

DOI:10.19853/j.zgjsps.1000-4602.2024.23.005

利巴韦林胁迫下好氧颗粒污泥的微观响应特征

刘奇欣¹, 冯莹¹, 陈宁¹, 沈斐², 王硕^{1,3,4}, 李激^{1,3,4}

(1. 江南大学 环境与生态学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江苏无锡环境监测中心 仪器分析实验室, 江苏 无锡 214121; 3. 江苏省厌氧生物技术重点实验室, 江苏 无锡 214122; 4. 江苏省水处理技术与材料协同创新中心, 江苏 苏州 215009)

摘要: 新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的暴发导致大量新冠药物被使用,部分药物及其代谢产物随下水道排入污水处理厂,目前已在污水处理厂及自然水体中检测到了抗病毒药物利巴韦林的存在。为此,通过考察在利巴韦林胁迫下好氧颗粒污泥(AGS)对其去除效果,以及AGS为应对利巴韦林胁迫而做出的微观响应特征,探究AGS形成过程的调控因子和维稳因素。结果表明,AGS在形成过程中对利巴韦林的去除率不断升高,最终稳定达到99%以上,并以生物降解为主。紧密结合型蛋白质(TB-PN)是在有或无利巴韦林胁迫条件下胞外聚合物(EPS)中均有且重要的组分,利巴韦林胁迫会刺激AGS培养前期微生物分泌较多EPS,表明AGS对于利巴韦林胁迫具有应激保护反应,且过多分泌的EPS会提高功能微生物间的电子传递效率,从而提高污染物降解效率。常规培养条件下,AHLs中的信号分子C8-HSL与EPS中蛋白质和多糖含量呈正相关,C8-HSL是促进TB-PN合成的关键信号分子。利巴韦林胁迫下C8-HSL更多负责指导多糖类物质的合成,表明利巴韦林可能干扰或抑制了TB-PN合成的通路,C4-HSL相关性分析同样证明利巴韦林的胁迫导致污泥微生物的代谢途径发生了变化。利巴韦林胁迫对微生物群落结构具有较强的干扰作用,在AGS培养前期促进了信号分子合成菌*Acidovorax*、耐药菌*Acinetobacter*及*Delftia*等可分泌生物毒性因子的菌属的优势生长,但不同条件下AGS系统中微生物群落组成最终达到高度相似,表明微生物多样性和群落演替是AGS保持稳定及良好污染物去除能力的主要原因。

关键词: 好氧颗粒污泥; 利巴韦林; 胞外聚合物; 信号分子; 微生物结构

中图分类号: TU992 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4602(2024)23-0029-11

Micro-response Characteristics of Aerobic Granular Sludge under Stress of Ribavirin

LIU Qi-xin¹, FENG Xuan¹, CHEN Ning¹, SHEN Fei², WANG Shuo^{1,3,4}, LI Ji^{1,3,4}

(1. School of Environment & Ecology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Laboratory of Instrumental Analysis, Jiangsu Wuxi Environmental Monitoring Center, Wuxi 214121, China; 3. Jiangsu Key Laboratory of Anaerobic Biotechnology, Wuxi 214122, China; 4. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Water Treatment Technology and Materials, Suzhou 215009, China)

Abstract: The emergence of corona virus disease (COVID-19) has resulted in the widespread

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(52470036); 江苏省水处理技术与材料协同创新中心预研课题(XTCXSZ2020-2)
通信作者: 王硕 E-mail: shuowang@jiangnan.edu.cn

utilization of numerous antiviral medications, leading to the discharge of certain drugs and their metabolites into wastewater treatment plants (WWTPs) through sanitary sewers. Notably, the presence of antiviral drug ribavirin has been identified in both WWTPs and natural water bodies. Consequently, this paper investigated the removal efficiency of aerobic granular sludge (AGS) under ribavirin stress and examined the microscopic response characteristics of AGS to such stress, thereby elucidating the regulatory factors and stability maintenance mechanisms involved in the formation of AGS. Throughout the development of AGS, the ribavirin removal efficiency exhibited a continuous increase, ultimately stabilizing at over 99%, and the removal was primarily through biodegradation. Tightly bound protein (TB-PN) served as a crucial component of extracellular polymeric substances (EPS), both in the presence and absence of ribavirin stress. Ribavirin stress showed to enhance EPS secretion by microorganisms during the early stage of AGS culture, suggesting that AGS exhibited a protective response to ribavirin-induced stress. Furthermore, an excessive secretion of EPS augmented electron transfer efficiency among functional microorganisms, thereby enhancing the pollutants degradation efficacy. Under conventional culture conditions, the concentration of C8-HSL in AHLs exhibited a positive correlation with the contents of protein and polysaccharide in EPS, indicating that C8-HSL served as a crucial signaling molecule to enhance the synthesis of TB-PN. Under ribavirin stress, C8-HSL played a more pivotal role in directing the synthesis of polysaccharides, suggesting that ribavirin might interfere with or inhibit the TB-PN synthesis pathway. Correlation analysis of C4-HSL further corroborated that ribavirin stress induced alterations in the metabolic pathways of sludge microorganisms. Ribavirin stress exerted a significant interference effect on the microbial community composition, promoting the dominant proliferation of signal molecule synthesizing bacteria such as *Acidovorax*, drug-resistant bacteria including *Acinetobacter* and *Delfia*, along with other bacterial species that secreted biotoxic factors during the early stage of AGS culture. Nevertheless, the microbial community composition within the AGS system ultimately achieved a high degree of similarity across various conditions, suggesting that microbial diversity and community succession were pivotal factors contributing to the stability and effective pollutants removal capabilities of the AGS system.

Key words: aerobic granular sludge; ribavirin; extracellular polymeric substances; signal molecule; microbial community composition

在2019年12月份暴发的新型冠状病毒肺炎(COVID-19)事件,对全球产生了重大影响,既包括对人类健康的威胁,又包括对环境的影响^[1],其中抗病毒药物的大量使用所带来的环境影响不容忽视。根据2021年国家卫生健康委办公厅、国家中医药管理局办公室印发的《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第八版 修订版)》,利巴韦林(RBV)等抗病毒药物被推荐用于COVID-19的治疗,可能会导致其在污水处理厂及环境中的负荷急剧升高^[2]。利巴韦林又名病毒唑,是一种强效抗病毒药物,其抗病毒效果明显,但同时具有较多副作用,对神经系统、消化系统、骨骼系统等均会造成损伤。利巴韦林采用

多种作用机制对抗感染,目前尚未完全了解其完整的抗病毒谱和这些机制的相互作用。作为一种非处方药物,利巴韦林滥用现象日趋严重,Chen等^[3]在武汉市的地表水和沉积物中检测到了利巴韦林的存在,在水体中最高达到52.2 ng/L,在沉积物中检测率达到100%。环境中赋存的利巴韦林可能会通过多种途径进入生物体内,对生态环境和生物体造成威胁;同时,高浓度药物的存在会引起污水处理过程中微生物群落的恶性转化,影响处理系统的稳定运行^[4]。因此针对包括利巴韦林在内的药物去除研究以及研发新污水处理工艺十分必要。

