1 降低了 6.68%, 该阶段效率的下降也是导致 BMP 实验中 R5 产甲烷速率低于 R1 的原因之一。产甲烷菌易受外界环境的影响, 多项研究也证明有毒污染物会严重影响产甲烷菌的生长代谢情况^[2]。因此, 根据单一 OFL 组与复合组中产甲烷阶段效率的下降推测, 对应条件下产甲烷功能微生物的生长代谢水平可能受到了限制。

2.4 OFL 与 PS 微塑料单一及复合污染对 EPS 的影响

EPS 的分泌是微生物防御有毒侵害的关键机制之一。由图 5 可看出, 两类污染物均刺激了 EPS 的分泌, 随着投加量的增长, EPS 质量浓度 (以单位体积 COD 计) 也在增加。单一条件下, R1、R2 组中 2 类 EPS 质量浓度均高于 R3、R4 组。这表明, OFL 较 PS 微塑料具有更强的毒性。将复合组与单一 OFL 组进行对照发现, R5 的 EPS 总质量浓度与 R1 基本相当 ($P>0.05$), R6 较 R2 则显著提高了 7.03% ($P<0.05$)。这表明, 高浓度 OFL 条件下生物毒性复合效应更强。

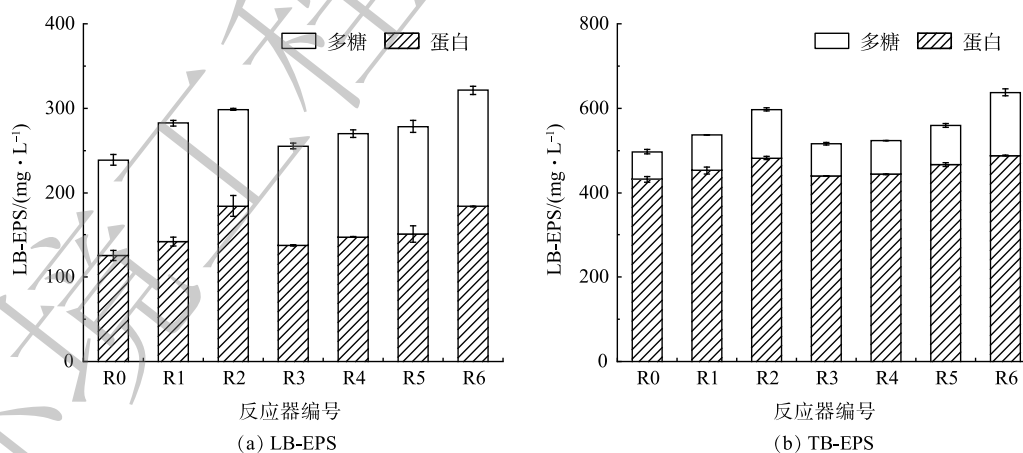
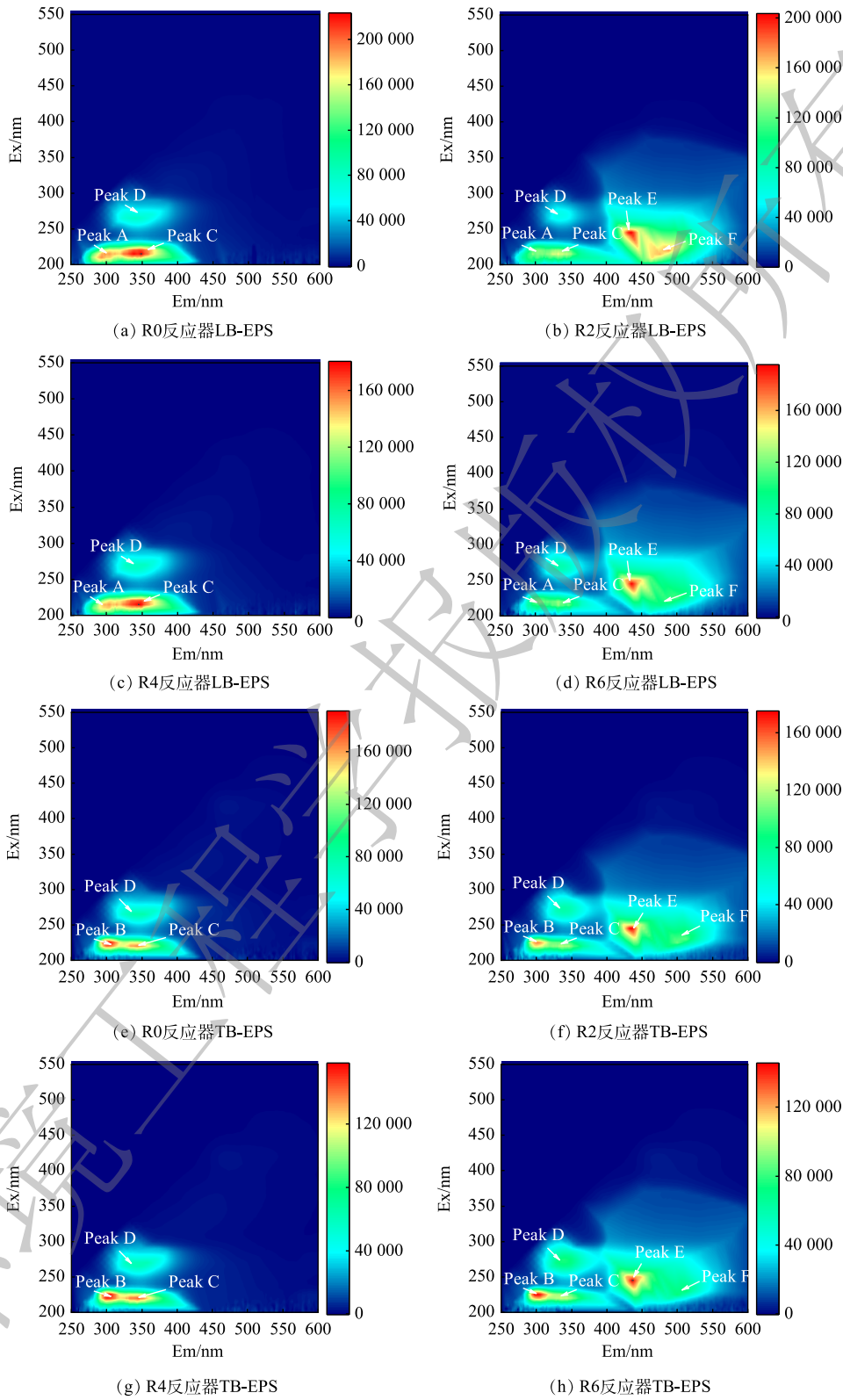


