

# 厌氧消化污泥的超声-臭氧预处理工艺对微生物群落结构和抗性基因影响研究

丘雷 王凯

济南市生态环境监控中心槐荫分中心

**摘要:** 超声和臭氧作为厌氧消化的预处理工艺, 可以突破污泥水解限速步骤从而有效地提高污泥减量化效果, 但剩余活性污泥中抗生素抗性基因丰度的变化情况和机制尚不清晰。本研究基于qPCR技术对tetG和tetX两种典型抗生素抗性基因进行了研究, 分析了微生物群落结构和多样性变化。结果表明臭氧处理的污泥微生物多样性较高, 臭氧和超声-臭氧预处理对tetX抗性基因的绝对丰度具有削减作用, 但相对丰度的上升说明宿主菌对臭氧的耐受和抵抗性作用可能导致了抗性基因的水平转移。通过对抗性基因和宿主菌丰度的相关性分析结果表明垂直转移机制不是抗性基因丰度变化的唯一来源, 应更关注水平转移。本研究的结果为抗性基因转移机制的研究提供了新的见解和证据。

**关键词:** 超声; 臭氧; 抗性基因; 微生物群落结构

【DOI】10.12254/j.issn.2096-6539.2022.10.101

## 一、引言

据统计, 2019年我国城镇污水处理厂污泥产量超过6000万吨, 预计2025年将突破9000万吨。通常厌氧消化是污泥减量化技术的首选<sup>[1]</sup>, 且多种预处理方式可以应用在厌氧消化之前, 如超声, 臭氧, 热水解等<sup>[2, 3]</sup>, 来解决厌氧消化效率受到较长停留时间和较慢水解速率影响的问题。超声处理通过空化气泡形成和坍塌带来的剪切力和空穴产生的自由基破坏污泥细胞壁<sup>[4]</sup>, 释放胞内有机物。研究表明超声预处理可以显著促进厌氧消化过程中的减量效果和产气量, 对污泥脱水性能也有改善; 臭氧氧化通过直接作用和羟基自由基的间接作用能够去除四环素等疏水性抗生素, 使病原体失活, 甚至是去削减抗性基因丰度<sup>[5]</sup>。抗生素抗性基因是一种新型、持久性的环境污染物, 由水、土壤等环境中传播和扩散的抗生素残留诱导生成, 在水平基因转移和微生物种群结构的影响下形成的一种脱氧核苷酸序列, 对人类健康造成风险。香港某污水厂活性污泥中四环素类、氨基糖苷和磺胺类是三种丰度最高的抗性基因, 在微生物活性较高的夏季仍有检出, 表明污水厂活性污泥工艺中抗性基因的存在不可避免<sup>[6]</sup>。研究表明200 mg/L臭氧处理实现了sulI和tetG的有效削减<sup>[7]</sup>, 但成本增加较多。超声与臭

氧联用技术凭借其出色的协同作用在污泥预处理、微生物消毒和有机物氧化等多方面效果显著<sup>[8]</sup>, 探究超声与臭氧联用技术对抗性基因的削减效果及机制对污泥减量化和抗性基因控制具有重要意义。

## 二、试验方法

本研究中使用的剩余活性污泥取自山东省某污水厂, 在实验室通过重力沉降将其浓缩备用。污泥基本性质如下: TS=64 g/L, VS=35 g/L, 含水率=94%。超声处理使用单频超声破碎机(UP-250, 宁波新芝), 探头放置于污泥液面下2cm处, 预处理时间为20min, 能量输入约为13.3 KJ/g TS, 声能密度为0.75 W/mL。氧气源臭氧发生器高压放电产生臭氧气, 持续曝气通入3℃的去离子水中, 制得饱和臭氧水用于污泥的臭氧处理, 臭氧投加量为0.14 g/g TS。污泥的预处理试验在250 mL锥形瓶中进行。样本中微生物DNA的提取采用QIAamp DNA Stool Mini Kit试剂盒(QIAGEN, Hilden, Germany), 基于分类学信息在纲、目、科、属分类水平上进行群落结构的统计分析。

## 三、结果与讨论

### (一) 预处理对剩余污泥中微生物群落结构和多样性影响

稀释性曲线是评价样品物种丰度和检测深度的指标<sup>[9]</sup>。图1(a)表明超声预处理和超声-臭氧预处理后剩余活性污泥样本具有相似的物种丰度, 与对照组和单独臭氧组有所差异。总体上样品的稀释性曲线随序列数的增加趋于平缓, 表明OUT数基本稳定, OUT分布和物种信息的结果具有一定的代表性。

图1(b)描述了不同预处理方式下剩余活性污泥微生物群落属水平的分布情况。来自拟杆菌纲的Petrimonas属是典型的发酵细菌, 臭氧和超声-臭氧预处理组的Petrimonas属丰度高于对照组, 表明了剩余活性污泥在臭氧预处理后可能具有较高的产氢产甲烷潜力。属水平上超声和超声-臭氧组的脱氯细菌dechlorobacter丰度明显增加, 可能与超声处理为该细菌提供了更多的外源性电子供体有关。Macellibacteroides是一种铁还原细菌, 其作为优势菌群的出现表明了污泥的厌氧消化潜力。Anaerocella在

