

活性污泥 SBR 系统对四环素耐药菌和总四环素的去除特性*

肖斌 黄满红** 陈亮

(东华大学环境科学与工程学院, 上海, 201620)

摘要 通过模拟运行 SBR 工艺, 比较不同四环素进水浓度、运行周期以及氧环境条件对四环素耐药菌及痕量四环素的去除特性。结果表明, 痕量四环素的存在会对活性污泥中微生物耐药性产生影响, SBR 进水四环素浓度为 $250 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时活性污泥中的微生物会逐步变成耐药微生物, 而进水中不含四环素时, 耐药的微生物会逐步变成非耐药微生物。总四环素的去除效果在好氧条件下周期为 12 h 时最好, 达到 90% 以上。好氧条件下周期为 8 h 时每克污泥增加的四环素耐药菌数最多, 约为 $2.89 \times 10^9 \text{CFU}\cdot\text{g}^{-1}$; 好氧条件下周期为 20 h 时为最少, 约为 $1.0 \times 10^8 \text{CFU}\cdot\text{g}^{-1}$, 有利于缓解四环素耐药菌的产生。

关键词 SBR, 运行周期, 氧环境, 四环素耐药菌。

据报道, 欧共体每年抗生素的消耗量达到 5000 t, 在肯尼亚每年也有 14.6 t 的抗生素用于畜禽生产^[1]。我国也是世界上四环素类抗生素的生产、使用和消费大国^[2], 2003 年我国仅土霉素产量就达到了 10000 t, 占世界土霉素生产总量的 65%^[1]。2005 年化学工业学会和制药工业学会统计数据显示, 我国每年抗生素原料生产量约为 21 万吨^[3]。正是由于大量抗生素的应用, 导致抗生素的滥用情况非常严重, 排放出的污水中也有抗生素的存在, 污水中的细菌在抗生素选择压力下产生了耐药性^[4]。

目前有一些研究者对污水处理系统中的四环素药物和耐药菌的分布进行了研究。Lapara^[5] 的研究表明, 德卢斯城市污水处理厂排放到湖泊和河流的污水中, 可能含有较高浓度的生物基因, 而这些生物基因将会导致其产生超强的耐药性。尽管德卢斯城市污水处理厂已经使用了一些先进的技术来净化污水, 但是, 仍然发现德卢斯城市污水处理厂是这种耐药基因的重要来源。Auerbach^[6] 发现污水处理厂的进水和出水及污泥中均含有较高浓度的耐药抗性菌株或抗生素抗性基因, 且这些都无法被生物处理和紫外消毒有效地去除。Szczepanowski^[7]、Gao^[8] 等都有相似的报告。在国内, 刘小云^[9] 从污水处理厂进水分离出的耐热大肠菌群中均 100% 耐青霉素 (PEN) 和耐红霉素 (EM), 80% 耐链霉素 (SM); 从出水分离出的耐热大肠菌群中均 100% 耐青霉素 (PEN) 和耐红霉素 (EM), 92% 耐链霉素 (SM)。

不同来源废水中四环素的含量差异较大。Gao^[8] 等对美国密西根州某污水厂的四环素进行了测定, 进水中总四环素浓度约为 $1.29 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 魏瑞成^[10] 等发现养殖废水中总四环素含量在 $3.67\text{--}72.91 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 之间, 医院废水中四环素浓度稍高, 约为 $500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 左右^[11]。本研究通过配水实验中添加四环素 ($250 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 和不添加四环素, 对活性污泥 SBR 系统中四环素耐药菌和总四环素的去除情况进行分析, 以期对环境废水中总四环素和四环素耐药菌的污染控制提供参考。

1 材料与方 法

1.1 实验装置

实验所用反应器均为聚氯乙烯材料的 SBR 反应池, 总体积为 12 L, 有效容积为 8 L, 由微电脑时间程序控制器及附属电子线路控制进水、曝气、沉淀、排水、闲置的全过程, 及控制需要选定的运行周期以

2012 年 2 月 9 日收稿。

* 国家自然科学基金(21007010); 教育部博士点基金项目(20090075120007); 上海科委项目(09230500200); 中央高校基本科研基金; 湖南省交通厅科研项目(200908); 交通运输部科技项目(2010353343290) 资助。

** 通讯联系人, E-mail: egghmh@163.com, xb_0610@126.com

及各阶段的启动和关闭时间. 温度控制在 20 ℃—30 ℃. 气源采用银湖 SP-780 双头可调空气曝气泵,以沙头作为微孔曝气器.

