

DOI:10.19853/j.zgjsps.1000-4602.2025.03.011

盐度对硝化污泥系统去除抗生素过程中ARGs的影响

张欢欢¹, 韩乐迪¹, 郭宁^{1,2}, 赵学宇¹, 王琳^{1,2}, 张志斌¹

(1. 山东建筑大学 市政与环境工程学院, 山东 济南 250101; 2. 山东建筑大学 资源与环境创新研究院, 山东 济南 250101)

摘要: 硝化污泥工艺可以有效去除抗生素,然而盐度对硝化污泥系统去除抗生素过程中抗性基因(ARGs)的影响尚不清楚。为此,研究了不同盐度(0、0.5%、1.0%和2.0%)对硝化污泥系统去除磺胺嘧啶(SDZ)性能的影响,同时利用微生物学和统计学方法探究了盐度对ARGs的影响机理,并分析了不同盐度条件下系统的微生物群落结构变化。结果表明,高盐度通过抑制抗生素降解菌(氨氧化菌和异养菌)的活性而降低对抗生素的去除率,2.0%盐度下SDZ的去除率仅为42.3%。另外,盐度对ARGs的影响是水平基因转移和微生物群落变化共同作用的结果,提高盐度会促进ARGs的增殖。在低盐度(0.5%)时ARGs丰度最高,其中 $sul1$ 和 $sul2$ 的丰度分别为 3.79×10^{-4} 、 2.97×10^{-4} copies (以16S rRNA为标准)。

关键词: 硝化污泥; 抗生素; 盐度; 抗性基因; 微生物群落

中图分类号: TU992 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4602(2025)03-0072-06

Impact of Salinity on Antibiotic Resistance Genes during Antibiotics Removal in Nitrifying Sludge System

ZHANG Huan-huan¹, HAN Le-di¹, GUO Ning^{1,2}, ZHAO Xue-yu¹, WANG Lin^{1,2}, ZHANG Zhi-bin¹

(1. School of Municipal and Environment Engineering, Shandong Jianzhu University, Jinan 250101, China; 2. Resources and Environment Innovation Institute, Shandong Jianzhu University, Jinan 250101, China)

Abstract: The nitrifying sludge process has been shown to effectively eliminate antibiotics; however, the impact of salinity on the removal of antibiotic resistance genes (ARGs) within the nitrifying sludge system remains poorly understood. In this paper, the impact of varying salinities (0, 0.5%, 1.0%, and 2.0%) on the performance of the nitrifying sludge system in treating sulfadiazine (SDZ) wastewater was investigated. Concurrently, the impact mechanisms of salinity on ARGs were examined using microbiological and statistical methods, and the microbial community composition under different salinity conditions was characterized. High salinity significantly reduced the antibiotic removal efficiency by inhibiting the activity of antibiotic-degrading bacteria, including ammonia-oxidizing bacteria and heterotrophic bacteria. Specifically, at a salinity level of 2.0%, the removal efficiency of sulfadiazine (SDZ) was only 42.3%. Furthermore, the impact of salinity on ARGs was attributed to horizontal gene

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目(51708337); 山东建筑大学博士基金资助项目(XNBS1629)

通信作者: 王琳 E-mail: lynn04@126.com

transfer and alterations in microbial community composition. Elevated salinity was likely to promote the proliferation of ARGs. The highest abundance of ARGs was observed at a low salinity of 0.5%, with the abundances of *sul1* and *sul2* being 3.79×10^{-4} copies and 2.97×10^{-4} copies (Standardized with 16S rRNA), respectively.

Key words: nitrifying sludge; antibiotics; salinity; antibiotic resistance genes (ARGs); microbial community

