

# 银杏叶提取液提高纳米零价铁活化过硫酸钠去除 抗生素抗性基因效果及作用研究

段婉君

(山西警察学院侦查系,山西太原 030401)

**摘要:** 抗生素抗性基因(antibiotic resistance genes, ARGs)可以编码在细菌染色体或质粒中触发其生化防御机制,这种机制使细菌能够在相应的抗生素存在下生存,对公众健康构成威胁。本研究分别使用车前草和银杏叶作为原料,通过液相还原法合成车前草改性型纳米零价铁(nanoscale zero valent iron modified by *Plantago asiatica* L., P-nZVI)和银杏叶改性型 nZVI(nZVI modified by *Ginkgo biloba* L. leaf, G-nZVI),利用 qPCR 技术研究改性纳米零价铁活化过硫酸钠(sodium persulfate, PS)对河流水中细菌 16S rRNA 基因和 ARGs 的去除情况。结果显示,相较于 nZVI+PS 和 P-nZVI+PS 体系,G-nZVI 对 PS 表现出优异的活化作用,反应 30 min 后,细菌 16S rRNA 基因丰度由  $1.56 \times 10^6 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  降至  $8.85 \times 10^2 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , 并实现最高的 ARGs 去除效率。代谢组学分析发现,黄酮类化合物、二萜类化合物(C20)和氰苷等可能是有效修饰 nZVI 的活性化合物。KEGG 功能通路表明,下调代谢产物可能通过改变分子间作用力、增加颗粒分散度、发挥抗氧化保护能力,实现 G-nZVI+PS 对细菌 16S rRNA 基因和 *aac(6')-Ib* 更高的去除率。G-nZVI 的特征官能团表征及改性效应相关潜在生物标志物和改性途径研究,为过硫酸盐技术高效治理 ARGs 废水污染提供参考。

**关键词:** 改性铁基催化剂;代谢组学;抗生素抗性基因

中图分类号:X703.1

文献标志码:A

## Study on the effect and role of *Ginkgo biloba* L. leaf extract in enhancing the removal of antibiotic resistance genes by activating sodium persulfate with nano zero valent iron

DUAN Wanjun

(Investigation Department of Shanxi Police College, Taiyuan, Shanxi 030401)

**Abstract:** Antibiotic resistance genes (ARGs) can be encoded in bacterial chromosomes or plasmids to trigger their biochemical defense mechanisms, enabling bacteria to survive in the presence of corresponding antibiotics, posing a threat to public health. This study utilized *Plantago asiatica* L. and *Ginkgo biloba* L. leaf as raw materials to synthesize nanoscale zero valent iron modified by *Plantago asiatica* L. (P-nZVI) and nZVI modified by *Ginkgo biloba* L. leaf (G-nZVI) through the liquid-phase reduction method. The qPCR technique was employed to investigate the removal efficiency of bacterial 16S rRNA genes and ARGs in river water by activating sodium persulfate (PS) with the modified nanoscale zero valent iron. The results showed that compared to the nZVI+PS and P-nZVI+PS systems, G-nZVI exhibited superior activation effects on PS. After 30 minutes of reaction, the bacterial 16S rRNA gene abundance decreased from  $1.56 \times 10^6 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  to  $8.85 \times 10^2 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , achieving the highest ARGs removal efficiency. Metabolomic analysis revealed that flavonoids, diterpenoids (C20), and cyanogenic glycosides might be the active compounds effectively modifying nZVI. The KEGG functional pathway analysis suggests that the downregulated metabolites may enhance the removal efficiency of G-nZVI+PS on bacterial 16S rRNA gene and *aac(6')-Ib* by altering intermolecular forces, increasing particle dispersion, and exerting antioxidant protective capabilities. The characterization of functional groups in G-nZVI and the study of related potential biomarkers and modification pathways provide a reference for the efficient treatment of ARGs-contaminated wastewater using persulfate technology.