图 5 不同条件下 LB-EPS (a) 与 TB-EPS (b) 质量浓度

Fig. 5 LB-EPS (a) and TB-EPS (b) mass concentration under different conditions

污染物在到达细胞体之前需要穿过 EPS 层, 通过三维荧光检测不同 EPS 的组分变化可以大致揭示不同污染条件对微生物的潜在毒性威胁。如图 6(a)~图 6(h) 所示, R2 和 R6 组中峰 A、峰 B 的荧光强度及对应 I 区+II 区的 P_{in} 值均明显低于对照组, 即其中可生物降解物质的相对含量有所降低。基于表 4, R4 中 III 区与 V 区的 P_{in} 值与对照组基本相当, 而投加了 OFL 的 R2 与 R6 组中富里



注：峰A与峰B为酪氨酸类物质，峰C为色氨酸类物质，峰D为微生物代谢产物，峰E与峰F为富里酸类物质。

图6 不同条件下LB-EPS与TB-EPS三维荧光光谱图

Fig. 6 EEM spectra of LB-EPS and TB-EPS under different conditions

酸类物质 (III 区) 与腐殖质类物质 (V 区) 的相对含量高于对照, 且这 2 组中新增了峰 E 与峰 F, 可见 EPS 中富里酸类与腐殖质类物质的增加与 OFL 有直接关系。EPS 中的腐殖质通常来源于自身分泌与环境吸附, 与蛋白质和多糖不同, 腐殖质难以生物降解。因此, EPS 中腐殖质的富集相当于增加了细胞体外层结构的复杂性, 使得相关酶与有机物的接触受限, 这将对水解产酸等过程造成不利影响^[27]。

