

DOI:10.3880/j.issn.1004-6933.2023.02.029

改性植物单宁絮凝剂对污水中抗生素抗性基因的去除效果

侯俊^{1,2}, 刘佳林^{1,2}, 潘正国³, 杨梓俊^{1,2}, 吴森^{1,2},
尤国祥^{1,2}, 苗令占^{1,2}, 周晓伟^{1,2}, 许伊⁴

(1. 河海大学浅水湖泊综合治理与资源开发教育部重点实验室, 江苏 南京 210098; 2. 河海大学环境学院, 江苏 南京 210098;
3. 无锡德林海环保科技股份有限公司, 江苏 无锡 214091; 4. 河海大学农业科学与工程学院, 江苏 南京 210098)

摘要:采用二甲基二烯丙基氯化铵(DMDAAC)改性植物单宁絮凝剂(TGCC-A)对污水处理厂的二沉池出水进行絮凝处理,探究TGCC-A对污水中胞内抗生素抗性基因(iARGs)、胞外抗生素抗性基因(eARGs)的去除效果以及对后续污水储存过程中抗生素抗性基因(ARGs)丰度的影响。结果表明:9 mg/L TGCC-A和7 mg/L 聚合氯化铝对原水中8种胞内目标基因的平均对数去除量分别为 $10^{3.82}$ copies/mL、 $10^{3.92}$ copies/mL,胞外目标基因的平均对数去除量分别为 $10^{2.27}$ copies/mL、 $10^{2.89}$ copies/mL;两种絮凝剂絮凝处理后的水样中同种ARGs在胞外的丰度都大于其在胞内的丰度,且在后续5 d的储存过程中8种目标基因丰度基本保持在絮凝后的即时丰度;TGCC-A对污水处理厂二级出水中的ARGs具有良好的去除和控制效果。

关键词:改性植物单宁絮凝剂;抗生素抗性基因;絮凝处理;污水处理

中图分类号:X52 **文献标志码:**A **文章编号:**1004-6933(2023)02-0244-08

Removal effect of modified plant tannin flocculant on antibiotic resistance genes in sewage // HOU Jun^{1,2}, LIU Jialin^{1,2}, PAN Zhengguo³, YANG Zijun^{1,2}, WU Miao^{1,2}, YOU Guoxiang^{1,2}, MIAO Lingzhan^{1,2}, ZHOU Xiaowei^{1,2}, XU Yi⁴ (1. Key Laboratory of Integrated Regulation and Resources Development on Shallow Lakes of Ministry of Education, Hohai University, Nanjing 210098, China; 2. College of Environment, Hohai University, Nanjing 210098, China; 3. Wuxi Delin Hai Environmental Protection Technology Co., Ltd., Wuxi 214091, China; 4. College of Agricultural Science and Engineering, Hohai University, Nanjing 210098, China)

Abstract: The effluent from the secondary sedimentation tank of the sewage treatment plant was flocculated with the plant tannin flocculant (TGCC-A) modified by dimethyl diallyl ammonium chloride (DMDAAC). The removal effect of TGCC-A on intracellular antibiotic resistance genes (iARGs) and extracellular antibiotic resistance genes (eARGs) in sewage and the impact on ARGs abundance in subsequent sewage storage was investigated. The results show that the average log reduction of 8 intracellular target genes in raw water by 9 mg/L TGCC-A and 7 mg/L PAC are $10^{3.82}$ copies/mL and $10^{3.92}$ copies/mL, respectively, and the average log reduction of extracellular target genes were $10^{2.27}$ copies/mL, $10^{2.89}$ copies/mL, respectively. The abundance of the extracellular form of the same ARGs was greater than that of the intracellular form in the water samples treated by the two flocculants, and the abundance of 8 target genes basically remained at the immediate abundance after flocculation during the subsequent 5 days of storage. TGCC-A has good removal and control effect on ARGs in secondary effluent of sewage plant.

Key words: modified plant tannin flocculant; antibiotic resistance genes; flocculation treatment; sewage disposal

抗生素的广泛使用导致自然环境中存在多种抗生素^[1],高强度的环境抗生素选择压力诱导产生了抗生素抗性细菌(antibiotic resistance bacteria, ARB),甚至产生了能够耐受多种抗生素的多重耐

药细菌和超级细菌^[2],严重威胁了人体健康及生态安全。ARB是抗生素抗性基因(antibiotic resistance genes, ARGs)的携带者以及传播者。ARGs的体内表达使细菌以不同的抗性机制耐受临床治疗细菌感

基金项目:国家自然科学基金(52009031,42107386);江苏省水利科技项目(2021042);江苏省重点研发计划(BE2022834)

作者简介:侯俊(1979—),男,教授,博士,主要从事水环境保护与生态修复研究。E-mail: hjy_hj@hhu.edu.cn

染浓度的抗生素,导致抗生素失去治疗效力。早在2006年,ARGs就被认定为一种新型环境污染物^[3]。通常情况下,ARGs位于细菌的可移动基因元件(mobile genetic elements, MGEs)上,其能够通过水平基因转移(horizontal gene transfer, HGT)的方式在同菌种甚至跨菌种间增殖传播。针对目前环境中普遍存在的ARGs,已有大量研究开始探究对ARGs的控制和削减技术,如絮凝^[4]、膜滤^[5]、消毒^[6]、高级氧化^[7]等水处理工艺对水中ARGs的去除效果。

絮凝是一种去除污水中ARGs的简单、经济、高效的方式。目前广泛使用的无机絮凝剂主要为铝盐和铁盐类。已有研究表明,当无机高分子絮凝剂聚合氯化铝(PAC)的投加量为50.0 mg/L时,对颗粒附着的ARGs和游离的ARGs对数去除量分别为 $10^{4.67}$ copies/mL、 $10^{3.18}$ copies/mL^[8];合肥市某污水处理厂出水中磺胺类抗性基因和四环素类抗性基因的丰度分别在 $5.85 \times 10^4 \sim 9.18 \times 10^4$ copies/mL和 $1.27 \times 10^3 \sim 4.44 \times 10^4$ copies/mL范围内,经12 mg/L的聚合氯化铁(PFC)絮凝处理后原水中的*sulI*、*sulIII*、*tetO*、*tetQ*基因的对数去除量分别为 $10^{2.9}$ copies/mL、 $10^{2.3}$ copies/mL、 $10^{2.4}$ copies/mL、 $10^{2.9}$ copies/mL^[4]。然而,铝盐类产品残留的 Al^{3+} 会通过各种途径在人体内蓄积,导致人体出现诸如铝性脑病等中毒症状;铁盐类产品储存和稀释稳定性差,残留的铁离子具有一定的色度,影响水质和后续水体使用^[9-10]。