**Key words:** modified iron-based catalyst; metabolomic; antibiotic resistance genes

收稿日期:2025-07-15

基金项目:山西省基础研究计划项目(202103021223017);山西省高等学校哲学社会科学研究项目(2024W203)

\*通信作者:段婉君(1991—),女,讲师,从事水处理、环食药犯罪案件侦查研究,e-mail:duanwanjun2021@163.com。

为有效治疗细菌等病原体引起的各种疾病并抑制细菌增殖,抗生素在临床医疗和禽畜养殖等领域被大量使用。然而在长期抗生素选择压力下,可能导致抗生素抗性基因(antibiotic resistance genes, ARGs)的产生。携带有 ARGs 的耐药细菌一旦感染人类,极易容易使人体内原本无抗生素抗性的致病菌群获得抗性,使原本能消灭致病菌的抗生素药物无法发挥治疗作用。世界卫生组织已将抗生素耐药性确定为全球健康问题的最大威胁之一。预计到 2050 年,每年将有超过 1 000 万人直接死于抗菌素耐药性<sup>[1]</sup>。

此外,抗生素耐药性主要通过 2 种方式传播。一是通过垂直基因转移实现 ARGs 从亲代到子代的传递<sup>[2]</sup>;二是通过水平基因转移完成种内甚至种间的传播<sup>[3]</sup>。细菌间的水平基因转移主要依靠包括转座子、整合子和质粒的可移动遗传元件进行。这些可移动遗传元件可作为 ARGs 传播的载体<sup>[4]</sup>,通过转化(裸露 DNA 的摄取)、转导(使用噬菌体作为遗传信息的转运体)和接合(携带 ARGs 的可移动遗传元件从供体细胞转移到受体细胞)3 种方式传递抗生素耐药性。可以确定的是,细菌可以通过转化直接从水环境中获得游离的 ARGs。意味着常规处理方法即使可以灭活抗性细菌,也有可能造成 ARGs 的转移和增殖。因此,ARGs 在环境中的持久性残留和易扩散性使其比抗性细菌本身危害更大,去除 ARGs 对于控制抗生素耐药性传播具有重要意义。

近年来,一些研究者采用高级氧化工艺来去除 ARGs,包括芬顿反应/光芬顿反应、光催化氧化反应和基于硫酸根自由基( $\text{SO}_4^{\cdot-}$ )的高级氧化技术。芬顿试剂浓度和 pH 值是影响抗性细菌失活率和 ARGs 去除率的重要因素。Fiorentino 等<sup>[5]</sup>研究了不同  $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$  摩尔比下太阳光芬顿法对中性 pH 二级出水中多重耐药大肠杆菌的灭活性能,当太阳光剂量为  $15 \sim 23 \text{ kJ} \cdot \text{L}^{-1}$  时,不同的  $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$  摩尔比(5:10、10:20、20:40  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )均使大肠杆菌完全灭活。但这一剂量对于供水设施来说是不切实际的。Fiorentino 等<sup>[6]</sup>的另一项研究比较了太阳光/ $\text{H}_2\text{O}_2$ 、太阳光/ $\text{TiO}_2$  和太阳光/ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{TiO}_2$  对废水中抗氨苄青霉素、环丙沙星和四环素的大肠杆菌的灭活效果。结果表明太阳光/ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{TiO}_2$  工艺的灭活效率要高于太阳光/ $\text{H}_2\text{O}_2$  和太阳光/ $\text{TiO}_2$  的灭活效率。但从工程学的角度考虑,处理后  $\text{TiO}_2$  浆料的分离和再生仍然是其在工程上全面应用的主要技术障碍。

由过硫酸钠(sodium persulfate, PS)活化产生的

$\text{SO}_4^{\cdot-}$  具有高的氧化能力(2.5~3.1 V NHE)和较长的半衰期(30~40  $\mu\text{s}$ ),是一种很有前途的氧化剂<sup>[7]</sup>。通常 PS 的活化方法有很多种,如热、碱、活性炭、过渡金属、无金属多相活化剂等。相比之下,金属离子活化似乎更易应用。加热和碱是活化 PS 的有效方法,但其都属于能源密集型方法,因为热活化 PS 需要大量的热输入,而碱活化 PS 后需要将水的 pH 值调整到中性条件;活性炭作为吸附剂和活化剂已被广泛研究<sup>[8]</sup>,近年来利用氮掺杂碳材料、过渡金属负载碳材料等来活化 PS 的方法受到人们的关注,然而改性过程中的能耗是不可避免的;Luo 等<sup>[9]</sup>发现,不同金属活化 PS 的效果为:PS/Zn>PS/Fe>PS/MnO<sub>2</sub>。虽然 Zn 活化 PS 效果好,但由于 Zn 对生物体有毒性<sup>[10]</sup>,因此暂不考虑 Zn 的使用;在高级氧化法中,以铁基( $\text{Fe}^{2+}$ )材料为催化剂活化 PS 是可行的、高效的、节能的。纳米零价铁(nanoscale zero valent iron, nZVI)可以作为  $\text{Fe}^{2+}$  的缓释源,然而由于 nZVI 的粒径小,比表面积大,易团聚,因此具有一定的应用局限性,此外  $\text{Fe}^{2+}$  很容易被氧化成  $\text{Fe}^{3+}$ ,降低 nZVI 的活化效率。提高 nZVI 表面  $\text{Fe}^{2+}$  含量或改变  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  循环性能,可以显著提高 nZVI 活化 PS 的性能。