本实验设计 4 个不同的 SBR 运行周期、2 个不同的进水四环素浓度和 3 个不同的氧环境,以便更好地研究四环素耐药菌和四环素的去除特性. 4 个周期分别为 8 h、12 h、16 h 和 20 h,不同周期的各阶段的时间见表 1. 2 个进水四环素浓度为 0 和 250 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. 3 个氧环境为好氧环境、缺氧环境和厌氧环境. 不同 SBR 运行条件定期测定混合液中的 pH、混合液悬浮固体浓度 (MLSS)、温度、DO,出水 COD、 $\text{NH}_3\text{-N}$ 、TP、TN、四环素浓度等运行参数,对此进行分析,判断反应器运行状况并作相应调整. 反应池中混合液的耐药菌数每个星期测 2 次,分别是星期二和星期五.

表 1 不同 SBR 运行周期的各阶段的时间表

Table 1 Timetable for various stages of different SBR cycles

周期	进水	曝气	沉淀	排水	闲置
8 h	1 h	5 h	1 h	0.5 h	0.5 h
12 h	1 h	9 h	1 h	0.5 h	0.5 h
16 h	2 h	10 h	2 h	1 h	1 h
20 h	2 h	14 h	2 h	1 h	1 h

1.2 实验方法

本实验拟采用 6 个 SBR 反应池,分为 3 组,分别为好氧池组、厌氧池组、缺氧池组. 好氧池组分为好氧池 1 和好氧池 2;厌氧池组分为厌氧池 1 和厌氧池 2;缺氧池组分为缺氧池 1 和缺氧池 2;各组中编码为 1 的均为实验反应池,编码为 2 的均为空白对照反应池. 实验用水为人工模拟生活污水,以葡萄糖、乙酸钠为碳源, NH_4Cl 为氮源, KH_2PO_4 为磷源,加入适量 Ca、Mg、Fe、Cu 等矿物盐后加自来水配制而成. 实验污水水质: COD 为 200—500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; TN 质量浓度为 25—40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; TP 质量浓度为 2.0—7.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$;四环素质量浓度为 250 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ [11]; pH 为 6.0—9.0. 好氧池组溶解氧为 $(4.80 \pm 0.5) \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,厌氧池组的溶解氧控制在 $(0.11 \pm 0.04) \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,缺氧池组的溶解氧控制在 $(0.14 \pm 0.04) \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. 每次换水体积为 6 L. 实验用活性污泥取自上海某污水处理厂,且经过一个多月的驯化过程.

1.3 分析方法

pH 采用 CT-6020A pH 计; MLSS 按标准方法测定; 温度和 DO 采用溶氧仪 (Oxi 330i, 德国 WTW 公司); COD: 微波消解-重铬酸钾氧化法; $\text{NH}_3\text{-N}$ 采用纳氏试剂光度法; TP 采用微波消解-钼酸铵比色法; TN 采用碱性过硫酸钾消解-紫外分光光度法.

反应池中混合液的耐药菌数采用平板计数法. 步骤如下: 本次实验采用含有 0.85% 生理盐水和 0.01% 的焦磷酸钠作为缓冲液对水样进行充分振荡. 首先, 无菌操作取各个反应池的混合液水样 5 mL, 放于 45 mL 灭菌缓冲液三角烧瓶内 (瓶内放有适量的小玻璃珠), 200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 剧烈振荡 2 h. 经充分振荡后制成 1:10 的均匀稀释液. 用 1 mL 灭菌吸管吸取 1:10 稀释液 1 mL, 沿管壁徐徐注入含有 9 mL 灭菌缓冲液于试管内, 振摇试管混合均匀, 制成相应稀释液. 依次操作制成 10 倍递增稀释液. 根据要求, 选择 2—3 个合适的稀释度, 各移取 100 μL 稀释液于已制好培养基的灭菌平皿中, 用涂布法 37 ℃ 培养细菌 18—24 h, 每个稀释度做两个平皿, 注意无菌操作[12]. 本次实验采用四环素浓度为 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 LB 营养肉汤选择性培养基, 以此作为培养耐四环素耐药菌选择性培养基.