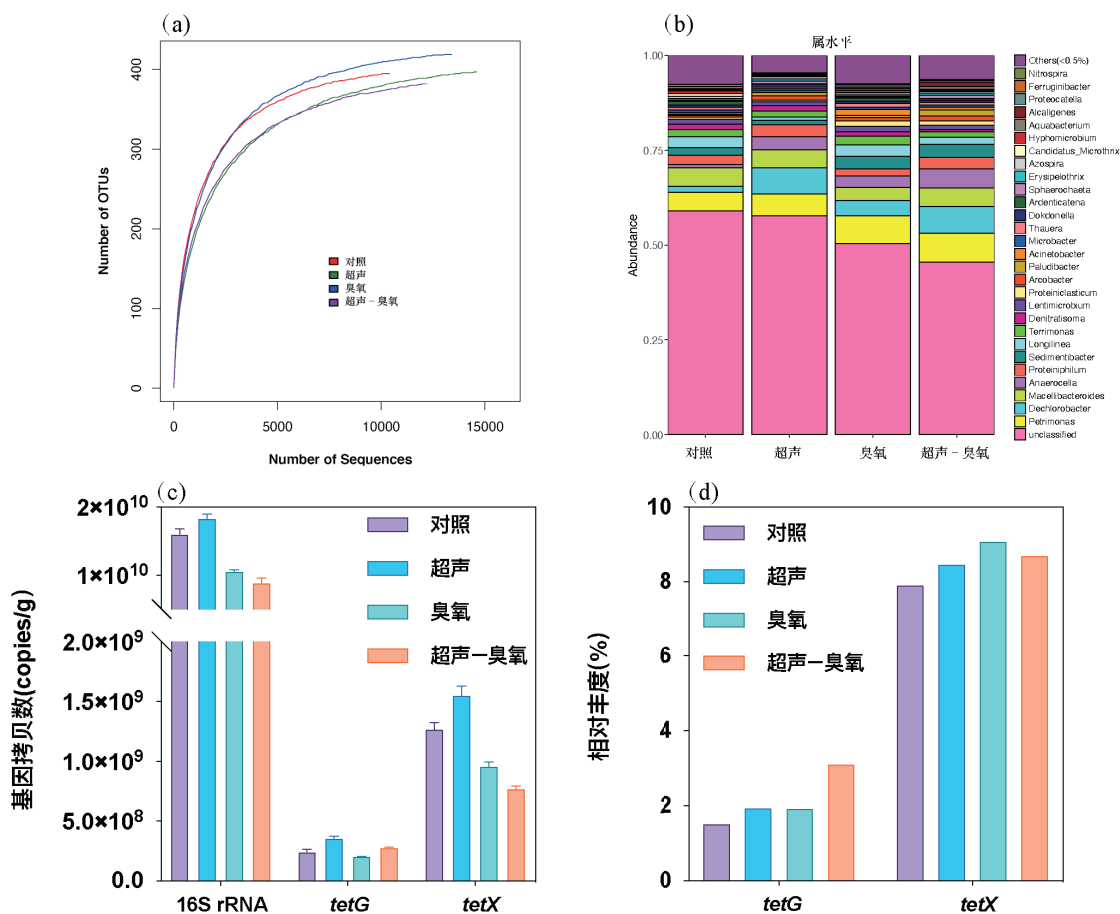


图1. (a) 微生物样本的稀释性曲线; (b) 属水平微生物群落分布; (c) tetG、tetX和16S rRNA的绝对丰度对比; (d); tetG和tetX的相对丰度对比

超声-臭氧预处理后丰度增加, 为后续的厌氧消化提供了更好的微环境<sup>[10]</sup>。此外, 超声处理(4.21)和超声-臭氧处理后(4.50)样品的Shannon指数与对照组相比(4.78)有所下降, 表明超声改变了污泥内部环境, 对某些对环境敏感的微生物种群的代谢起到了抑制作用, 降低了其多样性与活性, 程度的强弱可能受到超声时间和声能密度的影响。

### (二) 预处理工艺对抗性基因的影响

如图1(c)所示, 两种目标抗性基因tetG和tetX均被检出, 其浓度高达 $10^8 \sim 10^9$  copies/g。原始污泥中的

16S rRNA的基因拷贝数为 $2.41 \times 10^8$  copies  $\cdot$  g<sup>-1</sup>, 超声处理后绝对丰度增加14.3%。臭氧和超声-臭氧联用处理后其绝对丰度分别下降了34.1%和44.8%, 表明臭氧处理和超声-臭氧处理均可以有效削减活性污泥抗性基因的绝对丰度, 其中超声-臭氧对tetX的削减率最高, 达到40%。图1(d)可以看出臭氧处理削减了tetG和tetX抗药基因的绝对丰度, 但相对丰度分别从1.5%和7.9%上升到1.9%和8.4%, 特别是tetG的相对丰度增加了近三成, 而超声-臭氧处理后tetG的相对丰度上升更加显著, 达到了3.1%, 是对照组的2倍以上。臭氧参与的预处理可