好氧颗粒污泥(AGS)是微生物细胞在好氧条件

下通过自聚集形成的生物聚合体,是由自固定细胞组成的特殊的生物膜。与传统活性污泥工艺相比,AGS因具有良好的沉降性能、紧密的结构、丰富的微生物菌群以及处理有毒有害物质的潜力而被认为是最具有前途的污水生物处理技术之一^[5-6]。胞外聚合物(EPS)是微生物在特定环境下代谢分泌出的、包裹在细胞表面或分泌于细胞外的三维、凝胶状、高度水合的基质,由蛋白质(PN)、多糖(PS)和腐殖酸等物质组成^[7],对于微生物的聚集、传质和吸附污染物等发挥着重要作用^[8]。研究表明,在药物存在的情况下微生物会通过分泌EPS来延迟或阻止毒物直接接触微生物^[9]。PN可以改变细胞表面疏水性以改善细胞附着和污泥聚集,而PS可以形成网络结构层作为骨架将微生物包裹在里面,另外EPS还可以作为媒介促进细胞间的协作与信号转导,对AGS的形成与结构维持具有重要意义^[10-11]。

群体感应(QS)是微生物之间的通讯机制,微生物通过分泌和检测被称为自诱导剂的可溶性信号分子(AI)以调节种群密度并适应环境变化,从而介导生物膜形成、EPS产生和药物耐药性^[12]。微生物信号分子主要包括以下4种:①革兰氏阴性菌(G-)中由不同长度酰基侧链的高丝氨酸内酯(AHLs)介导的LuxR/I型信息系统;②革兰氏阳性菌(G+)中寡肽(AIPs)介导的信息系统;③LuxS/AI-2型的信息系统;④AI-3-肾上腺-去肾上腺素信息系统。当前的研究多集中于革兰氏阴性菌自身诱导物AHLs介导的LuxR/I型信息系统^[13]。AHLs类信号分子介导的群体感应是影响EPS分泌和微生物聚集的重要因素,Zhang等人研究发现,QS通过调控胞内ATP的分泌进而影响AGS中EPS的分泌和污染物的去除^[14]。因此,相比传统活性污泥法,具有大量EPS且可通过AHLs定向调控EPS的AGS技术可能对抗病毒药物利巴韦林具有更好的去除效果。

笔者通过对比利巴韦林胁迫与常规培养条件下AGS的形成特性,考察AGS对利巴韦林的去除效果以及为应对胁迫条件EPS的变化特征,分析两种条件下AGS中AHLs类信号分子的变化情况及相关性,探讨两种条件下微生物菌群的演替规律,揭示AGS为应对胁迫条件做出的微观响应特征,旨在为AGS维稳机制的完善提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 试验装置

试验装置采用序批式SBR,反应器高度为100 cm、内径为8 cm,有效容积约为4 L。反应器底部设置曝气装置,采用转子流量计控制充氧阶段曝气量为2 L/min。采用时控开关控制反应器各阶段状态,其中进水5 min、曝气时间由205 min逐渐增加到215 min、沉降时间由15 min逐渐降低到5 min,污泥龄为20 d,排水比为60%。

1.2 接种污泥与进水水质

试验共运行两组反应器,在常规培养条件下记作R0,在利巴韦林胁迫条件下记作R1。接种污泥取自无锡市某污水处理厂A²/O工艺的好氧池活性污泥,接种体积为2 L,接种污泥MLSS为5.0 g/L。试验进水为人工配水,采用混合碳源。其中,NaAc为400 mg/L,丙酸钠为1 000 mg/L,NH₄Cl为248 mg/L,K₂HPO₄为37.41 mg/L,KH₂PO₄为29.25 mg/L,MgSO₄为97 mg/L,CaCl₂为75 mg/L,EDTA为10 mg/L,微量元素包括1.5 μg/L的FeCl₃·6H₂O、0.15 μg/L的H₃BO₃、0.03 μg/L的CuSO₄·5H₂O、0.03 μg/L的KI、0.12 μg/L的MnCl₂·4H₂O、0.058 μg/L的ZnCl₂、0.15 μg/L的CoCl₂·6H₂O、0.06 μg/L的Na₂MoO₄·2H₂O。R1进水中添加利巴韦林,浓度为1 mg/L。

1.3 分析项目与方法

常规指标:COD采用重铬酸钾法测定,TN采用过硫酸钾氧化-紫外分光光度法测定,TP采用过硫酸钾氧化-钼锑抗分光光度法测定。

利巴韦林检测:进、出水中的利巴韦林浓度采用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)在正电离模式下进行测定。色谱柱使用BEH-C18(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm),柱温为30 °C,流动相为0.2%甲酸水(A)和乙腈(B),流速为0.3 mL/min,进样量为5 μL。

EPS的提取与测定:采用NaOH法提取污泥中的EPS。取反应器泥水混合物10 mL于50 mL离心管中,于20 kHz、40 W的条件下超声30 s,在4 °C、2 000g转速下于离心机中离心15 min,收集上清液即为溶解型EPS(SMP-EPS);沉淀物用缓冲液稀释至原体积,加入60 μL、37%的甲酰胺,于4 °C恒温摇床振荡1 h,在4 °C、5 000g条件下离心15 min,收集上清液即为松散附着型EPS(LB-EPS);将离心后沉

淀物用缓冲液稀释至原体积,加入4 mL、1 mol/L的NaOH溶液,于4℃恒温摇床振荡3 h,然后在4℃、10 000g条件下离心15 min,收集上清液即为紧密结合型EPS(TB-EPS)。分别采用考马斯亮蓝法和硫酸-蒽酮法测定EPS中的蛋白质和多糖含量。

AHLs的提取与测定:取100 mL泥水混合物并将污泥捣碎,2 000 r/min涡旋振荡5 min,涡旋后的样品在5 000g下离心10 min,上清液用0.22 μm滤膜过滤,用等体积的乙酸乙酯(用0.1%乙酸酸化)萃取3次,收集3次萃取后的有机相并加入适量无水硫酸钠除水,过滤后用旋转蒸发仪在30℃下蒸干,重新溶于1 mL色谱级甲醇中,溶液经0.22 μm注射式过滤器过滤后,放置在-20℃冰箱中保存待测。采用超高效液相色谱串联三重四极杆质谱测定AGS中的AHLs。采用SPSS 19.0统计软件对所测数据进行相关性分析。

微生物菌群测试:采用DNA抽提试剂盒提取AGS中的DNA,将DNA产物作为模板,采用细菌16S rDNA扩增的通用引物进行目标片段PCR扩增及PCR产物纯化,采用荧光试剂对PCR扩增回收产物进行荧光定量,后续上机进行Illumina MiSeq测序,本试验中测序文库的建立由上海晶能生物有限公司完成。通过高通量测序法分析两组反应器AGS形成过程中(20、40、60 d)及稳定运行后(70 d)的微生物菌群结构变化情况。

