

论述与研究

DOI:10.19853/j.zgjsps.1000-4602.2020.09.001

甲氧苄啶对好氧活性污泥硝化作用的长期影响

陈炳伟, 张朝升, 刘至能, 荣宏伟, 梁莹
(广州大学 土木工程学院, 广东 广州 510006)

摘要: 通过考察活性污泥硝化作用、微观结构以及微生物群落结构的变化,研究甲氧苄啶(TMP)对好氧活性污泥的长期影响。结果表明,长期运行过程中不同浓度的TMP均对氨氮的去除有抑制作用,但该抑制作用是可逆的,在25 d后可恢复到高效去除氨氮水平。连续运行30 d后的典型周期试验发现,在不同TMP浓度下,硝化性能在周期内依旧受到一定程度的抑制,但在周期结束时氨氮均能得到稳定去除;此外,在10 mg/L的高浓度TMP条件下,亚硝态氮会出现积累。扫描电镜观察发现,随着TMP浓度的升高,污泥絮体破裂程度加剧,污泥颗粒变小。微生物群落结构分析表明,优势菌群中放线菌门相比拟杆菌门对TMP有更强的耐受性,另外,硝化螺旋菌门对TMP有较强的耐受性,随着TMP浓度的升高,硝化螺旋菌门的相对丰度从0.84%升高至1.60%;属水平上,TMP对*Flavobacterium*菌属的抑制最明显。

关键词: 甲氧苄啶; 好氧活性污泥; 硝化; 微生物群落结构

中图分类号: TU992 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4602(2020)09-0001-06

Long-term Effect of Trimethoprim on Nitrification of Aerobic Activated Sludge

CHEN Bing-wei, ZHANG Chao-sheng, LIU Zhi-neng, RONG Hong-wei, LIANG Ying
(School of Civil Engineering, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: The long-term effect of trimethoprim (TMP) on aerobic activated sludge was explored by investigating the changes of nitrification, microstructure and microbial community composition of the activated sludge. Different concentrations of TMP inhibited the removal of ammonia nitrogen during long-term operation. However, removal ability of ammonia nitrogen could be gradually recovered and returned to stable after 25 days. Typical cycle experiments were conducted after 30 days of continuous operation. The results indicated that the nitrification performance was still inhibited to some extent under different TMP concentrations during a cycle. However, ammonia nitrogen could be stably removed at the end of one cycle. In addition, nitrite nitrogen was accumulated under high concentration of TMP (10 mg/L). Scanning electron microscopy showed that the breaking degree of sludge floc was more serious and the particles were smaller with the increase of TMP concentration. The analysis of microbial community composition showed that *Actinobacteria* had better tolerance to TMP than *Bacteroidetes*. In addition, the relative abundance of *Nitrospirae* increased from 0.84% to 1.60% with the increase of TMP concentration, indicating that *Nitrospirae* was more resistant to TMP. At the genus level, TMP had the

most obvious inhibition on *Flavobacterium*.

Key words: trimethoprim; aerobic activated sludge; nitrification; microbial community composition

抗生素被广泛应用于人类医药、兽用药品中,由于这些化合物未被人类和动物完全代谢,并且在污水处理系统中不能被有效去除,导致其被不断释放到水生生态系统中,对人类健康和生态环境构成了严重威胁。甲氧苄啶(TMP)是一种常见的含氮抗生素,在临床上常被用作增强剂来达到增强抑菌效果的目的,这种药物常与水体中的硝态氮和亚硝态氮等含氮污染物共存^[1]。相关研究表明,在污水处理过程中,抗生素会对硝化过程产生影响^[2-4],例如,Mai等人^[2]研究发现,双酚A、咖啡因、TMP等会影响硝化滴滤池中的硝化速率;杨腾飞等人^[3]研究发现,高浓度的TMP对硝化过程的抑制率达到了55.2%。但目前大多数研究集中在抗生素对硝化过程的短期影响,关于抗生素对硝化过程的长期影响及污泥微生物群落结构变化的研究较少。鉴于此,笔者通过好氧活性污泥处理不同浓度TMP的长期运行试验,探究TMP对好氧活性污泥降解常规污染物效能的影响以及经TMP驯化后典型周期内好氧活性污泥的硝化过程,并分析了微生物群落结构的变化。

