

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2026.04.017

黄志鹏, 王宁, 梁丹丹, 等. MnO_2 修饰碳布电极强化微生物电化学系统低碳氮比废水脱氮效能研究 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2026, 48(4): 240-254.

MnO_2 修饰碳布电极强化微生物 电化学系统低碳氮比废水脱氮效能研究

黄志鹏, 王宁, 梁丹丹, 冯玉杰

哈尔滨工业大学 环境学院/城乡水资源与水环境全国重点实验室/
污泥安全处置与资源化技术国家工程研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150090

摘要: 为提升微生物电化学系统 (Microbial Electrochemical System, MES) 处理低碳氮比 (C/N) 废水的反硝化效能, 采用水热合成法制备二氧化锰 (MnO_2) 修饰碳布电极, 运用周期极性反转策略 (阳极 +0.2 V/阴极 -0.5 V vs SCE) 培养双向电子传递生物膜, 以提高界面电子交换能力。结果表明: MnO_2 修饰组阴极期起始电流密度达 -10.2 A/m^2 , 生物膜阳极期最大储电子量为 $(0.80 \pm 0.03) \text{ mmol}$, 较对照组 (无修饰空白碳布) 提升 15.9%; 修饰组总氮去除率从初始 36% 提升至 91%, 且全程无亚硝酸盐积累。 MnO_2 修饰实现了功能菌的选择性富集, 核心电活性菌 *Geobacter* sp. 相对丰度从 50.84% 提升至 70.21%, 群落功能专一性显著提高。氮代谢功能基因分析显示, 反硝化全通路基因相对拷贝数同步提升 2.17 倍, 激活了硝酸盐 \rightarrow 亚硝酸盐 \rightarrow 一氧化氮 \rightarrow 一氧化二氮 \rightarrow 氮气的反硝化通路。电化学测试发现, MnO_2 修饰组在 2.0 mV/s 的扫描速率下, 氧化态峰电流中直接电子传递贡献率达 56%, 显著高于对照组, 电极与生物膜间的电子交换速率明显提升。生物膜三维结构分析发现, 修饰组活菌向生物膜表层迁移, 硝酸盐扩散距离缩短, 胞外聚合物形成均匀的三维网络骨架, 多糖与蛋白组分分布均衡, 生物膜结构稳定性与传质效率得到了显著优化。

关键词: 二氧化锰; 微生物电化学系统; 低碳氮比废水;

反硝化; 双向电子传递生物膜

中图分类号: X703; TQ426

文献标识码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



文章编号: 1673-9868(2026)04-0240-15

Study on the Enhancement of Nitrogen Removal Efficiency of Microbial Electrochemical System Treating Low C/N Wastewater by MnO_2 -Modified Carbon Cloth Electrode

收稿日期: 2026-03-10

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(42207257)。

作者简介: 黄志鹏, 硕士研究生, 主要从事微生物电化学水处理技术研究。

通信作者: 梁丹丹, 博士, 副研究员。

HUANG Zhipeng, WANG Ning, LIANG Dandan, FENG Yujie

School of Environment, Harbin Institute of Technology / State Key Laboratory of Urban-Rural Water Resource and Environment / National Engineering Research Center for Safe Sludge Disposal and Resource Recovery, Harbin Heilongjiang 150090, China

Abstract: To improve the denitrification efficiency of microbial electrochemical system (MES) in treating low carbon-to-nitrogen ratio (C/N) wastewater, manganese dioxide (MnO₂)-modified carbon cloth electrodes were prepared by hydrothermal synthesis method and a periodic polarity reversal strategy (anode +0.2 V/cathode -0.5 V vs SCE) was adopted to cultivate bidirectional electron transfer biofilms to further accelerate the interfacial electron exchange capability. The results showed that the initial current density of the MnO₂ modified group reached -10.2 A/m² in the cathode period, and the maximum electron storage capacity of the biofilm in the anode stage was (0.80±0.03) mmol, which was 15.9% higher than that of the control group (without modification). The total nitrogen removal of the modified group increased from the initial 36% to 91%, and there was no nitrite accumulation throughout the process. MnO₂ modification realized the selective enrichment of functional bacteria; the relative abundance of the core electroactive bacterium *Geobacter* sp. increased from 50.84% to 70.21%, indicating the improved community functional specificity. At the level of nitrogen metabolism functional genes, the relative copy numbers of genes in the whole denitrification pathway increased synchronously by 2.17 times, which completely activated the denitrification pathway of nitrate→nitrite→nitric oxide→nitrous oxide→nitrogen. Electrochemical tests showed that the direct electron transfer contribution rate of the oxidation peak current of the MnO₂ modified group reached 56% at a scan rate of 2.0 mV/s, which was significantly higher than that of the blank group, and the electron exchange rate between electrode and biofilm was improved. The analysis of biofilm three-dimensional structure showed that the viable bacteria of the modified group migrated to the surface of the biofilm, shortening the nitrate diffusion distance. The extracellular polymeric substance formed a uniform three-dimensional network skeleton, with a balanced distribution of polysaccharide and protein components, and the structural stability and mass transfer efficiency of the biofilm were significantly optimized. This study realized the improvement of denitrification efficiency of MES biocathode through MnO₂ modification, and provided experimental basis for the development of functional electrode materials and the optimization of operation strategies for denitrification of low C/N wastewater.

Key words: manganese dioxide; microbial electrochemical system; low C/N wastewater; denitrification; bidirectional electron transfer biofilm

由于农业生产中含氮化肥的过量施用、生活污水的大量排放及工业废水的直接排放等因素, 水体硝酸盐污染日益严峻。硝酸盐在水体中的累积不仅会引发富营养化, 破坏水生生态系统结构与功能, 其不完全还原产物(亚硝酸盐)还会诱发高铁血红蛋白血症, 对人类健康构成极大威胁。硝酸盐作为一种氧化态电子受体, 其去除需依赖电子供体的还原。一些低 C/N 废水(一般指 C/N<8)^[1], 例如生活污水、市政污水处理厂二沉池出水等, 因有机碳源匮乏, 导致硝酸盐无法被完全去除。为高效去除该类废水中的硝酸盐, 传统异养反硝化工艺常依赖大量外源有机碳源的投加, 这不仅大幅提升了处理成本, 又易因碳源利用不充分造成二次污染。因此, 开发高效、经济、环境友好的低 C/N 废水脱氮技术, 已成为水环境修复领域的核心需求^[2-3]。

微生物电化学系统(Microbial Electrochemical System, MES)作为融合微生物代谢与电化学过程的绿色创新技术,为低 C/N 废水脱氮提供了极具前景的解决方案。与传统工艺不同, MES 以电极为电子供体驱动反硝化菌生长,大幅降低了反硝化过程对有机碳源的依赖,契合绿色低碳治理理念^[4-5]。然而,该系统仍面临电极与生物膜间胞外电子传递效率偏低的难题,反硝化菌难以高效获取电子,限制了硝酸盐还原速率^[4]。在 MES 阴极反硝化体系中,电活性生物膜是电子传递与硝酸盐还原的核心载体。已有研究证实,通过电极极性反转方式可获得双向电子转移生物膜,其中的电活性菌可通过胞外电子传递搭建电极与反硝化菌间的电子转移桥梁,并驱动硝酸盐逐步还原为氮气。然而,电极极性的切换易引起活性细菌的大量流失,导致系统脱氮效能难以维持,影响长期运行稳定性^[6]。

优化电极表面特性及系统运行策略可实现对电活性生物膜的有效调控。利用功能性纳米材料修饰电极,可精准调控其电化学特性与表面微观结构:一方面可提升电极导电性、电容性能与电子储存能力,强化电极与生物膜间的电子传递效率^[7];另一方面可为电活性细菌提供适宜附着位点,促进功能菌群富集,优化微生物群落组成与生物膜空间结构^[8-9]。周期极性反转策略通过交替切换电极的阴阳极属性,定向培养双向电子传递生物膜,使其在阳极期储存电子、阴极期释放电子还原硝酸盐,实现电子的高效利用^[4,6]。二氧化锰(MnO_2)作为典型的过渡金属氧化物,兼具优异的导电性、电容特性、化学稳定性与生物相容性,已被广泛应用于电催化与生物电化学领域^[9]。已有研究表明, MnO_2 可刺激电活性菌产生胞外囊泡^[10-11],增强电极与电活性菌间的电子转移。同时,其赝电容特性也有助于增强种间电子转移能力,提升厌氧系统的产甲烷效率^[12]。因此,将 MnO_2 修饰于碳布电极表面,既可提升电极电子储存与传递能力,又能优化电极表面形貌,为 *Geobacter* sp. 等电活性细菌的定殖营造适宜微环境,促进电活性生物膜的形成与功能发挥,提高系统稳定性。