2.5 OFL 与 PS 微塑料单一及复合污染对微生物群落的影响

根据细菌属水平的结果 (图 7), 相对丰度最高的细菌菌属依次为: *Hydrogenispora*、*Dechlorobacter*、*Clostridium_sensu_stricto_1*。优势菌属 *Hydrogenispora* 具有良好的产酸性能^[28], 在 R2、R4 和 R6 中的相对丰度均低于对照, 依次降低了 55.63%、57.93%、60.47%, 这与 OFL 抑制产酸的结果相吻合。结合 2.3 节的结果, PS 微塑料对产酸的抑制远不及 OFL 和复合污染, 尽管 R4 中 *Hydrogenispora* 相对丰度大幅降低, 但其余一系列产酸菌, 如通过水解蛋白产酸的 *Lutispora*、*Proteiniclasticum* 等^[29, 30]在 R4 中的相对丰度要明显高于对

表 4 LB-EPS 与 TB-EPS 各区域荧光响应占比 (P_{in})

Table 4 DOM fluorescence response percentages by region %

样品类型	编号	区域I	区域II	区域III	区域IV	区域V
LB-EPS	R0	37.84	42.37	6.12	12.59	1.08
	R2	26.77	24.86	33.46	8.70	6.21
	R4	37.12	41.90	6.07	13.75	1.16
	R6	25.98	24.75	28.23	13.25	7.80
TB-EPS	R0	37.49	38.32	5.81	16.74	1.64
	R2	27.55	24.48	26.93	13.98	7.06
	R4	38.57	38.20	5.83	15.97	1.43
	R6	28.20	24.65	23.29	16.54	7.32

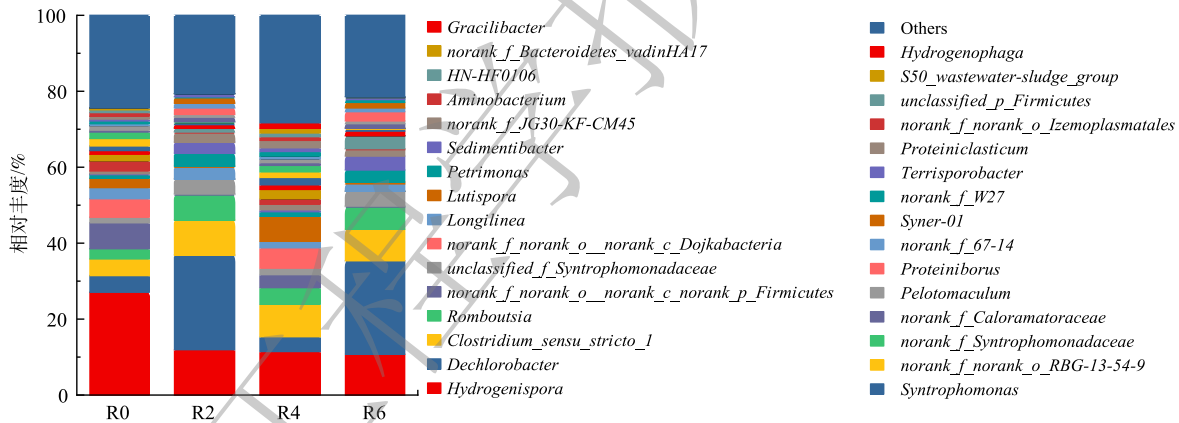


图 7 细菌在属水平的相对丰度

Fig. 7 Relative abundance of bacteria at the genus level

照以及其他污染组。这说明, 其水解产酸功能细菌群落结构出现了变化。次优势菌种 *Dechlorobacter* 被证实具有降解抗生素的能力^[31], 在 R2 与 R6 中的相对丰度明显大于 R0 与 R4。据此推测, 该菌可能参与了抗生素的生物降解过程。产酸细菌 *Clostridium_sensu_stricto_1* 在各污染组的丰度要高于对照组。这表明, 该菌属对有毒污染物具有一定的耐受能力, 这也与其他研究结果一致^[4, 32]。