为了克服 nZVI 具有的高表面强度和活跃内部磁性,人们采用了许多表面改性技术。其中利用植物的不同部分(花、叶、果实和其他部分)进行表面涂层改性是当今研究人员感兴趣的领域。黄酮类化合物是一种植物多酚,分子结构里的羟基能与  $\text{Fe}^{2+}$  络合, $\text{Fe}^{2+}$  被还原成零价的颗粒时,原本与  $\text{Fe}^{2+}$  络合的生物大分子也能覆盖在颗粒表面<sup>[11]</sup>,羟基化生物大分子结构和分子(内)间的氢键都有助于提升颗粒分散性。

本研究选取 2 种富含黄酮的植物改性 nZVI,通过实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative polymerase chain reaction, qPCR)技术分析改性铁基催化剂活化 PS 对河流水中细菌 16S rRNA 基因和 ARGs 去除情况。通过傅立叶红外光谱仪(fourier transform infrared spectrometer, FTIR)探究植物成分对改性铁基催化剂反应性的影响。最后基于代谢组学深层次分析挖掘与改性效应相关的潜在生物标志物和改性途径。

## 1 材料与方 法

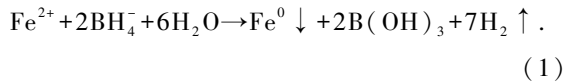
### 1.1 材料与试剂

硼氢化钾( $\text{KBH}_4$ )购自国药化学试剂有限公

司。七水合硫酸亚铁( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )以及用作氧化剂和终止剂的 PS ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) 和硫代硫酸钠( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ )购自麦克林生化有限公司。所有试剂均为分析级,未经进一步纯化即可使用。银杏叶采自冬季(11月)北京工业大学校内落叶。车前草购自京东,产地为安徽。过滤膜( $0.22 \mu\text{m}$ ,  $\varnothing 50 \text{ mm}$ )购自美国纽约市 Pall 公司。

## 1.2 nZVI 和改性型 nZVI 的制备

采用去离子水( $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ )制备溶液。在室温下,将  $0.267 \text{ M}$   $\text{KBH}_4$  ( $20 \text{ mL}$ ) 溶液逐滴滴加到  $0.089 \text{ M}$   $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $20 \text{ mL}$ ) 溶液中制备 nZVI。为了保证亚铁离子完全还原,根据式(1)添加过量的  $\text{KBH}_4$ 。合成的 nZVI 用磁铁收集,用去离子水清洗 3 次。



将  $30 \text{ g}$  银杏叶/车前草粉末( $<0.3 \text{ mm}$ )置于  $500 \text{ mL}$  水溶液中,在  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  下加热  $40 \text{ min}$ ,并持续搅拌,将加热后的溶液在  $4000 \text{ rpm}$  条件下离心  $10 \text{ min}$ ,得到银杏叶/车前草提取液。随后,将  $0.267 \text{ M}$   $\text{KBH}_4$  ( $20 \text{ mL}$ ) 逐滴加入到含有  $0.089 \text{ M}$   $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $20 \text{ mL}$ ) 和车前草/银杏叶提取液( $20 \text{ mL}$ ) 的混合物中。最后,得到  $0.089 \text{ M}$  车前草改性型纳米零价铁(nanoscale zero valent iron modified by *Plantago asiatica* L., P-nZVI)和  $0.089 \text{ M}$  银杏叶改性型 nZVI(nZVI modified by *Ginkgo biloba* L. leaf, G-nZVI),并用去离子水洗涤 3 次。

## 1.3 试验过程

### 1.3.1 P-nZVI 和 G-nZVI 对活化 PS 去除河水中细菌 16S rRNA 基因和 ARGs 效果的影响

本研究对比了 nZVI+PS、P-nZVI+PS 和 G-nZVI+PS 对河水中细菌 16S rRNA 基因和 ARGs 的去除效率。所有试验均在环境温度( $22 \pm 2$ ) $^\circ\text{C}$  下进行。在含有  $100 \text{ mL}$  河水的烧杯中进行批次试验,向其中加入  $0.1 \text{ g}$  的 nZVI/P-nZVI/G-nZVI 和  $1 \text{ g}$  PS 以引发反应。使用磁力搅拌器以  $400 \text{ rpm}$  摇动烧杯。在设