本研究通过水热合成法制备 MnO_2 修饰碳布电极,构建单室 MES 反应器,采用周期极性反转策略定向培养双向电子传递生物膜,以未修饰空白碳布电极为对照,系统探究 MnO_2 修饰对 MES 处理低 C/N 废水反硝化效能的影响。从脱氮效能、电子传递特性、微生物群落结构及生物膜形貌组成等角度,解析 MnO_2 修饰的强化机制,揭示其对电极-生物膜电子传递、生物膜结构优化及功能菌群富集的调控规律,旨在为提升 MES 脱氮效能提供可行技术手段,并为功能性电极材料开发与运行策略优化提供理论依据和实验支撑。

1 材料与方法

1.1 反应器的组装与运行

通过水热合成法制备 MnO_2 修饰碳布工作电极,具体流程如下:在磁力搅拌条件下,将 256 mg 氟化钾(KF)和 200 mg 高锰酸钾(KMnO_4)依次加入 20 mL 去离子水中,搅拌溶解后加入 25 mL 0.5 mol/L 的 H_2SO_4 溶液,继续搅拌 30 min。随后,取一块碳布放入上述溶液中,将溶液和碳布同时移入内衬聚四氟乙烯的不锈钢高压反应釜中,于 120 °C 反应 80 min。待反应完成后,将反应釜冷却至室温,取出碳布,用去离子水洗涤 3 次,而后于 60 °C 真空干燥箱中干燥 12 h,即得到 MnO_2 修饰的工作电极。

反应器的组装:使用有机玻璃构建立方体单室生物反应器,其内部空腔横截面直径约为 35 mm,腔体长度为 30 mm,反应器有效容积为 28 mL。采用合成的 MnO_2 修饰碳布(直径 30 mm)作为工作电极,安装相同直径的钛网(120 目,纯度 99.99%,昆山恒博新材料有限公司)作为对电极。参比电极为饱和甘汞电极(SCE,相对标准氢电极的电位为 +241.5 mV),固定在工作电极旁。

反应器的运行:启动阶段,反应器进水中加入体积分数为 20% 的生活污水,并在 +0.2 V vs SCE 电位下运行。在阳极电流输出稳定后,为培养双向电子传递生物膜,对反应器施加 -0.5 V vs SCE 的恒定负电位。阳极期以乙酸钠(1 g/L)为电子供体,电极为电子受体。阴极期进水模拟二沉池出水,提供

2 mmol/L 的硝酸盐氮作为电子受体, 电极为唯一电子供体。运行过程中, 通过恒电位仪 (CHI 1000C, 上海辰华仪器有限公司) 施加恒定电位。此外, 阳极和阴极电解质溶液均含有 50 mmol/L PBS 缓冲液、1.25% 微量矿物质溶液和 0.50% 维生素溶液^[13]。进水前, 阳极和阴极进水均用 N₂ (99.99%) 曝气 30 min 以保持厌氧状态。阳极、阴极期运行时间均为 1 d, 待获得成熟阳极生物膜后, 系统共运行了 14 个完整的阴阳极周期。

1.2 分析方法

化学需氧量 (Chemical Oxygen Demand, COD) 的测定: COD 采用《水质 化学需氧量的测定 快速消解分光光度法》(HJ/T399—2007) 测定。使用移液枪准确量取 2 mL 待测溶液置于 COD 测试管中, 随后准确量取 1 mL 消解液 1, 之后准确加入 4 mL 消解液 2, 拧紧瓶盖, 充分震荡使管内液体混合均匀。在快速消解仪 DRB 200 上设定恒温消解程序, 消解温度为 165 °C。待仪器升温完成后, 将消解管置于消解槽中恒温消解 15 min, 之后缓慢降温, 待温度降到 120 °C 时将消解管取出, 震荡混合均匀, 置于室温下自然冷却至常温。随后用分光光度计 DR 3900 测定其吸光度。

氮含量的测定: 测定前, 水样先经过 0.45 μm 滤膜过滤。硝酸盐氮 (NO₃⁻-N) 使用紫外分光光度法测定; 亚硝酸盐氮 (NO₂⁻-N) 使用 N-(1-萘基)-乙二胺光度法测定; 氨氮 (NH₄⁺-N) 使用纳氏试剂分光光度法测定, 由于系统中游离氨浓度仅占总氨氮的 0.8%~1.0%, 氨氮基本以 NH₄⁺-N 形式存在, 为简化表达, 使用 NH₄⁺-N 来代替氨氮。总氮去除率通过式 (1) 计算:

$$TN_{removal} = \left[1 - \frac{(\text{NO}_3^- - \text{N})_{\text{eff}} + (\text{NO}_2^- - \text{N})_{\text{eff}} + (\text{NH}_4^+ - \text{N})_{\text{eff}}}{(\text{NO}_3^- - \text{N})_{\text{inf}}} \right] \times 100\% \quad (1)$$

微生物群落结构分析: 于第 14 个运行周期结束后采集两组电极表面生物膜样品, 液氮速冻后置于 -80 °C 冰箱保存。对生物膜样品进行 16S rRNA 高通量测序, 探究其微生物群落结构组成。具体流程如下: 首先对样品进行 DNA 提取, 测试 DNA 浓度后, 利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量, 若电泳条带清晰明亮即可进行下一步扩增。对细菌 16S rRNA 基因的 V3-V4 区进行扩增, 正向引物为 338F (5'-ACTC-CTACGGGAGGCAGCAG-3'), 反向引物为 806R (5'-GGACTAACHVGGGTWTCTAAT-3')^[14], 经变性、退火、延伸后得到 PCR 产物。将 PCR 产物回收并进行纯化处理后, 进行 DNA 浓度检测及定量。依据 Illumina Miseq 平台的操作规范, 对纯化后的 DNA 片段构建基因文库。高通量测序完成后, 利用美吉生物公司云平台 (www.i-sanger.com) 进行生物信息学分析, 以优化后的扩增子序列变体特征表为基础, 在属分类水平下, 对空白碳布组和 MnO₂ 修饰碳布组样品进行群落结构可视化分析。同时, 基于 FAPROTAX 方法, 在该云平台完成微生物群落的氮代谢功能预测。

电化学测试方法: 进行有底物状态下的循环伏安 (Cyclic Voltammetry, CV) 扫描时, 待一个运行周期结束后, 向反应器中加入新鲜的电极液 (与进水阳极液保持一致), 并在开路状态下稳定 2h, 使用电化学工作站的 CV 模块进行测试。通过对 CV 曲线各数据点电流 (I) 对应的电极电位 (E) 求一阶导数 (DCV), 进而获得有底物状态下电活性生物膜的催化活性位点。在进行无底物状态下的 CV 扫描时, 待各系统完成一个完整周期运行并消耗完底物后, 加入 50 mmol/L PBS 缓冲液, 开路稳定 2 h 以上再进行测试。CV 扫描的参数设置如下: 起始电位 -0.5 V; 终止电位 +0.6 V; 有底物 CV 测试扫描速率为 5.0 mV/s, 无底物 CV 测试扫描速率分别为 0.5、0.7 和 1.2 mV/s; 扫描圈数为 3 圈, 选择最后一圈结果作为最终数据。

生物膜三维结构分析: 使用激光共聚焦显微镜 (CLSM 800, 德国蔡司) 对生物膜三维结构进行观察, 观察前对生物膜进行活死菌染色。染色母液配制: 将 1 mg 钙黄绿素 AM 溶于 1 mL 二甲基亚砜中, 1 mg 碘化丙啶溶于 1 mL 去离子水中。工作液配置前, 先将 50 mmol/L PBS 缓冲液置于 37 °C 恒

温箱中备用,再分别配制钙黄绿素 AM 工作液(取 2 μL 母液稀释于 1 mL PBS 缓冲液中)与碘化丙啶工作液(取 1 μL 母液稀释于 1 mL PBS 缓冲液中)。随后用恒温 PBS 缓冲液冲洗待测电极生物膜,除去电极表面多余的培养基,先加入钙黄绿素 AM 工作液,37 $^{\circ}\text{C}$ 染色 15 min,再加入碘化丙啶工作液,37 $^{\circ}\text{C}$ 继续染色 5 min,之后用恒温的 PBS 缓冲液快速冲洗电极生物膜 2 次,再浸泡电极 5 min 以去除多余染液。染色完成后,将电极生物膜置于激光共聚焦显微镜下进行三维形貌测试。生物膜胞外聚合物(Extracellular Polymeric Substance, EPS)分析:首先对生物膜 EPS 进行染色,荧光染料异硫氰酸荧光素(Fluorescein Isothiocyanate, FITC)用于蛋白染色,染料刀豆蛋白 A(Concanavalin A, ConA)和钙荧光白(Calcofluor White, CFW)分别用于测试 α -D-吡喃葡萄糖和 β -D-吡喃葡萄糖。染料工作液的配置参考 Liang 等^[15]的方法,全程在暗室进行,具体染色步骤如下:首先进行样品固定,将附着有电活性生物膜的电极浸泡在 2.5% 戊二醛溶液中,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下固定 12 h,随后倒掉多余戊二醛溶液,向电极生物膜样品中加入 0.1 mol/L NaHCO_3 溶液(pH=9.0)至完全覆盖样品,室温反应 10 min 后倒掉溶液;然后进行样品染色,将 FITC 溶液加入样品并覆盖电极生物膜,室温反应 1 h,用 PBS 缓冲液缓慢冲洗后,加入 ConA 溶液染色 30 min,再用 PBS 缓冲液轻微冲洗电极,随后加入 CFW,室温反应 30 min;最后用 PBS 缓冲液缓慢冲洗掉多余染色剂。测试时,将样品置于激光共聚焦显微镜下观测,通过设置 Z 轴层扫对 EPS 形态进行三维建模。

