

潮汐-复合流人工湿地系统优化及对抗生素抗性基因的去除效果

程羽霄^{1,2}, 吴丹^{1,2}, 陈铨乐^{1,2}, 高方舟^{1,2}, 杨永强³, 刘有胜^{1,2*}, 应光国^{1,2}

(1. 华南师范大学环境学院, 广州 510006; 2. 华南师范大学广东省化学品污染与环境安全重点实验室, 环境理论化学教育部重点实验室, 广州 510006; 3. 中国科学院广州地球化学研究所, 有机地球化学国家重点实验室, 广州 516000)

摘要: 抗生素抗性基因随废水排放传播扩散, 对环境生物和民众健康构成严重威胁. 针对废水中抗性基因的深度去除值得重点关注. 在前期研究中发现潮汐流人工湿地能有效去除废水中多种氮素. 本研究通过增加隔板和种植植物等方式进一步优化潮汐流人工湿地系统, 并考察了工艺优化对抗生素抗性基因去除和脱氮功能微生物的影响机制. 结果表明, 同时增加隔板和种植植物后的潮汐-复合流人工湿地系统能有效提高抗性基因的去除效率. 在增加隔板和种植植物组对 7 类 21 种抗性基因去除率最高达到 83.82%~100.0%, 显著高于单一增加隔板或种植植物组. 从湿地基质和植物中的抗性基因绝对丰度对比可以看出, 增加隔板能促进湿地基质中抗性基因量积累, 而植物对抗生素抗性基因吸附也是其去除途径之一. 同时, 结合氮循环功能基因测序结果显示, 湿地系统优化能提高基质中硝化和反硝化功能微生物物种多样性和丰富度, 这与优化系统对废水中硝化量、反硝化量和总氮的去除率相对更高结果一致.

关键词: 人工湿地; 抗生素抗性基因; 去除效率; 微生物多样性; 硝化和反硝化

中图分类号: X52 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2021)08-3799-09 DOI: 10.13227/j.hjxx.202012168

Optimization of Tidal-Combined Flow Constructed Wetland System and Its Removal Effect on Antibiotic Resistance Genes

CHENG Yu-xiao^{1,2}, WU Dan^{1,2}, CHEN Quan-le^{1,2}, GAO Fang-zhou^{1,2}, YANG Yong-qiang³, LIU You-sheng^{1,2*}, YING Guang-guo^{1,2}

(1. School of Environment, South China Normal University, Guangzhou 510006, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Chemical Pollution and Environmental Safety, Key Laboratory of Theoretical Chemistry of Environment, South China Normal University, Guangzhou 510006, China; 3. State Key Laboratory of Organic Geochemistry, Guangzhou Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Antibiotic resistance genes (ARGs) pose a serious threat to environmental biology and public health, along with the discharge and spread of wastewater. The advanced treatment of ARGs in wastewater therefore deserves special attention. In our previous study, we found that tidal flow constructed wetlands can effectively remove multiple ammonia from wastewater. In this study, we further optimized tidal flow constructed wetland systems by adding baffles and cultivating plants; we investigated the influence of process optimization on the removal of ARGs and the influence of functional microorganism distribution on nitrogen removal. The results show that the addition of baffles and plants can effectively improve the removal efficiency of ARGs, with the maximum removal rate of 21 resistance genes, in 7 categories, reaching 83.82%–100.0% with the simultaneous addition of baffles and plants. These removal rates were significantly higher than the increase resulting from a single baffle or plant group. From the comparison of the absolute abundance of ARGs in the substrate and plants, it is clear that the baffles can promote the enrichment of ARGs in the wetland substrate, while uptake by plants is also a way of removing ARGs. Combined with the results of nitrogen-cycle functional gene sequencing, system optimization can increase the diversity and richness of nitrification and denitrification functional microorganisms in the substrate, which is consistent with the higher removal rate of nitrification and total nitrogen in wastewater.

Key words: constructed wetlands; antibiotic resistance genes; removal efficiency; microbial diversity; nitrification and denitrification

我国是抗生素使用大国, 抗生素使用量已突破 16 万 t, 人均使用量是英美等发达国家 5 倍以上, 其中人用抗生素占 48%, 畜用抗生素占 52%^[1]. 抗生素大量使用导致环境中抗生素残留和耐药细菌与抗性基因的传播扩散^[2~4]. 世界卫生组织发布的首份全球耐药调查报告显示全球抗生素耐药形势严峻^[4]. 中国动物耐药监测显示, 动物源细菌的高耐药水平和耐药率有递增趋势^[5]. 抗生素抗性基因已在地表水、地下水^[6,7]、沉积物^[6,8,9]、土壤^[10,11]和空

气^[12]等不同环境介质中广泛检出. 城市生活污水处理厂污水排放、行业废水排放和分散型污水排放是环境中抗性基因的主要污染源. 现行污水处理工艺仅针对常规水质指标如 COD 和氨氮等去除设计,

收稿日期: 2020-12-18; 修订日期: 2021-01-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(41877359); 广东省自然科学基金项目(2020A1515010448)

作者简介: 程羽霄(1996~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为环境化学. E-mail: 2018023298@m.scnu.edu.cn

* 通信作者. E-mail: yousheng.liu@m.scnu.edu.cn

无法有效去除抗性基因,传统的生化处理工艺甚至会导致出水中抗性基因丰度不降反升^[13~15].有研究发现,污水厂出水抗性基因浓度高于周围湖泊环境含量的四环素类抗性基因^[16],以及排放口下游抗性基因丰度高于上游等^[17].为此,污染源如生活污水和养殖废水中抗生素抗性基因的深度消除技术和机制亟待解决.

人工湿地系统是一种应用广泛和有效的废水处理技术,尤其在农村和居住分散废水难以集中收集的地区.传统人工湿地通常分为表面流、潜流和垂直流这3种,其中垂直流湿地综合了地表流和潜流特性^[18].但传统湿地占地面积大,氧气传递速率低,系统处理效能低^[19].潮汐流人工湿地通过营造周期淹/排水环境,提供了缺氧/好氧交替的反应条件^[20],能够有效提高氧气传递速率.但也会导致潮汐流人工湿地在宏观上处于好氧状态,反硝化过程受限,对总氮的去除率不高^[21].因此,人工湿地适用性和应用性方面的优化升级研究亟需开展.本研究构造了潮汐流与垂直潜流人工湿地叠置的潮汐-复合流人工湿地,并进一步开展潮汐-复合流人工湿地的污染物去除机制研究.

笔者前期的研究表明,人工湿地在去除新型有机污染物方面也有不错的效果,能有效去除废水中的部分个人护理品类化合物(PPCPs)如激素和杀生剂等,但对抗生素和抗性基因通常去除率不高,去除途径包括生物降解、基质吸附和植物吸收,其中生物降解去除比重最高^[22~25].另外,通过调节曝气和控制干湿交替等方式,笔者构建的潮汐流人工湿地系统在氨氮和总氮等氮素去除效果方面有显著提高^[26].潮汐-复合流人工湿地系统及其优化后是否能有效去除抗生素抗性基因不清楚,通过优化系统中废水流动路径和种植植物后能否导致基质中微生物

种群特别是功能微生物组成产生变化,进而影响抗性基因的去除需要开展研究.