置的时间间隔使用  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  淬灭反应。反应终止后, $100 \text{ mL}$  水样立即用  $0.22 \mu\text{m}$  膜过滤,用于提取 DNA,并进一步通过 qPCR 定量细菌 16S rRNA 基因和 ARGs 的丰度。

### 1.3.2 目标基因的 DNA 提取和 qPCR 分析

将截留了细菌的膜直接剪碎到裂解基质管中,并依照 Fast DNA<sup>®</sup> SPIN Kit for soil (Qiagen, CA, USA)试剂盒里的操作规程提取膜样品中的 DNA,提取出的 DNA 保存在  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  条件下,以备后续分子生物学分析。

采用 qPCR 法对样品中细菌 16S rRNA 基因丰度进行绝对定量分析。用 BeyoFast<sup>™</sup>-SYBR-Green-qPCR 混合物和特异性引物(2X,低 ROX)在 MX3005P qPCR 仪(安捷伦科技公司,美国)上测定样品中细菌 16S rRNA 基因的丰度。所有样本均一式 3 份。反应体系共  $20 \mu\text{L}$ ,其中包括  $2 \mu\text{L}$  模板 DNA、 $7.2 \mu\text{L}$  无菌水、 $0.4 \mu\text{L}$  各自前后引物和  $10 \mu\text{L}$  GoTaq<sup>®</sup> qPCR Master Mix 组成。热循环方案包括初始阶段  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  下运行  $5 \text{ min}$ ,然后是 35 个循环(变性阶段  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  下运行  $30 \text{ s}$ ,引物退火  $58 \text{ }^\circ\text{C}$  下运行  $30 \text{ s}$  和延伸  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  下运行  $1 \text{ min}$ )。将携带靶基因的质粒连续稀释 10 倍(质粒的最终稀释后浓度梯度为  $10^8 \sim 10^1$ ),得到 qPCR 的校准曲线。根据标准曲线算得待测样品中目标基因的绝对丰度。

利用高通量 qPCR 技术对 *aac(6')-Ib* 丰度进行相对定量分析。高通量 qPCR 通过 Wafergen-SmarChip 实时 PCR 系统(Wafergen, Fremont, CA)进行。每  $100 \text{ nL}$  PCR 混合物由  $1 \times \text{LightCycle 480 SYBR Green I Master}$ (Roche Applied Sciences, Indianapolis, IN)、 $2 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  模板 DNA 和  $0.5 \mu\text{M}$  各自引物组成。热循环如下进行:在  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  下初始预变性  $10 \text{ min}$ ,然后进行 40 个循环( $95 \text{ }^\circ\text{C}$  下运行  $30 \text{ s}$ ,  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  下运行  $30 \text{ s}$ )。

细菌 16S rRNA 基因和 *aac(6')-Ib* (编码氨基糖苷类药物的耐药性基因)用于 qPCR 分析的特异性引物如表 1。

表 1 qPCR 分析用特异性引物及其分类

Table 1 Specific primers and classification for qPCR analysis

基因	前引物(5'-3')	后引物(5'-3')	基因分类	机制
16S rRNA	GGGTTGCGCTCGTTGC	ATGGYTGTCTCAGCTCCTG	16S rRNA	
<i>aac(6')-Ib</i>	CGTGGCCGAGCAACTTG	CGGTACCTGCCTCTCAAACC	氨基糖苷类	灭活

### 1.3.3 车前草与银杏叶 FTIR 采集

取适量车前草/银杏叶植物粉末( $<0.3 \text{ mm}$ ),置于样品杯内,样品与溴化钾按照质量比 1:100 混合摊

平,压实,装样厚度为  $0.1 \text{ cm}$ ,使用 FTIR (Nicolet iS10, Thermo, USA)对光谱宽度为  $400 \sim 4000 \text{ cm}^{-1}$  范围内的官能团进行分析。

进一步使用冻干机将 nZVI 改性前后的样品冻干,冻干后的样品与溴化钾按照质量比 1:100 混合,研磨后压成小圆片,进行 FTIR 测量,以研究样品改性前后(nZVI 和 G-nZVI)官能团的变化。