古菌在属水平的优势菌属分别为 *Methanobacterium*、*Methanosarcina*、*Methanosaeta* (图 8)。

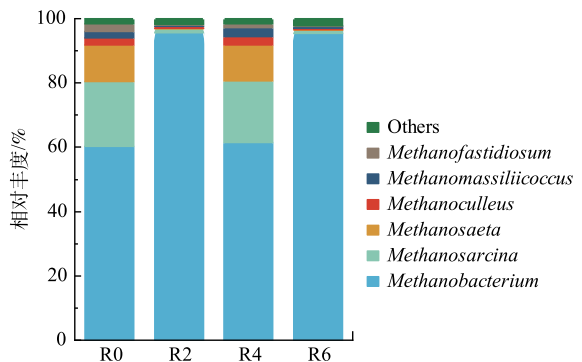


图 8 古菌在属水平的相对丰度

Fig. 8 Relative abundance of archaea at genus level

这3种菌分别代表了不同的产甲烷方式。丰度最高的 *Methanobacterium* 是嗜氢产甲烷菌, 在 R0、R2 和 R4 中相对丰度分别为 60.22%、95.62% 和 61.51%。复合组 R6 中 *Methanobacterium* 丰度水平与 R2 较为接近, 为 95.34%。这说明, 复合污染体系内古菌受 OFL 影响主导。由于嗜氢产甲烷菌在 OFL 的影响下几乎覆盖了 R2 与 R6 的古菌群落。因此, 在这 2 组中其他产甲烷菌的相对丰度降低。以乙酸为底物的 *Methanosaeta* 在 R0 和 R4 中的相对丰度为 11.40% 和 11.17%, 可视作重要的产甲烷途径之一, 而在 R2 与 R6 中的占比仅为 0.28% 和 0.21%。据此推测, OFL 严重阻碍了利用乙酸产甲烷的代谢途径^[33]。次优势菌属 *Methanosarcina* 为兼性产甲烷菌, 可利用的底物更为多样, 其丰度排序为: R0(20.29%)>R4(19.14%)>R2(1.14%)≈R6(1.13%)。综上可知, OFL 对古菌群落的影响表现在改变了其主要的产甲烷途径, 结合 2.3 节 OFL 对产酸过程的抑制, 推断在厌氧消化过程中, R2 与 R6 乙酸生成受到限制, 导致嗜乙酸产甲烷菌的底物缩减, 从而诱导古菌群落向氢营养为主导的代谢途径演替。

3 结论

1) 当厌氧消化受到 OFL 胁迫时, 甲烷产量会随其投加量增加而显著降低。机理分析发现, OFL 会导致 DOM 生物降解性降低, EPS 结构复杂化。产酸细菌 *Hydrogenispora* 等以及嗜乙酸产甲烷菌 *Methanosaeta* 丰度明显减少, 导致产酸性能下降, 不利于甲烷化。

2) PS 微塑料对甲烷产量的抑制弱于 OFL, 且对初期甲烷生成速率略有提高; PS 微塑料有利于 *Lutispora*、*Proteiniclasticum* 等消耗蛋白产酸的细菌的富集。

3) 低浓度 OFL 与 PS 微塑料复合污染会减缓产甲烷速率, 高浓度 OFL 与微塑料复合污染则会严重阻碍产酸活动的正常代谢。复合组微生物群落的变化主要受 OFL 影响, 古菌群落向氢营养为主导的代谢途径演替。