2 结果与讨论

2.1 AGS的形态与结构

两组反应器中AGS的粒径变化如图1所示。

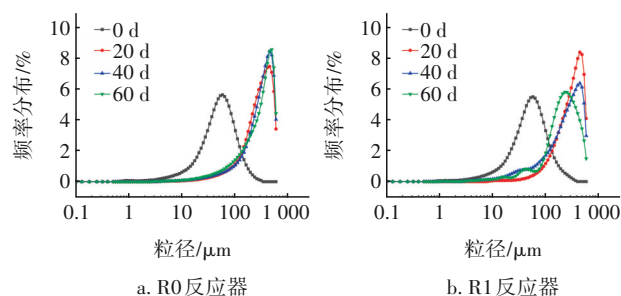


图1 污泥颗粒化过程中的粒径变化

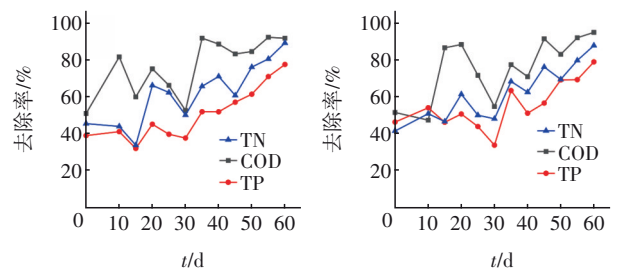
Fig.1 Variation of particle size during sludge granulation process

R0和R1运行至20 d时,粒径>200 μm的AGS比例分别达到72.88%和75.45%,平均粒径分别为296.34和312.12 μm,基本实现颗粒化,在利巴韦林胁迫下污泥的颗粒化速率更快。继续运行到40 d

时,R0中污泥絮体比例继续下降,污泥颗粒化程度有一定提升,而R1中出现部分AGS解体现象,R0和R1中粒径>200 μm的AGS比例分别为74.93%和61.87%,平均粒径分别为308.3和262.56 μm。之后,R0中AGS增长速度基本维持稳定,R1中持续出现污泥解体现象,镜检发现R1中大粒径AGS成蓬松状,周围缠绕絮状污泥,发生失稳解体现象并随出水大量流失,表明利巴韦林的长期胁迫可能不利于较大粒径AGS结构的维持,最终R0中AGS维持在较大粒径范围,R1中AGS维持在较小粒径范围,此时两组反应器均完全颗粒化并稳定运行,表明在利巴韦林胁迫下AGS依旧能维持运行。

2.2 常规污染物及利巴韦林的去除特性

两组反应器在运行周期内对污染物的降解情况如图2所示。在AGS培养前期,污染负荷增加、沉降时间缩短等外界条件的变化导致反应器中大量污泥排出,接种污泥中的微生物难以快速适应环境变化,两组反应器在运行前期对污染物的去除效果均呈现出较大波动情况。R0中常规污染物的去除率在第15和30天出现下降情况,可能与第15天缩短沉降时间加大排泥量导致生物量下降以及第30天出现的丝状菌繁殖有关。R1中常规污染物的去除率在第30天出现下降情况,可能与第30天出现的丝状菌繁殖有关;由于其颗粒化程度较快,因此在第15天缩短沉降时间未对其造成明显影响。随着AGS的形成,污泥对污染物的处理能力逐渐稳定。在R0中,COD去除率从最初的51.4%逐渐提高并最终稳定维持在92%以上,TP和TN去除率分别从39.5%、46.0%提高至77.9%和89.5%。在R1中,COD去除率从最初的51.4%逐渐提高至94.6%以上,TP和TN去除率分别从46.3%、41.5%提高至78.7%和87.6%,表明在利巴韦林胁迫下AGS依旧可以表现出较好的污染物去除性能。



a. 常规指标去除效果(R0)

b. 常规指标去除效果(R1)

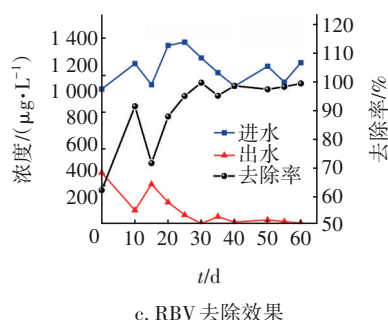


图2 污泥颗粒化过程中对污染物的去除特性

Fig.2 Removal characteristics of pollutants during sludge granulation process

R1运行周期内对利巴韦林的降解情况如图2(c)所示。随着AGS的形成,对利巴韦林的去除率逐渐升高,由最初的61.9%升高至99%以上并维持稳定,表明AGS对利巴韦林有较好的去除效果。一方面,这可能与利巴韦林的结构有关,其结构式为 $C_8H_{12}N_4O_5$,由一个三氮唑环和一个含氧五元杂环通过C—N键连在一起,在微生物降解作用下该结构可能易发生C—N键断裂^[15];另一方面,AGS的形成可能增加了EPS的含量,进而提升了污泥对利巴韦林的吸附能力,药物的胁迫可能导致系统中出现一

些耐药性较强的微生物,提高了对利巴韦林的生物降解能力^[14,16]。

2.3 EPS的变化

两组反应器在AGS培养过程中不同层EPS中蛋白质和多糖含量变化如图3所示。由于两组反应器在第40天均出现了丝状菌膨胀情况,采取加大排泥等措施协助反应器恢复稳定,导致第40天的EPS含量均呈现下降趋势。图3(a)和(d)显示,R0和R1中各层蛋白质含量在AGS颗粒化过程中均呈现上升趋势。在R0中,SMP层蛋白质(SMP-PN)从最初的0.5 mg/gVSS增至29.0 mg/gVSS, LB层蛋白质(LB-PN)从最初的1.1 mg/gVSS增至7.7 mg/gVSS, TB层蛋白质(TB-PN)从最初的107.6 mg/gVSS增至338.2 mg/gVSS;在R1中,SMP-PN从最初的0.5 mg/gVSS增至23.1 mg/gVSS, LB-PN从最初的1.1 mg/gVSS增至6.5 mg/gVSS, TB-PN从最初的107.6 mg/gVSS增至370.8 mg/gVSS。图3(c)和(f)显示,R0和R1中PN总量从最初的109.1 mg/gVSS分别增至375.0、400.4 mg/gVSS,表明在外界选择压下,污泥通过分泌较多的蛋白质以增强表面疏水性、促进生物团聚^[17],有利于AGS的形成。