### 1.3.4 原始的银杏叶提取液以及与 nZVI 反应后残留提取液的高分辨率质谱分析

原始的银杏叶提取液(raw *Ginkgo biloba* L. leaf extract, RG)以及与 nZVI 反应后的残余银杏叶提取液(residual *Ginkgo biloba* L. leaf extract after reaction with nZVI, AG)通过台式冻干机(2.5 L Freezone, Labconco, USA)进行冷冻干燥。50 mg 银杏叶提取液冻干后的粉末在 400  $\mu\text{L}$  超纯水(含 80% 甲醇)中均质化,并向其中添加 20  $\mu\text{L}$  内标物(0.3  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、L-2-氯苯丙氨酸和乙腈),研磨 6 min,超声 30 min(5  $^{\circ}\text{C}$ , 40 kHz)。然后将 2 种混合物置于-20  $^{\circ}\text{C}$  下放置 30 min,在 4  $^{\circ}\text{C}$ 、转速 13 000 rcf 条件下离心 15 min 后获得的上清液作为植物样品。使用三重液相色谱-串联质谱仪分析溶液。每个样品制备 6 份。色谱流动相 A 和 B 为 0.1% 甲酸水溶液和含 0.1% 甲酸的甲醇/异丙醇(1/1)。使用 HSS T3 (100 mm $\times$ 2.1 mm i. d., 1.8  $\mu\text{m}$ ; Waters, Milford, USA)作为色谱柱。根据 Progenesis-QI 软件对 2 组(每组 n=6)的原始数据进行分析,建立数据矩阵。

## 2 结果与分析

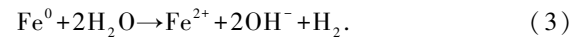
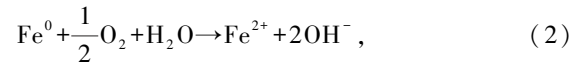
### 2.1 nZVI、P-nZVI 和 G-nZVI 活化 PS 去除细菌 16S rRNA 基因和 ARGs 能力对比

原水中细菌 16S rRNA 基因丰度为  $1.56\times 10^6$  copies $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ (图 1a),通过 nZVI+PS、P-nZVI+PS 和 G-nZVI+PS 处理 10 min 后,其丰度分别下降到  $6.14\times 10^3$  copies $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 、 $4.57\times 10^3$  copies $\cdot\mu\text{L}^{-1}$  和  $2.96\times 10^3$  copies $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。反应 30 min 后,其丰度分别下降到  $2.16\times 10^3$  copies $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 、 $1.95\times 10^3$  copies $\cdot\mu\text{L}^{-1}$  和  $8.85\times 10^2$  copies $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。G-nZVI+PS 对细菌 16S rRNA 基因的去除率又增加了一个数量级,而 nZVI+PS 和 P-nZVI+PS 对细菌 16S rRNA 基因去除率与 10 min 相比变化不大。降解结果表明,以 G-nZVI+PS 去除细菌 16S rRNA 基因的效果比 nZVI+PS 和 P-nZVI+PS 去除细菌 16S rRNA 基因效果高一个数量级,G-nZVI 对 PS 的活化效率高于 nZVI 和 P-nZVI。

同样,以 *aac(6')-Ib* 作为污染物,比较 nZVI+PS、P-nZVI+PS 和 G-nZVI+PS 体系的去除能力。结果显示(图 1b),原水样本中 *aac(6')-Ib* 的丰度最高。反应 30 min 后,nZVI+PS、P-nZVI+PS 和 G-nZ-

VI+PS 体系均可将 *aac(6')-Ib* 的丰度降低到检测限以下。然而,G-nZVI+PS 体系用最少的时间内将 *aac(6')-Ib* 丰度降至检测限以下,其次是 P-nZVI+PS 体系,再次是 nZVI+PS 体系。结果表明 G-nZVI+PS 体系对 *aac(6')-Ib* 的去除效率最高。