1 材料与方法

1.1 试验材料

TMP(CAS#738-70-5, $C_{14}H_{18}N_4O_3$, 纯度>99%),甲醇为HPLC级,其他化学药剂均为分析纯。

好氧活性污泥培养液成分如下:138 mg/L的 NH_4Cl 、15 mg/L的 KH_2PO_4 、100 mg/L的 CH_3COONa 、150 mg/L的 $C_6H_{12}O_6$ 和0.1 mL/L的微量元素溶液。其中,微量元素溶液的成分如下:18.0 g/L的 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、9.0 g/L的 $CaCl_2$ 、5.0 g/L的 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 、5.0 g/L的 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 、4.0 g/L的 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 、2.0 g/L的 $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 、0.5 g/L的 $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 、4.0 g/L的 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 、10.0 g/L的EDTA、10.0 g/L的 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 。

1.2 反应器的启动与运行

1.2.1 污泥来源及驯化

采用SBR反应器考察TMP对好氧活性污泥的长期影响。接种污泥取自广州市沥滘污水处理厂的二沉池,污泥首先经过曝气活化,然后置于10 L的

SBR反应器中,加入培养液进行驯化,驯化期间反应器的运行参数如下:进水15 min、好氧270 min、静置60 min、出水15 min,每个周期运行时间为6 h。经过一段时间的驯化,使氨氮在6 h内能够完全降解,并且没有亚硝态氮的积累,表明污泥驯化完成。

1.2.2 TMP的投加运行及周期内硝化性能研究

接种经过驯化的污泥于5个1 L的反应器,运行参数与驯化期一致,控制污泥浓度在3 000 mg/L左右,反应器稳定5 d后,使进水TMP浓度分别为0、1、2、5、10 mg/L(编号分别为S1、S2、S3、S4、S5),再连续运行30 d,使氨氮去除效果趋于稳定,考察在不同TMP浓度的影响下,典型周期内氨氮、亚硝态氮和硝态氮随时间的变化情况。

1.3 分析项目与方法

氨氮、亚硝态氮、硝态氮和COD浓度分别采用纳氏试剂分光光度法、N-(1-萘基)-乙二胺分光光度法、麝香草酚分光光度法和重铬酸钾滴定法测定。TMP采用高效液相色谱测定,色谱柱为Agilent Eclipse XDB-C18(3.5 μm , 2.1 mm \times 150 mm),流动相分别为甲醇和超纯水、体积比为50:50,流速设置为0.4 mL/min,进样量为10 μL ,柱温为25 $^{\circ}C$,检测波长为280 nm。污泥微观结构采用扫描电镜(SEM)观察。

使用16S rRNA高通量测序分析微生物群落结构的变化。PCR引物为338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')和806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3');PCR扩增试验采用TransGen AP221-02:TransStart Fastpfu DNA Polymerase,20 μL 反应体系;扩增完成后,采用Illumina测序分析。以上工作由上海美吉生物医药科技有限公司协助完成。

2 结果与讨论

2.1 SBR反应器的运行效果

不同TMP浓度下,SBR反应器对氨氮和COD的去除效果如图1所示。空白组(S1)在整个试验过程中都能有效地去除氨氮;当TMP投加量为1 mg/L(S2)和2 mg/L(S3)时,氨氮去除效能在第19天出现了最大抑制,氨氮去除率为78.69%;当TMP

投加量为 5 mg/L(S4)时,氨氮去除效能 在 19~21 d 出现了最大抑制,氨氮去除率为 70.45%;当 TMP 投加量为 10 mg/L(S5)时,氨氮去除效能 在第 17 天出现了最大抑制,氨氮去除率为 26.15%。试验进行到 25 d 以后,各反应器对氨氮的去除能力得到恢复,都能够高效去除氨氮,说明不同浓度的 TMP 对硝化菌活性均存在一定的抑制,但随着反应器的运行,硝化菌能够逐渐适应 TMP 从而恢复活性,使氨氮在运行周期内能够得到有效去除。进一步从图 1(b)可以看出,高浓度的 TMP(S4、S5)对 COD 的降解同样存在一定程度的抑制,但随着反应器进一步运行,COD 去除率都达到了 80% 以上,这说明异养菌在经历一段适应期后,同样能够在一定程度上解除 TMP 对其活性的抑制。