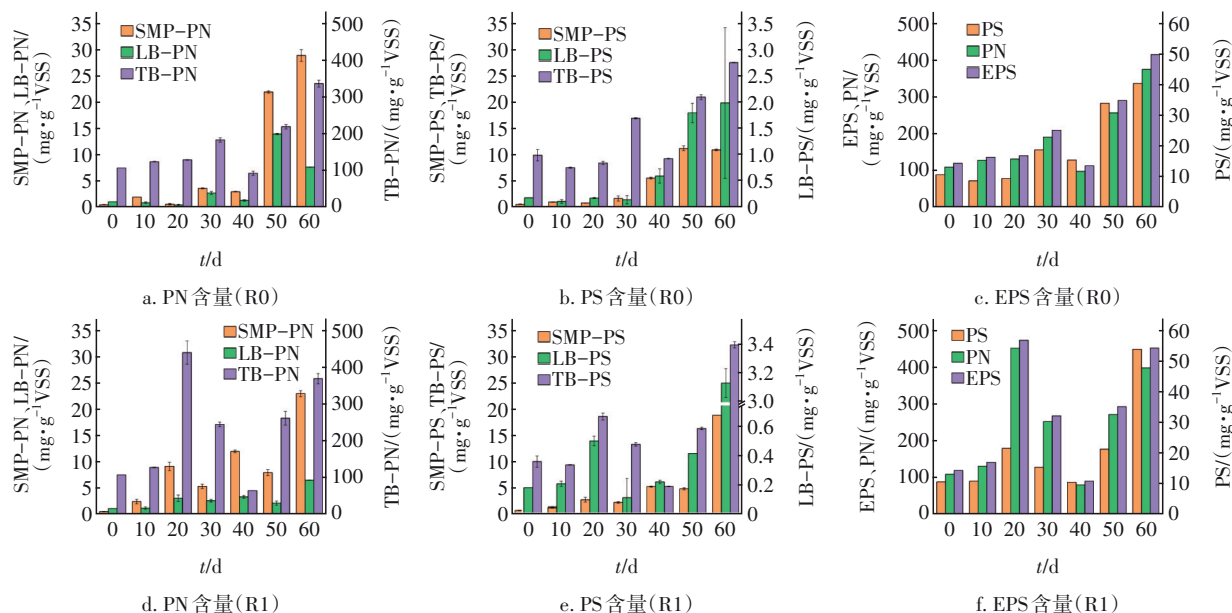


图3 污泥颗粒化过程中EPS、PN及PS含量变化

Fig.3 Comparison of EPS, PN and PS contents during sludge granulation process

两组反应器中的PN均以TB-PN为主,且含量占总EPS的90%以上,表明无论有无外界胁迫,TB-PN在AGS的培养中均发挥重要作用,相对高含量的TB-PN有利于AGS内部致密结构的形成,从而提升

AGS的沉降性能^[18]。图3(b)和(e)显示,R0和R1中各层多糖含量在AGS颗粒化进程中呈现上升趋势。在R0中,SMP层多糖(SMP-PS)从最初的0.5 mg/gVSS增至10.9 mg/gVSS, LB层多糖(LB-PS)从最初

的 0.2 mg/gVSS 增至 2.0 mg/gVSS, TB 层多糖 (TB-PS) 从最初的 9.9 mg/gVSS 增至 27.5 mg/gVSS。在 R1 中, SMP-PS 从最初的 0.5 mg/gVSS 增至 18.8 mg/gVSS, LB-PS 从最初的 0.2 mg/gVSS 增至 3.1 mg/gVSS, TB-PS 从最初的 9.9 mg/gVSS 增至 32.2 mg/gVSS。图 3(c) 和 (f) 显示, R0 和 R1 中 PS 总量由最初的 10.6 mg/gVSS 分别增至 40.4、54.1 mg/gVSS, 表明多糖含量的增加可能增强 EPS 的凝胶特性, 有利于微生物间相互黏附形成菌胶团和相互交联的网状结构, 进而促进污泥颗粒化进程^[19]。

R1 在第 20、40 天时 PS 和 PN 含量变化呈现出与 R0 不同的规律, 在第 20 天 R1 中 SMP、LB 和 TB 层的 PN 含量急剧增加, 分别达到 9.2、3.0、442.0 mg/gVSS, LB 和 TB 层的 PS 含量也大幅增加, 分别达到了 0.5、18.5 mg/gVSS, 表明利巴韦林的刺激可能导致 AGS 表现出应激保护反应, 分泌更多的 EPS 从而形成保护微生物的网络结构^[20]。在第 40 天采取了加大排泥措施以解决丝状菌膨胀问题, 相比 R0, R1 中 SMP-PN 含量仍呈现增加趋势, 达到 12.0 mg/gVSS, 可能与利巴韦林的胁迫促进了 EPS 分泌以提高对利巴韦林的吸附去除有关^[21]。

R0 和 R1 中 EPS 总量最终分别达到 415.4、454.5 mg/gVSS, 利巴韦林胁迫对 EPS 总量的变化趋势以及 AGS 培养后期 EPS 总量未产生显著影响, 但是与 R0 相比, R1 中 EPS 波动较大, 尤其以 PN 为主。PN 作为 EPS 中的主要组分, 包含细胞色素 c (Cyt-c) 等多种电化学活性物质, Cyt-c 作为电子传递介质参与电子转移过程, 有利于污染物的降解^[22]。因此, R1 中 EPS 的变化规律一方面与 EPS 作为微生物菌群的第一道保护屏障, 在反应器中直接与利巴韦林接触引起的应激保护反应有关; 另一方面, EPS 具有较强的吸附能力, 其含量的提高和变化可能促进了 AGS 对常规污染物及利巴韦林的吸附^[21]。另外, EPS 中储存有较多的电化学活性物质 Cyt-c 等, 其含量的增加可能引起了电化学活性物质含量的增加, 强化了利巴韦林降解过程中的电子传递, 进而提高了对利巴韦林的去除效率^[23]。

2.4 信号分子含量变化及相关性分析

污水生物处理系统中富集的微生物以革兰氏阴性菌为主, 微生物间主要的群体感应信号分子为 AHLs, 其介导产生的群体感应会影响 AGS 中 EPS 的分泌并强化 AGS 的结构稳定^[24]。两组反应器运行