四环素浓度的测定方法采用酶联免疫法[13]. 方法的最低检测限为 0.15 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 加标回收率在 73%—127%, 平均变异系数为 5%.

2 结果与讨论

2.1 不同周期对四环素耐药菌和四环素去除特性的影响

在好氧环境、进水四环素浓度为 250 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 下, 研究不同周期对四环素耐药菌和四环素的去除特性. 本次实验历时 2 个月左右, 每个周期经过 5—7 次不等的重复性实验.

从图 1 中可以看出:

(1) 总四环素去除率在 60%—97% 之间, COD 去除率在 80%—90% 之间, 总氮去除率在 50%—70% 之间, 总磷去除率在 80%—94% 之间, 出水均可达到城镇污水处理厂污染物排放标准的一级 A 标准. 说明 SBR 反应池的运行情况良好.

(2) 周期 8 h 时, 总四环素去除率在 60% 左右; 而周期 12 h 时就达到 90% 以上, 随着周期的延长总四环素的去除率并没有上升, 反而下降了. 说明总四环素的去除率并不会随着周期的延长而增加. 与 Le-Minh^[14] 等对各地污水处理厂的调查和总结的结果相符.

(3) 通过比较每个周期运行 15 d 后好氧池中四环素耐药菌的数量得知, 周期 8 h 时, 每克污泥增加的耐药菌数最多, 为 2.89×10^9 CFU·g⁻¹; 周期 20 h 时的最少, 为 1.0×10^8 CFU·g⁻¹. 说明周期的延长, 在一定程度上有利于缓解四环素耐药菌的增加. 原因可能是周期的延长, 降低了污泥有机负荷, 从而导致细菌生长速率的减慢, 进而减少了四环素耐药菌的增加. 与 Kim 等^[13] 研究发现城市污水处理系统中污泥有机负荷和细菌生长速率的提高会导致出水四环素耐药菌的增多相符.

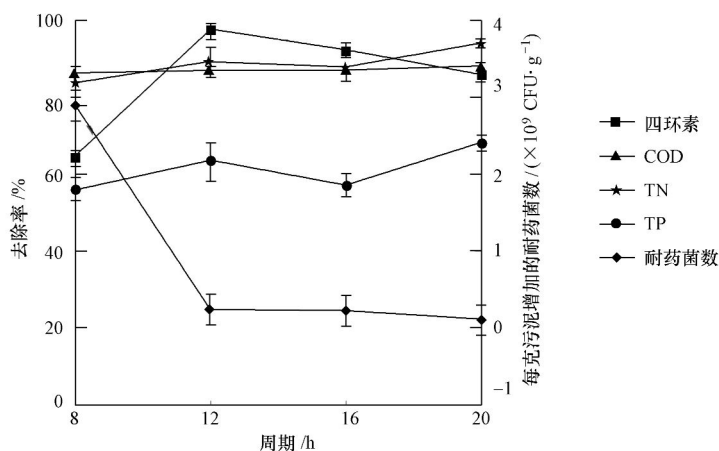


图 1 不同周期对四环素耐药菌和总四环素去除特性的影响

Fig. 1 Removal ratios of tetracycline resistant bacteria and tetracycline with different reaction cycles

2.2 不同进水四环素浓度对四环素耐药菌的影响

选择控制条件在好氧环境、周期 20 h 下, 研究不同进水四环素浓度对四环素耐药菌的影响. 本次实验历时 15 d 左右, 经过 5 次重复性实验.