本研究构建和优化了3种类型的潮汐-复合流人工湿地系统,主要开展了2个方面的工作:①对比分析了3种类型(单一增加隔板,单一种植植物,同时增加隔板和种植植物)湿地系统对抗性基因的去除效果;②揭示了潮汐-复合流人工湿地优化过程对基质中微生物种群结构组成、氮循环功能微生物组成特征以及与氮素去除能力和效果之间的关系.

1 材料与方法

1.1 实验装置和样品采集

1.1.1 潮汐-复合流人工湿地设计和优化

在中国科学院广州地球化学研究所构建了3个潮汐流人工湿地系统(TFCW),分别编号为A、B和C,3个装置长×宽×高均为0.6 m×0.5 m×1 m(图1).并用3种不同尺寸的沸石作为填充材料(堆积密度 $\rho = 1\ 030\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).底部(高度为10 cm)填充粒径20~40 mm的沸石,中部(高度为50 cm)填充粒径7~12 mm的沸石,上部填充粒径3~6 mm的沸石(高度20 cm).废水来源为中国科学院广州地球化学研究所生活污水.在常规水质指标去除稳定后,3个湿地运行490 d后,开展本研究中的样品采集.

如图1所示,在A和C装置中间增加隔板以改变水流方向,在B和C装置中种植美人蕉.由于隔板的存在,A和C装置被分为两部分,每一部分均设计出水口,即中间出水口和最终出水口.其中,SA1和SA2分别表示A装置隔板两侧基质样品,SB表示B装置中的基质样品,SC1和SC2分别表示C装置隔板两侧基质样品;箭头表示水流方向,如A和C装置,污水由左侧上部进入,流经装置底

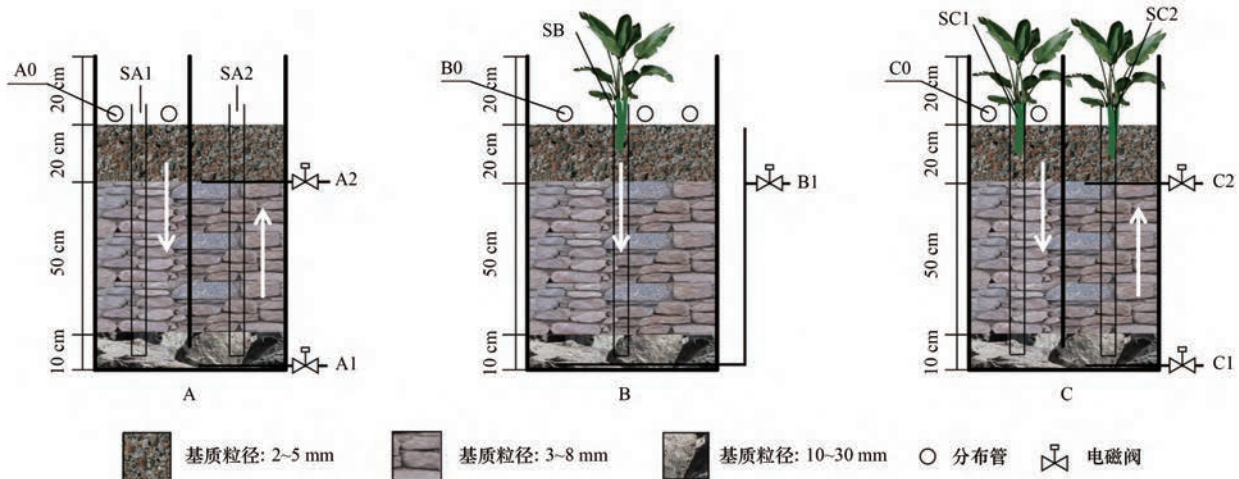


图1 实验装置示意

Fig. 1 Schematic of experimental devices

部小孔,经右侧出水口流出;污水由 B 装置上部进入,底部流出.运行模式为进水不排水,进水开始 30 min 后再排水,在表层 20 cm 填料营造间歇性淹水环境.排水吸空气有利于表层滤料复氧,污水的水力停留时间设置为 12 h.每 3 h 间隔进水一次,每次 11.25 L 污水.

1.1.2 样品采集和预处理

使用灭菌的 2 L 白色不透明聚乙烯塑料瓶分别采集了 8 个点位水样: A 装置的进水和出水(A0、A1 和 A2); B 装置的进水和出水(B0 和 B1); C 装置的进水和出水(C0、C1 和 C2),均为 24 h 混合样品.共采集 5 个湿地基质样品(SA1、SA2、SB、SC1 和 SC2).基质样品的采集:通过将实验体系设置前预埋的带固定孔的不锈钢套管取出,采集不同粒径的基质样品并混合,储存在组培瓶中.种植植物样品的采集:用剪刀分别采集 B 和 C 装置中的美人蕉茎和叶样品,共 4 个植物样品(RB、LB、RC 和 LC)储存在自封袋中.所有样品采集后放置于保温箱中立即运回实验室,水样即可开展过膜等预处理,基质和植物样品则经冷冻干燥后保存于 -20°C 直至提取.

1.2 目标抗性基因

本研究分析的抗性基因包括 7 大类共计 21 个: 2 个磺酰胺耐药基因(*sul1* 和 *sul2*), 6 种四环素耐药基因(*tetC*、*tetG*、*tetH*、*tetO*、*tetW* 和 *tetBP*), 2 个大环内酯耐药基因(*ereA* 和 *ermA*), 2 个喹诺酮耐药基因(*qnrD* 和 *qnrS*), 4 个氯霉素耐药基因(*cmlA*、*fexA*、*cfr* 和 *floR*), 氨基糖苷耐药基因(*aadA*) 和 β -内酰胺酶耐药基因(*blaTEM*), 16S rRNA 以及 2 个整合酶基因(*int1* 和 *int2*).

1.3 样品 DNA 提取

采集样品的 DNA 提取参考文献 [27] 的方法,具体为,水样中 DNA 的提取:将一定体积的水样经 $0.22\ \mu\text{m}$ 的混合醋酸酯纤维素膜过滤后,采用 PowerSoil DNA(QIAGEN, 德国)提取试剂盒提取.基质样品中 DNA 的提取:每个基质样品称取 25 g,用 0.85% 的生理盐水洗涤,通过摇床振荡 2 次(参数: $220\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 30°C , 每次 20 min)以洗脱表面微生物.将得到的含有微生物的溶液以与水样品相同的方式提取 DNA.植物样品 DNA 的提取:称取 0.05 g 植物样品,采用试剂盒内的操作步骤提取植物中的 DNA.提取获得的样品 DNA 通过核酸检测仪(NANODROP ONE[®], Thermo SCIENTIFIC)测定 DNA 浓度和纯度,并保存于 -80°C 冰箱.