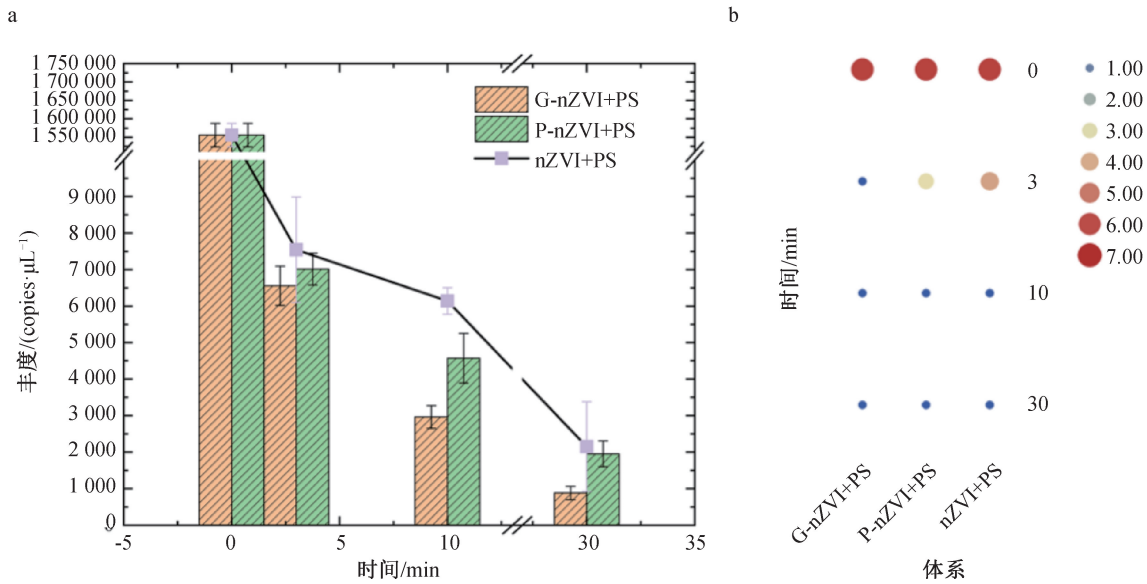
当 nZVI 与 PS 反应时,nZVI 被认为是  $\text{Fe}^{2+}$  的缓释源<sup>[12-13]</sup>,公式如下:



由于其表面积大、尺寸小,因此 nZVI 容易钝化和团聚<sup>[14]</sup>。此外,nZVI 很容易与氧反应,这些氧化层抑制了 nZVI 表面的氧化位点活性,并阻止了电子从 nZVI 表面转移到 PS 上。车前草与银杏叶提取液能阻止 nZVI 氧化物的形成,延长  $\text{Fe}^{2+}$  的有效释放时间。但与 P-nZVI 相比,G-nZVI 具有更好的性能,这可能是由于银杏叶的成分(黄酮类化合物和其他酚类化合物)有助于金属离子的稳定,充当改性剂。因此,需要对车前草和银杏叶的化学成分和结构进行进一步的分析与鉴定。

### 2.2 植物改性剂对 nZVI 表面官能团影响

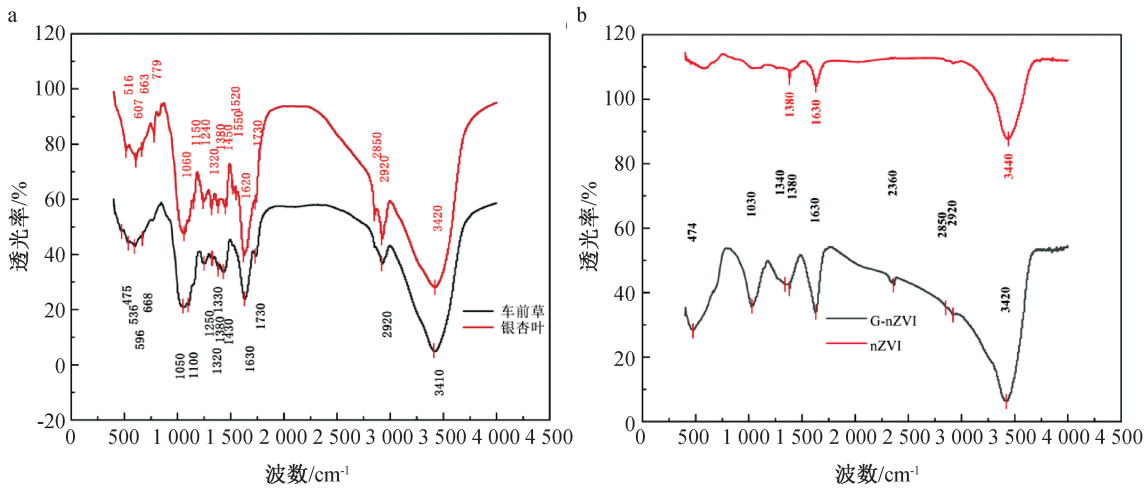
通过 FTIR 分析了车前草和银杏叶的官能团(图 2a),显示两者均在  $3420\text{ cm}^{-1}$  和  $1620\text{ cm}^{-1}$  处有吸收峰,对应为 O—H 伸缩振动峰,以及烯烃的 C=C 伸缩振动峰或醛、酮、酰胺类 C=O 伸缩振动吸收峰。值得注意的是,银杏叶在  $2850\text{ cm}^{-1}$  处,以及  $1550\text{ cm}^{-1}$  和  $1520\text{ cm}^{-1}$  处出现独有吸收峰,对应亚甲基中 C-H 伸缩振动的吸收峰和多环芳烃的骨架振动产生的吸收峰,表明银杏叶中可能含有糖类,酚类,黄酮类、脂肪胺等抗氧化物质。这些物质涂敷在 nZVI 表面可以形成稳定的配合物,并通过静电排斥和分散活性位点来增加 G-nZVI 与 PS 接触的可及性,从而产生更多的活性氧来提高对目标基因去除率。另外,银杏叶在  $1060\text{ cm}^{-1}$  处的强吸收峰表明了存在吡喃糖环,这是多糖特征吸收峰之一<sup>[15]</sup>,在  $779\text{ cm}^{-1}$  处有一个较弱的吸收峰表明可能存在  $\beta$ -糖苷键<sup>[16]</sup>。多糖是生物体内最重要的 4 种生物大分子之一,其中一些具有生物活性的多糖被称为活性多糖,活性多糖最具代表性的生物活性有免疫调节活性、抗氧化活性、抗病毒活性等<sup>[17]</sup>,有助于将  $\text{Fe}^{3+}$  还原成  $\text{Fe}^{2+}$ ,不断释放的  $\text{Fe}^{2+}$  活化 PS 产生  $\text{SO}_4^{\cdot-}$  及  $\text{OH}\cdot$ ,可提高对目标基因的去除率。以上原因可能是造成 G-nZVI+PS 去除细菌 16S rRNA 基因和 *aac(6')-Ib* 性能优于 P-nZVI+PS 的原因。