已有研究开发了许多环保型的絮凝剂,如微生物絮凝剂^[11]、壳聚糖基^[12]、淀粉基^[13]天然有机高分子絮凝剂等,这类絮凝剂具有原料来源广、成本低、无毒、易于生物降解等优点。改性植物单宁絮凝剂是一种以植物中天然存在的单宁为原料,经过改良其絮凝性能的方式制备的新型天然高分子絮凝剂。由于植物单宁的等电点较低(pH值为2.0~3.0),而水中的常见污染物如细菌等一般呈表面负电性,所以通常需要对其进行化学改性才能用于污水处理。比如通过曼尼希反应将氨基引入到植物单宁的化学结构,可合成具有黄酮类结构的改性植物单宁絮凝剂(Tanfloc)^[14]。改性之后植物单宁的等电点明显增加(pH值为7.0~8.0),絮凝能力显著提高,其在絮凝除藻^[15]、去除城市污水处理厂原水中的浊度、BOD₅、COD等污染物^[16]中的性能已被证实。已有研究利用Tanfloc对污水处理厂二级出水中的ARGs进行絮凝去除试验,发现*bla*_{TEM}、*qnrS*两种ARGs的平均对数去除量约为 10^1 copies/mL^[17]。此外,通过接枝共聚的方式使单宁季铵盐化,不仅提高了其阳离子度,使其絮凝性能更加优异,还能使其具有抗菌/抑菌性能^[18]。改性单宁絮凝剂作为一种

天然高分子有机絮凝剂,在水处理中具有广阔的应用前景,但其对ARGs的去除行为还鲜有研究。此外,现有的研究主要关注絮凝对ARGs的即时去除效率,忽略了后续的变化过程。因此,本试验采用一种新型改性植物单宁絮凝剂对抗性基因的“源”与“汇”^[19]—污水处理厂的二沉池出水进行絮凝处理,并与典型的无机絮凝剂PAC进行比较,探究絮凝对污水中ARGs的即时去除效果以及后续5 d内ARGs的丰度变化,为充分了解絮凝深度处理对出水及排放过程中抗性基因的变化规律提供参考。

1 材料与方法

1.1 水样采集与预处理

水样于2020年12月采集于南京市江宁区某生活污水处理厂,该厂采用A²O工艺。城市污水处理厂二级处理出水的污染物的种类、组成十分复杂^[20],常采用后续添加以混凝沉淀为强化手段的深度处理工艺^[21],使出水水质稳定、优化。采集二沉池水样,用25 L灭菌聚乙烯桶储存,在3 h内迅速运回实验室。在实验室使用纱布简单过滤水样中的树叶、树枝等杂质后,使用便携式水质分析仪检测水样的理化性质,后置于4℃冰箱保存,并尽快开始试验。供试水样的pH值为 7.2 ± 0.3 ,浊度为 (7.6 ± 1.5) NTU,电导率为 (703.0 ± 247.9) ms/cm, COD质量浓度为 (30.1 ± 0.9) mg/L。

1.2 絮凝试验

改性植物单宁絮凝剂TGCC-A由本实验室合成:取一定量的黑荆树单宁栲胶溶于去离子水,50℃加热搅拌分散30 min,分散完成后加入一定浓度的引发剂进行硝酸铈铵反应10 min,之后用恒压滴液漏斗逐滴加入二甲基二烯丙基氯化铵(DMDAAC),氩气保护条件下反应4 h,反应结束后,离心得到红色溶液即为产物。将产物用旋转蒸发器干燥至胶状后放入真空干燥箱干燥至恒重,研磨得到粉末状样品。根据组内已有研究结果^[22],改性后的植物单宁絮凝剂TGCC-A经傅立叶红外光谱(FIRT)、核磁共振氢谱(¹H NMR)、Zeta电位、电荷密度等手段表征后,证实DMDAAC成功接枝到单宁结构上。改性后的TGCC-A具有阳离子-N⁺(CH₃)₃基团,因此其在pH值为3~12的范围内表现出正Zeta电位,而未改性单宁溶液的等电点低至pH值为2.1。将TGCC-A和商业生产的PAC(国药集团试剂有限公司)分别配制成质量浓度为1 g/L的母液待用。

絮凝试验在六联搅拌器中进行。有研究表明,污水的浊度值与ARGs丰度显著相关^[23],因此首先以浊度为指标进行絮凝试验,探究浊度的最佳去除

投加量,随后探究该投加量下的絮凝剂对 ARGs 的去除效果。将 2 L 水样置于烧杯中,投加不同体积的絮凝剂。搅拌程序为 200 r/min 快速搅拌 3 min, 50 r/min 慢速搅拌 15 min,静置 30 min。随后用针管吸取液面下 2 cm 的上清液,用便携式浊度仪(HACH 2100Q)测量浊度,观察浊度变化。如表 1 所示,当 TGCC-A、PAC 的投加质量浓度分别为 9 mg/L、7 mg/L 时,水样浊度达到的最佳去除率分别为 82.7%、85.9%,故以该投加量分别进行去除 ARGs 的絮凝试验。

去除 ARGs 的絮凝试验步骤同上。静置 30 min 后,立即用 50 mL 针管将上层的 1 L 水样缓慢吸出,用于后续 DNA 的提取。将完成絮凝程序后的两组平行水样置于培养箱室温静置避光保存 5d,在第 3 天、第 5 天定时取上清水样和提取 DNA,同时设置不投加絮凝剂的空白对照组。本文中,TGCC-A 和 PAC 絮凝处理组样品分别用 A 组、P 组表示;N 表示未加絮凝剂的对照组样品;1、3、5 分别表示絮凝程序结束后即时、絮凝后水样保存第 3 天、第 5 天的样品;I、E 分别表示胞内抗生素抗性基因(iARGs)、胞外抗生素抗性基因(eARGs)。因此,试验编号 A-1-E 即表示 A 组絮凝程序结束后即时测量的 iARGs 处理组,以此类推。