1.4 分析方法

抗性基因定量: 21 种目标抗性基因的引物选择、体系配置以及荧光定量 PCR 检测和分析均采用

笔者前期已发表的方法^[28, 29].

高通量测序:另外对基质样品进行了硝化和反硝化功能基因的 16S rDNA 测序来分析基质中氮循环功能微生物多样性变化差异,氨氧化和固氮功能基因和反硝化基因扩增子测序由诺禾致源生物信息学研究所(北京)完成.功能基因测序引物为: *nifH* 引物(*nifH-F*: TGCGAYCCSAARGCBGA CTC 和 *nifH-R*: ATSGCCATCATYTCRCCGGA) 和 *nirS* 引物(*cd3aF*: G TSAACG TSAAGGARACSGG 和 *R3cd*: GASTTCGGRTGSGTCTTGA).并使用 TruSeq[®] DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 建库试剂盒进行文库构建,构建好的文库经过 Qubit 和 Q-PCR 定量,文库合格后,使用 HiSeq2500 PE250 进行上机测序.

废水常规指标分析:本文中的各种氮形态数据、硝化和反硝化量数据等均来源于笔者前期报道的数据^[26].

1.5 数据处理与分析

采用 Excel 2016 进行数据的平均值和标准偏差分析,采用 SPSS 24. 进行统计差异与相关性分析,使用 Sigmaplot(版本 12.5)软件绘制图形.

2 结果与讨论

2.1 3 种潮汐-复合流人工湿地系统中抗性基因的分布和去除

2.1.1 3 种湿地系统废水中抗性基因的分布特征和去除效率

3 种类型潮汐流-人工湿地系统各阶段废水中目标抗性基因的含量如图 2 所示,进水中 7 类目标抗性基因全部检出,绝对丰度排序为四环素类 > 氨基糖苷类 > 磺胺类 > 大环内酯类 > β -内酰胺酶类 > 氯霉素类 > 喹诺酮类,抗性基因丰度范围为 $7.37 \times 10^3 \sim 8.26 \times 10^3$ (喹诺酮类) $\sim 1.70 \times 10^8 \sim 2.07 \times 10^8$ (四环素类) $\text{copies}\cdot\text{mL}^{-1}$.出水中,各类抗性基因的绝对丰度均有不同程度地降低(1~2 个数量级).而从湿地 A 和 C 的中间出水点发现,A 和 C 装置对于耐药基因的去除效果较好,所有抗性基因的总绝对丰度分别降低到 $2.15 \times 10^3 \sim 6.25 \times 10^7$ $\text{copies}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $\text{ND} \sim 4.12 \times 10^7$ $\text{copies}\cdot\text{mL}^{-1}$ (去除率为 89.84%~90.84%).在各装置的最终出水检测到 6 类抗性基因(喹诺酮类均未检出),最终出水中抗性基因的绝对丰度范围为 $2.59 \times 10^5 \sim 6.63 \times 10^5$ (β -内酰胺酶类) $\sim 1.79 \times 10^7 \sim 2.14 \times 10^7$ (磺胺类) $\text{copies}\cdot\text{mL}^{-1}$.

3 种类型湿地系统对于进水中的 7 类抗性基因具有较好的去除,总的水相去除率在 82.82%~

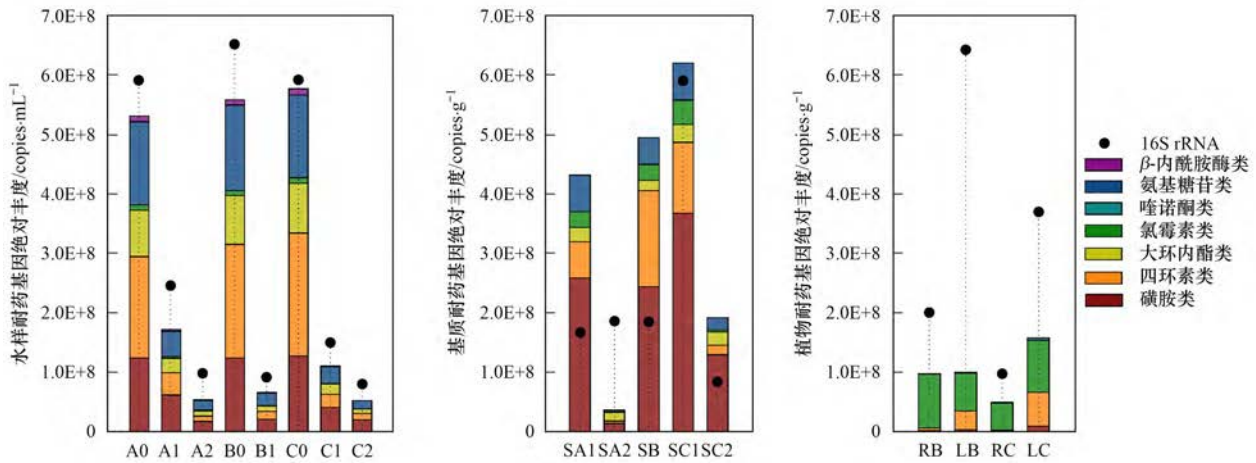
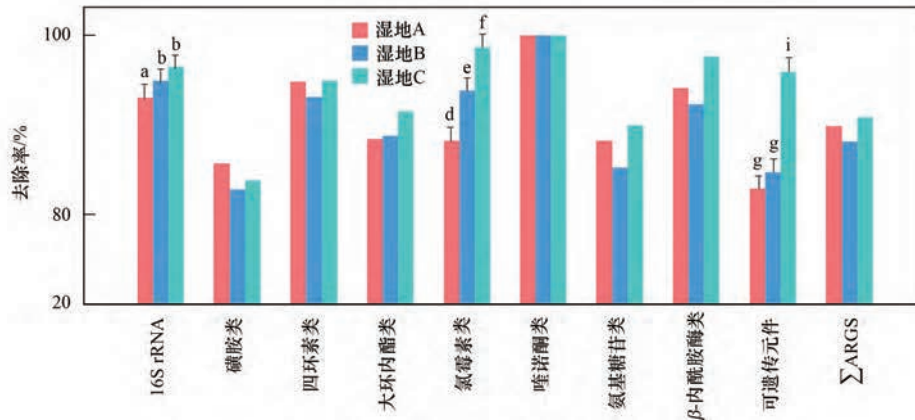


图2 3种湿地系统各段废水、基质和种植植物中抗性基因绝对丰度

Fig. 2 Absolute abundance of antibiotic resistance genes in water, substrates, and plants

100%之间(图3)。其中,增加了隔板的湿地A系统对于抗性基因的总去除率最高(85.66%~100%),而仅种植植物的湿地B系统总去除率相对最低(82.82%~100%)。其中喹诺酮类去除率最高为100%去除,四环素类次之,达到93.10%~94.87%,而磺胺类抗性基因的去除效果相对最低为82.82%~85.66%。对比3种类型的湿地系统发现,湿地A与湿地C去除效率基本一致,初步推测隔板的添加在一定程度上增加了废水的流程,从而增加了抗性