近年来,抗生素被广泛应用于医疗和畜牧业,根据2000年—2018年的研究,全球抗生素消耗量增长了46%^[1],其中青霉素类、磺胺类和喹诺酮类等抗生素主要在发展中国家被广泛使用,2000年—2010年的使用量增长了36%^[2]。抗生素的滥用导致细菌产生耐药性,加剧了抗性基因(ARGs)在生态环境中的传播,对公众健康构成威胁^[3-4]。硝化污泥系统可以通过氨氧化微生物的共代谢作用有效去除多种药理活性化合物(PhACs),包括抗生素、雌激素、阿替洛尔等^[5]。氨氧化微生物以氨氧化细菌(AOB)为主,其分泌的一种非特异性酶(氨单加氧酶),可以将氨氧化成羟胺的同时有效降解抗生素^[6]。但是抗生素废水的条件经常发生波动,比如盐度、pH、温度等,而硝化污泥系统对抗生素的降解效果易受到这些因素的影响,进而影响ARGs的丰度。目前,在硝化污泥系统去除抗生素的过程中,关于盐度对ARGs影响的研究较少。为此,笔者以一种广泛使用的磺胺类抗生素磺胺嘧啶(SDZ)为研究对象,探究盐度对硝化污泥系统去除抗生素效能的影响,并分析不同盐度下系统中ARGs丰度以及微生物群落结构的变化。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验接种污泥取自济南光大水务小清河污水处理厂二沉池中的回流污泥。试验进水采用模拟废水,SDZ浓度为5.0 mg/L,其他组分如下:氯化铵为191 mg/L、磷酸氢二钾为58 mg/L、磷酸二氢钾为24 mg/L、二水合氯化钙为67 mg/L、结晶硫酸镁为42 mg/L、碳酸氢钠为1 000 mg/L。废水中加入微量元素溶液,以保证微生物正常生长,其组分如下:氯化铁为1 500 mg/L、硼酸为150 mg/L、五水合硫酸铜为30 mg/L、碘化钾为30 mg/L、四水合氯化锰为120 mg/L、二水合钼酸钠为60 mg/L、七水合硫酸锌为120 mg/L、六水合氯化钴为150 mg/L。

1.2 试验方法

1.2.1 污泥驯化

由于接种污泥中硝化细菌的含量和活性均较低,因此,试验开始时需要对其进行驯化,驯化总周期为30 d。试验装置如图1所示,采用圆柱形SBR反应器,有效容积为4 L,体积交换比为1:1。反应器为全自动运行,每个运行周期为6 h,其中进水30 min、曝气270 min、污泥沉降30 min、出水10 min、静置20 min,每天运行4个周期。

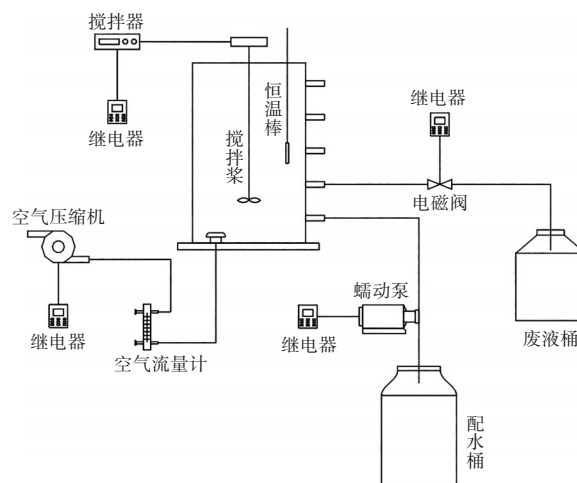


图1 试验装置

Fig.1 Schematic diagram of experimental setup

试验采用好氧曝气,并采取连续增加进水负荷的方法来驯化污泥,最终使得进水氨氮浓度控制在50 mg/L。驯化过程中需要对反应器进行定期排泥,以保证污泥浓度基本维持在4 000 mg/L。当系统出水水质稳定、 NH_4^+-N 基本被完全去除且无 NO_2^--N 积累时,表明硝化污泥驯化完成。

1.2.2 硝化污泥系统性能研究

试验设置4组平行的SBR反应器(S1~S4),将驯化完成后的污泥放至反应器中,并控制每个反应器的污泥浓度在4 000 mg/L左右。反应器的运行参数与污泥驯化阶段一致。通过控制NaCl的添加量使

反应器S1~S4的进水盐度分别为0、0.5%、1.0%、2.0%，反应器运行30 d，分别在第1、5、10、15、20、25、30天测定出水 NH_4^+-N 、 NO_3^--N 、 NO_2^--N 以及SDZ浓度，考察不同盐度下系统的硝化效果以及对SDZ的去除效果。其中， NH_4^+-N 、 NO_3^--N 、 NO_2^--N 浓度均采用国家标准方法进行测定，SDZ浓度采用高效液相色谱仪进行测定。