1.3 DNA 分离与提取

为了探究絮凝过程中 iARGs 和 eARGs 的变化,使用 DNA 酶法^[24]分别提取 eDNA 和 iDNA。首先,将收集的 1 L 水样平均分配到两个 500 ml 烧杯中。其次,将一个烧杯中的水样通过无菌膜过滤(0.22 μm 孔径,PVDF, Osmonics, 美国),另一个烧杯中加入 500 单位的 DNase I (Worthington, 美国),然后在 25℃ 条件下振荡(100 rpm)孵育 2 h,水解水样中的 eDNA。为防止 DNase I 影响后续的 DNA 提取和分析,将该样品在 80℃ 下孵育 10 min,使 DNase I 失活,然后立即用 0.22 μm 无菌膜过滤,提取 DNA。最后,使用 PowerSoil © DNA 分离试剂盒从膜中提取 DNA。经过 DNA 酶处理的水样经膜过滤富集的细菌提取的 DNA 被视为仅来自胞内的 DNA,其与未经过 DNA 酶处理的水样中提取的基因丰度的差值被视为水解掉的胞外 DNA。

表 1 不同质量浓度的两种絮凝剂处理后污水浊度去除率

絮凝剂	去除率/%					
	1 mg/L	3 mg/L	5 mg/L	7 mg/L	9 mg/L	15 mg/L
TGCC-A	60.5 ± 2.5	65.4 ± 1.6	69.8 ± 0.9	75.9 ± 0.5	82.7 ± 1.6	76.7 ± 1.3
PAC	62.1 ± 1.9	75.6 ± 0.8	82.1 ± 1.1	85.9 ± 0.9	78.5 ± 1.7	67.3 ± 2.1

1.4 抗性基因荧光定量 PCR 检测

本文检测了 2 种常见的编码四环素耐药(*tetG*、*tetX*)、2 种大环内酯类耐药(*ermB*、*ermF*)、1 种磺胺类耐药(*sul1*) 基因,和 1 种 I 类整合子(*int11*)。此外,还检测了 1 种季铵化合物抗性基因(*qacEΔ1*),这些基因均与细菌对消毒剂和抗生素的常见耐药性有关^[25]。通过定量 16S rRNA (338F_806R) (简称 16S) 的基因拷贝数检测细菌总丰度的变化。将 ARGs 和移动元件的拷贝数归一化到 16S 基因的拷贝数,得到相对丰度,以尽量减少不同细菌丰度和不同 DNA 提取和定量效率所造成的差异。聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR) 试验由上海美吉生物科技有限公司完成,表 2 为 PCR 引物及扩增过程相关信息。

1.5 数据分析

所有试验均开展至少 3 个平行试验,所得结果以(平均值 ± 标准方差)的形式展示。采用独立样本 *t* 检验对两组间的平均基因丰度、平均对数去除量进行统计学分析。基因对数去除量的计算方法为

$$L_R = \lg C_{0j} - \lg C_j \tag{1}$$

式中: L_R 为基因对数去除量; C_{0j} 为目标基因 *j* 在处理前水样中的原始拷贝数,copies/mL; C_j 为目标基因 *j* 在絮凝后水样中的拷贝数,copies/mL。

2 结果与分析

2.1 絮凝前后 ARGs 绝对丰度的变化

图 1(a)为原水中 iARGs 的绝对丰度以及 A 组和 P 组絮凝处理前后的即时丰度变化。5 种 ARGs (*tetG*、*tetX*、*ermB*、*ermF*、*sul1*) 在原水中被检出,绝对丰度在 2.28×10^3 copies/mL (*tetX*, P 组) ~ 1.35×10^5 copies/mL (*sul1*, A 组) 范围内。原水中移动遗传元件 *int11* 丰度在 10^4 copies/mL 范围内。而 *qacEΔ1* 丰度高于 *int11*, 达到 8.05×10^4 copies/mL (A 组) ~ 5.63×10^5 copies/mL (P 组),这表明环境中存在很高的季铵盐抗性基因污染风险。*qacEΔ1* 是一种由质粒、整合子或者转座子等 MGEs 所介导的季铵盐类抗性基因,这些可移动遗传元件往往同时携带着其他 ARGs,这些基因通过 MGEs 在细菌

表 2 PCR 引物及扩增过程相关信息

Table 2 Information about the primers and amplification of PCR

目标基因	类型	引物	引物序列	退火温度/°C	扩增长度/bp
<i>tetG</i>	四环素类	tetG-F	GCTACATCCTGCTTGCCTTC	61.0	210
		tetG-R	CATAGATCGCCGTGAAGAGG		
<i>tetX</i>		tetX-F	CAATAATTGGTGGTGACCC	64.5	468
		tetX-R	TTCTTACCTTGGACATCCCG		
<i>ermB</i>	大环内酯类	ermB-F	GATACCGTTTACGAAATTGG	58.0	364
		ermB-R	GAATCGAGACTTGAGTGTGC		
<i>ermF</i>		ermF-F	CGACACAGCTTTGGTTGAAC	56.0	309
		ermF-R	GGACCTACCTCATAGACAAG		
<i>sul1</i>	磺胺类	sul1-F	CACCGGAAACATCGCTGCA	55.0	158
		sul1-R	AAGTCCGCCGCAAGGCT		
<i>intI1</i>	MGE	intI1-F	CTGGATTTCGATCAGGCACG	60.0	473
		intI1-R	ACATGCGTGTAATCATCGTCG		
16S	Biomass	16S-338F	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	55.0	460
		16S-806R	GGACTACHVGGGTWTCTAAT		
<i>qacEΔ1</i>	季铵盐类	qacEΔ1-F	AATCCATCCCTGTCGGTGTT	56.0	175
		qacEΔ1-R	CGCAGCGACTTCCACGATGGGGAT		

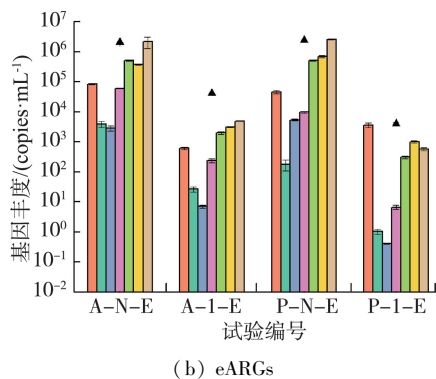
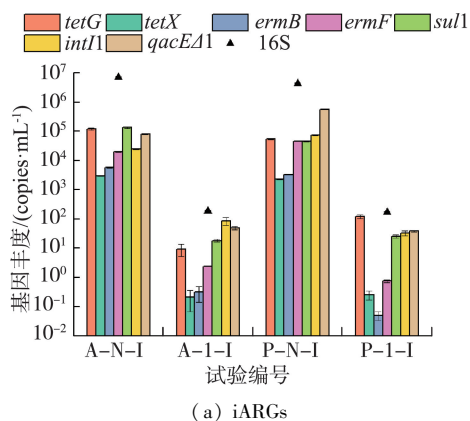