结合表 2 和图 2 可以看出, 在进水不加四环素时, 污泥系统中的耐药菌数随着时间的增加而减少, 说明耐药的微生物在进水不加四环素的情况下会逐步变成非耐药菌, 虽然这样的转化率很低; 而在进水四环素浓度为 $250 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 污泥系统中的耐药菌数呈现上升的趋势, 说明有部分微生物在进水四环素浓度为 $250 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时会逐步变成耐药菌. 且在进水不加四环素时, 活性污泥系统中就有四环素耐药菌的存在, 可能的原因是基因突变的缘故^[15]. Chad W 等^[16] 考察了氧化塘处理禽畜废水时抗生素浓度以及运行参数对耐药菌及耐药基因数量的影响, 发现四环素耐药基因的总量随抗生素浓度的增大而增多. 这与本次研究的结果一致.

表 2 不同进水四环素浓度对四环素耐药菌的影响

Table 2 Effect of tetracycline concentration on tetracycline resistant bacteria

周期/h	进水四环素浓度 /($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	每克污泥增加/减少的耐药 菌数($\times 10^8$)/(CFU·g ⁻¹)	COD/%	TN/%	TP/%
20	0	0.015 ± 0.005	89 ± 1	59 ± 4	87 ± 2
	250	1.0 ± 0.07	88 ± 1	68 ± 2	86 ± 1

痕量四环素的加入并没有影响到活性污泥 SBR 系统对 COD、TN、TP 的去除 ($P > 0.05$), 原因可能是加入的四环素浓度还没达到抑制微生物活性的浓度. 与 Kim^[17] 比较不同水力停留时间下的 COD 去除率无显著差异 ($P > 0.05$) 相似.

图 2a 显示了进水四环素浓度为 $250 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,四环素耐药菌随着时间的增加而增加,在第 8 天左右增加的速率最快.图 2b 显示了未添加四环素时,四环素耐药菌随着时间的增加,反而减少了,前 10 d 一直在减少,最后趋于平稳.与表 2 中每克污泥增加/减少的耐药菌数的数据相对应.

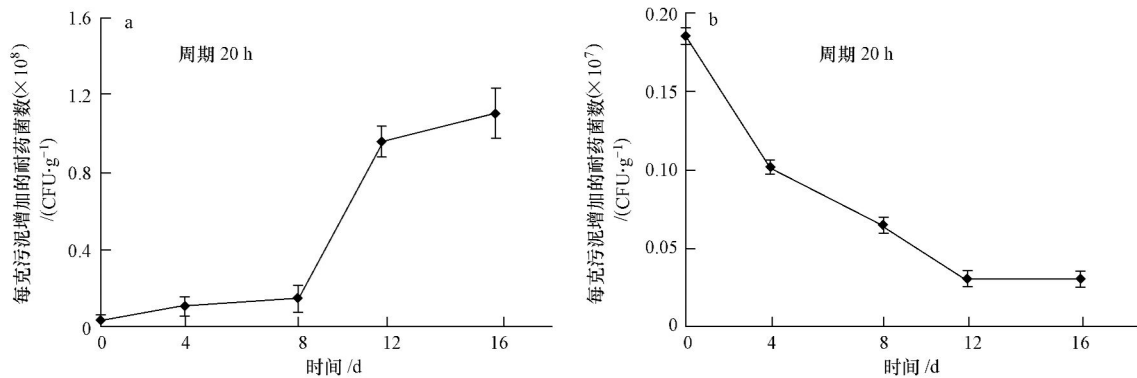


图 2 比较不同进水四环素浓度下四环素耐药菌随时间的变化

a. 进水四环素浓度 $250 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; b. 未添加四环素

Fig. 2 Change of tetracycline resistant bacteria with time under different concentrations of influent tetracycline

2.3 不同氧环境对四环素耐药菌和四环素去除特性的影响

在周期为 20 h、进水四环素浓度为 $250 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 下,研究不同氧环境对四环素耐药菌和四环素的去除特性.本次实验历时 15 d 左右,经过 5 次重复性实验.