1.3 计算

电流积分:阳极期,电极作为电子受体,产生正电流;阴极期,电极作为电子供体向生物膜提供电子,产生负电流。电流积分结果可反映电极与生物膜之间的双向电子传递能力,计算公式如下:

$$n_{A-anode} = \frac{\int_0^t I_{An} dt}{F} \times 1000 \quad (2)$$

$$n_{A-cathode} = \frac{\int_0^t I_{Cath} dt}{F} \times 1000 \quad (3)$$

式中: $n_{A-anode}$ 为阳极期电极获得的电量(mmol); $n_{A-cathode}$ 为阴极期电极提供的电量(mmol); I_{An} 和 I_{Cath} 分别为阳极期和阴极期记录的正电流和负电流(A); t 为采集一个电流数据的时间间隔(s); F 为法拉第常数(96 485 C/mol)。

电子平衡分析:在阴极期,电极是唯一的电子供体,在阳极期,电子从乙酸盐氧化中释放。其中一部分电子通过电流形式转移至电极,另一部分则储存于生物膜中,用于阴极期的硝酸盐还原过程^[16]。因此,在阴极期,总电子量来自电极和生物膜,计算公式如下:

$$n_C = n_{A-cathode} + n_{biofilm} \quad (4)$$

式中: n_C 为阴极期总电子量(mmol); $n_{A-cathode}$ 为阴极期电极提供的电子量(mmol); $n_{biofilm}$ 为生物膜储存的电子量(mmol)。

各系统中用于硝酸盐还原的电子量计算公式如下:

$$n_N = 5 \times \Delta \text{NO}_3^- \text{-N} + 2 \times \Delta \text{NO}_2^- \text{-N} + 8 \times \Delta \text{NH}_4^+ \text{-N} \quad (5)$$

式中: n_N 为用于硝酸盐还原的电子量(mmol); $\Delta \text{NO}_3^- \text{-N}$ 为去除的硝酸盐氮摩尔数; $\Delta \text{NO}_2^- \text{-N}$ 为每个循环后出水中产生的亚硝酸盐氮摩尔数; $\Delta \text{NH}_4^+ \text{-N}$ 为出水中产生的氨氮摩尔数。

直接电子传递(Direct Electron Transfer, DET)和间接电子传递(Mediated Electron Transfer, MET)对电流构成的贡献:为明确电极与生物膜间主导的电子传递过程,对不同扫描速率下无底物循环伏安(CV)测试所得数据进行线性拟合分析,计算公式如下:

$$\log i = b \log v + k \quad (6)$$

式中: i 为特定外加电位下的峰值电流(包括阳极峰值电流和阴极峰值电流, mA); v 为扫描速率(mV/s); b 为斜率, 是评估主导电子传递过程的重要指标; k 为常数。当 $b \approx 1$ 时, 对应直接电子传递过程的动力学控制反应; 当 $b = 0.5$ 时, 表现为扩散控制行为, 对应介导电子传递过程; 当 $0.5 < b < 1$ 时, 代表电子传递过程为动力学控制和扩散控制相结合^[17]。

在特定扫描速率下进一步分析了 DET(动力学控制过程)和 MET(扩散控制过程)的贡献。电流 i 由与扫描速率(v)和扫描速率平方根($v^{1/2}$)相关的两部分组成, 如式(7)所示:

$$i = k_1 v + k_2 v^{1/2} \quad (7)$$

式中: k_1 和 k_2 是常数; $k_1 v$ 代表动力学控制过程的贡献; $k_2 v^{1/2}$ 表示扩散控制过程的贡献。将式(7)两边除以 $v^{1/2}$, 得到式(8):

$$i/v^{1/2} = k_1 v^{1/2} + k_2 \quad (8)$$

通过在不同扫描速率下对 $i/v^{1/2}$ 和 $v^{1/2}$ 进行线性拟合, 可以得到斜率 k_1 。

DET 贡献率计算公式如下:

$$R = k_1 v / i \quad (9)$$

为了确定 MnO₂ 修饰组与空白对照组在总氮去除率上是否具有统计学意义, 用 Microsoft Excel 2019 软件进行了 t 检验, 当 $p < 0.001$ 时, 判定两组数据间差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 微生物电化学系统脱氮效能

采用周期性极性反转方法, 成功获得了具有双向电子传递功能的生物膜。结果表明, 阳极期和阴极阶段分别产生正向和负向电流, 说明电活性生物膜与电极之间实现了双向电子传递。如图 1 所示, 系统在经历多次极性反转后, 阳极最大输出电流密度及阴极输出电流密度在各周期间并未产生巨大变化, 说明该生物膜的双向电子转移能力较为稳定。系统阳极期的最大电流密度均可维持在约 5.9 A/m², MnO₂ 修饰组在阴极期的起始电流密度较空白碳布组更低, 约为 -10.2 A/m²。电极极性反转后, 生物膜内储存的电子可能发生瞬时释放, 且电极表面生物膜电容强度越大时, 其产生的初始电流绝对值越高。在本系统中, MnO₂ 修饰碳布组的初始电流值显著高于对照组, 这与其生物膜电量存储能力直接相关, 得益于 MnO₂ 的电容特性, 使得生物膜具备暂时储存更多电子的能力。

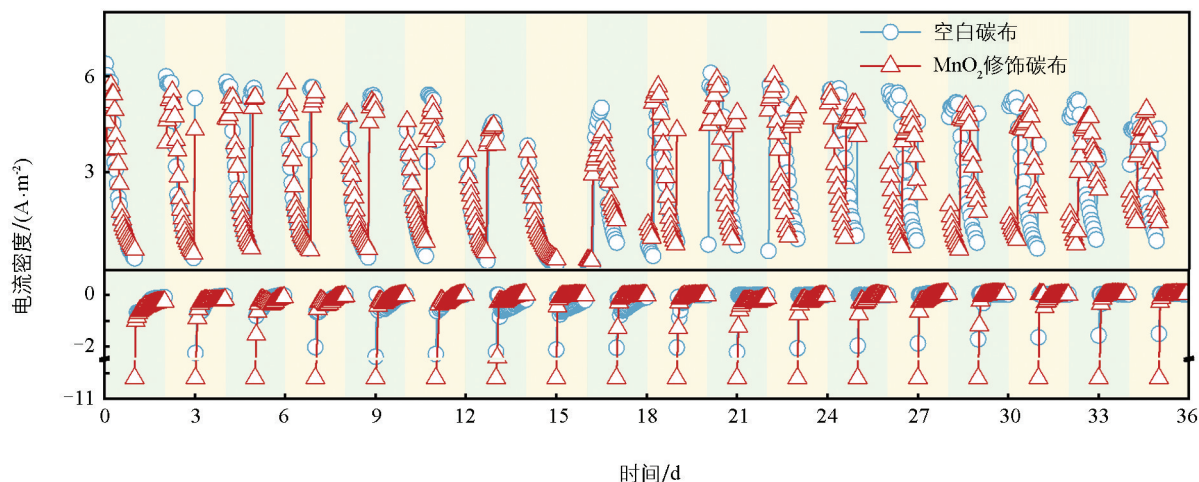


图1 MnO₂ 修饰组与空白组各运行周期阴阳极状态电流输出情况

对极性反转后生物膜的脱氮能力进行探究,图 2 为 MnO_2 修饰组和对照组在阴极状态运行 24 h 后的硝酸盐转化情况。结果显示,两组均未观察到明显的亚硝酸盐积累; NH_4^+-N 均呈先累积后降低的趋势,这可能与阳极期富集的高丰度 *Geobacter* sp. 有关,与部分生物电化学系统中存在的硝酸盐还原为氨氮的现象类似^[18]。在硝酸盐的持续胁迫下,系统反硝化功能逐步被驯化,生物膜的代谢路径发生功能性调整。最终, MnO_2 修饰组总氮去除率由初始的 36% 提升到了 91%,显著高于空白碳布组($p < 0.001$),表明 MnO_2 修饰对生物膜功能演替起到正向调节作用,有利于微生物群落的稳定发展。