图 1 絮凝前后污水中 ARGs 绝对丰度的变化

Fig. 1 Absolute abundances of ARGs in wastewater before and after flocculation

之间传递,因此,*qacEΔ1* 基因和 ARGs 可同时表达,从而表现出共同耐药^[26]。作为环境中细菌丰度的指标,16S 基因丰度达 10^6 copies/mL。同时,发现 A 组原水的平均基因丰度与 P 处理组无显著差异,这证明两组试验所用的水样水质基本均匀。由图 1 (b) 可见,原水中 5 种 eARGs 的绝对丰度范围为 1.77×10^2 copies/mL (*tetX*, P 组) $\sim 5.04 \times 10^5$ (*sul1*,

P 组) copies/mL。胞外移动遗传元件 *intI1* 的丰度在 10^5 copies/mL 范围内,*qacEΔ1* 丰度高于 *intI1*,在 10^6 copies/mL 范围内。代表生物量的 16S 基因丰度也在 10^6 copies/mL 范围内,表明原水中存在高丰度的 eARGs,这可能与污水处理厂的前处理中存在大量的死细胞裂解产生或由活细胞分泌产生的、不易去除的胞外 DNA 有关。eARGs 一般以游离态和附着在颗粒物上的形态存在^[27-28],且吸附的 eARGs 比游离的 eARGs 更容易耦合到感受态细胞上^[29],引起水平基因转移。此外,eARGs 具有环境持久性和低衰减率^[30],这可能是一种重要的但被忽视的污染物来源,需要引起重视。

图 2 为絮凝前后污水中 ARGs 的对数去除量。当投加 9 mg/L 的 TGCC-A 后,原水中的 5 种 iARGs (*tetG*、*tetX*、*ermB*、*ermF*、*sul1*) 的绝对丰度降低至 $10^{-1} \sim 10^2$ copies/mL (图 1(a)),8 种胞内目标基因的平均对数去除量为 $10^{3.82}$ copies/mL,其中 *ermB* 的去除量最高,为 $10^{3.07}$ copies/mL,*intI1* 的去除量最低,为 $10^{2.09}$ copies/mL。代表生物量的 16S 基因丰度降低至 10^4 copies/mL,对数去除量为 $10^{2.50}$ copies/mL。当使用 7 mg/L 的 PAC 絮凝处理后,iARGs 绝对丰度降低至 $10^{-2} \sim 10^2$ copies/mL,8 种胞内目标基因的平均对数去除量为 $10^{3.92}$ copies/mL,其中 *ermB* 的去除量最高,为 $10^{4.28}$ copies/mL,*tetG* 的去除量最低,为 $10^{1.43}$ copies/mL。16S 基因丰度降低至 10^3 copies/mL,对数去除量为 $10^{3.20}$ copies/mL。独立样本 *t* 检验证明 TGCC-A 处理组和 PAC 处理组对 8 种胞内基因的平均去除量没有显著差异。有研究发现,20 mg/L 投加量下的 PAC 将二级出水中的 ARGs 有效降低了 $10^{1.85} \sim 10^{2.64}$ copies/mL,本试验同样证明絮凝是一

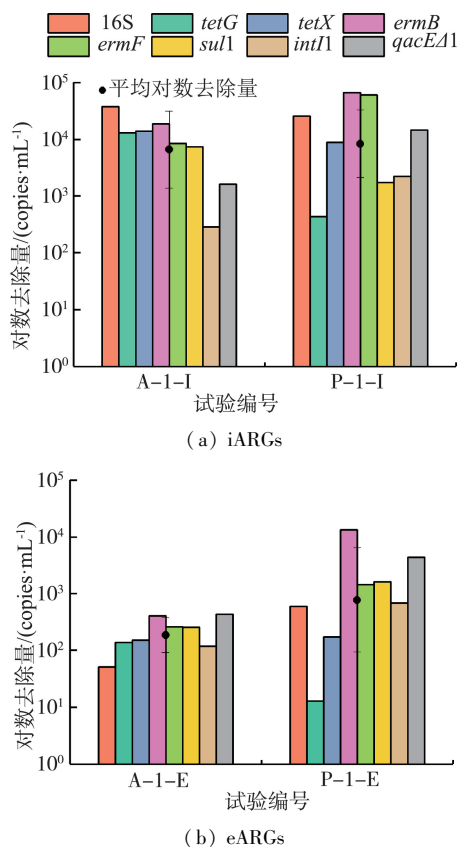


图2 絮凝前后污水中 ARGs 的对数去除量

Fig.2 Log reduction value of ARGs in wastewater before and after flocculation

种有效去除污水中 ARGs 的方法。图 2(b) 为两处理组对原水中 eARGs 的对数去除量。TGCC-A 处理后原水中的 5 种 eARGs 绝对丰度降低至 $10^0 \sim 10^3$ copies/mL, 对 8 种胞外目标基因的平均对数去除量为 $10^{2.27}$ copies/mL, 其中 *ermB* 的去除量最高, 为 $10^{2.61}$ copies/mL, *int11* 的去除量最低, 为 $10^{2.07}$ copies/mL。16S 基因丰度降低至 10^4 copies/mL, 去除量仅为 $10^{1.70}$ copies/mL。PAC 处理后, eARGs 绝对丰度降低至 $10^{-1} \sim 10^3$ copies/mL, 8 种胞外目标基因的平均对数去除量为 $10^{2.89}$ copies/mL, 其中 *ermB* 的去除量最高, 为 $10^{4.12}$ copies/mL, *tetG* 的去除量最低, 为 $10^{1.11}$ copies/mL。16S 基因丰度降低至 10^3 copies/mL, 对数去除量为 $10^{2.77}$ copies/mL。A 处理组和 P 处理组对 8 种胞外目标基因的平均对数去除量同样不存在显著差异。通过比较发现, TGCC-A 对 eARGs 的总体去除效果小于 PAC, 且两者对 eARGs 的去除效果都小于 iARGs。

混凝法对于抗性基因的去除取决于混凝剂对胞外 DNA 以及对胞内抗性基因的宿主(如细菌)的电中和、吸附、网捕等作用。污水中的 eARGs 和携带 iARGs 的微生物等在混凝作用下沉降, 使得上清液中的 ARGs 总量减少, 基因的检出率随之变低。本研究发现, 两种絮凝剂对于同种基因的胞外形式的