从图 3 中可以看到,每克污泥增加的四环素耐药菌数最少的是好氧池,为 $1.0 \times 10^8 \text{ CFU}\cdot\text{g}^{-1}$;缺氧池次之,为 $2.5 \times 10^8 \text{ CFU}\cdot\text{g}^{-1}$;增加最多的是厌氧池,为 $8.9 \times 10^8 \text{ CFU}\cdot\text{g}^{-1}$.说明好氧工艺有利于缓解四环素耐药菌数的增加.

好氧池的总四环素去除率为 $86\% \pm 1\%$,缺氧池的总四环素去除率为 $87\% \pm 1\%$,厌氧池的总四环素去除率为 $80\% \pm 1\%$, $P > 0.05$.说明在周期 20 h 时,不同氧环境条件对总四环素去除影响不大.

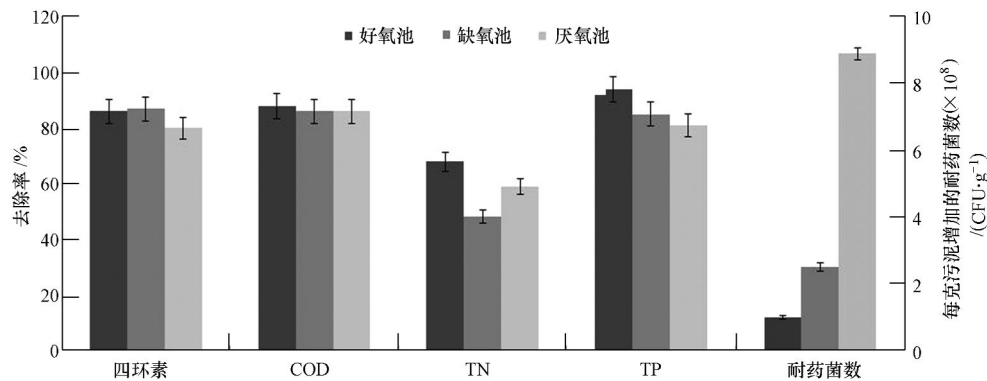


图 3 不同氧环境对四环素耐药菌和总四环素去除特性的影响

Fig. 3 Removal ratios of tetracycline resistant bacteria and tetracycline under different oxygen concentrations

3 结论

(1) 在好氧条件、进水四环素浓度为 $250 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,周期 8 h 的总四环素去除率最低,在 60% 左右.周期 12 h 的总四环素去除率最高,达到 90% 以上,随后增加周期时间,总四环素去除率并不随之增加,说明总四环素的去除率并不会随着周期的延长而增加.

(2) 在好氧条件、进水四环素浓度为 $250 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,针对 4 个 SBR 运行周期的每克污泥增加的耐药菌数顺序为 $8 \text{ h} > 12 \text{ h} > 16 \text{ h} > 20 \text{ h}$,说明 SBR 运行周期的增加,在一定程度上有利于缓解四环素耐药菌的增加.

(3) 在好氧条件、不同周期时,痕量四环素浓度对细菌耐药性有较大影响.当进水四环素浓度为 $250 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,部分微生物会逐步变成耐药菌;当进水中不含四环素时,耐药的微生物会逐步变成非耐药菌.

(4) 在周期为 20 h、进水四环素浓度为 $250 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,3 种不同氧环境的总四环素去除率相差不大,说明在周期 20 h 时,不同氧环境对总四环素去除影响不大.