过程中 AHLs 含量的变化如图 4 所示。

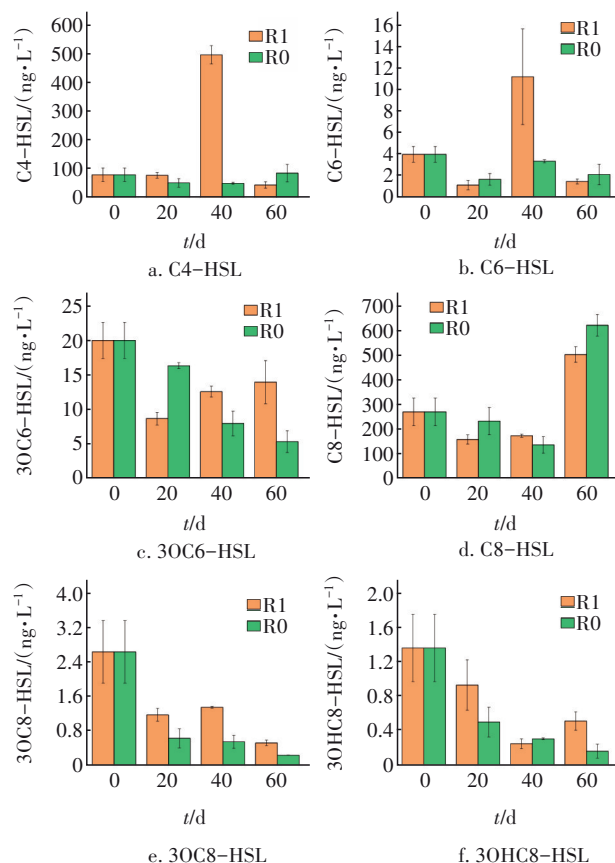


图4 污泥颗粒化过程中AHLs信号分子含量的变化

Fig.4 Variation of AHLs contents during sludge granulation process

由图 4 可知, C4-HSL、C6-HSL、3OC6-HSL 和 C8-HSL 是 AGS 培养过程中检测到的最主要 AHLs。其中, C4-HSL 在 R0 和 R1 中由最初的 78.1 ng/L 分别变为 83.9、42.6 ng/L, C4-HSL 在 R0 中未表现出明显变化, 在 R1 中存在一定的波动, 尤其在运行至第 40 天时出现了异常增加的现象。C4-HSL 会导致真菌生长和污泥形貌变化, 加速丝状真菌的生长速率, 可能导致了 40 d 时 R1 中丝状菌膨胀的现象^[25]。C6-HSL 在 R0 和 R1 中由最初的 4.0 ng/L 分别变为 2.1、1.5 ng/L, 并在 R1 运行至第 40 天时出现了异常增加的现象。C6-HSL 能够调控生物膜形成丝状连接结构, 增加细胞与细胞之间的信息交流, 促进 AGS 的结构稳定^[26], 因此 C6-HSL 异常增加的现象可能与丝状菌膨胀情况下 R1 中污泥的自我调控机制有关, 而 R0 中的丝状菌膨胀情况通过加大排泥措施得到了较好的控制, 未表现出 C4-HSL 和 C6-HSL 异常增加的现象。3OC6-HSL 在 R0 和 R1 中由最初

的20.0 ng/L分别变为5.3、14.0 ng/L, C8-HSL在反应器中含量最高,运行到60 d时分别达到了626.1 ng/L (R0) 和506.2 ng/L (R1)。已有研究证明, 3OC6-HSL和C8-HSL具有促进EPS分泌、强化电子传递过程、调节代谢和信号传导过程的作用^[27-28]。与R0相比, R1中AHLs的变化说明利巴韦林的投加可能促进了3OC6-HSL、3OC8-HSL和3OHC8-HSL的分泌, 已有研究证明这些信号分子具有促进EPS分泌、提高蛋白质结构稳定性和复杂性、促进生物膜生长以及降解污染物的作用^[14,29]。但是以上信号分子在污泥颗粒化过程中呈现减少趋势^[30], 表明C8-HSL才是促进AGS形成的主要信号分子。

AHLs信号分子能指导EPS的产生, 在调控生物膜的形成等方面均发挥重要作用^[31], 为了探究AHLs、EPS和利巴韦林去除率之间的关系, 将所有数据根据皮尔逊相关性系数进行分析, 绘制聚类热图(见图5)以解析不同AHLs信号分子的功能。R0中C4-HSL和C8-HSL与EPS中蛋白质和多糖含量呈显著正相关, 其中C8-HSL与EPS组分含量相关性系数均在0.70以上, 说明C4-HSL和C8-HSL可能作为AGS培养过程中的关键信号分子, 且C8介导的TB-PN合成是AGS形成的重要因素。R1中C8-HSL与EPS中蛋白质和多糖含量呈正相关, 其中C8-HSL与总多糖、LB-PS、SMP-PS、TB-PS的相关性系数分别为0.87、0.92、0.87、0.80, 与LB-PN和SMP-PN的相关性系数分别为0.72和0.66。这进一步表明C8-HSL可能是AGS培养过程中促进PS和PN分泌的关键信号分子, 促进污泥颗粒化过程, 加速初始生物膜的形成, 进而显著提高污染物的去除效果^[14]。但是由于利巴韦林的胁迫, C8-HSL更多负责指导多糖类物质的合成, 其与TB-PN的相关性系数仅为0.27, 表明利巴韦林可能干扰或抑制了TB-PN合成的通路^[32]。此外, R1中C4-HSL与SMP-PS、LB-PS和LB-PN呈负相关, 同样证明利巴韦林的胁迫导致污泥微生物的代谢途径发生了变化^[33]。C6-HSL、3OC6-HSL、3OC8-HSL和3OHC8-HSL与两组反应器中的EPS组分含量变化呈现负相关性或未表现出较强的相关性, 结合图4, 说明上述信号分子相比于C8-HSL, 未对EPS分泌产生显著影响。利巴韦林的去除率与EPS各组分含量呈现一定的正相关性, 但其与SMP-PN和LB-PN含量的相关性系数仅为0.57和0.52, 表明利巴韦林的去除仍

然以微生物降解为主。此外, 利巴韦林的去除率与C4-HSL、3OC6-HSL、3OC8-HSL、3OHC8-HSL变化呈现负相关, 其相关性系数分别为-0.82、-0.70、-0.92和-0.94, 表明AGS中利巴韦林的去除与EPS组分的吸附特性有关, 但通过生物吸附去除的比例相对较低。由AHLs介导的污染物去除过程并非利巴韦林去除的主要途径, 进一步说明AGS中大量EPS的存在为污泥微生物抵御利巴韦林的胁迫发挥了重要作用, 从而促进了功能微生物菌群对利巴韦林的降解, 有效维持了AGS系统的稳定性。

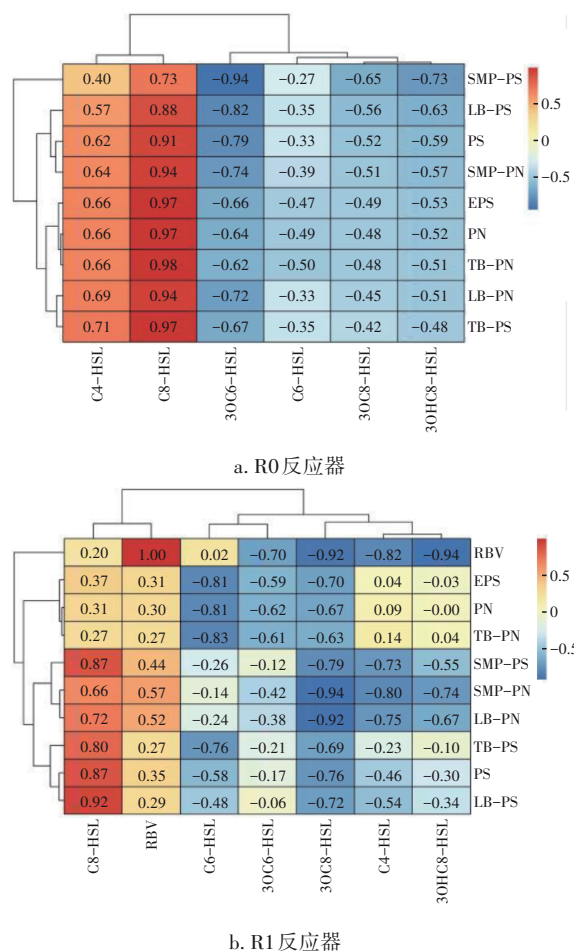


图5 信号分子、利巴韦林去除率与EPS的相关性分析

Fig.5 Correlation analysis of signal molecules with ribavirin removal efficiency and EPS