去除效果都小于胞内形式, 但对于不同种类的基因的去 除效果却没有显著的规律可言。这是合理的, 因为 DNA 是一种小分子物质, 胞外 DNA 通常游离存在, 或者附着在颗粒物上, 而 iARGs 通常存在于微生物细胞内, 这使得 iARGs、eARGs 的存在形式具有粒径分级的特点。有研究发现, 与颗粒附着的 ARGs 相比, 需要更大的混凝剂剂量来去除游离的 ARGs, 说明 iARGs 相比 eARGs 更容易被去除^[8]。混凝对于不同抗性基因的去 除作用的差异可能与抗性基因本身和存在的复杂性、宿主微生物种类的多样性有关, 需要更深入的研究。综上, TGCC-A 与 PAC 对污水中的 ARGs 都有着良好的去除效果, 两种絮凝剂对于去除 iARGs 更有效, 而 eARGs 可能需要后续通过膜滤等更有针对性的方式去除。

2.2 絮凝前后 ARGs 相对丰度的变化

一般情况下, 16S 基因是用来表征环境中细菌丰度的指标, 也可以利用其丰度对 ARGs 的丰度进行标准化处理, 以表示单个细菌中 ARGs 的数量, 称为 ARGs 的相对丰度。因此, 本文定义 iARGs 与胞内 16S 的比值、eARGs 与胞外 16S 的比值分别表示 iARGs 的相对丰度和 eARGs 的相对丰度。理论上来说, iARGs 具有接合转移的潜力, eARGs 具有转化的潜力, 因此两者的相对丰度既表明了单个细菌中 ARGs 的相对含量, 又在某种程度上与水平基因转移的潜力正相关。

图 3 为絮凝前后 iARGs、eARGs 的相对丰度变化。由图 3(a) 可见, 在 A 和 P 组的原水中, 5 种 iARGs(*tetG*、*tetX*、*ermB*、*ermF*、*sul1*) 的相对丰度分布相似, 最高为 *sul1* (1.87×10^{-2} , A 组), 最低为 *tetX* (4.13×10^{-4} , A 组)。A 组中, 原水中的 7 种(*tetG*、*tetX*、*ermB*、*ermF*、*sul1*、*int11*、*qacEΔ1*) 胞内基因相对丰度均值与处理后没有显著差异, 但可以观察到 *sul1*、*int11*、*qacEΔ1* 的胞内相对丰度上升, *sul1* 从 1.87×10^{-2} 上升至 9.44×10^{-2} , *int11* 从 3.41×10^{-3} 上升至 4.51×10^{-1} , *qacEΔ1* 从 1.12×10^{-2} 上升至 2.57×10^{-1} 。P 组中也观察到类似的情况, *sul1* 从 1.01×10^{-2} 上升至 1.49×10^{-1} , *int11* 从 1.64×10^{-2} 上升至 1.89×10^{-1} , *qacEΔ1* 从 1.27×10^{-1} 上升至 2.26×10^{-1} 。有研究基于宏基因组序列的组装技术得到的重叠群中发现了 *sul1* 和 *int11* 的共存模式, 同时也在该重叠群中发现了 *aadA*、*tetA* 和 *qacEΔ1* 基因的共现性^[19]。因此, 这很好地解释了絮凝对于 *sul1*、*int11*、*qacEΔ1* 这 3 种基因的共去除行为。同时, 絮凝后部分基因的相对丰度升高可能预示着污水中水平基因转移的风险提高。由图 3(b) 可见, TGCC-A 絮凝处理后 7 种胞外目标基因的相对丰度

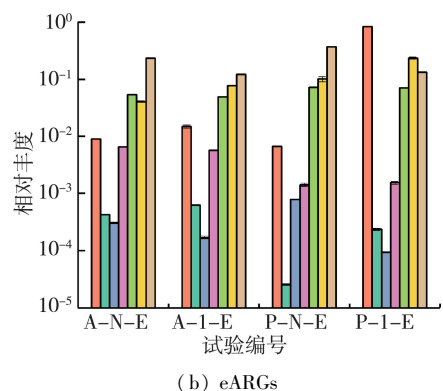
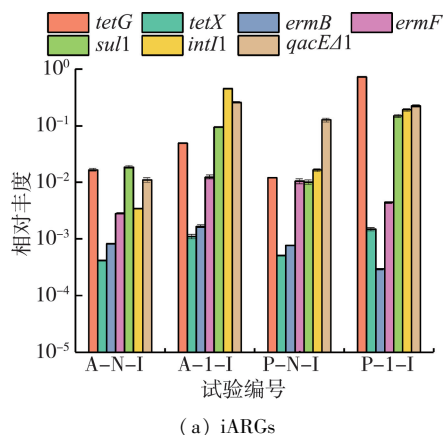


图3 絮凝前后污水中 ARGs 相对丰度

Fig.3 Relative abundances of ARGs in wastewater before and after flocculation

与原水中并无显著差异,而经 PAC 絮凝处理后,*tetG* 的相对丰度由 6.72×10^{-3} 显著上升至 8.33×10^{-1} ,其余 6 种胞外基因的相对丰度则未发生显著变化,这再次体现了絮凝对于 eARGs 的去除性能小于 iARGs 的特点。絮凝过程中部分 ARGs 的相对丰度升高可能是由于絮凝过程中细胞裂解,导致部分胞内 ARGs 释放到胞外引起的,需要进一步研究。

2.3 絮凝前后胞内、胞外 ARGs 的分布比例

图 4 为不同处理组 8 种基因胞内、胞外 ARGs 的分布比例。A 组的原水中,16S、*tetG*、*ermB* 的胞内基因占比分别为 77.41%、59.07%、67.33%,大于其胞外基因占比。而剩余的 5 种基因的胞外基因占比大于胞内,尤其是 *sul1*、*int11* 和 *qacEΔ1* 这 3 种基因,胞外基因占比分别达到了 78.89%、93.88% 和 96.42%。这与 2.2 节中分析的结论一致,即 *sul1*、*qacEΔ1* 与 *int11* 显著相关,而 *int11* 通常以游离态存在且常在胞外分布。经过 TGCC-A 絮凝处理后,16S、*tetG*、*ermB* 的胞内基因比例显著下降至 0.47%、1.51%、4.38%,*tetX*、*ermF*、*sul1*、*int11*、*qacEΔ1* 这 5 种基因经絮凝处理后也呈现胞内基因分布比例小于胞外的情况,分别为 0.81%、1.02%、0.90%、2.67%、0.99%。这充分表明 TGCC-A 主要去除了