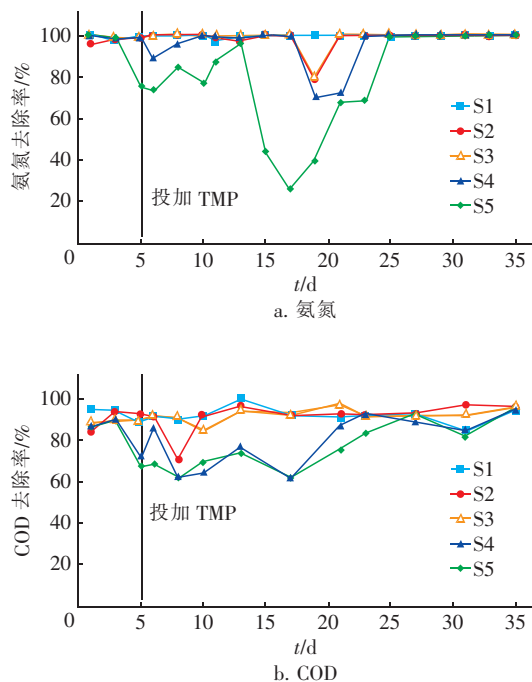


图 1 长期运行过程中 TMP 对氨氮和 COD 去除效果的影响

Fig. 1 Effect of TMP on ammonia nitrogen and COD removal during long-term operation

2.2 经TMP驯化后活性污泥的性能

2.2.1 硝化性能

生物硝化过程主要包括两步反应:氨氧化菌(AOB)将氨氮转化为亚硝态氮,亚硝酸盐氧化菌(NO₂)进一步将亚硝态氮转化为硝态氮。系统的硝化性能与这两部分受到的抑制程度有关^[5]。本研究通过典型周期试验,进一步明确了经不同浓度 TMP 驯化后反应器的硝化性能,各反应器中氮元素