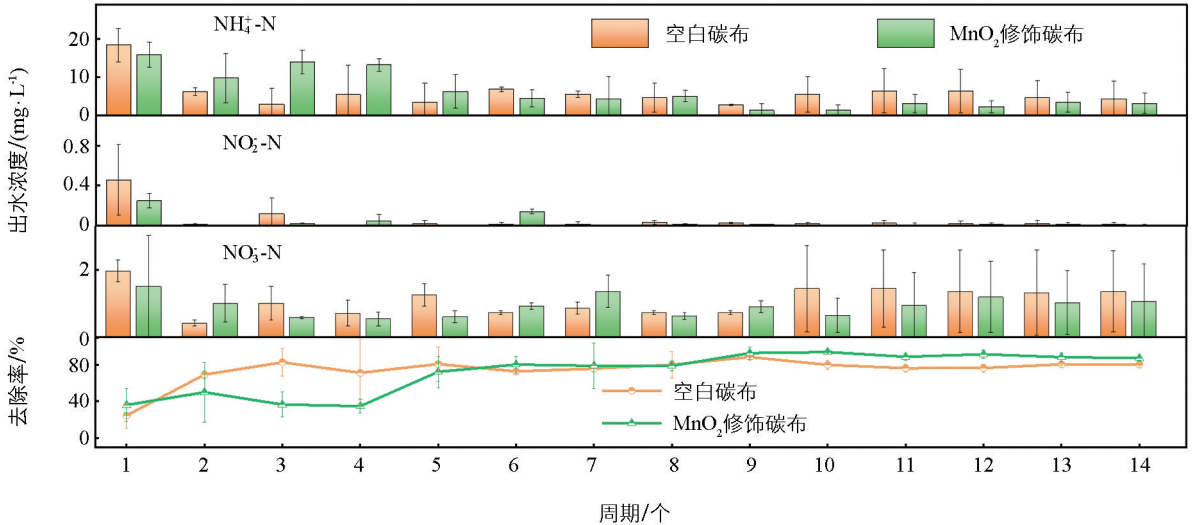


图 2 系统中阴极状态下各周期硝酸盐转化情况

已有研究证实,电活性生物膜具有“生物膜电容”特征,能够在阳极期将电子储存在聚羟基脂肪酸酯(Polyhydroxyalkanoate, PHA)、胞外聚合物(EPS)或细胞色素 C 中,并在电子供体缺乏的阴极期按需释放^[19]。图 3a 展示了空白碳布组与 MnO_2 修饰组在 14 个运行周期内阳极期与阴极期的平均电流积分,直观呈现了系统电子储存与释放的动态特征。空白碳布组与 MnO_2 修饰组阳极期电流积分均显著高于阴极期,证实阳极期是系统电子储存的关键时期; MnO_2 修饰组阳极期平均电流积分在多数周期内高于空白碳布组,充分体现了 MnO_2 的电容特性。 MnO_2 作为典型赝电容材料,可通过 $\text{Mn}^{4+}/\text{Mn}^{3+}$ 的可逆氧化还原反应直接储存电子。同时, MnO_2 修饰组阴极期电流积分的绝对值也略高于空白组,表明其在阴极期可更高效地释放储存电子,为硝酸盐还原提供电子供体。空白碳布组和 MnO_2 修饰组生物膜在阳极期的最大电子储存量分别约为 (0.69 ± 0.01) mmol 和 (0.80 ± 0.03) mmol,这部分电子可作为阴极期硝酸盐还原的补充电子供体。图 3b 的电子平衡分析进一步显示,在所有运行周期中, MnO_2 修饰组来自生物膜与电极的累计电子量均显著高于空白碳布组,这是其电子储存能力提升的直接量化体现。其中,生物膜贡献电子量的增加,可能与 MnO_2 诱导电活性菌(如 *Geobacter* 属)过表达 C 型细胞色素等关键蛋白有关,增强了生物膜的电子储存与传递效能;电极贡献电子量的提升,则应归因于 MnO_2 材料自身赝电容特性所贡献的额外电子储存,弥补了空白碳布电极因缺乏电容特性而导致储电能力不足的局限。与此同时, MnO_2 修饰组用于反硝化的电子量持续高于空白碳布组,这有利于硝酸盐的还原。周期性极性反转策略利用“生物膜电容”特性,实现了充电和放电反应的交替进行,有利于双向电子传递生物膜的形成。在本系统中,硝酸盐还原的理论电子需求量略小于电极供给电子与生物膜储存电子之和,推测多余电子可能用于生物同化作用。

2.2 群落结构分析

MnO_2 修饰碳布电极对微生物群落结构与氮代谢功能基因的表达有显著调控作用。对系统运行结束后

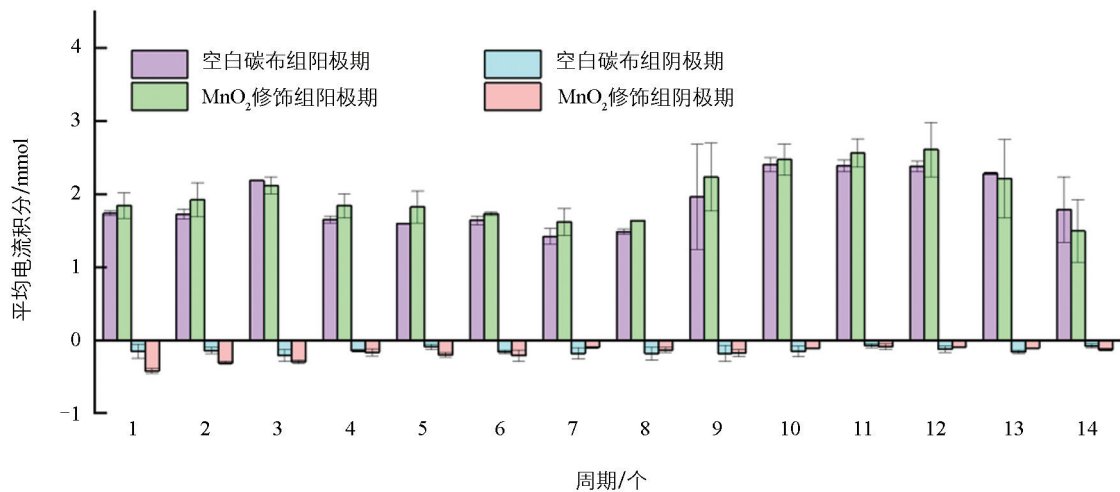
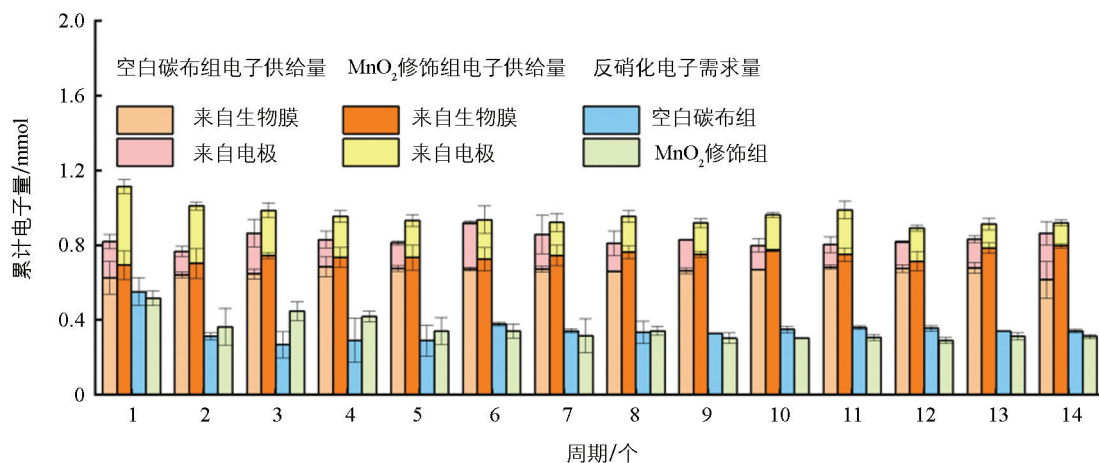
a. 空白碳布组和 MnO_2 修饰组每个周期的平均电流积分b. 空白碳布组和 MnO_2 修饰组系统中的电子平衡分析

图 3 双向电子转移过程中每个周期的平均电流积分和系统中的电子平衡分析

的群落结构分析表明, MnO_2 修饰实现了对功能菌的选择性富集与筛选, 核心电活性菌 *Geobacter* sp. 作为电子传递关键功能菌^[20], 其相对丰度从空白对照组的 50.84% 升至 MnO_2 修饰组的 70.21% (图 4a), 该菌可通过外膜细胞色素 C 与导电菌毛构建电极与微生物间的直接电子传递路径^[21], 为反硝化过程持续提供电子供体。另一电活性菌 *Geothrix* sp. 的相对丰度从空白对照组的 1.16% 升至 MnO_2 修饰组的 1.45%, 进一步完善了生物膜胞外电子传递网络^[22]; *Thiobacillus* sp. 是典型的电极营养型自养反硝化菌, 在活性炭、磁铁矿等的作用下可与 *Geobacter* sp. 形成互营关系, 实现种间电子传递^[23]。反硝化菌 *Thauera* sp. 可高效将硝酸盐还原为氮气^[24], 其相对丰度在修饰组中保持稳定, 保障了反硝化功能的稳定性; 修饰组中反硝化菌 *Pseudazocarcus* sp. 丰度虽低但略有提升(从 0.02% 提升至 0.04%), 该菌可高效利用电极型无机电子供体进行反硝化^[25]。与此同时, MnO_2 修饰组中 *Dechlorobacter* sp. 等反硝化菌相对丰度下降, *Pseudomonas* sp. 和 *Thiopseudomonas* sp. 未检出, 说明 MnO_2 修饰降低了菌群整体的多样性, 提升了群落功能专一性。此外, 未分类杂菌丰度从空白对照组的 29.74% 降至 MnO_2 修饰组的 23.17%, 进一步增强了群落功能专一性。