1.2.3 *amoA*、ARGs和微生物群落分析

已有研究证实，在氨存在的情况下，AOB的共代谢降解是去除SDZ的主要机制，亚硝酸盐氧化菌(NO_B)的贡献很小^[7-8]。*amoA*基因的表达量可以作为AOB活性的生物标志物^[9]，水平基因转移(HGT)和微生物群落是影响ARGs丰度的两个重要因素^[10]，因此在试验运行30 d后提取不同盐度反应器的污泥样本DNA进行q-PCR检测，探究每个阶段污泥中*amoA*基因、整合子基因(*intI1*，水平转移的指示性基因)、ARGs(*sul1*、*sul2*)和细菌的16S rRNA基因丰度的变化情况，并分析不同盐度条件下硝化污泥系统中微生物群落结构的变化。同时对ARGs、*intI1*和微生物群落丰度进行了Pearson相关性分析，确定ARGs丰度的变化机制。其中宿主菌的识别依据是相关性的显著性系数(*p*值)，当*p*<0.05时为显著相关，即认为该菌是ARGs的宿主菌^[11]。相关性分析由SPSS软件完成，微生物群落与ARGs的相关性热图由Origin软件完成。

2 结果与讨论

2.1 SDZ的去除

不同盐度条件下硝化污泥系统对SDZ的去除效果如图2所示。在无盐度条件下，在生物降解的最初10 d，反应器对SDZ的去除率呈升高趋势，并在第10天达到最佳去除效果，而后趋于稳定(平均去除率为93.37%)，这种现象与硝化污泥对抗生素的适应性有关。随着进水盐度的增加，硝化污泥系统对SDZ的去除率逐渐降低。当进水盐度分别为0.5%、1.0%和2.0%时，第10天时对SDZ的去除率分别为94.3%、71.2%和42.3%。此外，盐度由0.5%增加到2.0%时，出水SDZ浓度由0.276 mg/L增加到2.804 mg/L。该结果表明，长期暴露在盐度冲击负荷环境下，硝化污泥对抗生素的生物降解能力受到影响，降解能力随着盐度的增加而逐渐降低，这也说明在高盐度下微生物活性较低。

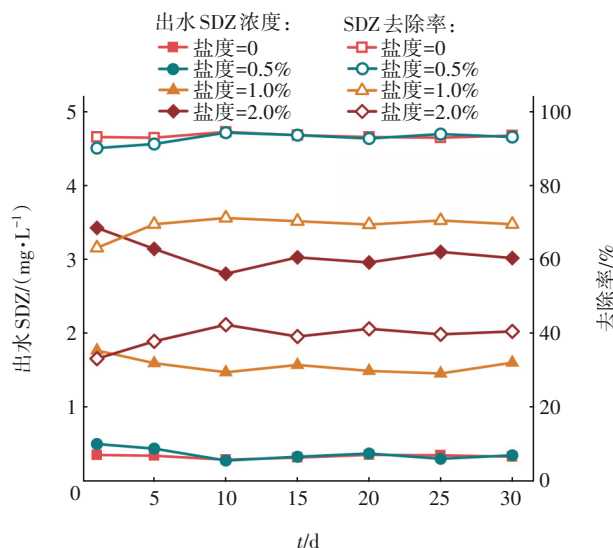
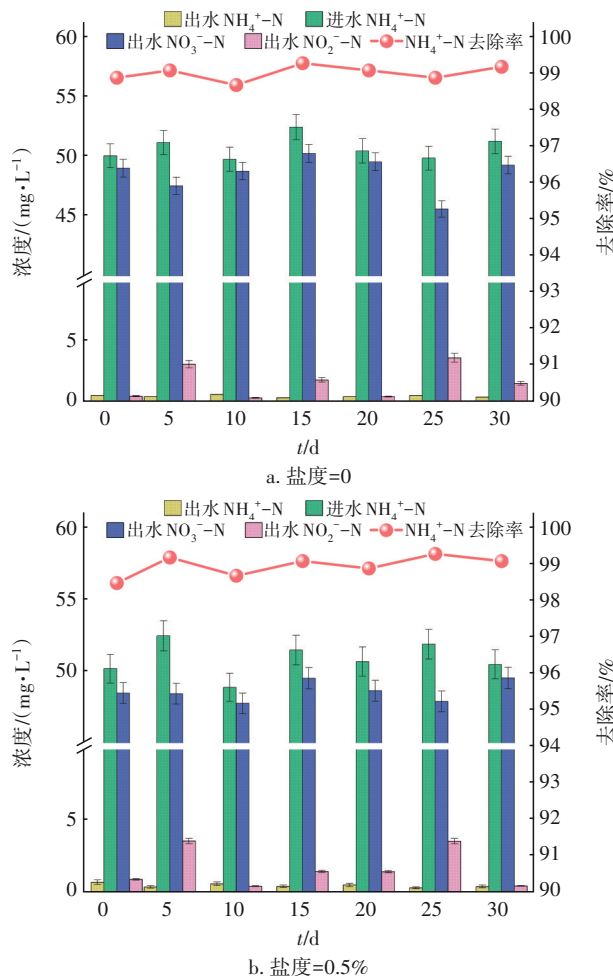