的转化情况见图 2。

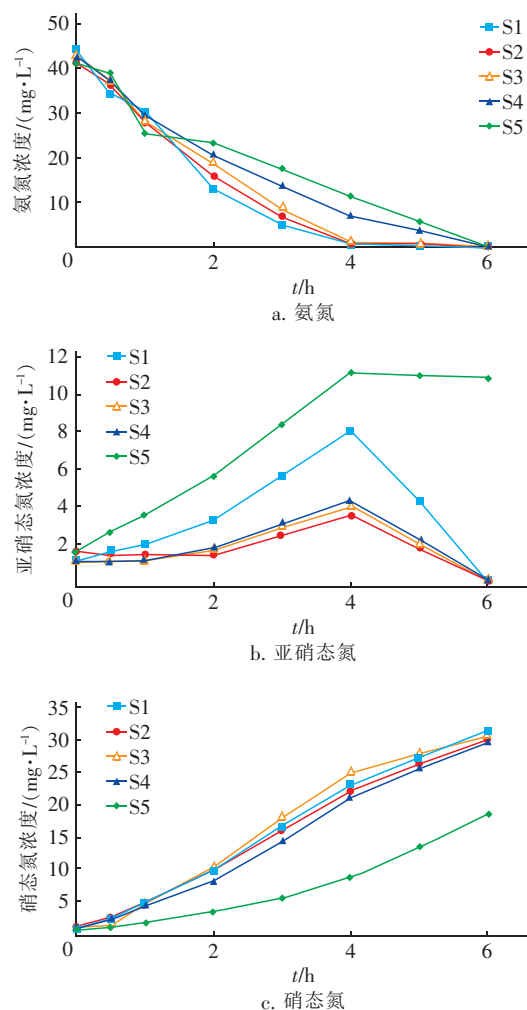


图 2 长期运行后 TMP 对硝化过程的影响

Fig. 2 Effect of TMP on nitrification after long-term operation

如图 2(a)所示,不同 TMP 投加浓度下,氨氧化速率随着 TMP 浓度的升高而存在一定的抑制,且抑制程度随着 TMP 浓度的升高而增强,但氨氮在 6 h 内都能得到有效的去除,这表明在不同 TMP 浓度下连续驯化 30 d 后,AOB 活性得到了较好的恢复,但依然受到一定的抑制,且在高浓度 TMP 下,AOB 受到的抑制最明显。结合图 2(a)和(b)可知,5 个反应器中亚硝态氮均在第 4 小时达到最大积累量;在 S1(对照组)中,AOB 活性较高导致前期氨氮迅速消耗而使得亚硝态氮有较高的积累(8.04 mg/L),但后期亚硝态氮迅速消耗说明 NO₂ 也维持着较高的活性;在 S2、S3 和 S4 中,AOB 活性受到一定抑制,使得氨氮降解相对较慢,NO₂ 活性也受到抑制,但

能使积累的亚硝态氮在6 h内得到转化;在S5中, AOB活性同样受到一定抑制,氨氧化速率下降,但仍能在6 h内将氨氮完全去除,而NOB活性受到了明显抑制,最终导致亚硝态氮出现10.88 mg/L的积累。由图2可知,在前4 h,随着氨氮的去除,亚硝态氮和硝态氮均逐渐积累,表明TMP同时抑制了AOB和NOB活性,但AOB的代谢活性依然高于NOB。综上,经过长期驯化后,TMP的存在依然会抑制AOB和NOB活性,且高浓度的TMP对NOB的抑制性更强,这与Schmidt等人^[6]的研究结果一致。

2.2.2 去除TMP的效能

典型周期内各SBR反应器对TMP的去除效能如图3所示。

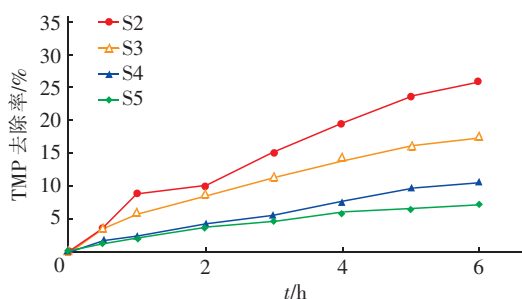


图3 长期运行后TMP在周期内的去除情况

Fig.3 TMP removal during the period after long-term operation

由图3可以看出,在不同TMP投加浓度下,反

应器对TMP的去除率随时间而缓慢升高,且低投加浓度下对TMP的去除率高于高投加浓度下;在周期结束时,S2~S5反应器中TMP的去除率分别达到了25.79%、17.33%、10.56%和7.07%。这表明,在污泥浓度、氨氮和COD等生物量和培养基质相同的情况下,活性污泥系统对TMP的去除能力有限,而TMP浓度的升高导致活性污泥系统对其去除能力下降,在布洛芬的降解研究中也有类似现象^[7]。此外有研究表明,高浓度的TMP会抑制关键的转化物种或酶^[8]。

2.3 污泥微观结构变化

不同反应器中活性污泥的SEM照片如图4所示。可以看出,对照组(S1)形成了较为密实的污泥絮体,相比之下,随着TMP投加浓度的升高,S2~S5中的污泥结构逐渐变得松散,且出现明显的空洞。进一步放大观察发现,不同TMP投加浓度下,球状菌出现了不同程度的破损,且破损程度随着TMP投加浓度的升高而加剧。以上结果表明,TMP的投加会导致污泥结构的改变,破坏污泥絮体,使污泥颗粒变小,并且随着TMP投加浓度的升高,污泥结构破坏程度加大。相关研究表明,抗生素的投加会导致EPS中DNA和色氨酸含量的增加,进而导致活性污泥絮体破裂、颗粒变小、细胞解体、内容物释放以及微生物副产物积累等结果^[9]。