2.5 微生物群落结构解析

AGS培养过程中属水平上的微生物群落结构如图6所示(仅列出相对丰度在前20名的菌属)。利巴韦林的添加对微生物群落结构具有较强的干扰作用, 导致微生物相对丰度变化较大。R0运行至第20天时优势菌属为 *Meganema*、*Acinetobacter* 和

Acidovorax, 其相对丰度分别为 55.7%、11.0% 和 10.0%。其中, *Meganema* 对 EPS 的分泌具有促进作用, 该菌是隶属于变形菌纲的一种丝状菌, 在 AGS 丝状菌形成假说中认为 *Meganema* 对 AGS 的形成极为重要, 且 *Meganema* 还可在 AGS 系统中完成有机碳储存和反硝化作用, 与图 2 中 TN 去除率提高相呼应^[34-35]。R1 运行至 20 d 时优势菌属为 *Acidovorax*、*Acinetobacter* 和 *Delftia*, 相对丰度分别为 30%、24.6% 和 20.1%。与 R0 相比, *Meganema* 相对丰度下降, *Acidovorax*、*Acinetobacter* 和 *Delftia* 相对丰度明显提高, *Acidovorax* 是 AHLs 信号分子生产者, 有利于 EPS 的分泌, 同时该菌也是一种含有细胞色素 P-450 单加氧酶、环己醇脱氢酶、环己酮单加氧酶和内酯酶等具有高效催化性能的菌, 可利用乙酸钠进行生长和繁殖, 且能够降解环己烷等有机化合物, 可能对利巴韦林具有一定的降解作用^[36]。*Acinetobacter* 是一种“超级”耐药菌, 是引起医院获得性感染的细菌之一, 另外该菌在有氧和无氧条件下均可以促进生物膜的生长, 有利于 AGS 颗粒化进程^[37-38]。*Delftia* 菌属被证明能够分泌生物铋纳米颗粒, 具有细胞毒性和抗氧化活性, 说明利巴韦林的加入可能促进可以分泌生物毒性因子微生物的生长, 诱导 Bnip3 蛋白(细胞死亡调节剂)的表达^[39], 在一定程度上影响系统的稳定性。运行至第 20 天时, 两组反应器中均存在脱氮除磷关键功能菌 *Meganema* 和 *Paracoccus*, 其中 *Meganema* 具备有机碳储存和反硝化功能, *Paracoccus* 具有反硝化作用, 与图 2 中污染物去除率的变化相呼应。

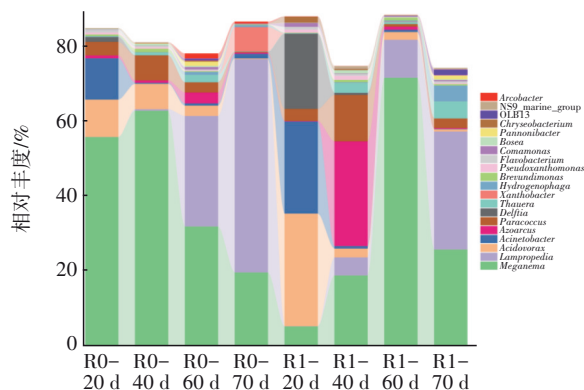


图6 AGS培养过程中属水平上微生物群落组成

Fig.6 Microbial community composition at the genus level during granulation process

运行至第 40 天时, R0 和 R1 中微生物差距依旧

明显, R0 中优势菌属依旧是 *Meganema*, 其相对丰度增大至 62.7%, 该菌作为一种丝状菌, 其丰度的进一步增加可能导致了该阶段 R0 的丝状菌膨胀情况。R1 中优势菌属为 *Azoarcus*、*Meganema* 和 *Paracoccus*, 相对丰度分别为 27.9%、18.8% 和 12.4%, 与第 20 天相比差异明显。该阶段 *Meganema* 相对丰度升高, 促进了 AGS 的形成。*Azoarcus* 和 *Paracoccus* 相对丰度明显升高, 其中 *Azoarcus* 是一种影响硝酸盐还原的关键反硝化菌, 与图 2 中 30 d 后 TN 去除率升高相对应; *Paracoccus* 被认为是 EPS 合成者并具有反硝化作用, 与 AGS 的形成和稳定性高度相关, 保证了利巴韦林胁迫下 AGS 的稳定性^[40]。此外, 两组反应器中均存在脱氮除磷关键功能微生物 *Meganema*、*Paracoccus*、*Azoarcus* 和 *Thauera*, 其中 *Azoarcus* 参与反硝化过程, *Thauera* 可以同步进行硝化和反硝化过程, 表现出较好的脱氮除磷效果。反应器运行至第 60 天时, R0 和 R1 之间的差异菌属逐渐减少, 两者均以 *Meganema* 和 *Lampropedia* 为主。R0 中 *Meganema* 和 *Lampropedia* 的相对丰度分别为 31.8% 和 29.5%, *Meganema* 的相对丰度相比 40 d 时显著降低, 说明系统较好地控制了丝状菌膨胀现象; *Lampropedia* 的相对丰度明显增加, 该菌作为一种聚磷菌, 具有除磷作用, 与图 2 中较高的 TP 去除率相呼应^[41]。R1 中 *Meganema* 和 *Lampropedia* 的相对丰度分别为 71.5% 和 10.1%, 微生物组成逐渐与 R0 相似。运行至第 70 天时两组反应器达到稳定状态, 差异菌属持续减少, 菌属组成相似, 均以 *Meganema* 和 *Lampropedia* 为主, R0 中两者相对丰度分别为 19.6% 和 56.9%, *Xanthobacter* 的相对丰度增加, 其分泌的细胞色素 P-450 参与污染物代谢过程, 可能与较高的污染物去除率有关^[42]; R1 中两者相对丰度分别为 25.7% 和 31.5%, *Hydrogenophaga* 和 *Thauera* 相对丰度增加, *Hydrogenophaga* 是有效的药物降解菌, *Thauera* 是污水处理中常见的微生物, 具有较好的脱氮能力^[43-44]。两组反应器均表现出 *Meganema* 相对丰度减少、*Lampropedia* 相对丰度增加的变化趋势, 说明 AGS 中的群落组成达到稳定。运行至 60 d 后, *Meganema*、*Paracoccus*、*Azoarcus* 和 *Thauera* 等关键功能菌属依旧存在且丰度逐渐增加, 证明即使存在利巴韦林的胁迫, AGS 仍然可以表现出较高的脱氮除磷效能。