基因的去除效率。而仅种植植物的湿地B显著低于湿地C,说明在提高抗性基因去除效率方面,隔板的作用要大于植物。张金璐^[30]的研究也发现,表面流人工湿地能有效去除养殖废水中抗性基因,其中对于四环素类抗性基因(90.65%)去除效果优于磺胺类抗性基因(82.10%)。仅从喹诺酮类抗性基因的水相去除率(100%)来看,本研究的人工湿地系统的去除效果优于已报道的一些城市污水处理厂(75%~>98%)^[31]。



不同小写字母代表存在显著性差异($P < 0.05$)

图3 3种湿地系统中抗性基因的水相去除率

Fig. 3 Removal rates of antibiotic resistance genes in three wetlands

2.1.2 湿地各基质和种植植物中抗性基因分布

3种类型的湿地基质和植物均有不同程度抗性基因检出(图2)。在湿地基质中共检出6类抗性基因,分别为四环素类、氨基糖苷类、磺胺类、大环内酯类、β-内酰胺酶类和氯霉素类。抗性基因绝对丰度由高到低为磺胺类>四环素类>氨基糖苷类>大环内酯类>氯霉素类>β-内酰胺酶类。抗性基因总绝对丰度在 $3.69 \times 10^7 \sim 6.21 \times 10^8 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$ 之间,其中磺胺类绝对丰度最高为 $1.45 \times 10^7 \sim 3.68 \times 10^8 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$ 。另外,也发现湿地A和C的隔板两侧基

质中抗性基因积累有差异,出水侧基质中抗性基因丰度要相对更低,这可能与增加隔板后导致废水在湿地系统中的流程增加有关。植物中也检出6类抗性基因,分别为四环素类、氨基糖苷类、磺胺类、β-内酰胺酶类、氯霉素类和喹诺酮类,与基质不同的是在植物中检出了喹诺酮类,但没有发现大环内酯类抗性基因(图2)。植物中检出的抗性基因总丰度显著低于基质,绝对丰度范围为 $1.70 \times 10^4 \sim 4.96 \times 10^4 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$ (喹诺酮类)和 $4.60 \times 10^7 \sim 9.10 \times 10^7 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$ (氯霉素类)。植物不同组织间抗性基因

的分布有显著差异,植物叶中的总抗性基因丰度高于茎(仅有喹诺酮类抗性基因检出,湿地 B)。需要注意的是本研究中的 3 种人工湿地系统基质和种植植物中检出的抗性基因为长期积累的结果。以上结果也与已有研究发现的人工湿地系统土壤和植物能够有效吸收废水中的抗性基因一致^[32]。前人研究也表明,植物种类、基质类型和水流方向等均会对湿地性能产生影响,植物吸收和水流会影响细菌群落组成和结构,进而影响人工湿地对污染物的去除效果^[33]。湿地植物去除新兴污染物的方式主要是植物吸收、植物挥发和/或植物降解^[34-36]。此外,也有研究表明植物能间接参与 ARGs 的去除,主要是通过过滤固体颗粒并向微生物群落输送氧气,增强根际细菌的作用,或为生物膜的发育提供介质,增强了微生物的去除能力,减少 ARGs 的积累,从而影响 ARGs 的丰度^[37-40]。因此植物吸附 ARGs 后,并不会对植物组织内部造成明显影响。但植物对 ARGs 的吸附机制和组织传输机制仍不清楚,值得后续开展更深入的研究。

2.1.3 抗性基因与可移动元件的相关性及其相对丰度特征

湿地系统中检出的可移动元件基因 MGEs 在进水和出水中的绝对丰度分别为 $4.50 \times 10^7 \sim 4.54 \times 10^7$ copies·mL⁻¹ 和 $1.87 \times 10^6 \sim 7.79 \times 10^6$ copies·mL⁻¹,其中 *Int11* 丰度较高,占主导地位。对比 3 种湿地对可移动元件的去除发现,湿地 C 去除效

果最好(95.84%),显著高于湿地 B(84.63%)和湿地 A(82.85%)。抗性基因与可移动元件相关性分析结果如表 1 所示,结果显示磺胺类、四环素类、氯霉素类、喹诺酮类、大环内酯类、氨基糖苷类以及 β -内酰胺酶类抗性基因与可移动元件呈极显著正相关(相关系数为 0.931~0.976, $P < 0.01$),表明这几类抗性基因均存在水平转移的风险,这与在污水处理厂、河水、养殖场土壤、河口环境和地下水均发现可移动元件与 ARGs 表现了很高的相关性一致^[41-43]。可移动元件(整合子)可以整合不同的抗性基因发生水平转移,使耐药性得以散播,甚至导致多重耐药菌株的产生^[44]。此外,本研究结果也发现磺胺类、四环素类、氯霉素类、喹诺酮类、大环内酯类、氨基糖苷类和 β -内酰胺酶类抗性基因两两之间也表现出显著相关性(0.979~0.999, $P < 0.01$),如表 1 所示。

检测到的 7 类抗性基因与细菌 16S rRNA 的相对丰度如图 4 所示。水相中磺胺类及氨基糖苷类抗性基因相对丰度较高(0.043~3.476),基质中相对丰度更高的为磺胺类(0.041~0.752)和四环素类(0.011~0.456)抗性基因,而植物中相对丰度最高的为氯霉素类(0.095~0.202)和磺胺类(0.004~0.019)抗性基因。许多研究已报道环境中四环素类和磺胺类抗性菌占的比重很大,与海水养殖环境^[45]、养鸡场^[46]和设施菜地土壤^[47]中抗性基因的含量及种类类似。

表 1 抗性基因和可移动元件之间的相关性¹⁾

Table 1 Correlations between various ARGs and MGEs

	四环素类	氯霉素类	喹诺酮类	大环内酯类	氨基糖苷类	β -内酰胺酶类	可移动元件
磺胺类	0.979**	0.986**	0.984**	0.989**	0.987**	0.989**	0.976**
四环素类		0.990**	0.987**	0.991**	0.994**	0.988**	0.931**
氯霉素			0.987**	0.988**	0.992**	0.997**	0.957**
喹诺酮				0.995**	0.995**	0.981**	0.960**
大环内酯类					0.999**	0.983**	0.950**
氨基糖苷						0.988**	0.948**
β -内酰胺酶类							0.957**

1) **表示 $P < 0.01$ 样本数量 $n = 8$

2.2 潮汐-复合流人工湿地系统优化对氮循环功能微生物多样性的影响

湿地基质中的微生物尤其是功能微生物是污染物去除的主体,功能微生物的种群结构和分布直接影响着湿地系统的污染物去除能力^[24,48,49]。为揭示湿地系统优化过程对硝化和反硝化功能微生物种群结构的影响,分别对 3 类湿地系统的 5 种基质中氨氧化和反硝化功能微生物组成和变化进行了对比分析。不同基质中氨氧化和反硝化功能微生物多样性指数等如表 2 所示。整体而言,湿地 A 和 C 基质中