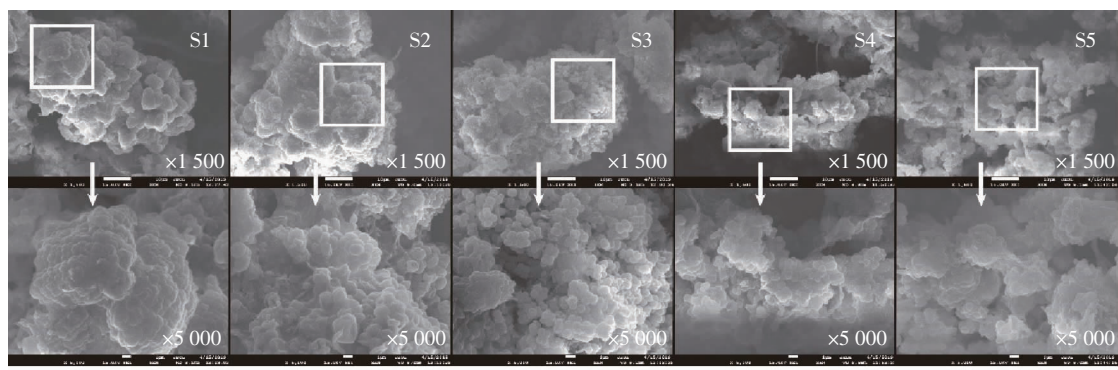


图4 长期运行后污泥的微观结构

Fig.4 Microstructure of sludge after long-term operation

2.4 微生物群落结构分析

TMP投加30 d后,各反应器中活性污泥微生物在门水平上的群落结构如图5所示。5个反应器的活性污泥中共检出9个门类,优势菌群主要有放线菌门 *Actinobacteria* (相对丰度为22.60%~37.53%)、拟杆菌门 *Bacteroidetes* (相对丰度为

38.81%~19.78%)、变形菌门 *Proteobacteria* (相对丰度为21.16%~12.76%)、螺旋体菌门 *Saccharibacteria* (相对丰度为13.84%~21.19%),此外还有绿弯菌门 *Chloroflexi* (相对丰度为1.32%~2.10%)、硝化螺旋菌门 *Nitrospirae* (相对丰度为0.84%~1.60%)、浮霉菌门 *Planctomycetes* (相对丰

度为 0.40% ~ 1.41%)、酸杆菌门 *Acidobacteria* (相对丰度为 0.32% ~ 1.22%) 和疣微菌门 *Verrucomicrobia* (相对丰度为 0.14% ~ 1.46%)。

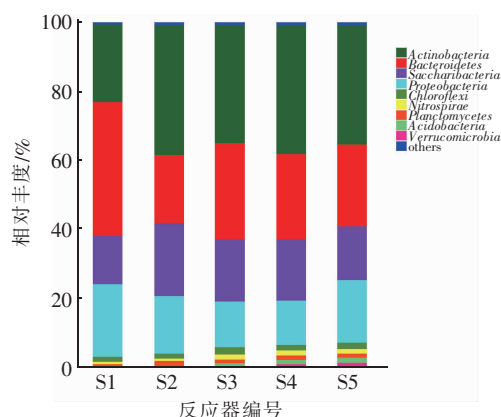


图5 门水平上的微生物群落结构组成

Fig. 5 Distribution of microorganism at phylum level

与对照组(S1)相比,投加了TMP的反应器中,放线菌门的相对丰度有较大的提高,而拟杆菌门的相对丰度有一定程度的降低,这说明作为降解有机碳源的放线菌门^[10]相比拟杆菌门对TMP有更强的耐受性。研究表明,缺氧/厌氧环境有利于拟杆菌门定殖^[11],结合SEM结果可以推测,污泥絮体内部微环境存在缺氧/厌氧环境,TMP的存在使污泥絮体破裂、颗粒变小,进而使缺氧/厌氧环境缺失。有研究表明,与硝化作用相关的菌为变形菌门和硝化螺旋菌门^[12-13]。从图5可以看出,随着TMP投加浓度的升高,变形菌门的相对丰度呈先降低后升高的趋势,而硝化螺旋菌门的相对丰度从0.84%逐渐上升至1.60%,推断与硝化作用相关的菌对TMP有较强的耐受性。结合典型周期试验,经过长期运行,虽然两种菌门的相对丰度升高,对TMP的耐受性相比其他菌门更强,但随着TMP投加浓度的升高,氨氮去除能力依然会受到一定程度的影响,两种菌门的活性依然会受到一定程度的抑制,使其功能未能完全发挥出来,去除效率出现明显下降。此外有关研究表明,硝化细菌与TMP的去除有关^[14]。