综上, 利巴韦林的加入导致反应器运行初期微生物群落多样性增加, 促进了部分耐药菌及可以分

泌生物毒性因子的菌属的生长,增大了系统的复杂性。随着AGS的形成,系统通过增加有利于EPS产生、AHLs信号分子合成以及有利于维持AGS稳定性的菌属的相对丰度来抵御利巴韦林的胁迫。但是经过长期的培养,胁迫与正常条件下AGS系统中微生物群落组成最终达到高度相似,说明利巴韦林的胁迫影响了反应器运行前期功能微生物的相对丰度,后期微生物组成逐渐恢复至正常水平,表明微生物多样性和群落演替是AGS保持稳定且良好的污染物去除能力的主要原因。

3 结论

① 利巴韦林胁迫导致AGS稳定维持在更小粒径。AGS对利巴韦林的去除率随着AGS的形成逐渐由最初的61.9%升高至99%以上并维持稳定,AGS中通过生物吸附去除的利巴韦林比例相对较低,以生物降解为主。在利巴韦林胁迫下AGS工艺对COD、TN、TP和利巴韦林仍然具有良好的去除效果。

② EPS能够帮助AGS抵御利巴韦林的胁迫,TB-PN占总EPS的90%以上,有利于AGS内部致密结构的形成,提升AGS的沉降性能。利巴韦林胁迫刺激AGS培养前期微生物分泌EPS,AGS对利巴韦林的胁迫具有应激保护反应,过多分泌的EPS可能有利于形成保护微生物的网络结构并提高功能微生物间电子传递效率,进而提高对利巴韦林的生物降解效率。

③ C4-HSL、C6-HSL、3OC6-HSL和C8-HSL是AGS形成过程中最主要的AHLs。在利巴韦林胁迫下C8-HSL更多负责指导多糖类物质的合成,干扰或抑制TB-PN合成通路,C4-HSL与SMP-PS、LB-PS和LB-PN呈负相关,表明利巴韦林胁迫导致污泥中微生物的代谢途径发生了变化。

④ 利巴韦林胁迫对微生物群落结构具有较强的干扰作用,可促进信号分子合成菌*Acidovorax*、耐药菌*Acinetobacter*及*Delftia*等可分泌生物毒性因子的菌属的生长,增大系统的复杂性。胁迫与正常条件下AGS系统中微生物群落结构最终达到高度相似,表明微生物多样性和群落演替是AGS保持稳定且良好的污染物去除能力的主要原因。

参考文献:

[1] SHAKIL M H, MUNIM Z H, TASNIA M, *et al.*

COVID-19 and the environment: a critical review and research agenda[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 745: 141022.

[2] CASTILLO-ZACARÍAS C, BAROCIO M E, HIDALGO-VÁZQUEZ E, *et al.* Antidepressant drugs as emerging contaminants: occurrence in urban and non-urban waters and analytical methods for their detection [J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 757: 143722.

[3] CHEN X P, LEI L, LIU S T, *et al.* Occurrence and risk assessment of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) against COVID-19 in lakes and WWTP-river-estuary system in Wuhan, China [J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 792: 148352.

[4] MENG L, LI X, WANG S, *et al.* The long-term impact of cefalexin on organic substrate degradation and microbial community structure in EGSB system [J]. *Chemosphere*, 2017, 184: 215-223.

[5] KHAN M F, YU L, TAY J H, *et al.* Coaggregation of bacterial communities in aerobic granulation and its application on the biodegradation of sulfolane [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2019, 377: 206-214.

[6] WANG X, LI J, ZHANG X, *et al.* The performance of aerobic granular sludge for simulated swine wastewater treatment and the removal mechanism of tetracycline [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 408: 124762.

[7] 陆薇儿. 微生物胞外聚合物的膜污染机理研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2020.

LU Wei'er. Study on Membrane Fouling Mechanism of Extracellular Polymeric Substances[D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2020 (in Chinese).

[8] WANG L, YUAN L, LI Z, *et al.* Extracellular polymeric substances (EPS) associated extracellular antibiotic resistance genes in activated sludge along the AAO process: distribution and microbial secretors [J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 816: 151575.

[9] MELO A, COSTA J, QUINTELAS C, *et al.* Effect of ibuprofen on extracellular polymeric substances (EPS) production and composition, and assessment of microbial structure by quantitative image analysis [J]. *Journal of Environmental Management*, 2021, 293: 112852.

[10] CHEN H, LI A, CUI C, *et al.* AHL-mediated quorum sensing regulates the variations of microbial community and sludge properties of aerobic granular sludge under