的硝化和反硝化功能微生物物种 Shannon 指数均高于湿地 B。此外,C 基质样品的 Chao1 和 ACE 指数明显高于湿地 A 和湿地 B。这都说明增加隔板和种植植物后湿地系统的功能微生物物种丰富度有明显增高。

3 种类型湿地基质中氨氧化和反硝化功能微生物的物种多样性差异与笔者前期监测的 3 种湿地中硝化量和反硝化量的结果(表 3)具有较好的对应性^[26]:如湿地 C 的反硝化量相对最高 $6.37 \text{ g} \cdot (\text{m}^2 \cdot \text{d})^{-1}$,总氮去除率也最高(69.9%),这与湿

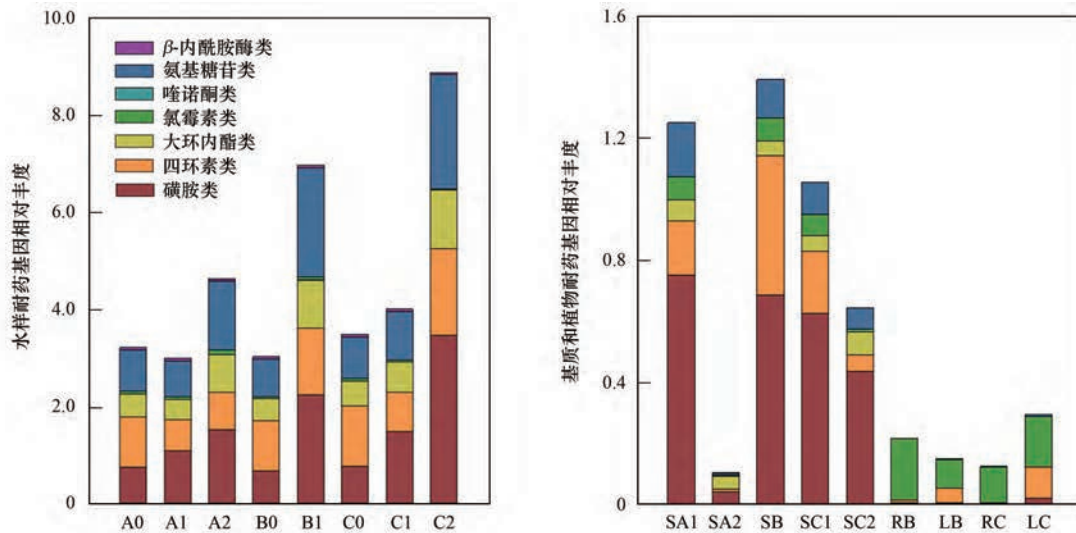


图4 抗性基因在水、基质和植物的相对丰度

Fig. 4 Relative abundance of antibiotic resistance genes in water, substrates, and plants

表2 湿地基质中氨氧化和反硝化功能基因 α 指数统计Table 2 The α index of ammonia oxidation and denitrification functional genes

样品	物种数目		Shannon 指数		Simpson 指数		Chao1 指数		ACE 指数		覆盖度指数	
	<i>nifH</i>	<i>nirS</i>	<i>nifH</i>	<i>nirS</i>	<i>nifH</i>	<i>nirS</i>	<i>nifH</i>	<i>nirS</i>	<i>nifH</i>	<i>nirS</i>	<i>nifH</i>	<i>nirS</i>
SA1	1 542	9 020	5.160	9.005	0.909	0.980	2 021	13 663	2 102	15 088	0.994	0.946
SA2	1 636	7 716	6.107	8.771	0.960	0.983	2 152	10 999	2 231	11 871	0.994	0.957
SB	1 412	6 536	5.177	7.742	0.928	0.959	1 901	9 637	1 973	10 642	0.994	0.962
SC1	1 631	7 490	5.168	8.598	0.900	0.984	2 205	11 686	2 296	12 919	0.993	0.953
SC2	1 702	6 735	5.727	8.499	0.942	0.981	2 562	9 184	2 664	9 978	0.992	0.965

表3 3种湿地系统对氨氮、总氮和反硝化量的去除效果

Table 3 Removal rates of ammonia nitrogen, total nitrogen, and denitrification amount in three wetland systems

湿地	出水口	硝化量	反硝化量	$\text{NO}_3^- - \text{N}$ 浓度	$\text{NH}_4^+ - \text{N}$		TN	
		$/\text{g} \cdot (\text{m}^2 \cdot \text{d})^{-1}$	$/\text{g} \cdot (\text{m}^2 \cdot \text{d})^{-1}$		浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	去除率/%	浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	去除率/%
A	A1	3.97	3.62	8.29 ± 1.39	10.24 ± 2.13	56.4	17.45 ± 2.43	43.3
	A2	5.01	4.48	8.91 ± 1.18	6.77 ± 0.68	71.2	14.88 ± 1.08	51.7
B	B1	6.62	3.69	16.20 ± 2.03	2.06 ± 0.73	91.5	19.33 ± 0.61	38.3
C	C1	4.43	5.15	4.88 ± 1.86	8.92 ± 4.09	62.4	13.16 ± 3.84	57.3
	C2	5.65	6.37	4.88 ± 2.13	4.85 ± 1.85	79.5	9.28 ± 1.89	69.9

地 C 基质中的功能微生物多样性指数更高对应; 湿地 B 的硝化量最高为 $6.62 \text{ g} \cdot (\text{m}^2 \cdot \text{d})^{-1}$, 对氨氮的去除率也最高(91.5%), 这与湿地 B 的氨氧化功能微生物多样性指数比湿地 A (SA1) 和湿地 C (SC1) 更高一致. 这此结果同时也表明增加隔板有利于反硝化功能微生物多样性, 而种植植物则更能促进氨氧化功能微生物的分布.

从属水平聚类分析结果可以看出, 不同湿地系统的基质中氨氧化和反硝化功能微生物组成(丰度最高的 10 种) 差异较大(图 5), 虽然存在大量未知的微生物种群, 但同样也匹配了很多已知的氨氧化和反硝化功能微生物. 对于氨氧化功能微生物, *Bradyrhizobium* (缓生根瘤菌) 仅出现在湿地 A 系统的基质(SA2) 与湿地 C 系统的基质(SC2) 中, 具有

氨氧化等固氮能力, 这与这两种基质所处阶段具有较高的硝化量 $5.01 \sim 5.65 \text{ g} \cdot (\text{m}^2 \cdot \text{d})^{-1}$ 相符. 反硝化功能基因物种注释结果发现有 *Diaphorobacter* 和 *Acidovorax* 菌, 二者均为革兰氏阴性, 通常在土壤、水和植物中发现^[50, 51], 以及常见于污水中的厌氧菌 *Leptothrix*^[52], 易存在于含有高浓度有机物的污染水体, *Rubrivivax* 是一种常见的能进行光合作用的反硝化细菌^[53], 在湿地 B 的基质(SB) 和湿地 C 的基质(SC1) 中含量相对最多, 这可能与这两种湿地都种植了湿地植物美人蕉有关. 此外, 从聚类分析结果可以看出(图 6). 无论是氨氧化还是反硝化功能微生物组成, 增加隔板对基质中的氨氧化和反硝化微生物种群结构都产生了显著影响, 如湿地 A 和 C 种的基质 SA1 和 SC1、基质 SA2 和 SC2 中的氨氧化微生