已有研究表明, *Geobacter* sp. 作为“电子桥梁”, 可通过胞外电子传递系统将电极表面电子传递至 *Thauera* sp. 等核心反硝化菌, 构建起电活性菌、反硝化菌互惠协同的功能体系^[26]。与空白碳布相比,

MnO₂ 修饰对电活性菌的固着能力增强,使其能够持续发挥电子桥梁作用。与传统碳布电极仅依靠阳极电势富集电活性菌群不同,MnO₂ 凭借其优异的赝电容特性与可逆氧化还原特性,使 *Geobacter* sp. 稳定在更高丰度水平。高丰度的 *Geobacter* sp. 既保障了生物膜的双向电子传递功能,其含有的细胞色素 C、导电菌毛及胞外电子中介体等组分,还强化了电极向反硝化菌的定向电子转移效率,并实现了在阳极期储存更多电子、在阴极期按需释放的功能。

菌群变化结果与前述电子平衡分析结果高度吻合,MnO₂ 诱导 *Geobacter* sp. 大量富集,使得 MnO₂ 修饰组生物膜最大电子储存量高于空白组,同时,电极供给电子与生物膜储存电子总量均明显提升。菌群结构优化为电子储存与双向传递提供了微生物基础,而电子储存与释放能力的增强又进一步巩固了 *Geobacter* sp. 等核心功能菌的生态位优势。由此可见,MnO₂ 修饰在传统“电活性菌—反硝化菌”协同脱氮体系之上,进一步构建了以高丰度 *Geobacter* sp. 为核心、兼具高效电子传递与生物赝电容特性的强化体系,使生物膜不仅能够高效传递电子,还可稳定存储与释放电子,从而在周期性极性反转条件下实现更持续、更高效的硝酸盐还原。

氮代谢功能基因预测结果进一步揭示了 MnO₂ 修饰提升脱氮效果的生物学机制(图 4b)。基于 FAPROTAX 功能预测结果,硝酸盐异化还原成铵、亚硝酸盐异化还原成铵相关功能基因的相对表达量在空白组与 MnO₂ 修饰组中均处于较低水平,且组间无明显差异,这与硝酸盐加入后期,系统出水仅有极少量氨氮产生的实验结果一致。MnO₂ 修饰组中反硝化全通路基因呈现上调特征,硝酸盐还原、亚硝酸盐还原、一氧化二氮还原及总反硝化功能基因相对表达量均提升了 2.17 倍,激活了从硝酸盐→亚硝酸盐→一氧化氮→一氧化二氮→氮气的完整反硝化通路^[27],且各步骤基因表达同步上调,避免了中间产物积累。*Geobacter* sp. 的富集与反硝化基因上调形成协同作用,*Geobacter* sp. 通过高效胞外电子传递系统为反硝化提供充足电子,反硝化基因的上调则增强了反硝化菌对电子的利用效率,形成“电子供体供给—电子受体利用”的协同,促进反硝化反应高效运行。综上所述,MnO₂ 修饰通过富集电活性菌强化了反硝化电子供体供给,通过上调氮代谢功能基因激活了反硝化全通路,微生物群落演替与功能基因表达的协同调控共同缓解了低 C/N 废水反硝化能力不足的问题。

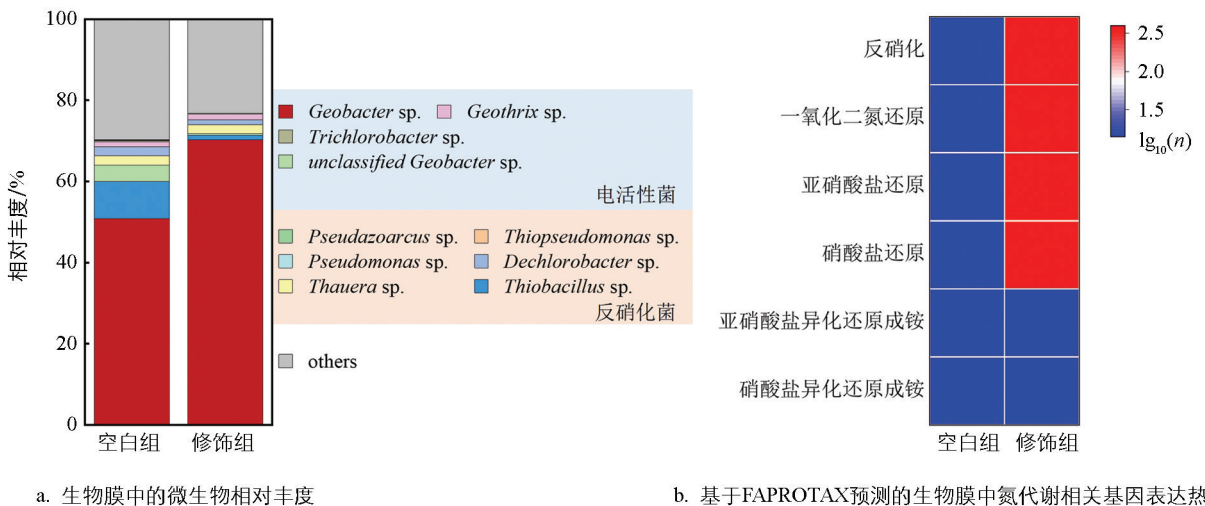
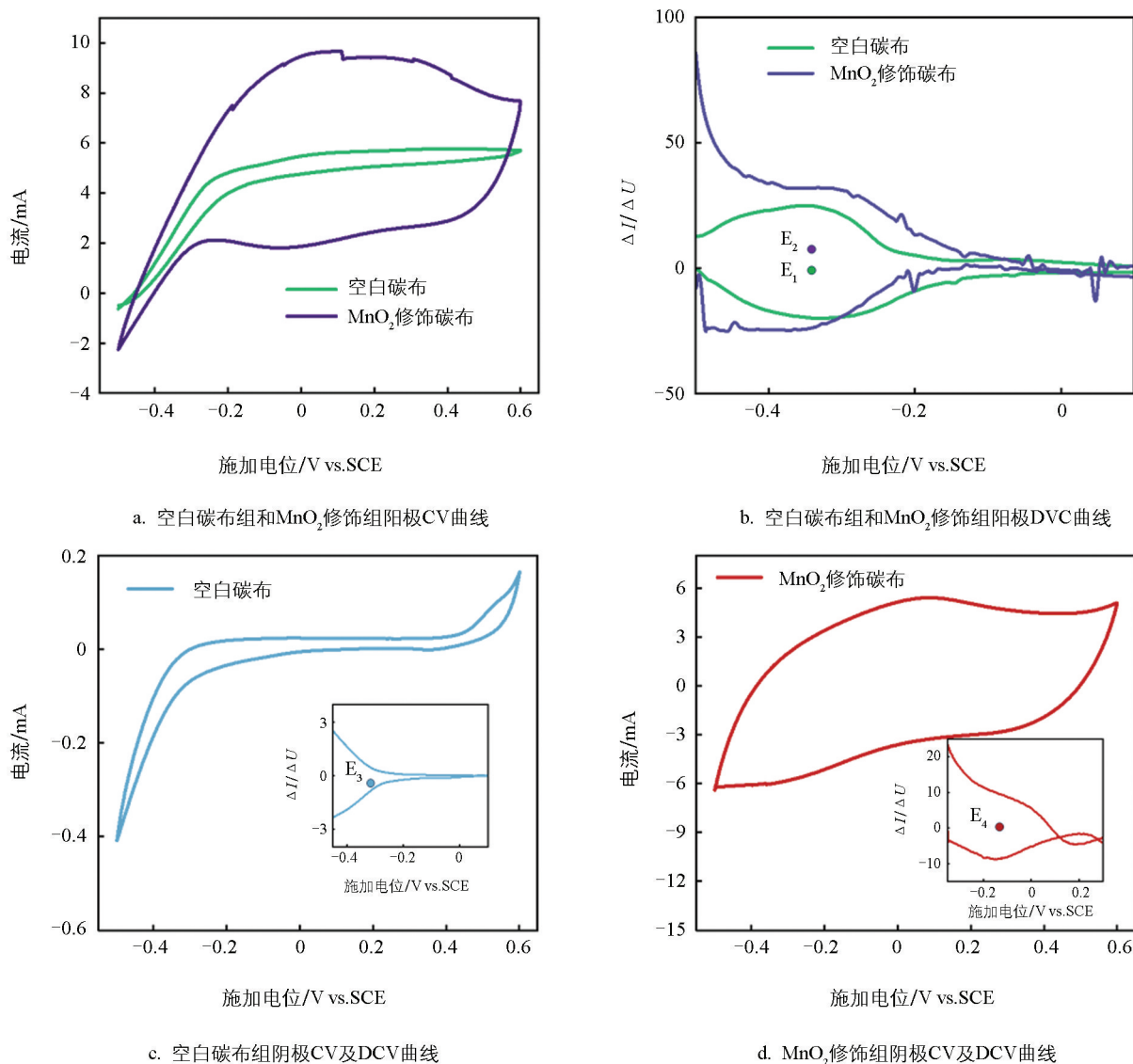