表1 tetG、tetX与宿主菌相对丰度的相关性

		Acinetobacter	Brevundimonas	Roseobacter	Escherichia	Pseudomonas
tetG相对丰度	皮尔逊相关性	-.510	.091	-.501	.546	-.179
	Sig. (双尾)	.490	.909	.499	.454	.821
tetX相对丰度	皮尔逊相关性	.718	-.713	-.554	.609	-.736
	Sig. (双尾)	.282	.287	.446	.391	.264

以有效地削减tetX的绝对丰度，对tetG绝对丰度的削减效果不明显。tetG和tetX的相对丰度在预处理后反而会增加。先前研究表明细菌通过增加分泌胞外聚合物或改变细胞聚集形态提高对氧化剂的耐受性<sup>[11]</sup>，据此推测本试验中抗性基因丰度的变化与抗性基因宿主菌对臭氧氧化的耐受和抵抗性有关。因此，在经过不同处理后，抗性基因的水平垂直转移均可能导致丰度的变化。

表1中分析了抗性基因与宿主菌相对丰度的相关性。tetG与Escherichia、tetX与Comamonadaceae和Bacteroidaceae宿主菌的相关性均高于0.5，但不显著。上述结果表明两种目标抗性基因与多种宿主菌均未呈现统计学意义的相关，一方面来源于样本量较少，导致数据存在误差，另一方面暗示了抗性基因在不同处理方式后表现出的变化不仅来源于垂直转移，也可能通过水平转移机制在环境中传播。

#### 四、结论

本研究采用超声、臭氧以及超声-臭氧联用工艺对污水厂剩余活性污泥进行预处理，考察了微生物群落结构和物种多样性的变化，通过qPCR定量分析了tetG和tetX两种四环素抗性基因的削减效果，并结合宿主菌的丰度变化探讨了抗性基因的转移机制，得到以下主要结论：

(1) 丰度等级图描述了臭氧处理后的剩余活性污泥的物种丰富度较高，与Shannon指数表明超声和超声-臭氧处理的剩余活性污泥微生物的丰富度下降结论一致；

(2) 纲到属水平的优势菌群预示了臭氧预处理后的剩余活性污泥具有更好的厌氧消化潜力；

(3) 臭氧和超声-臭氧工艺对tetX抗性基因的绝对丰度具有削减效果，但相对丰度会增加。抗性基因与宿主菌的相关性分析结果表明抗性基因的丰度变化来源于水平转移和垂直转移两种途径；

#### 参考文献

[1] Zhang, J., et al., Fate of antibiotic resistance genes and its drivers during anaerobic co-digestion of food waste and sewage sludge based on microwave pretreatment. *Bioresour Technol*, 2016. 217: p. 28-36.

[2] Braguglia, C.M., et al., Effect of feed/inoculum ratio on anaerobic digestion of sonicated sludge. *Water Science & Technology A Journal of the International Association on Water*

*Pollution Research*, 2006. 54 (5): p. 77-84.

[3] Chu, L.B., et al., Progress and perspectives of sludge ozonation as a powerful pretreatment method for minimization of excess sludge production. *Water Research*, 2009. 43 (7): p. 1811-22.

[4] Zhao, H., et al., Enhancement of ultrasonic disintegration of sewage sludge by aeration. *Journal of Environmental Sciences*, 2016. 42 (4): p. 163-167.

[5] Ben, W., et al., Distribution of antibiotic resistance in the effluents of ten municipal wastewater treatment plants in China and the effect of treatment processes. *Chemosphere*, 2017. 172: p. 392.

[6] Yang, Y., et al., Exploring variation of antibiotic resistance genes in activated sludge over a four-year period through a metagenomic approach. *Environ Sci Technol*, 2013. 47 (18): p. 10197-205.

[7] Zhang, Y., et al., Inactivation of antibiotic resistance genes in municipal wastewater effluent by chlorination and sequential UV/chlorination disinfection. *Science of the Total Environment*, 2015. 512-513 (9): p. 125-132.

[8] Dahl, E., Physicochemical aspects of disinfection of water by means of ultrasound and ozone. *Water Research*, 1976. 10 (8): p. 677-684.

[9] Amato, K.R., et al., Habitat degradation impacts black howler monkey (*Alouatta pigra*) gastrointestinal microbiomes. *Isme Journal*, 2013. 7 (7): p. 1344-1353.

[10] Zhao, J., et al., Pyrosequencing reveals contrasting soil bacterial diversity and community structure of two main winter wheat cropping systems in China. *Microbial Ecology*, 2014. 67 (2): p. 443.

[11] 田少因. 污泥臭氧氧化处理过程中活菌抗药基因丰度的消减. *环境工程学报*, 2017. 11 (05): p. 3271-3278.