与细菌结合的 iARGs,从而大大降低了 iARGs 的占比。P 组的原水中,16S、*tetG*、*tetX*、*ermF* 的胞内基因占比大于它们的胞外基因,分别为 64.24%、52.83%、92.80%、82.70%,而 *sul1*、*qacEΔ1*、*int11* 这 3 种基因的胞外基因占比显著高于胞内,分别达 91.76%、90.54%、81.95%。经 PAC 絮凝处理后,P 组也呈现与 A 组相似的情况,即 8 种胞外基因占比远大于胞内基因。这表明混凝后 eARGs 含量占主导地位,大部分 iARG 被完全去除,且 PAC 与 TGCC-A 一样,对 iARGs 的去除更具优势。以上数据说明原水中部分 iARGs 和 16S 基因的含量要高于胞外,而经过两种絮凝剂处理后,无一例外显示出 iARGs 被显著去除,絮凝后的水样中呈现 eARGs 占比大于 iARGs 的现象。该结果表明,加强对 eARGs 丰度的控制才能有效降低二沉池出水中 ARGs 传播与转移的风险。

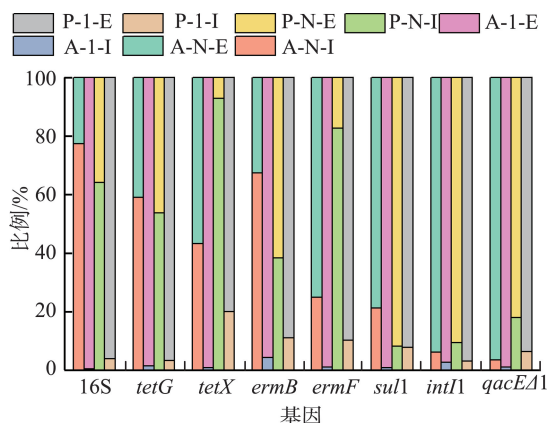


图4 不同处理组 8 种 ARGs 的胞内、胞外分布比例

Fig.4 Distribution ratio of extracellular and intracellular genes of 8 ARGs in different treatment groups

2.4 絮凝后的储存过程中 ARGs 的变化

将絮凝后的水样置于培养箱室温 (25℃) 静置避光储存,在絮凝过程结束后即时、第 3 天、第 5 天检测保存后水体中的 iARGs、eARGs 的绝对丰度的变化,分析污水处理厂出水保存及排放过程中 ARGs 的变化。图 5 采用热图的形式,将 8 种基因丰度使用 Z 分数归一化,得到 8 种基因在即时、第 3 天、第 5 天的丰度变化的可视化结果。由图 5(a) 可见,TGCC-A 处理组中原水的 5 种 iARGs 在 5 d 的保存时间内丰度逐渐降低,这可能是由于携带 iARGs 的微生物随着时间的推移在重力作用下自然沉降导致的。而 TGCC-A 絮凝处理后的水样中基因丰度在 5 d 的保存时间内无明显变化。有研究发现,改性单宁絮凝剂 Tanfloc 对蓝藻细胞的去除具有长达 8 d 的保存作用,并且能控制絮体中蓝藻的胞内物质的释放^[31]。这表明 TGCC-A 对于 ARGs 去除效果的维

持可能来自 TGCC-A 形成的絮体,其阻碍了 iARGs 的释放。图 5(a)中原水对照组的 eARGs 在絮凝 5 d 的保存过程中的变化情况不同于 iARGs: *sul1*、*qacEΔ1* 和 *intI1* 3 种基因在第 5 天的丰度显著升高, 16S rRNA、*tetG* 丰度也略有上升,其他 3 种基因最终呈现下降的趋势。这表明原水中部分 eARGs 尤其是 MGEs 在长期储存过程中会不断释放,而 iARGs 则大多自然沉降,提示污水处理厂二沉池静置出水的过程中可能存在 eARGs 丰度增加的风险。对于 TGCC-A 絮凝处理后的原水,其上清液中的 eARGs 在保存 5d 后并没有呈现出明显的再生情况,表明 TGCC-A 对絮凝后 eARGs 的释放也有很好的控制作用。由图 5(b)可见,PAC 絮凝剂对胞内、胞外基因的控制情况。P 组原水中 iARGs 丰度在 5 d 的保存过程中总体上呈现降低趋势,而除了 *tetG* 以外的 eARGs 却与 A 组原水不同,呈现先增加后减少的趋势,这可能是由于不同基因的宿主细菌差异导致的,需要进一步的研究。同 TGCC-A 一样,PAC 絮凝剂对二沉池出水保存过程中 iARGs、eARGs 的再生情况也呈现出较好的抑制作用,其基因丰度在 5 d 内基本保持在絮凝过程结束后的水平。

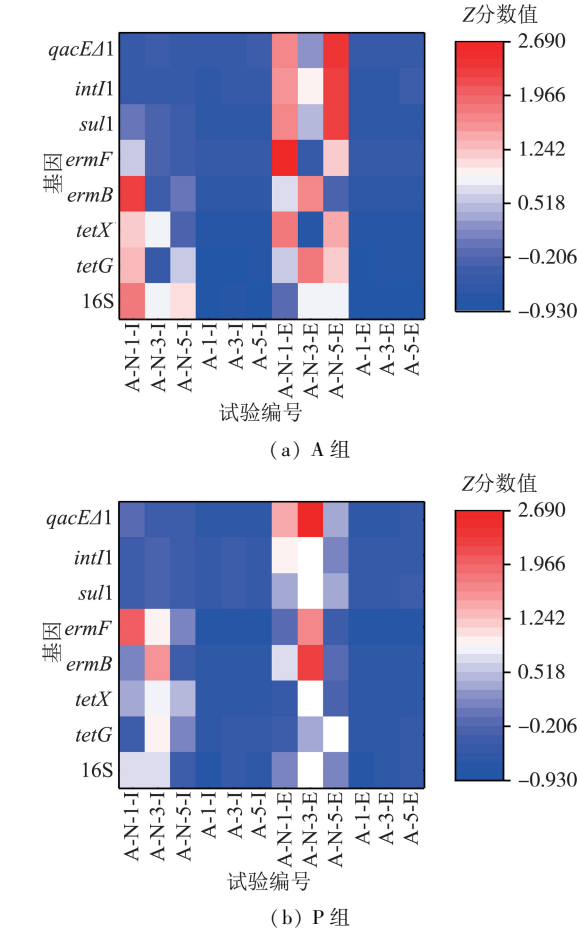


图 5 絮凝保存过程中胞内、胞外基因的绝对丰度变化
Fig. 5 Changes in the absolute abundance of intracellular and extracellular genes during flocculation and preservation