图 4 群落结构分析及功能基因预测

2.3 电极生物膜电化学生物学特性解析

探究生物膜电化学生物学活性位点对理解代谢过程及电子传递机制具有重要意义。如图 5a 所示,在有底物状态下的循环伏安(CV)扫描测试中,阳极状态下 CV 曲线呈明显“S 型”,这是以 *Geobacter* sp. 为优势菌的电活性生物膜的典型特征^[28],表明阳极生物膜中富集了大量 *Geobacter* sp.,这与微生物群落组成结果一

致。 MnO_2 修饰组表现出更强的电容特性, 也印证了其在阳极状态能够储存更多电量的能力。由图 5b 可知, 阳极态生物膜的电化学活性位点均位于 -0.34 V (E_1 、 E_2), 这一电位与以往报道的以 *Geobacter* sp. 为主的生物膜电位特征一致^[29]。在反硝化态下, 有底物 CV 曲线与阳极态呈现显著差异, 表明其群落结构发生演替。DCV 曲线显示, 空白碳布组和 MnO_2 修饰组的电活性生物膜活性位点分别位于 -0.31 V (E_3) 以及 -0.15 V (E_4)。其中, -0.15 V 处的活性位点推测主要归因于细胞色素 C 的低电位血红素中心^[30]。在 *Geobacter sulfurreducens* 中, 内膜多血红素细胞色素中心电位约为 -0.15 V , 负责将电子从内膜醌库传递至周质蛋白^[31]。



E_1 , -0.34 V ; E_2 , -0.34 V ; E_3 , -0.31 V ; E_4 , -0.15 V 。

图 5 系统中生物膜的电化学特性

无底物状态下的 CV 测试是表征电极—生物膜电子传递过程的重要研究手段, 图 6a 和图 6b 分别为空白碳布组和 MnO_2 修饰组在无底物状态下的 CV 曲线, 以及峰电流与扫描速率平方根之间的线性拟合结果。从电流密度绝对值来看, MnO_2 修饰组生物膜电流密度显著高于空白碳布组, 表明 MnO_2 修饰可显著提高生物膜导电性, 增强电子转移能力, 这与前述分析 MnO_2 诱导生物膜产生更多细胞色素 C 或导电菌毛的分析结论一致。当扫描速率从 0.5 mV/s 增加至 1.0 mV/s 时, 峰电流与扫速平方根呈显著正

相关,表明此扫描速率范围内,反应主要受扩散过程限制,电子传递过程以间接电子传递为主。为精准反映直接电子传递(DET)与间接电子传递(MET)对电流的具体贡献,通过 1.3 节的公式计算二者对峰电流的贡献率。

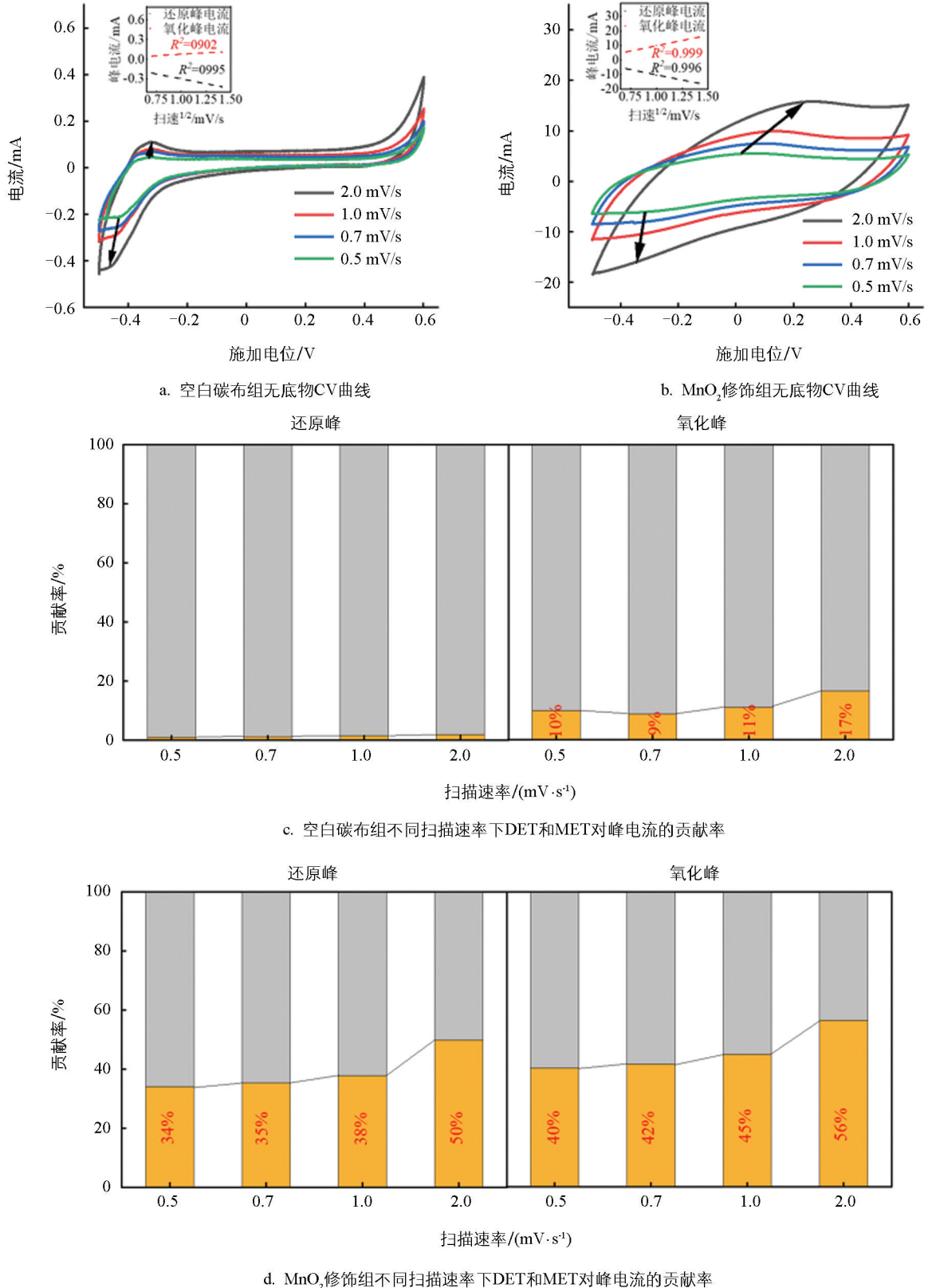


图 6 不同扫描速率下的无底物 CV 以及不同扫描速率下 DET 和 MET 对峰电流的贡献率

图 6c 和图 6d 分别为空白碳布组和 MnO₂ 修饰组 DET 及 MET 对峰电流的贡献率。空白碳布组中, 当扫描速率较小时(0.5 mV/s), 还原态峰电流中 MET 贡献率接近 100%, 氧化态峰电流中 DET 贡献率为 10%。随着扫描速率的增加, DET 的贡献率有所增加, 但无论是还原态还是氧化态峰电流中, DET 贡献率仍未超过 20%, 说明空白碳布组电极-生物膜界面反应主要由扩散反应控制, 电子传递过程以 MET 为主导。对 MnO₂ 修饰组还原态和氧化态峰电流的 DET 和 MET 贡献率进行计算发现, 同样扫描速率下, 其 DET 贡献率高于空白碳布组; 但当扫速低于 1.0 mV/s 时, DET 的贡献率仍低于 50%, 说明此时界面反应仍由扩散反应控制。当扫描速率提高至 2.0 mV/s 时, 氧化态峰电流中 DET 的贡献率达到 56%, 即氧化态电流主要由动力学过程控制, 电子传递以 DET 为主导, 表明该体系具有更快的储存电子释放能力。DET 贡献比例越高, 表明生物膜-电极界面电子交换速率越快。DET 主要与膜结合型细胞色素 C、导电菌毛等直接相关, 这些组分可作为生物膜与电极间的“电子桥”, 实现电子的直接传递^[32-33]。该结果与 2.1 节讨论中电子可能储存在细胞色素 C 中相吻合。在反硝化阶段, MnO₂ 修饰组生物膜中的细胞色素 C 可作为“电子库”, 释放其储存的大量电子, 用于硝酸盐的还原。