图2 不同盐度条件下硝化污泥系统对SDZ的去除效果

Fig.2 Removal efficiency of SDZ in nitrifying sludge system under different salinity conditions

2.2 盐度对硝化污泥系统性能的影响

不同盐度下硝化污泥系统的性能如图3所示。



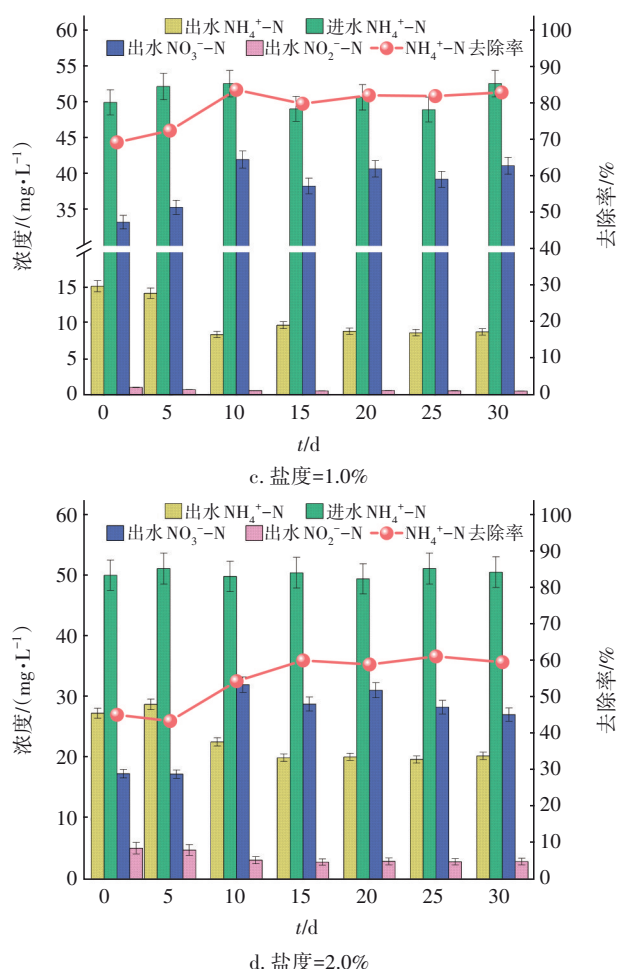


图3 不同盐度条件下硝化污泥系统的性能

Fig.3 Performance of nitrifying sludge system under different salinity conditions

在未添加NaCl的反应器S1中, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 能够被快速去除,平均去除率可达99%。当盐度由0.5%增加到1.0%时, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的平均去除率稍微降低(由98.97%降至82.06%),而当盐度增加到2.0%时, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的平均去除率急剧下降,仅为54.88%。该结果表明高盐度对反应器的硝化性能有显著影响,这是由于AOB对盐度敏感,在高盐环境中生长缓慢,氨氧化活性被抑制,从而导致 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除率降低。

在未添加NaCl的反应器S1中,大部分 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 转化为 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ (平均浓度为48.63 mg/L),几乎没有出现 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 的积累,说明系统硝化性能良好。而当进水盐度为1.0%和2.0%时, $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 浓度有所升高, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度降低,尤其是当盐度为2.0%时, $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 平均浓度增至3.63 mg/L,而 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 平均浓度仅为26.09 mg/L,这是由于在此盐度下AOB和