a:0.1 g 的 nZVI/P-nZVI/G-nZVI 和 1g PS 反应对细菌 16S rRNA 基因的去除效果;b:0.1 g 的 nZVI/P-nZVI/G-nZVI 和 1g PS 反应对 *aac(6')-Ib* 的去除效果。

图 1 nZVI+PS、P-nZVI+PS 和 G-nZVI+PS 体系对基因的去除效果

Figure 1 The removal efficiency of genes by nZVI+PS、P-nZVI+PS and G-nZVI+PS systems



a:红黑线分别对应银杏叶和车前草的 FTIR 谱图;b:红黑线分别对应 nZVI 和 G-nZVI 的 FTIR 谱图。

图 2 光谱宽度为 400~4 000 cm<sup>-1</sup> 范围内的 FTIR 谱图

Figure 2 FTIR spectrum with a spectral width in the range of 400~4 000 cm<sup>-1</sup>

另外,通过 FTIR 分析了 nZVI 和 G-nZVI 的官能团(图 2b)。与 nZVI 相比,G-nZVI 在 3 420 cm<sup>-1</sup> 处的峰值变得更宽,且峰的强度大,代表银杏叶提取液中的多酚物质包裹在 nZVI 表面。多酚类含量与 G-nZVI 的抗氧化性成正比<sup>[18]</sup>。由此印证 G-nZVI+PS 对细菌 16S rRNA 基因和 *aac(6')-Ib* 具有高去除率的原因。同样,与 nZVI 相比,G-nZVI 在 1 630 cm<sup>-1</sup> 和 1 380 cm<sup>-1</sup> 处的峰值变得更宽,且峰的强度大,这是由于银杏叶提取液中不饱和烯烃 C=C 官能团和多环芳烃的骨架振动引起的。

另外,G-nZVI 的 FTIR 图谱出现了新的条带,分

别为在 2 920 cm<sup>-1</sup>、1 340 cm<sup>-1</sup>、1 257 cm<sup>-1</sup> 和 1 030 cm<sup>-1</sup> 处对应 -CH<sub>2</sub> 官能团、-CH<sub>3</sub> 官能团、C=O 官能团和 C-N 官能团的存在,可以推测这些物质可能归属于 C 链,如树脂、油和烷基化合物<sup>[19]</sup>。G-nZVI 的 FTIR 显示有这些官能团,表明银杏叶提取液的生物组分成功包裹在 nZVI 的表面。