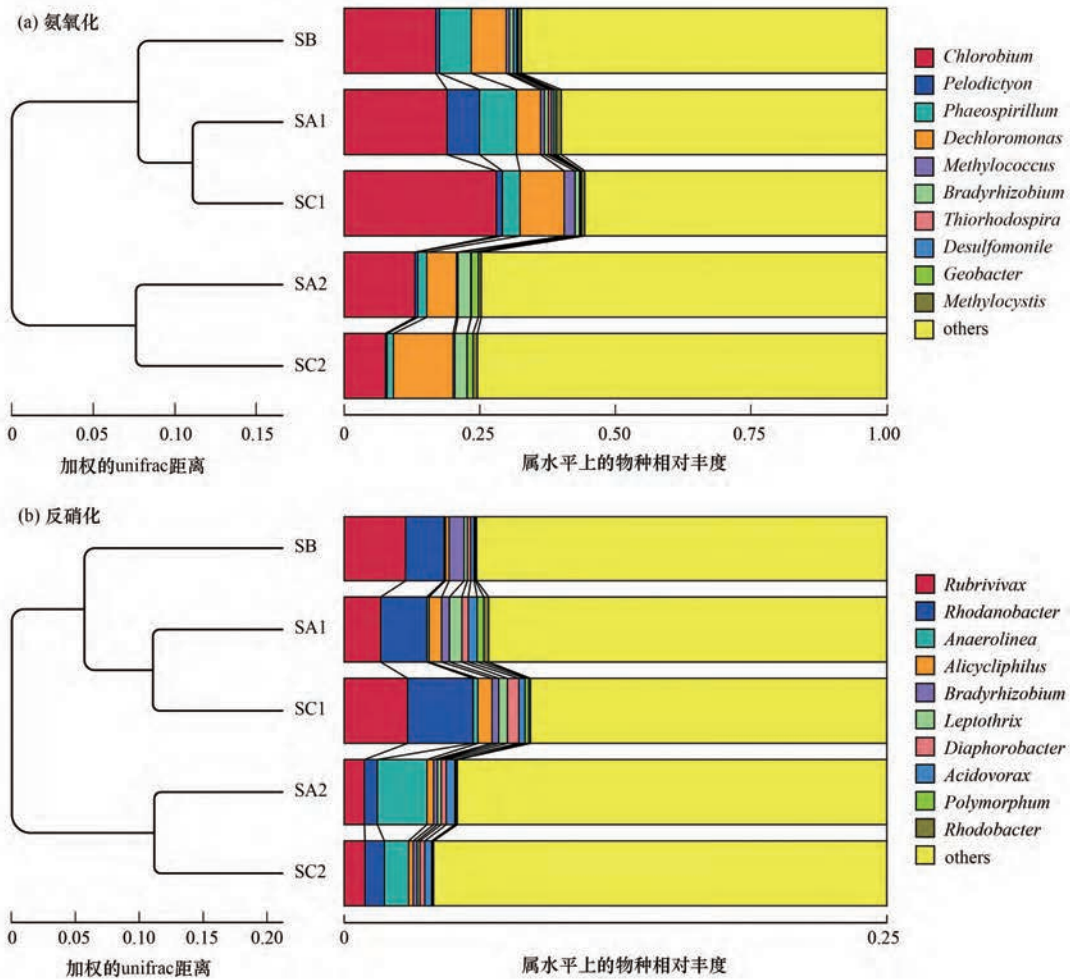


图 5 基于加权 unifrac 距离的 UPGMA 氨氧化和反硝化细菌聚类树

Fig. 5 UPGMA clustering tree of ammonia oxidizing and denitrifying bacteria based on weighted unifrac distance

物组成相似,但与湿地 B 的基质 SB 中氨氧化微生物物种组成则差异很大,基质中反硝化功能微生物的组成也是同样的规律.

氮循环与湿地基质微生物多样性之间具有相关性,而对于人工湿地中氮循环与 ARGs 的关系研究较少.从本研究结果可以看出,TN 的去除率湿地 C > 湿地 A > 湿地 B(表 3),而 ARGs 的去除效果总体

也是湿地 A 和 C 优于湿地 B(图 2),其中湿地 C 氯霉素类、可遗传元件类耐药基因和 16S rRNA 的去除率最好,且与其他两个湿地具有显著性差异($P < 0.05$),因此,可以看出 TN 去除率与 ARGs 的去除效果具有协同一致性,即总氮的去除率越高,某种程度反映了微生物的物种多样性和丰富度更高,对于耐药基因的去除效果也越好.相关研究也表明,污水理

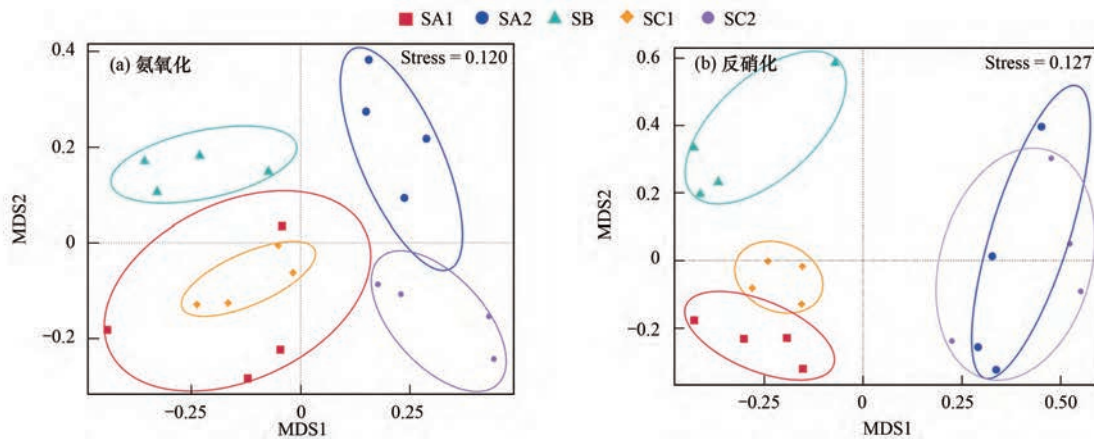


图 6 湿地基质中氨氧化和反硝化细菌组成无度量多维标定分析

Fig. 6 Non-metric multi-dimensional scaling(NMDS) of ammonia oxidizing and denitrifying bacteria

化性质可单独对 ARGs 的分布产生影响,但更多可能是通过影响土壤总细菌群落结构,间接对 ARGs 产生影响^[54]。

3 结论

(1) 通过增加隔板和种植植物能有效提高潮汐-复合流人工湿地系统对抗生素抗性基因的去除效率,7类21个抗性基因去除率最高能达到83.82%~100.0%,显著高于仅增加隔板或者仅种植植物。增加隔板有利于湿地基质富集抗性基因,而种植的植物对抗性基因的吸附也是其去除方式。