参考文献

- [1] 聂宇, 陈娅婷, 孙照勇, 等. 污水/城市污泥中抗生素对厌氧消化的影响研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2020, 26: 479-488.
- [2] NI B J, ZENG S T, WEI W, et al. Impact of roxithromycin on waste activated sludge anaerobic digestion: Methane production, carbon transformation and antibiotic resistance genes[J]. Science of The Total Environment, 2020: 703.
- [3] FU S F, DING J N, ZHANG Y, et al. Exposure to polystyrene nanoplastic leads to inhibition of anaerobic digestion system[J]. Science of the Total Environment, 2018, 625: 64-70.
- [4] ZHI S L, ZHANG K Q. Antibiotic residues may stimulate or suppress methane yield and microbial activity during high-solid anaerobic digestion[J]. Chemical Engineering Journal, 2019, 359: 1303-1315.
- [5] WEI W, HUANG Q S, SUN J, et al. Polyvinyl Chloride Microplastics Affect Methane Production from the Anaerobic Digestion of Waste Activated Sludge through Leaching Toxic Bisphenol-A[J]. Environmental Science & Technology, 2019, 53(5): 2509-2517.
- [6] WEI W, HAO Q, CHEN Z J, et al. Polystyrene nanoplastics reshape the anaerobic granular sludge for recovering methane from wastewater[J]. Water Research, 2020, 182: 116041.
- [7] MENG Y, LIU W Y, FIEDLER H, et al. Fate and risk assessment of emerging contaminants in reclaimed water production processes[J]. Frontiers of Environmental Science & Engineering volume 2021, 15(5): 104.
- [8] LUO J Y, ZHANG Q, ZHAO J, et al. Potential influences of exogenous pollutants occurred in waste activated sludge on anaerobic digestion: A review[J]. Journal of Hazardous Materials, 2020, 383: 121176.
- [9] SU Y, ZHANG Z, ZHU J, et al. Microplastics act as vectors for antibiotic resistance genes in landfill leachate: The enhanced roles of the long-term aging process[J]. Environmental Pollution, 2021, 270: 116278.
- [10] HOLLIGER C, ALVES M, ANDRADE D, et al. Towards a standardization of biomethane potential tests[J]. Water Science and Technology, 2016, 74(11): 2515-2522.
- [11] 河北省环境监测中心站. 水质 化学需氧量的测定 快速消解分光光度法[S]. 行业标准-环保. 2007: 12P. ;A14
- [12] LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. The Journal of biological chemistry, 1951, 193(1): 265-275.
- [13] MADHUSUDANAN NAIR P, VAIDYANATHAN C S. A colorimetric method for determination of pyrocatechol and related substances[J].