2.4 生物膜三维结构分析

电极经修饰后, 生物膜结构也随之发生变化。如图 7 所示, 空白碳布组与 MnO₂ 修饰组电极生物膜厚度均约为 220 μm, 但活菌空间分布存在显著差异。空白碳布组活菌荧光强度峰值出现在距电极 80 μm 处, MnO₂ 修饰组则迁移至 120 μm 处, 且生物膜表层(100~150 μm)活菌比例显著提升。结合本体系以硝酸盐氮为电子受体的特性, 这种活菌空间分布差异对硝酸盐氮去除具有积极作用。

硝酸盐氮作为可溶性电子受体, 通过扩散作用从溶液主体进入生物膜内部。空白碳布组活菌集中于近电极(80 μm)区域, 硝酸盐氮需克服更大的扩散阻力才能到达活菌富集区, 易形成表层硝酸盐氮浓度高、内部底物匮乏的传质瓶颈, 导致部分硝酸盐氮未被充分降解便随溶液流出。而 MnO₂ 修饰组活菌向表层(120 μm)迁移后, 活菌富集区与硝酸盐氮扩散前沿直接重合, 大幅缩短了硝酸盐氮的扩散距离, 减少了传质阻力, 使溶液中的硝酸盐氮能快速与高活性活菌接触, 提升了底物与微生物的作用效率。结合前文硝酸盐氮还原速率提升、中间产物积累减少的结果, 可进一步证实 MnO₂ 修饰组的生物膜传质效率得到了有效优化。这种活菌“外移”现象, 表明微生物在适应硝酸盐冲击时, 可主动调节其在生物膜中的空间位置, 而这一适应性变化与 MnO₂ 修饰强化了生物膜的电子传递能力密切相关。该体系中, 反硝化过程是电子传递驱动的还原反应, 电子传递效率直接决定硝酸盐氮的还原速率与效能。无底物状态下 CV 结果显示, MnO₂ 修饰组的生物膜电流密度远高于空白碳布组, 说明其导电性显著高于空白碳布组, 这可能与 MnO₂ 诱导下生物膜大量分泌细胞色素 C 及导电菌毛等相关, 进而搭建起高效的电子传输网络。空白碳布组活菌集中于近电极区, 虽能直接获取电子, 但电子需经多层生物膜传递至表层, 受限于较差的生物膜导电性, 表层硝酸盐氮无法获得充足电子, 易出现硝酸盐还原不彻底的现象; 而 MnO₂ 修饰组活菌外移后, 依赖生物膜优异的导电性, 保障了电子快速传输, 使表层活菌快速获得来自电极的电子, 为硝酸盐氮的多步还原反应提供了充足电子驱动力, 提升了硝酸盐氮的还原速率, 减少了中间产物的积累。

图 8 为生物膜胞外聚合物(EPS)的激光共聚焦扫描显微成像及三维重构结果, 其中, 红色、绿色、蓝色分别对应 EPS 中的 α-多糖、蛋白类物质和 β-多糖。测试结果显示, 空白碳布组 EPS 整体组成以 α-多糖为主, β-多糖含量极低。α-多糖虽覆盖生物膜全域, 但分布不均, 呈块状聚集特征。MnO₂ 修饰组 α-多糖分布连续且均匀, 形成三维网络骨架, 为细菌黏附提供稳定支撑, 同时蛋白类物质和 β-多糖填充于 α-多糖网络间隙, 使 EPS 组成更均衡, 表明生物膜结构稳定性得到了显著提升。连续的 EPS 三维网络可维持生物膜内部的水分平衡与菌群生理活性, 确保系统在长期运行中仍能保持高效的硝酸盐氮去除性能, 进一步提升了系统的稳定性。