- low organic loading [J]. *Environment International*, 2019, 130: 104946.
- [11] 支丽玲, 马鑫欣, 刘奇欣, 等. 好氧颗粒污泥形成过程中群感效应的作用研究[J]. *中国环境科学*, 2020, 40(5): 2148–2156.
- ZHI Liling, MA Xinxin, LIU Qixin, *et al.* Effect of quorum sensing in the formation of aerobic granular sludge [J]. *China Environmental Science*, 2020, 40(5): 2148–2156 (in Chinese).
- [12] ZHAO X, YU Z, DING T. Quorum-sensing regulation of antimicrobial resistance in bacteria [J]. *Microorganisms*, 2020, 8(3): 425.
- [13] PARK S, KIM H S, OK K, *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of 4-(alkyloxy)-6-methyl-2H-pyran-2-one derivatives as quorum sensing inhibitors [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2015, 25(15): 2913–2917.
- [14] ZHANG Z, YU Z, WANG Z, *et al.* Understanding of aerobic sludge granulation enhanced by sludge retention time in the aspect of quorum sensing [J]. *Bioresource Technology*, 2019, 272: 226–234.
- [15] 张小庆. 抗病毒药物利巴韦林在蛋鸡体内代谢产物探究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2017.
- ZHANG Xiaoqing. *Metabolic Study of Antiviral Drug Ribavirin in Laying Hens* [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2017 (in Chinese).
- [16] YU Z, ZHANG Y, ZHANG Z, *et al.* Enhancement of PPCPs removal by shaped microbial community of aerobic granular sludge under condition of low C/N ratio influent [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 394: 122583.
- [17] HE Q, XIE Z, FU Z, *et al.* Interaction and removal of oxytetracycline with aerobic granular sludge [J]. *Bioresource Technology*, 2021, 320: 124358.
- [18] OLIVEIRA A S, AMORIM C L, MESQUITA D P, *et al.* Increased extracellular polymeric substances production contributes for the robustness of aerobic granular sludge during long-term intermittent exposure to 2-fluorophenol in saline wastewater [J]. *Journal of Water Process Engineering*, 2021, 40: 101977.
- [19] SEVIOUR T, YUAN Z, VAN LOOSDRECHT M C M, *et al.* Aerobic sludge granulation: a tale of two polysaccharides? [J]. *Water Research*, 2012, 46(15): 4803–4813.
- [20] ZHANG Y, GENG J, MA H, *et al.* Characterization of microbial community and antibiotic resistance genes in activated sludge under tetracycline and sulfamethoxazole selection pressure [J]. *Science of the Total Environment*, 2016, 571: 479–486.
- [21] XU J, SHENG G. Microbial extracellular polymeric substances (EPS) acted as a potential reservoir in responding to high concentrations of sulfonamides shocks during biological wastewater treatment [J]. *Bioresource Technology*, 2020, 313: 123654.
- [22] XIAO Y, ZHANG E, ZHANG J, *et al.* Extracellular polymeric substances are transient media for microbial extracellular electron transfer [J]. *Science Advances*, 2017, 3(7): e1700623.
- [23] YE J, HU A, REN G, *et al.* Enhancing sludge methanogenesis with improved redox activity of extracellular polymeric substances by hematite in red mud [J]. *Water Research*, 2018, 134: 54–62.
- [24] XUE W, HAO T, MACKEY H R, *et al.* The role of sulfate in aerobic granular sludge process for emerging sulfate-laden wastewater treatment [J]. *Water Research*, 2017, 124: 513–520.
- [25] 王越. 丝状真菌(*Galactomyces*)对N-酰基高丝氨酸内酯的响应机制[D]. 长春: 东北师范大学, 2020.
- WANG Yue. *Response Mechanism of Filamentous Fungi Galactomyces to N-acyl-homoserine Lactone* [D]. Changchun: Northeast Normal University, 2020 (in Chinese).
- [26] 冯惠. 基于AHL的群体感应强化受微污染水中微生物去除氨氮及机制研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2017.
- FENG Hui. *Investigation of Enhanced Microbiological Removal of Ammonium Based on AHL Dependent Quorum Sensing from Slightly Polluted Water and Mechanisms* [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2017 (in Chinese).
- [27] LIU L, JI M, WANG F, *et al.* Insight into the short-term effect of fulvic acid on nitrogen removal performance and N-acylated-L-homoserine lactones (AHLs) release in the anammox system [J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 704: 135285.
- [28] JI Y, YU H, CAO R, *et al.* Promoting the granulation process of aerobic sludge via a sustainable strategy of effluent reflux in view of AHLs-mediated quorum sensing [J]. *Journal of Environmental Management*, 2022, 303: 114091.
- [29] MANGWANI N, KUMARI S, DAS S. Effect of synthetic N-acylhomoserine lactones on cell-cell

- interactions in marine *Pseudomonas* and biofilm mediated degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. Chemical Engineering Journal, 2016, 302: 172–186.
- [30] MA C, ZENG W, MENG Q, *et al.* Identification of partial denitrification granulation enhanced by low C/N ratio in the aspect of metabolomics and quorum sensing [J]. Chemosphere, 2022, 286(Pt 3): 131895.
- [31] 刘琳, 谭小娟, 贾爱群. 细菌群体感应与细菌生物被膜形成之间的关系[J]. 微生物学报, 2012, 52(3): 271–278.
- LIU Lin, TAN Xiaojuan, JIA Aiqun. Relationship between bacterial quorum sensing and biofilm formation—a review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(3): 271–278 (in Chinese).
- [32] MA H, WANG X, ZHANG Y, *et al.* The diversity, distribution and function of N-acyl-homoserine lactone (AHL) in industrial anaerobic granular sludge [J]. Bioresource Technology, 2018, 247: 116–124.
- [33] FENG X, GUO W, ZHENG H, *et al.* Inhibition of biofouling in membrane bioreactor by metabolic uncoupler based on controlling microorganisms accumulation and quorum sensing signals secretion [J]. Chemosphere, 2020, 245: 125363.
- [34] SZABÓ E, LIÉBANA R, HERMANSSON M, *et al.* Microbial population dynamics and ecosystem functions of anoxic/aerobic granular sludge in sequencing batch reactors operated at different organic loading rates [J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 770.
- [35] IORHEMEN O T, ZAGHLOUL M S, HAMZA R A, *et al.* Long-term aerobic granular sludge stability through anaerobic slow feeding, fixed feast-famine period ratio, and fixed SRT [J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2020, 8(2): 103681.
- [36] SALAMANCA D, BÜHLER K, ENGESSER K, *et al.* Whole-cell biocatalysis using the *Acidovorax* sp. CHX100 Δ 6HX for the production of ω -hydroxycarboxylic acids from cycloalkanes[J]. New Biotechnology, 2021, 60: 200–206.
- [37] KALUBA C K, SAMUTELA M T, KAPESA C, *et al.* Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species at a large tertiary referral hospital in Lusaka, Zambia [J]. Scientific African, 2021, 13: e00908.
- [38] SHELLY Y, KUK M, MENASHE O, *et al.* Nitrate removal from a nitrate-rich reverse osmosis concentrate: superior efficiency using the bioaugmentation of an *Acinetobacter* biofilm [J]. Journal of Water Process Engineering, 2021, 44: 102425.
- [39] SHAKIBAIE M, AMIRI-MOGHADAM P, GHAZANFARI M, *et al.* Cytotoxic and antioxidant activity of the biogenic bismuth nanoparticles produced by *Delftia* sp. SFG [J]. Materials Research Bulletin, 2018, 104: 155–163.
- [40] LI J, MA Z, GAO M, *et al.* Enhanced aerobic granulation at low temperature by stepwise increasing of salinity [J]. Science of the Total Environment, 2020, 722: 137660.
- [41] ZHANG Y, ZHENG X, XU X, *et al.* Straw return promoted the simultaneous elimination of sulfamethoxazole and related antibiotic resistance genes in the paddy soil [J]. Science of the Total Environment, 2022, 806: 150525.
- [42] VAN DER WERF M J, KEIJZER P M, VAN DER SCHAFT P H. *Xanthobacter* sp. C20 contains a novel bioconversion pathway for limonene [J]. Journal of biotechnology, 2001, 84(2): 133–143.
- [43] YI M, SHENG Q, LV Z, *et al.* Novel pathway and acetate-facilitated complete atenolol degradation by *Hydrogenophaga* sp. YM1 isolated from activated sludge [J]. Science of the Total Environment, 2022, 810: 152218.
- [44] WANG Q, HE J. Complete nitrogen removal via simultaneous nitrification and denitrification by a novel phosphate accumulating *Thauera* sp. strain SND5 [J]. Water Research, 2020, 185: 116300.

作者简介:刘奇欣(1996–),女,河北沧州人,硕士,研究方向为水污染控制工程。

E-mail: qixin_0314@163.com

收稿日期:2024-01-23

修回日期:2024-03-05

(编辑:刘贵春)