NOB活性均受到一定程度的抑制。综上所述,在较低盐度(0.5%)条件下硝化污泥系统的硝化性能较好,但是当盐度升高时(1.0%和2.0%),系统的硝化性能会受到不同程度的抑制。

2.3 盐度对硝化污泥系统中微生物群落的影响

2.3.1 *amoA* 基因的相对表达

amoA 基因的表达受到了盐度冲击的影响。*amoA* 基因的丰度在未投加NaCl的初始污泥中最高,为 6.45×10^{-6} copies(以16S rRNA为标准,下同)。投加NaCl之后,*amoA* 基因的丰度随着盐度的增加而逐渐降低,当盐度增至2.0%时其丰度最低,为 2.42×10^{-6} copies。这表明盐度对硝化污泥系统中*amoA* 基因的表达具有显著的抑制作用,盐度冲击负荷越大,系统内AOB活性受到的抑制作用也越大,这与高盐度下 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除率下降的结果一致。

2.3.2 属水平上的菌群变化

运行30 d后,不同盐度下硝化污泥系统中微生物菌群在属水平上的分布情况如图4所示。

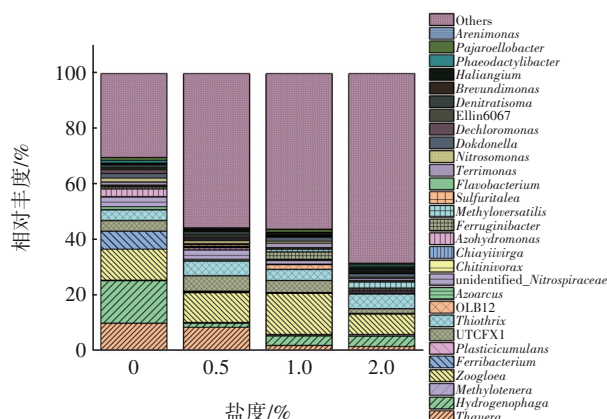


图4 硝化污泥系统中微生物菌群在属水平上的分布情况

Fig.4 Distribution of microbial communities in nitrification sludge system at genus level

从图4可以看出,随着进水盐度的增加,相对丰度排名前30之外的其他菌种丰度逐渐升高,说明盐度的冲击降低了物种分布的均匀程度。在硝化污泥系统中,AOB和异养菌均参与抗生素的去除过程^[12]。*Nitrospiraceae*作为常见的AOB,它所分泌的氨单加氧酶可以共代谢降解多种抗生素。图4显示,*unidentified_Nitrospiraceae*的相对丰度随盐度的升高而逐渐降低,这与*amoA* 基因的表达变化一致。除了AOB,多种异养菌也被检测到,如动胶菌属(*Zoogloea*)、氢噬胞菌属(*Hydrogenophaga*)和陶厄氏

菌属(*Thauera*)等。其中,*Zoogloea*、*Hydrogenophaga* 均具有降解有机物和有毒物质的能力^[13],*Thauera* 具有降解芳香族污染物的能力,因此它们对磺胺嘧啶也具有一定的生物降解作用^[14]。另外发现,*Zoogloea*、*Hydrogenophaga* 和 *Thauera* 的相对丰度在盐度为 2.0% 时大幅降低,这是由于高盐度会显著影响细菌的细胞结构和生理功能,并在一定程度上抑制其活性^[15]。综上,高盐度抑制了抗生素降解菌的活性,进而导致抗生素去除率降低。

2.4 盐度冲击下 ARGs 的变化

在硝化污泥系统中,ARGs 的传播机制仍不明确,盐度对 ARGs 的影响也有待研究。因此,本研究通过 4 个 SBR 反应器研究了不同盐度条件下 ARGs 的丰度,结果如图 5 所示。添加 NaCl 后,*sul1* 和 *sul2* 的丰度随着盐度的提高而逐渐降低,但均比无盐度条件下要高,其中,当盐度为 0.5% 时,各基因的丰度均达到最大值,*sul1* 和 *sul2* 的丰度分别为 3.79×10^{-4} 、 2.97×10^{-4} copies,这表明低盐度的冲击促进了 ARGs 的增殖。