- Analytical Biochemistry*, 1964, 7(3): 315-321.
- [14] XIE S B, MA J W, LI L, et al. Anaerobic caproate production on carbon chain elongation: Effect of lactate/butyrate ratio, concentration and operation mode[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 329: 124893.
- [15] WANG H, CAI W W, LIU W Z, et al. Application of sulfate radicals from ultrasonic activation: Disintegration of extracellular polymeric substances for enhanced anaerobic fermentation of sulfate-containing waste-activated sludge[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2018, 352: 380-388.
- [16] BATSTONE D J, TORRIJOS M J, RUIZ C, et al. Use of an anaerobic sequencing batch reactor for parameter estimation in modelling of anaerobic digestion[J]. *Water Science and Technology*, 2004, 50(10): 295-303.
- [17] 方慧莹, 王端立, 陈皓, 等. 纳米零价铁对厌氧消化影响的反应动力学模型[J]. *化工学报*, 2017, 68: 2042-2048+2217.
- [18] FENG Y, FENG L J, LIU S C, et al. Emerging investigator series: inhibition and recovery of anaerobic granular sludge performance in response to short-term polystyrene nanoparticle exposure[J]. *Environmental Science: Water Research & Technology*, 2018, 4(12): 1902-1911.
- [19] QIAN J, HE X X, WANG P F, et al. Effects of polystyrene nanoplastics on extracellular polymeric substance composition of activated sludge: The role of surface functional groups[J]. *Environmental Pollution*, 2021, 279: 116904.
- [20] KAFLE G K, CHEN L. Comparison on batch anaerobic digestion of five different livestock manures and prediction of biochemical methane potential (BMP) using different statistical models[J]. *Waste Management*, 2016, 48: 492-502.
- [21] CHEN W, WESTERHOFF P, LEENHEER J A, et al. Fluorescence excitation - Emission matrix regional integration to quantify spectra for dissolved organic matter[J]. *Environmental Science & Technology*, 2003, 37(24): 5701-5710.
- [22] WANG D B, DUAN Y Y, YANG Q, et al. Free ammonia enhances dark fermentative hydrogen production from waste activated sludge[J]. *Water Research*, 2018, 133: 272-281.
- [23] REYNOLDS D M. The differentiation of biodegradable and non-biodegradable dissolved organic matter in wastewaters using fluorescence spectroscopy[J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2002, 77(8): 965-972.
- [24] 刘旭冉. 聚丙烯酰胺对剩余污泥厌氧消化过程影响行为的解析与调控[D]. 长沙: 湖南大学, 2019.
- [25] LI J, HAO X D, VAN LOOSDRECHT M C M, et al. Relieving the inhibition of humic acid on anaerobic digestion of excess sludge by metal ions[J]. *Water Research*, 2021, 188: 116541.
- [26] ZHANG J J, ZHAO M X, LI C, et al. Evaluation the impact of polystyrene micro and nanoplastics on the methane generation by anaerobic digestion[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2020: 205.
- [27] FERNANDES T V, VAN LIER J B, ZEEMAN G. Humic Acid-Like and Fulvic Acid-Like Inhibition on the Hydrolysis of Cellulose and Tributyrin[J]. *BioEnergy Research*, 2015, 8(2): 821-831.
- [28] WANG X Q, LYU T, DONG R J, et al. Revealing the link between evolution of electron transfer capacity of humic acid and key enzyme activities during anaerobic digestion[J]. *Journal of Environmental Management*, 2022, 301: 113914.
- [29] JIANG X R, LYU Q Y, BI L F, et al. Improvement of sewage sludge anaerobic digestion through synergistic effect combined trace elements enhancer with enzyme pretreatment and microbial community response[J]. *Chemosphere*, 2022, 286: 131356.
- [30] WEI W, HUANG Q S, SUN J, et al. Revealing the Mechanisms of Polyethylene Microplastics Affecting Anaerobic Digestion of Waste Activated Sludge[J]. *Environmental Science & Technology*, 2019, 53(16): 9604-9613.
- [31] SONG H L, LU Y X, YANG X L, et al. Degradation of sulfamethoxazole in low-C/N ratio wastewater by a novel membrane bioelectrochemical reactor[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 305: 123029.
- [32] LI J J, LI C X, LI Y L, et al. Elucidation of high removal efficiency of dichlorophen wastewater in anaerobic treatment system with iron/carbon mediator[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2022, 330: 129854.
- [33] CHE L X, YANG B, TIAN Q, et al. Iron-based biochar derived from waste-activated sludge enhances anaerobic digestion of synthetic salty organic wastewater for methane production[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 345: 126465.

(责任编辑: 金曙光)

Effects of combined ofloxacin and polystyrene microplastics on anaerobic digestion of waste activated sludge

MA Jingwei, YI Kewei, HE Qiulai, HE Weipeng, KE Shuizhou*

Civil Engineering College, Hunan University, Changsha 410082, China

*Corresponding author, E-mail: ksz@hnu.edu.cn

Abstract In order to explore the influence of combined antibiotic and microplastic on anaerobic digestion, the effects of two pollutants, ofloxacin (OFL) and polystyrene (PS) microplastics, on anaerobic digestion were investigated at different mass concentrations by BMP tests. The mechanism was explored by analyzing dissolved organic matter (DOM), extracellular polymeric substance (EPS), four stages metabolic process of anaerobic digestion and microbial community. The results showed that the individual OFL and individual PS microplastics decreased the methane cumulative production by 15.95%~81.36% and 4.25%~5.78%, respectively, compared to the control. However, under the combined conditions, the two showed synergistic effects, leading to the further decrease in methane production rate and the reduction in effective gas production time, in which OFL stress was dominant. The mechanism analysis revealed that both individual OFL pollution and combined pollution greatly increased the humic substances in DOM, complicated the structure of EPS components and inhibited the efficiency of the four stages of anaerobic digestion. The individual PS microplastics pollution increased methane production rate at the beginning of the reaction, and caused relatively less effect on the four stages. Microbial community analysis indicated that the combined pollution had a more similar community distribution to the individual OFL pollution. The relative abundance of acidification bacteria and acetic acid methanogen decreased significantly, which resulted in a severe suppression of methanogenic pathway of acetic acid nutrition. The results of this study can provide a reference for the process regulation of waste sludge resource treatment under complex pollution situations.

Keywords ofloxacin; microplastics; polystyrene; anaerobic digestion; microbial community