(2) 通过抗性基因丰度与可移动元件相关性分析,发现磺胺类、四环素类、氯霉素类、喹诺酮类、大环内酯类、氨基糖苷类以及 β -内酰胺酶类抗性基因与可移动元件呈极显著正相关,存在水平转移的风险,能导致抗生素耐药性随废水排放传播扩散,导致多重耐药菌株的产生。

(3) 增加隔板和种植植物等工艺优化对氮循环功能微生物物种多样性和丰富度有显著影响,增加隔板能提高反硝化功能微生物多样性,种植植物对氨氧化功能微生物分布有利,这与湿地系统废水中硝化量、反硝化量和总氮去除率相对更高呈现对应关系。

参考文献:

- [1] Zhang Q Q, Ying G G, Pan C G, *et al.* Comprehensive evaluation of antibiotics emission and fate in the river basins of China: Source analysis, multimedia modeling, and linkage to bacterial resistance [J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, **49**(11): 6772-6782.
- [2] Qiao M, Ying G G, Singer A C, *et al.* Review of antibiotic resistance in China and its environment [J]. *Environment International*, 2018, **110**: 160-172.
- [3] He L Y, Liu Y S, Su H C, *et al.* Dissemination of antibiotic resistance genes in representative broiler feedlots environments: Identification of indicator ARGs and correlations with environmental variables [J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, **48**(22): 13120-13129.
- [4] Ravi Shankar P, Balasubramaniam R. Antimicrobial resistance: global report on surveillance [J]. *Australasian Medical Journal*, 2014, **7**(5): 238-239.
- [5] Ying G G, He L Y, Ying A J, *et al.* China must reduce its antibiotic use [J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, **51**(3): 1072-1073.
- [6] 梁惜梅. 珠江口及其沿岸典型水产养殖区水和沉积物中抗生素及抗生素抗性基因的研究 [D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2013.
- [7] Jiang L, Hu X L, Xu T, *et al.* Prevalence of antibiotic resistance genes and their relationship with antibiotics in the Huangpu River and the drinking water sources, Shanghai, China [J]. *Science of the Total Environment*, 2013, **458-460**: 267-272.
- [8] 张瑞泉, 应光国, 丁永祯, 等. 广东西枝江-东江流域抗生素抗性基因污染特征研究 [J]. *农业环境科学学报*, 2013, **32**(12): 2471-2479.

- Zhang R Q, Ying G G, Ding Y Z, *et al.* Pollution characteristics of antibiotic resistance genes in Xizhijiang-Dongjiang River basin, Guangdong Province, China [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2013, **32**(12): 2471-2479.
- [9] 陈超琼. 抗生素在中国东南沿海沉积物中的分布初探 [D]. 上海: 华东师范大学, 2017.
- [10] 李青. 土壤耐药菌及耐药基因丰度与多样性对高温处理猪粪施用的短期响应 [D]. 扬州: 扬州大学, 2016.
- [11] 楚莹莹. 基于土壤耐药基因污染分析土壤修复及防治处理 [J]. *环境与发展*, 2019, **31**(7): 46, 72.
- Chu Y Y. Based on antibiotic resistance genes pollution in soil for exploring soil rehabilitation and revention and treatment [J]. *Inner Mongolia Environmental Sciences*, 2019, **31**(7): 46, 72.
- [12] 李菁, 要茂盛. 空气介质中耐药细菌和耐药基因的研究进展 [J]. *中华预防医学杂志*, 2018, **52**(4): 440-445.
- Li J, Yao M S. State-of-the-art status on airborne antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes [J]. *Chinese Journal of Preventive Medicine*, 2018, **52**(4): 440-445.
- [13] 董冀欣. 污水中抗生素及耐药基因的有效去除技术 [J]. *农家参谋*, 2019, (10): 205.
- [14] Munir M, Wong K, Xagorarakis I. Release of antibiotic resistant bacteria and genes in the effluent and biosolids of five wastewater utilities in Michigan [J]. *Water Research*, 2011, **45**(2): 681-693.
- [15] 刘冲, 刘鹏程, 黄满红. 城市污水厂中四环素耐药基因的分布特性研究 [EB/OL]. <http://www.doc88.com/p-019966340389.html>, 2013-01-15.
- [16] Auerbach E A, Seyfried E E, McMahon K D. Tetracycline resistance genes in activated sludge wastewater treatment plants [J]. *Water Research*, 2007, **41**(5): 1143-1151.
- [17] Pei R T, Cha J, Carlson K H, *et al.* Response of antibiotic resistance genes (ARG) to biological treatment in dairy lagoon water [J]. *Environmental Science & Technology*, 2007, **41**(14): 5108-5113.
- [18] 宁晓宇, 宋旭阳. 湿地污水处理技术在城市污水处理中的应用 [J]. *辽宁城乡环境科技*, 2004, **24**(2): 51-52, 50.
- Ning X Y, Song X Y. Application of wet land system to urban sewage treatment [J]. *Liaoning Urban and Rural Environmental Science & Technology*, 2004, **24**(2): 51-52, 50.
- [19] Sun G, Zhao Y, Allen S, *et al.* Generating "Tide" in pilot-scale constructed wetlands to enhance agricultural wastewater treatment [J]. *Engineering in Life Sciences*, 2006, **6**(6): 560-565.
- [20] Han Z F, Dong J, Shen Z Q, *et al.* Nitrogen removal of anaerobically digested swine wastewater by pilot-scale tidal flow constructed wetland based on in-situ biological regeneration of zeolite [J]. *Chemosphere*, 2019, **217**: 364-373.
- [21] 胡沅胜, 赵亚乾, 赵晓红. 强化总氮去除的改进型潮汐流人工湿地 [J]. *中国给水排水*, 2015, **31**(15): 133-138.
- Hu Y S, Zhao Y Q, Zhao X H. Modified tidal flow constructed wetland for enhanced total nitrogen removal [J]. *China Water & Wastewater*, 2015, **31**(15): 133-138.
- [22] Li Y F, Zhu G B, Ng W J, *et al.* A review on removing pharmaceutical contaminants from wastewater by constructed wetlands: Design, performance and mechanism [J]. *Science of the Total Environment*, 2014, **468-469**: 908-932.
- [23] Carvalho P N, Basto M C P, Almeida C M R, *et al.* A review of plant-pharmaceutical interactions: from uptake and effects in crop plants to phytoremediation in constructed wetlands [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2014, **21**(20): 11729-11763.
- [24] Chen J, Deng W J, Liu Y S, *et al.* Fate and removal of