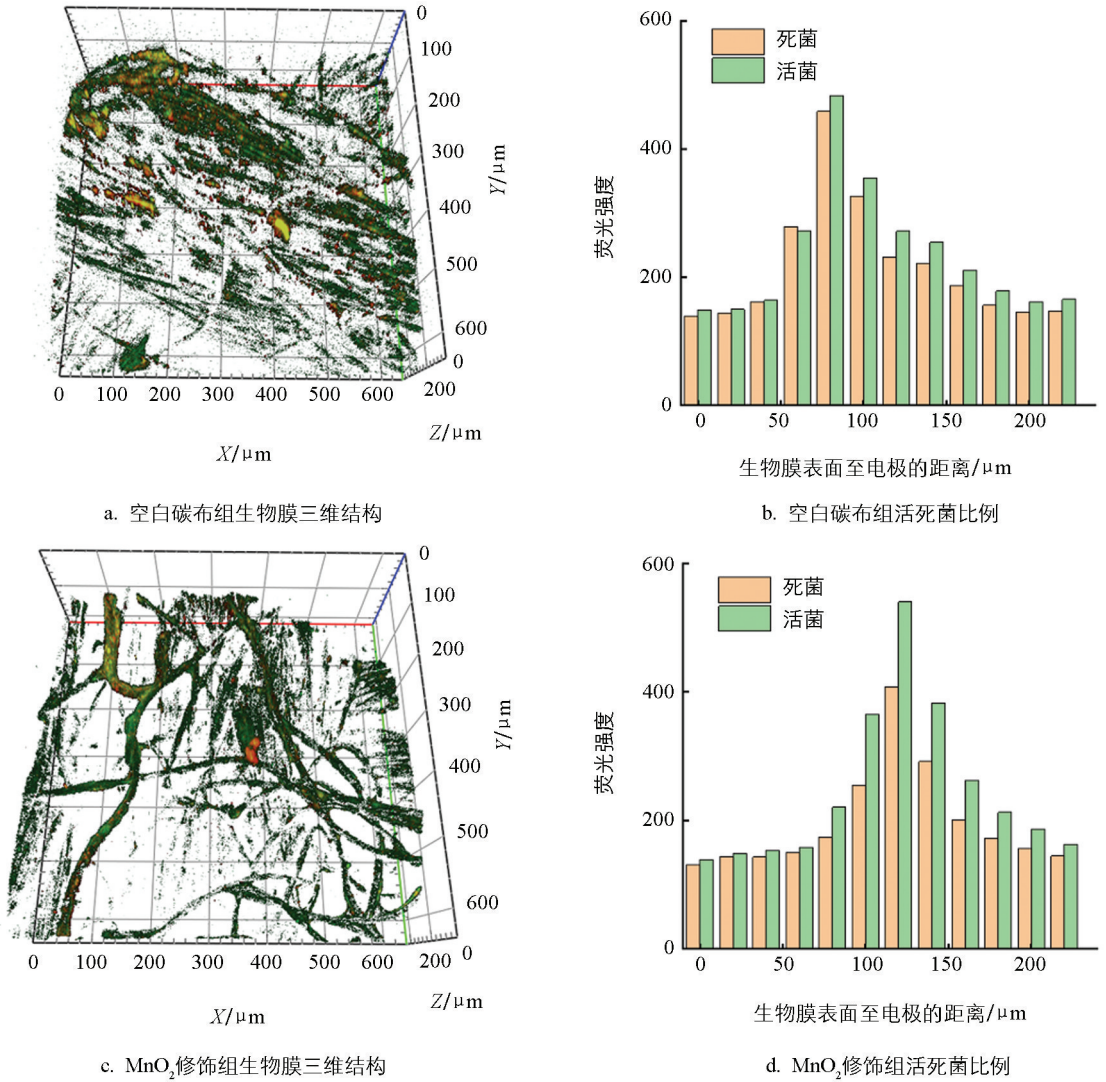


图 7 生物膜三维结构及各层活死菌比例

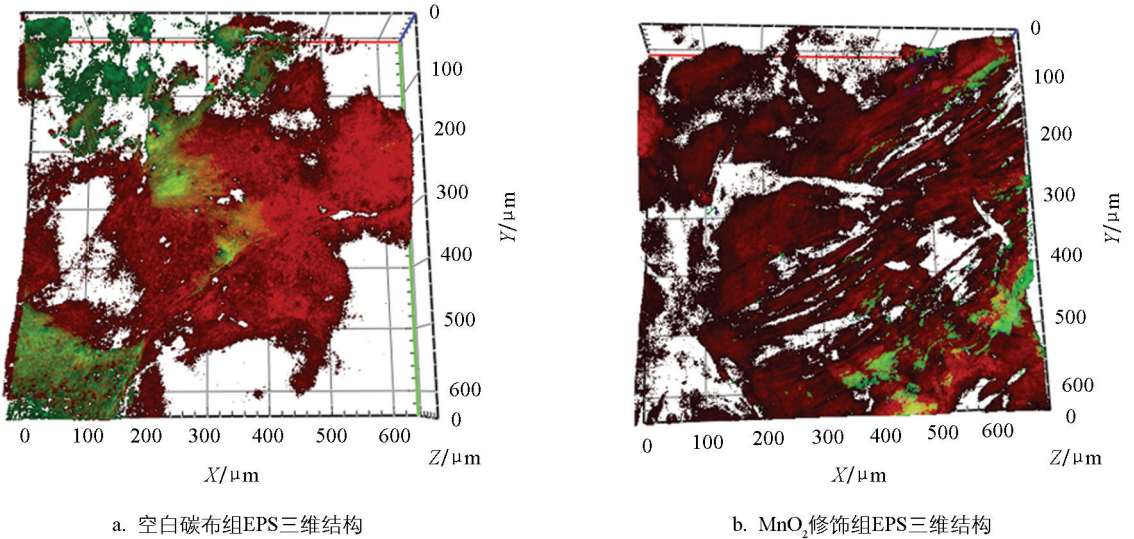


图 8 生物膜 EPS 三维结构

3 结论

MnO₂ 修饰碳布电极结合周期极性反转策略,可显著提升微生物电化学系统(MES)的反硝化脱氮效能,该修饰通过优化电极电化学特性、定向调控微生物群落结构、改善电活性生物膜形貌与组成,实现了电极-生物膜电子传递效率、反硝化功能基因表达及生物膜传质效率的协同提升。反应器阴极期起始电流密度达 -10.2 A/m^2 ,生物膜在阳极期的最大储电子量提升至 $(0.80\pm 0.03)\text{ mmol}$,总氮去除率从初始36%提升至91%,且反应全程无亚硝酸盐积累。MnO₂ 通过发挥自身电容特性,增强了生物膜的电子储存与释放能力,加速了硝酸盐还原;同时促使活菌向生物膜表层迁移,缩短了硝酸盐扩散距离,为反硝化营造适宜微环境,保障了系统脱氮效能的长期稳定。

参考文献:

- [1] 袁强军,张宏星,陈芳媛. 不同低碳氮比废水中好氧颗粒污泥的长期运行稳定性 [J]. 环境科学, 2020, 41(10): 4661-4668.
- [2] IUELE H, BUCCIARELLI A, LING N. Novel Hyphenation of DGT In-Situ Passive Sampling with YES Assay to Ascertain the Potency of Emerging Endocrine Disruptors in Water Systems in New Zealand [J]. Water Research, 2022, 219: 118567.
- [3] LIU J Z, WU L R, GONG L N, et al. Phototrophic Biofilms Transform Soil-Dissolved Organic Matter Similarly Despite Compositional and Environmental Differences [J]. Environmental Science & Technology, 2023, 57(11): 4679-4689.
- [4] LIANG DD, HE W H, LI C, et al. Bidirectional Electron Transfer Biofilm Assisted Complete Bioelectrochemical Denitrification Process [J]. Chemical Engineering Journal, 2019, 375: 121960.
- [5] CHEN C Y, LU I C, NAGARAJAN D, et al. A Highly Efficient Two-Stage Cultivation Strategy for Lutein Production Using Heterotrophic Culture of *Chlorella Sorokiniana* MB-1-M12 [J]. Bioresource Technology, 2018, 253: 141-147.
- [6] LIU Y X, LIU L, HE Y H, et al. Quantum-Dots-Encoded-Microbeads Based Molecularly Imprinted Polymer [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2016, 77: 886-893.
- [7] ZHANG Z, QIU Y F, ZHENG Q W, et al. Enhancing Extracellular Electron Transfer with a Novel Carbonized Balsa Wood-Carbon Nanotubes Composite Anode [J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2025, 13(17): 6130-6141.
- [8] HEMDAN B A, EL-TAWEEL G E, NAHA S, et al. Bacterial Community Structure of Electrogenic Biofilm Developed on Modified Graphite Anode in Microbial Fuel Cell [J]. Scientific Reports, 2023, 13: 1255.
- [9] LI Y F, LIU J, CHEN X P, et al. Tailoring Spatial Structure of Electroactive Biofilm for Enhanced Activity and Direct Electron Transfer on Iron Phthalocyanine Modified Anode in Microbial Fuel Cells [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2021, 191: 113410.
- [10] LIU X, JING X Y, YE Y, et al. Bacterial Vesicles Mediate Extracellular Electron Transfer [J]. Environmental Science & Technology Letters, 2020, 7(1): 27-34.
- [11] YANG F, XU W J, ZHU L T, et al. Multiple Roles of Extracellular Vesicles in Promoting Microbial-Driven Manganese Reduction [J]. Environmental Science & Technology, 2025, 59(43): 23275-23288.
- [12] YAN X Y, CHEN L X, PENG P, et al. Dual Role of Birnessite on the Modulation of Acid Production and Reinforcement of Interspecific Electron Transfer in Anaerobic Digestion [J]. Science of the Total Environment, 2024, 906: 167842.
- [13] 王菲. 微生物电化学耦合硫自养反硝化脱氮效能及机制研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2024.
- [14] ALLAM F, ELNOUBY M, SABRY S A, et al. Optimization of Factors Affecting Current Generation, Biofilm Formation and Rhamnolipid Production by Electroactive *Pseudomonas Aeruginosa* FA17 [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2021, 46(20): 11419-11432.
- [15] LIANG D D, LI C, HE W H, et al. Response of Exoelectrogens Centered Consortium to Nitrate on Collaborative

- Metabolism, Microbial Community, and Spatial Structure [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2021, 426: 130975.
- [16] WANG B, LIU W Z, ZHANG Y F, et al. Bioenergy Recovery from Wastewater Accelerated by Solar Power: Intermittent Electro-Driving Regulation and Capacitive Storage in Biomass [J]. *Water Research*, 2020, 175: 115696.
- [17] YAO B, CHANDRASEKARAN S, ZHANG H Z, et al. 3D-Printed Structure Boosts the Kinetics and Intrinsic Capacitance of Pseudocapacitive Graphene Aerogels [J]. *Advanced Materials*, 2020, 32(8): 1906652.
- [18] WU Y, DU Q, WAN Y X, et al. Autotrophic Nitrate Reduction to Ammonium via Reverse Electron Transfer in *Geobacter* Dominated Biofilm [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2022, 215: 114578.
- [19] TER HEIJNE A, PEREIRA M A, PEREIRA J, et al. Electron Storage in Electroactive Biofilms [J]. *Trends in Biotechnology*, 2021, 39(1): 34-42.
- [20] SHI L, DONG H L, REGUERA G, et al. Extracellular Electron Transfer Mechanisms between Microorganisms and Minerals [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(10): 651-662.
- [21] 孔冠楠, 许玫英, 杨永刚. 基于直接接触的微生物胞外电子传递 [J]. *微生物学报*, 2017, 57(5): 643-650.
- [22] BOND D R, LOVLEY D R. Evidence for Involvement of an Electron Shuttle in Electricity Generation by *Geothrix Fermentans* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(4): 2186-2189.
- [23] KATO S, HASHIMOTO K, WATANABE K. Microbial Interspecies Electron Transfer via Electric Currents through Conductive Minerals [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(25): 10042-10046.
- [24] WANG Q K, HE J Z. Complete Nitrogen Removal via Simultaneous Nitrification and Denitrification by a Novel Phosphate Accumulating *Thauera* sp. Strain SND5 [J]. *Water Research*, 2020, 185: 116300.
- [25] PHILIPPON T, TIAN J H, BUREAU C, et al. Denitrifying Bio-Cathodes Developed from Constructed Wetland Sediments Exhibit Electroactive Nitrate Reducing Biofilms Dominated by the Genera *Azoarcus* and *Pontibacter* [J]. *Bioelectrochemistry*, 2021, 140: 107819.
- [26] 葛丹丹, 吴兵党, 杨晶晶, 等. FeS_2 强化微生物燃料电池阳极反硝化脱氮与产电特性 [J]. *环境工程技术学报*, 2023, 13(6): 2105-2116.
- [27] ZHANG HH, ZHAO Z F, CHEN S N, et al. *Paracoccus Versutus* KS293 Adaptation to Aerobic and Anaerobic Denitrification: Insights from Nitrogen Removal, Functional Gene Abundance, and Proteomic Profiling Analysis [J]. *Biore-source Technology*, 2018, 260: 321-328.
- [28] 梁丹丹. 贫电子供体水中硝酸盐的生物电化学去除技术及过程机制 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2022.
- [29] SNIDER R M, STRYCHARZ-GLAVEN S M, TSOI S D, et al. Long-Range Electron Transport in *Geobacter sulfurreducens* Biofilms Is Redox Gradient-Driven [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(38): 15467-15472.
- [30] MATSUDA S, LIU H, KATO S, et al. Negative Faradaic Resistance in Extracellular Electron Transfer by Anode-Respiring *Geobacter sulfurreducens* Cells [J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45(23): 10163-10169.
- [31] KIM I H, WANG H, SODERLING S H, et al. Loss of *Cdc42* Leads to Defects in Synaptic Plasticity and Remote Memory Recall [J]. *eLife*, 2014, 3: e02839.
- [32] REGUERA G, MCCARTHY K D, MEHTA T, et al. Extracellular Electron Transfer via Microbial Nanowires [J]. *Nature*, 2005, 435(7045): 1098-1101.
- [33] LOVLEY D R, WALKER D J F. *Geobacter* Protein Nanowires [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2078.