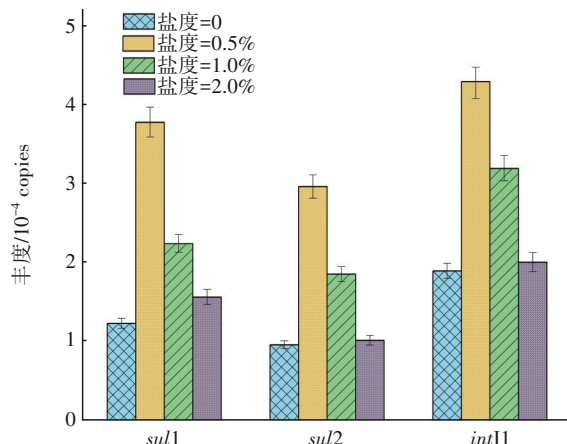


图5 不同盐度下 *sul1*、*sul2* 和 *int11* 基因的丰度

Fig.5 Abundance of *sul1*, *sul2* and *int11* genes under different salinity conditions

为了进一步确定 ARGs 的变化机制,对 *int11*、*sul1* 和 *sul2* 进行相关性分析,结果显示,*sul1*、*sul2* 与 *int11* 基因显著相关,表明水平基因转移促进了 ARGs 的传播。另外,对微生物群落和 *sul1*、*sul2* 进行了相关性分析,结果如图 6 所示(“*”表示在 $p < 0.05$ 水平上相关性显著)。可知,*Plasticicumulans*、*Sulfuritalea* 和 *Brevundimonas* 是 *sul1* 和 *sul2* 的宿主菌。因此,水平转移和微生物群落结构变化均会导致 ARGs 的变化,即 0.5% 盐度条件下较高的 *sul1*、

sul2 丰度一方面是由水平基因转移(较高的 *int11* 丰度)导致;另一方面,*Plasticicumulans*、*Sulfuritalea* 以及 *Brevundimonas* 在 0.5% 盐度下较高的丰度也使得 *sul1* 和 *sul2* 丰度升高。

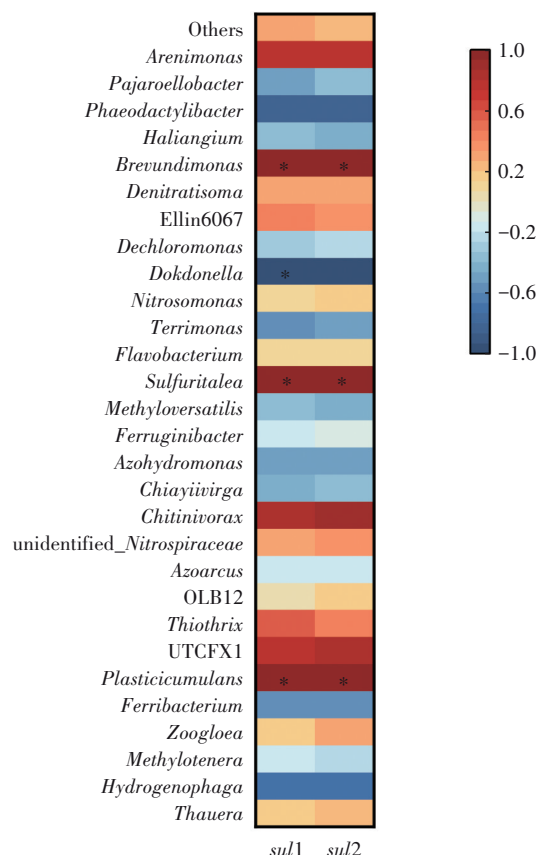


图6 属水平上微生物群落与 *sul1*、*sul2* 基因的相关性热图
Fig.6 Heat map of correlation between microbial groups and *sul1*, *sul2* genes

3 结论

① 无盐度时硝化污泥能够高效去除 SDZ,平均去除率可达 93.37%,而高盐度会抑制抗生素降解菌的活性,进而导致抗生素去除率降低。

② 较低盐度(0.5%)时硝化污泥系统的脱氮性能较好, NH_4^+ -N 去除率高达 99%。但是当盐度升高(1.0% 和 2.0%)时,AOB 和 NOB 活性受到抑制,系统的硝化效果降低。