参 考 文 献

- [1] 张浩,罗义,周启星. 四环素类抗生素生态毒性研究进展[J]. 农业环境科学学报, 2008,27(2): 407-413
- [2] 贺德春,许振成,吴根义,等. 四环素类抗生素的环境行为研究进展[J]. 动物医学进展, 2011,32(4): 98-102
- [3] 周启星,罗义,王美娥. 抗生素的环境残留、生态毒性及抗性基因污染[J]. 生态毒理学报, 2007,2(3): 243-251
- [4] Kummerer K. Significance of antibiotics in the environment[J]. J Antimicrob Chemother, 2003, 52(1): 5-7
- [5] Lapara T M, Burch T R, Mcnamara P J, et al. Tertiary-treated municipal wastewater is a significant point source of antibiotic resistance genes into duluth-superior harbor[J]. Environmental Science & Technology, 2011, 45(22): 9543-9549
- [6] Auerbach E A, Seyfried E E, Memahon K D. Tetracycline resistance genes in activated sludge wastewater treatment plants[J]. Water Research, 2007, 41(5): 1143-1151
- [7] Szczepanowski R, Krahn I, Linke B, et al. Antibiotic multiresistance plasmid pRSB101 isolated from a wastewater treatment plant is related to plasmids residing in phytopathogenic bacteria and carries eight different resistance determinants including a multidrug transport system[J]. Microbiology, 2004, 150 (Pt 11): 3613-3630
- [8] Gao P, Munir M, Xagorarakis I. Correlation of tetracycline and sulfonamide antibiotics with corresponding resistance genes and resistant bacteria in a conventional municipal wastewater treatment plant[J]. Science of The Total Environment, 2012, 421/422: 173-183
- [9] 刘小云,舒为群,邱志群,等. 水环境中耐热大肠菌群的抗生素耐药性与质粒谱研究[J]. 应用与环境生物学报, 2006,12(1): 118-121
- [10] 魏瑞成,葛峰,陈明,等. 江苏省畜禽养殖场水环境中四环素类抗生素污染研究[J]. 农业环境科学学报, 2010,29(6): 1205-1210
- [11] 侯延民. 亲水有机溶剂气浮浮选分离/富集环境中四环素类抗生素残留研究[D]. 南京: 江苏大学博士学位论文, 2009
- [12] 郭怡雯. 污水处理厂活性污泥中四环素耐药基因和耐四环素乳糖发酵型肠杆菌研究[D]. 上海: 华东师范大学硕士学位论文, 2009
- [13] Kim S, Jensen J N, Aga D S, et al. Fate of tetracycline resistant bacteria as a function of activated sludge process organic loading and growth rate[J]. Environmental Science & Technology, 2007, 55(1): 291-297
- [14] Le-Minh N, Khan S J, Drewes J E, et al. Fate of antibiotics during municipal water recycling treatment processes[J]. Water Research, 2010, 44(15): 4295-4323
- [15] 常晓松,舒为群,曹佳. 水环境中耐药菌的研究进展[J]. 癌变·畸变·突变, 2007,(3): 206-208
- [16] Chad W, Keith A, Michael T, et al. Tet and sul antibiotic resistance genes in livestock lagoons of various operation type, configuration, and antibiotic occurrence[J]. Environ Sci Technol, 2010, 44 (16): 6102-6109
- [17] Kim S. The effect of operational parameters on the fate of tetracycline resistant bacteria in biological wastewater treatment plants[D]. New York: State University of New York At Buffalo, 2005

Study of removal characteristic on tetracycline and tetracycline resistant bacteria in SBR

XIAO Bin HUANG Manhong* CHEN Liang

(College of Environmental Science & Engineering, Dong Hua University, Shanghai, 201620, China)

ABSTRACT

In this work, the removal characteristics of tetracycline and tetracycline resistant bacteria through operating SBR were compared with different concentrations of tetracycline, operation cycles and oxygen environmental conditions. The results show that the existence of trace tetracycline has great impact on the resistance of microorganisms in activated sludge. Some microorganisms in the activated sludge turned gradually into resistant microorganisms when the concentration of influent tetracycline was $250 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. When the influent did not contain tetracycline, the resistant microorganisms gradually became non-resistant. Total tetracycline removal rate in aerobic condition and 12 h cycle is the highest, up to 90%. In aerobic condition and 8 h cycle, the increase of tetracycline resistant bacteria number per gram sludge was the largest, about $2.89 \times 10^9 \text{CFU}\cdot\text{g}^{-1}$. In aerobic condition and 20 h cycle, it was about $1.0 \times 10^8 \text{CFU}\cdot\text{g}^{-1}$, and was the lowest. This is the beneficial in inhibiting the production of tetracycline resistant bacteria.

Keywords: SBR, operation cycle, oxygen environment, tetracycline resistant bacteria.