综上,本研究中采用的天然有机高分子絮凝剂 TGCC-A 与无机高分子絮凝剂 PAC 具有相似的 ARGs 去除和控制效果。因此,可对两种絮凝剂在饮用水处理或污水处理应用中可能造成的环境影响进行了合理展望:PAC 絮凝后的出水中可能存在铝离子超标的风险^[32],而 TGCC-A 絮凝剂则不存在这一风险;除了在处理后的水中产生残留物外,PAC 絮凝后会产生低或无生物降解性和毒性效应的污泥^[33],造成二次固体污染,而 TGCC-A 具有良好的生物降解性能,这使得污泥处理更加方便,成本更低^[34];季铵盐改性的单宁絮凝剂 TGCC-A 可能具有抗菌特性,有助于控制饮用水生产中引起感染和水媒疾病的致病微生物,而 PAC 则无抗菌效果。以上推测需要进一步的探究。

3 结 论

a. 在 9 mg/L TGCC-A 和 7 mg/L PAC 的投加量下,污水处理厂二沉池出水中浊度去除率最高分别为 82.7%、85.9%,以此投加量对原水中的 ARGs 进行絮凝去除试验,发现原水中 5 种 ARGs、1 种季铵盐抗性基因、1 种移动遗传元件均被检测出;两种絮凝剂对原水中 8 种胞内目标基因的对数去除量分别在 $10^{2.09} \sim 10^{3.07}$ copies/mL、 $10^{1.43} \sim 10^{4.28}$ copies/mL 范围内,对 8 种胞外目标基因的对数去除量分别在 $10^{2.07} \sim 10^{2.61}$ copies/mL、 $10^{1.11} \sim 10^{4.12}$ copies/mL 范围内;*sul1*、*intI1*、*qacEΔ1* 3 种基因在絮凝过程中表现出相似的去除效果。试验证明 TGCC-A、PAC 均能有效絮凝去除污水中的 iARGs、eARGs。

b. 在 TGCC-A、PAC 絮凝处理后水体的 5 d 保存过程中,目标基因丰度基本保持在絮凝后的即时丰度,没有回升;而原水中部分 eARGs,尤其是 *intI1*,在长期保存过程中丰度会有所增加,表明污水处理厂二沉池静置出水的过程中可能存在 eARGs 增加的风险。

c. TGCC-A 与 PAC 相比具有相似的 ARGs 去除效果,但 PAC 絮凝后会造成二次固体污染,而 TGCC-A 具有良好的生物降解性能,在考虑到环境影响、综合利用率的情况下,TGCC-A 是更好的选择。

参考文献:

[1] 胡冠九,陈素兰,穆肃,等. 江苏省某市典型饮用水水源中抗生素质量浓度特征[J]. 水资源保护,2016,32(3):84-88. (HU Guanjiu, CHEN Sulan, MU Su, et al. Characteristics of concentrations of antibiotics in typical drinking water sources in a city in Jiangsu Province[J].

- Water Resources Protection, 2016, 32 (3): 84-88. (in Chinese))
- [2] VIKESLAND P J, PRUDEN A, ALVAREZ P J J, et al. Toward a comprehensive strategy to mitigate dissemination of environmental sources of antibiotic resistance [J]. Environmental Science & Technology, 2017, 51 (22): 13061-13069.
- [3] LIAO H, LU X, RENSING C, et al. Hyperthermophilic composting accelerates the removal of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in sewage sludge [J]. Environmental Science & Technology, 2018, 52 (1): 266-276.
- [4] LI N, SHENG G, LU Y, et al. Removal of antibiotic resistance genes from wastewater treatment plant effluent by coagulation [J]. Water Research, 2017, 111: 204-212.
- [6] REN S, BOO C, GUO N, et al. Photocatalytic reactive ultrafiltration membrane for removal of antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes from wastewater effluent [J]. Environmental Science & Technology, 2018, 52 (15): 8666-8673.
- [6] LIU S, QU H, YANG D, et al. Chlorine disinfection increases both intracellular and extracellular antibiotic resistance genes in a full-scale wastewater treatment plant [J]. Water Research, 2018, 136: 131-136.
- [7] MICHAEL- KORDATOU I, KARAOLIA P, FATTA-KASSINOS D. The role of operating parameters and oxidative damage mechanisms of advanced chemical oxidation processes in the combat against antibiotic-resistant bacteria and resistance genes present in urban wastewater [J]. Water Research, 2018, 129: 208-230.
- [8] YU K, LI P, LI H, et al. Potential of coagulation to remove particle-associated and free-living antibiotic resistome from wastewater [J]. Journal of Hazardous Materials, 2021, 406: 124295.
- [9] 宋力. 絮凝剂在水处理中的应用与展望 [J]. 工业水处理, 2010, 30 (6): 4-7. (SONG Li. Application of flocculants to water treatment and its forecast [J]. Industrial Water Treatment, 2010, 30 (6): 4-7. (in Chinese))
- [10] 郑怀礼, 刘克万. 无机高分子复合絮凝剂的研究进展及发展趋势 [J]. 水处理技术, 2004 (6): 315-319. (ZHENG Huaili, LIU Kewan. Research progress and development trend of inorganic polymer composite flocculants [J]. Echnology of Water Treatment, 2004 (6): 315-319. (in Chinese))
- [11] 万俊杰, 梁耀开, 邓毛程. A3 菌产絮凝剂培养动力学及靛蓝废水脱色研究 [J]. 水资源保护, 2011, 27 (2): 67-69. (WAN Junjie, LIANG Yaokai, DENG Maocheng. Study on flocculant culture kinetics of A3 bacteria and decolorization of indigo wastewater [J]. Water Resources Protection, 2011, 27 (2): 67-69. (in Chinese))
- [12] 曾德芳, 余刚, 张彭义, 等. 天然有机高分子絮凝剂壳聚糖制备工艺的改进 [J]. 环境科学, 2001 (3): 123-125. (ZENG Defang, YU Gang, ZHANG Pengyi, et al. Improvement of preparation technology of natural organic polymer flocculant chitosa [J]. Environmental Science, 2001 (3): 123-125. (in Chinese))
- [13] 许映军, 丁永生, 公维民, 等. 新型天然有机高分子阳离子改性絮凝剂的制备 [J]. 应用化学, 2004 (5): 498-501. (XU Yinghui, DING Yongsheng, GONG Weimin, et al. Preparation of new natural organic macromolecule cationic modified flocculant [J]. Chinese Journal of Applied Chemistry, 2004 (5): 498-501. (in Chinese))
- [14] 於昌峰, 顾扣泉, 周涛, 等. 改性植物单宁对铜绿微囊藻的去除效果与机理 [J]. 水资源保护, 2022, 38 (2): 197-202. (YU Changfeng, GU Kouquan, ZHOU Tao, et al. Removal effect and mechanism of modified tannin on Microcystis aeruginosa [J]. Water Resources Protection, 2022, 38 (2): 197-202. (in Chinese))
- [15] GUTIERREZ R, PASSOS F, FERRER I, et al. Harvesting microalgae from wastewater treatment systems with natural flocculants: effect on biomass settling and biogas production [J]. Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts, 2015, 9: 204-211.
- [16] BELTRAN-HEREDIA J, SANCHEZ-MARTIN J. Municipal wastewater treatment by modified tannin flocculant agent [J]. Desalination, 2009, 249 (1): 353-358.
- [17] GREHS B W N, LOPES A R, MOREIRA N F F, et al. Removal of microorganisms and antibiotic resistance genes from treated urban wastewater: a comparison between aluminium sulphate and tannin coagulants [J]. Water Research, 2019, 166: 115056.
- [18] FABRES R B, DA LUZ R B, SOLIMAN M C, et al. Evaluation of virus recovery methods and efficiency of tannin-derived coagulants in removing total coliforms, E-coli and enteric viruses in effluents of a domestic sewage treatment plant [J]. Water Science and Technology, 2017, 76 (8): 2195-2202.
- [19] GARNER E, CHEN C, XIA K, et al. Metagenomic characterization of antibiotic resistance genes in full-scale reclaimed water distribution systems and corresponding potable systems [J]. Environmental Science & Technology, 2018, 52 (11): 6113-6125.
- [20] 王树涛, 王虹, 马军, 等. 我国北方城市污水处理厂二级处理出水的水质特性 [J]. 环境科学, 2009, 30 (4): 1099-1104. (WANG Shutao, WANG Hong, MA Jun, et al. Analysis of the secondary effluent of municipal wastewater in north China [J]. Environmental Science, 2009, 30 (4): 1099-1104. (in Chinese))