在属水平上,相对丰度较高的有 *Micropruina*、*norank_p_Saccharibacteria* 和 *norank_f_Cytophagaceae* 属,分别在 22.37% ~ 36.57%、13.84% ~ 21.19% 和 11.10% ~ 21.15% 之间(见图6)。其中,*norank_f_Cytophagaceae* 属在对照组(S1)中的相对丰度低于投加了TMP的其余各组,研究表明,这种菌属与蛋

白和多糖的水解有关^[15]。另外,与EPS合成有关的 *Zoogloea* 属在S1中的相对丰度为4.87%,而在投加了TMP的反应器中相对丰度为0.72% ~ 2.11%,结合2.3节的污泥微观结构分析推断,TMP的投加导致 *norank_f_Cytophagaceae* 属的相对丰度升高而 *Zoogloea* 属的相对丰度降低,进而导致EPS合成量的减少,破坏了污泥絮体颗粒的形成。此外, *Flavobacterium* 属在对照组(S1)中的相对丰度达到了24.34%,而在投加了TMP的反应器中相对丰度为0.41% ~ 2.33%,说明TMP的存在会对 *Flavobacterium* 属产生较强的抑制,使其失去优势菌属地位。

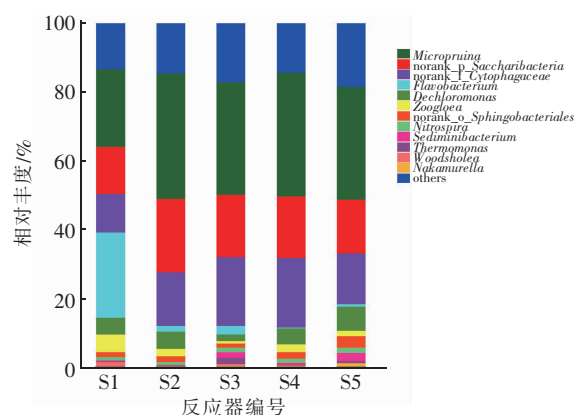


图6 属水平上的微生物群落结构组成

Fig. 6 Distribution of microorganism at genus level

3 结论

① SBR反应器的长期运行效果显示,TMP对好氧活性污泥去除氨氮和COD的能力都有明显的抑制,且TMP投加浓度越高则抑制效果越明显;但此抑制作用是可逆的,运行25d后好氧活性污泥可基本恢复去除氨氮和COD的能力。

② 在连续运行30d后,随着TMP投加浓度的升高,AOB活性依然会受到一定程度的抑制,但能够在在一个周期内将氨氮完全转化;而在高浓度(10 mg/L)TMP条件下,NOB活性受到明显抑制,出现了亚硝态氮的积累。

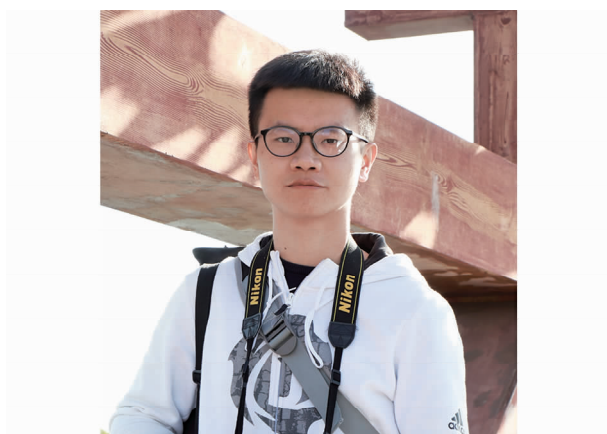
③ SEM观察结果表明,TMP的投加会使好氧活性污泥絮体破裂、颗粒变小,而且投加浓度越高,污泥结构越松散。

④ 微生物群落结构分析表明,TMP会使污泥中的放线菌门相对丰度降低而拟杆菌门相对丰度升高,硝化螺旋菌门对TMP有较强的耐受性;在属水

平上,*Flavobacterium* 属受到的抑制作用最明显。

参考文献:

- [1] Barber L B, Keefe S H, Leblanc D R, *et al.* Fate of sulfamethoxazole, 4-nonylphenol, and 17 β -estradiol in groundwater contaminated by wastewater treatment plant effluent[J]. *Environ Sci Technol*, 2009, 43 (13): 4843 – 4850.
- [2] Mai L, van den Akker B, Du J, *et al.* Removal of chemicals of concern by high rate nitrifying trickling filters[J]. *J Chem Technol Biotechnol*, 2016, 91 (12): 3070 – 3078.
- [3] 杨腾飞, 张小寒, 黄铄淇, 等. 磺胺甲恶唑和甲氧苄啶对生物脱氮过程的影响规律[J]. *环境化学*, 2018, 37 (3): 471 – 479.
Yang Tengfei, Zhang Xiaohan, Huang Shuoqi, *et al.* Effect of sulfamethoxazole and trimethoprim on biological nitrogen removal[J]. *Environmental Chemistry*, 2018, 37(3): 471 – 479 (in Chinese).
- [4] Huang X, Feng Y, Hu C, *et al.* Mechanistic model for interpreting the toxic effects of sulfonamides on nitrification[J]. *J Hazard Mater*, 2016, 305: 123 – 129.
- [5] Banu J R, Do K U, Kaliappan S, *et al.* Effect of alum on nitrification during simultaneous phosphorous removal in anoxic/oxic reactor [J]. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 2009, 14 (4): 543 – 548.
- [6] Schmidt S, Winter J, Gallert C. Long-term effects of antibiotics on the elimination of chemical oxygen demand, nitrification, and viable bacteria in laboratory-scale wastewater treatment plants [J]. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2012, 63 (3): 354 – 364.
- [7] Collado N, Buttiglieri G, Ferrando-Climent L, *et al.* Removal of ibuprofen and its transformation products: Experimental and simulation studies [J]. *Sci Total Environ*, 2012, 433: 296 – 301.
- [8] Halling-Sorensen B, Lützhøft H, Andersen H R, *et al.* Environmental risk assessment of antibiotics: comparison of mecillinam, trimethoprim and ciprofloxacin [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2000, 46: 53 – 58.
- [9] 李娟英, 王肖颖, 解满俊, 等. 磺胺和四环素类抗生素对活性污泥性能的影响[J]. *环境工程学报*, 2014, 8 (2): 573 – 580.
Li Juanying, Wang Xiaoying, Xie Manjun, *et al.* Effect of sulfonamides and tetracycline antibiotics on performance of activated sludge [J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2014, 8 (2): 573 – 580 (in Chinese).
- [10] 马思佳, 顾卓江, 丁丽丽, 等. 碳源对活性污泥微生物细胞膜特性和群落结构影响[J]. *微生物学通报*, 2017, 44 (3): 561 – 573.
Ma Sijia, Gu Zhuojia, Ding Lili, *et al.* Effects of carbon sources on cell membrane properties and microbial community of activated sludge [J]. *Microbiology China*, 2017, 44 (3): 561 – 573 (in Chinese).
- [11] Jang A, Yoon Y H, Kim I S, *et al.* Characterization and evaluation of aerobic granules in sequencing batch reactor[J]. *J Biotechnol*, 2003, 105 (1): 71 – 82.
- [12] Hovanec T A, Taylor L T, Blakis A, *et al.* Nitrospira-like bacteria associated with nitrite oxidation in freshwater aquaria[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64 (1): 258 – 264.
- [13] Nold S C, Zhou J, Devol A H, *et al.* Pacific northwest marine sediments contain ammonia-oxidizing bacteria in the β subdivision of the *Proteobacteria* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66 (10): 4532 – 4535.
- [14] Liu Q, Li M, Liu X, *et al.* Removal of sulfamethoxazole and trimethoprim from reclaimed water and the biodegradation mechanism[J]. *Front Environ Sci Eng*, 2018, 12 (6): 61 – 68.
- [15] McBride M J, Liu W, Lu X, *et al.* The Family *Cytophagaceae* [M]. Heidelberg: Springer, 2014.



作者简介: 陈炳伟(1994 –), 男, 广东陆丰人, 硕士研究生, 主要从事污水处理技术研究。

E-mail: 510066252@qq.com

收稿日期: 2019 – 10 – 16