③ NaCl 的投加促进了 ARGs 的增殖,在较低盐度(0.5%)时 ARGs 丰度最高,这是水平基因转移和微生物群落变化共同作用的结果。

参考文献:

[1] BROWNE A J,CHIPETA M G,HAINES-WOODHOUSE

- G, *et al.* Global antibiotic consumption and usage in humans, 2000–2018: a spatial modelling study[J]. *The Lancet Planetary Health*, 2021, 5(12): e893–e904.
- [2] THUNG I, ARAMIN H, VAVINSKAYA V, *et al.* Review article: the global emergence of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance[J]. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2016, 43(4): 514–533.
- [3] MCCONNELL M M, TRUELSTRUP HANSEN L, JAMIESON R C, *et al.* Removal of antibiotic resistance genes in two tertiary level municipal wastewater treatment plants[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 643: 292–300.
- [4] CHENG D, NGO H H, GUO W, *et al.* A critical review on antibiotics and hormones in swine wastewater: water pollution problems and control approaches [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 387: 121682.
- [5] NGUYEN P Y, CARVALHO G, REIS M, *et al.* A review of the biotransformations of priority pharmaceuticals in biological wastewater treatment processes[J]. *Water Research*, 2021, 188: 116446.
- [6] STADLER L B, LOVE N G. Impact of microbial physiology and microbial community structure on pharmaceutical fate driven by dissolved oxygen concentration in nitrifying bioreactors [J]. *Water Research*, 2016, 104: 189–199.
- [7] WANG B, NI B, YUAN Z, *et al.* Unravelling kinetic and microbial responses of enriched nitrifying sludge under long-term exposure of cephalexin and sulfadiazine [J]. *Water Research*, 2020, 173: 115592.
- [8] WANG B, NI B, YUAN Z, *et al.* Insight into the nitrification kinetics and microbial response of an enriched nitrifying sludge in the biodegradation of sulfadiazine [J]. *Environmental Pollution*, 2019, 255: 113160.
- [9] HELBLING D E, JOHNSON D R, HONTI M, *et al.* Micropollutant biotransformation kinetics associate with WWTP process parameters and microbial community characteristics[J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(19): 10579–10588.
- [10] GUO N, WANG Y, TONG T, *et al.* The fate of antibiotic resistance genes and their potential hosts during bio-electrochemical treatment of high-salinity pharmaceutical wastewater[J]. *Water Research*, 2018, 133: 79–86.
- [11] LI Z H, YUAN L, WANG L, *et al.* Coexistence of silver ion and tetracycline at environmentally relevant concentrations greatly enhanced antibiotic resistance gene development in activated sludge bioreactor [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 423: 127088.
- [12] MEN Y, ACHERMANN S, HELBLING D E, *et al.* Relative contribution of ammonia oxidizing bacteria and other members of nitrifying activated sludge communities to micropollutant biotransformation[J]. *Water Research*, 2017, 109: 217–226.
- [13] 安卫星,高娜,夏明,等. 动胶菌属系统分类、生理特征及其在活性污泥中的作用[J]. *应用与环境生物学报*, 2016, 22(6): 1167–1174.
AN Weixing, GAO Na, XIA Ming, *et al.* Physiological characteristics and systematic classification of the *Zoogloea* species and their role in the activated sludge [J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2016, 22(6): 1167–1174 (in Chinese).
- [14] 付垚. 抗生素压力下好氧颗粒污泥的培养及抗性基因归趋[D]. 济南: 山东大学, 2020.
FU Yao. Cultivation of Aerobic Granular Sludge and Fate of Antibiotic Resistance Genes under Antibiotics Pressures [D]. Jinan: Shandong University, 2020 (in Chinese).
- [15] LIU M, LI Q, SUN H, *et al.* Impact of salinity on antibiotic resistance genes in wastewater treatment bioreactors [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2018, 338: 557–563.

作者简介:张欢欢(1998–),女,河南周口人,硕士研究生,研究方向为水处理理论与技术。

E-mail:hhzhang1005@163.com

收稿日期:2023-09-07

修回日期:2024-01-17

(编辑:刘贵春)