- Zhiyu, et al. Thoughts on key technologies of flood prevention and emergency management in small and medium sized rivers [J]. Journal of Hohai University (Natural Sciences), 2021, 49(1): 13-18. (in Chinese))
- [25] 李蓓,李勇涛,蔡梅. 基于数据挖掘的太湖蓝藻生长水环境关键因子研究[J]. 河海大学学报(自然科学版), 2020, 48(6): 506-513. (LI Bei, LI Yongtao, CAI Mei. Research on key factors of water environment for cyanobacteria growth in Taihu Lake based on data mining [J]. Journal of Hohai University (Natural Sciences), 2020, 48(6): 506-513. (in Chinese))
- +++++
- (上接第 251 页)
- [21] 郑兴灿,尚巍,孙永利,等. 城镇污水处理厂一级 A 稳定达标的工艺流程分析与建议[J]. 给水排水, 2009, 45(5): 24-28. (ZHENG Xingchan, SHANG Wei, SUN Yongli, et al. Analysis and suggestions on the process flow of grade a stable standard of urban sewage treatment plant [J]. Water & Wastewater Engineering, 2009, 45(5): 24-28. (in Chinese))
- [22] YANG Z, HOU J, WU M, et al. A novel co-graft tannin-based flocculant for the mitigation of harmful algal blooms (HABs): the effect of charge density and molecular weight [J]. Science of the Total Environment, 2022, 806: 150518.
- [23] NNADOZIE C F, KUMARI S, BUX F. Status of pathogens, antibiotic resistance genes and antibiotic residues in wastewater treatment systems [J]. Reviews in Environmental Science and Bio-Technology, 2017, 16(3): 491-515.
- [24] ZHANG H, ZHANG M, YUAN L, et al. Synergistic effect of permanganate and in situ synthesized hydrated manganese oxide for removing antibiotic resistance genes from wastewater treatment plant effluent [J]. Environmental Science & Technology, 2019, 53(22): 13374-13381.
- [25] LUO Y, LAI Y S, ZHENG C, et al. Increased expression of antibiotic-resistance genes in biofilm communities upon exposure to cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) and other stress conditions [J]. Science of the Total Environment, 2021, 765: 144264.
- [26] MOURA A, PEREIRA C, HENRIQUES I, et al. Novel gene cassettes and integrons in antibiotic-resistant bacteria isolated from urban wastewaters [J]. Research in Microbiology, 2012, 163(2): 92-100.
- [27] 庄耀,任洪强,耿金菊,等. 混凝法去除城市生活污水中抗性基因[J]. 环境工程学报, 2014, 8(12): 5105-5110. (ZHUANG Yao, REN Hongqiang, GENG Jinju, et al. Removal of antibiotic resistant genes in municipal wastewater with coagulation method [J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2014, 8(12): 5105-5110. (in Chinese))
- [28] LIU M, HATA A, KATAYAMA H, et al. Consecutive ultrafiltration and silica adsorption for recovery of extracellular antibiotic resistance genes from an urban river [J]. Environmental Pollution, 2020, 260: 114062.
- [29] DONG P, WANG H, FANG T, et al. Assessment of extracellular antibiotic resistance genes (eARGs) in typical environmental samples and the transforming ability of eARG [J]. Environment International, 2019, 125: 90-96.
- [30] ZHANG Y, LI A, DAI T, et al. Cell-free DNA: a neglected source for antibiotic resistance genes spreading from WWTPs [J]. Environmental Science & Technology, 2018, 52(1): 248-257.
- [31] HOU J, YANG Z, WANG P, et al. Changes in microcystis aeruginosa cell integrity and variation in microcystin-LR and proteins during Tanfloc flocculation and floc storage [J]. Science of The Total Environment, 2018, 626: 264-273.
- [32] LEE C S, ROBINSON J, CHONG M F. A review on application of flocculants in wastewater treatment [J]. Process Safety and Environmental Protection, 2014, 92(6): 489-508.
- [33] TEH C Y, WU T Y. The potential use of natural coagulants and flocculants in the treatment of urban waters [J]. Chemical Engineering Transactions, 2014, 39: 1603-1608.
- [34] YANG Z, DEGORCE-DUMAS J, YANG H, et al. Flocculation of escherichia coli using a quaternary ammonium salt grafted carboxymethyl chitosan flocculant [J]. Environmental Science & Technology, 2014, 48(12): 6867-6873.
- (收稿日期: 2022-03-05 编辑: 王芳)