- antibiotics and antibiotic resistance genes in hybrid constructed wetlands[J]. *Environmental Pollution*, 2019, **249**: 894–903.
- [25] Chen J, Liu Y S, Deng W J, *et al.* Removal of steroid hormones and biocides from rural wastewater by an integrated constructed wetland[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, **660**: 358–365.
- [26] 张玲玲, 杨永强, 张权, 等. 组合型人工湿地对二级好氧单元出水的深度处理[J]. *环境工程学报*, 2019, **13**(7): 1592–1601.
- Zhang L L, Yang Y Q, Zhang Q, *et al.* Advanced treatment of secondary aerobic unit effluent by combined constructed wetlands[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2019, **13**(7): 1592–1601.
- [27] 陈军, 魏晓东, 刘有胜, 等. 人工湿地对抗生素、耐药基因的去除与湿地优化[A]. 见: 第三届生态毒理学学术研讨会[C]. 无锡: 南京大学, 2016.
- [28] Gao F Z, Zou H Y, Wu D L, *et al.* Swine farming elevated the proliferation of *Acinetobacter* with the prevalence of antibiotic resistance genes in the groundwater [J]. *Environment International*, 2020, **136**, doi: 10.1016/j.envint.2020.105484.
- [29] Su H C, Pan C G, Ying G G, *et al.* Contamination profiles of antibiotic resistance genes in the sediments at a catchment scale [J]. *Science of the Total Environment*, 2014, **490**: 708–714.
- [30] 张金璐. 表面流人工湿地对养殖废水中抗生素和抗性基因去除效应研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2017.
- [31] 李超, 鲁建江, 童延斌, 等. 喹诺酮抗性基因在城市污水处理系统中的分布及去除[J]. *环境工程学报*, 2016, **10**(3): 1177–1183.
- Li C, Lu J J, Tong Y B, *et al.* Removal of quinolone resistance bacteria and corresponding resistance genes in a conventional municipal sewage treatment plant [J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2016, **10**(3): 1177–1183.
- [32] 郑加玉. 养殖废水中抗生素及抗性基因在垂直流人工湿地中的去除[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2013.
- [33] Arroyo P, Ansola G, de Miera L E S, *et al.* Effects of substrate, vegetation and flow on arsenic and zinc removal efficiency and microbial diversity in constructed wetlands [J]. *Ecological Engineering*, 2013, **51**: 95–103.
- [34] Wang X P, Dossett M P, Gordon M P, *et al.* Fate of carbon tetrachloride during phytoremediation with poplar under controlled field conditions [J]. *Environmental Science & Technology*, 2004, **38**(21): 5744–5749.
- [35] Imfeld G, Braeckvelt M, Kusch P, *et al.* Monitoring and assessing processes of organic chemicals removal in constructed wetlands[J]. *Chemosphere*, 2009, **74**(3): 349–362.
- [36] Brennan R A, Sanford R A, Werth C J. Chitin and corncobs as electron donor sources for the reductive dechlorination of tetrachloroethene[J]. *Water Research*, 2006, **40**(11): 2125–2134.
- [37] Anderson J C, Carlson J C, Low J E, *et al.* Performance of a constructed wetland in Grand Marais, Manitoba, Canada: Removal of nutrients, pharmaceuticals, and antibiotic resistance genes from municipal wastewater[J]. *Chemistry Central Journal*, 2013, **7**(1), doi: 10.1186/1752-153X-7-54.
- [38] Chen H, Zhang M M. Occurrence and removal of antibiotic resistance genes in municipal wastewater and rural domestic sewage treatment systems in eastern China [J]. *Environment International*, 2013, **55**: 9–14.
- [39] Fang H S, Zhang Q, Nie X P, *et al.* Occurrence and elimination of antibiotic resistance genes in a long-term operation integrated surface flow constructed wetland[J]. *Chemosphere*, 2017, **173**: 99–106.
- [40] Huang X, Liu C X, Li K, *et al.* Performance of vertical up-flow constructed wetlands on swine wastewater containing tetracyclines and *tet* genes[J]. *Water Research*, 2015, **70**: 109–117.
- [41] Chen Q L, Li H, Zhou X Y, *et al.* An underappreciated hotspot of antibiotic resistance: the groundwater near the municipal solid waste landfill[J]. *Science of the Total Environment*, 2017, **609**: 966–973.
- [42] Ma L P, Li A D, Yin X L, *et al.* The prevalence of integrons as the carrier of antibiotic resistance genes in natural and man-made environments[J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, **51**(10): 5721–5728.
- [43] Zhu Y G, Zhao Y, Li B, *et al.* Continental-scale pollution of estuaries with antibiotic resistance genes [J]. *Nature Microbiology*, 2017, **2**(4), doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.270.
- [44] 蔡敏泓. 整合子与大肠埃希菌耐药基因水平转移关系的研究进展[J]. *西南军医*, 2011, **13**(1): 124–126.
- [45] 曲凌云, 李壹, 朱鹏飞. 海水养殖区耐药菌抗四环素和磺胺类药物耐药基因的研究[A]. 见: 第五届全国微生物资源学术暨国家微生物资源平台运行服务研讨会论文集[C]. 广州: 广东省科学技术协会科技交流部, 2013. 79–80.
- [46] 王娜, 焦少俊, 单正军, 等. 典型养殖场中磺胺耐药菌与抗性基因的分布特性[A]. 见: 中国环境科学学会生态与自然保护分会2013学术年会论文集[C]. 南京: 中国环境科学学会, 2013. 64.
- [47] 赵祥, 王金花, 朱鲁生. 设施菜地土壤中抗生素及抗性基因多样性及丰度的研究[A]. 见: 中国土壤学会土壤环境专业委员会第二十次会议暨农田土壤污染与修复研讨会摘要集[C]. 合肥: 中国土壤学会土壤环境专业委员会, 2018. 208–209.
- [48] 黄德锋, 李田, 陆斌. 复合垂直流人工湿地污染物去除及微生物群落结构的PCR-DGGE分析[J]. *环境科学研究*, 2007, **20**(6): 137–141.
- Huang D F, Li T, Lu B. Pollutants removal and analysis of structure changes of microbial community in integrated vertical-flow constructed wetland [J]. *Research of Environmental Sciences*, 2007, **20**(6): 137–141.
- [49] Chen J, Ying G G, Wei X D, *et al.* Removal of antibiotics and antibiotic resistance genes from domestic sewage by constructed wetlands: effect of flow configuration and plant species [J]. *Science of the Total Environment*, 2016, **571**: 974–982.
- [50] Chakravarthy S S, Pande S, Kapoor A, *et al.* Comparison of denitrification between *Paracoccus* sp. and *Diaphorobacter* sp. [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2011, **165**(1): 260–269.
- [51] Wisplinghoff H. *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. and miscellaneous gram-negative bacilli [J]. *Infectious Diseases*, 2017, **2**: 1579–1599. e2.
- [52] Gupta P K, McGrath C. Microbiology, inflammation, and viral infections[A]. In: Bibbo M, Wilbur D (Eds.). *Comprehensive Cytopathology* (3rd ed.) [M]. Philadelphia: Elsevier, 2008.
- [53] Kator H, Rhodes M. Detection, enumeration and identification of environmental microorganisms of public health significance[A]. In: Mara D, Horan N (Eds.). *Handbook of Water and Wastewater Microbiology* [M]. New York: Academic Press, 2003. 113–144.
- [54] 张凤丽. 某冶炼厂周围农田土壤中抗生素抗性基因分布及其影响因素[D]. 郑州: 郑州大学, 2018.