### 2.3 G-nZVI 制备前后银杏叶提取液的代谢组学分析和潜在的生物标记物分析

#### 2.3.1 G-nZVI 制备前后银杏叶提取液代谢物的变化

研究采用 LC-MS 技术进行非靶向代谢组学分析,对 G-nZVI 制备前后银杏叶提取液代谢物的变

化进行数据处理(图 3a),包括改性前组(*Ginkgo biloba* L. leaf extract before preparation of G-nZVI, GBG)和改性后组(*Ginkgo biloba* L. leaf extract after preparation of G-nZVI, GAG)。预处理后,阳/阴离子模式分别鉴定出 5 247 和 5 406 个峰。

Upset 图是用于多组差异的统计工具,可以看出不同组样本之间的相似度和差异程度。从图 3b 可知,本实验对 GBG 组和 GAG 组 2 个实验组特有和共有代谢物进行分析,去除该组内样本缺失值  $\geq$

50%的代谢物后,制成 Upset 图。结果显示,阳离子模式下,GBG 组共鉴定出 486 个代谢物,其中特有代谢物 145 个,其似乎参与了 nZVI 的改性。GAG 组共鉴定出 368 个代谢物,其中特有代谢物 27 个。2 个样本共有 341 个代谢物。同样,阴离子模式下,GBG 组共鉴定出 453 个代谢物,其中特有代谢物 163 个,其可能参与了 nZVI 的改性。GAG 组共鉴定出 305 个代谢物,其中特有代谢物 15 个。2 个样本共有 290 个代谢物。

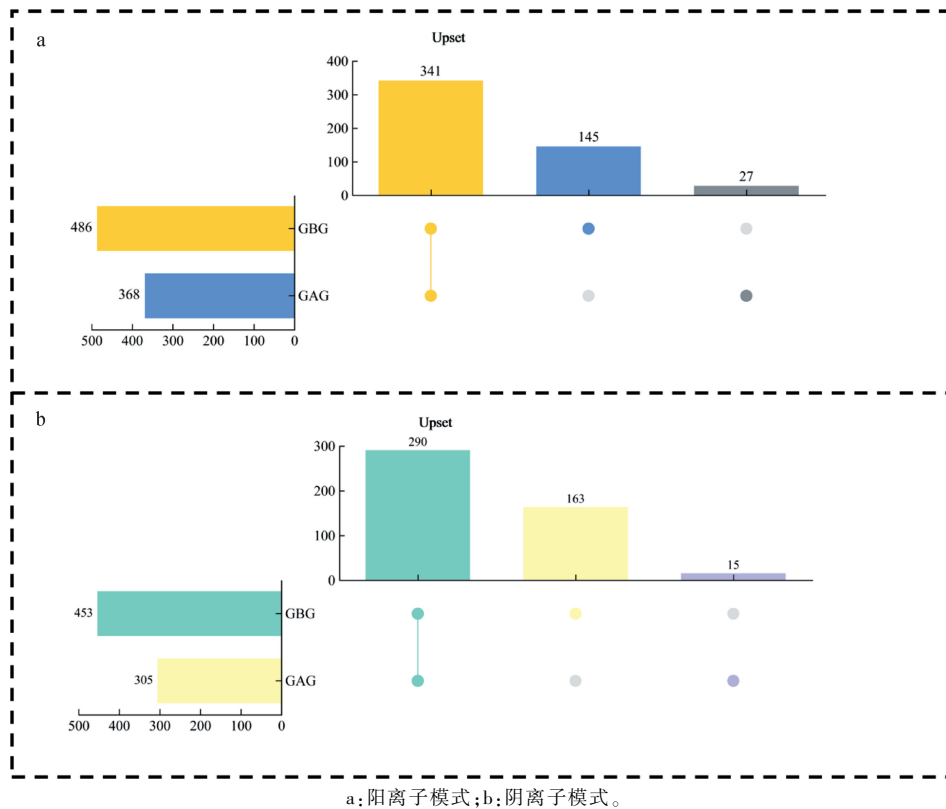


图 3 GBG 和 GAG 组别中所共有和特有的代谢物数目 Upset 图

Figure 3 Upset modeling of the identified common and unique metabolites including GBG and GAG samples analysis

### 2.3.2 差异代谢物鉴定及 KEGG 注释和分析

VIP(图 4)展示差异组中代谢物在各样本中的表达模式和代谢物在多元统计分析的 VIP 值和单维统计中的 P 值,从而直观的看出差异代谢物的重要性和表达量趋势变化。

制备 G-nZVI 后,GBG 和 GAG 间的代谢物差异明显。说明 nZVI 与银杏叶提取液相互作用后,银杏叶提取液的代谢物发生了明显的变化,并可能转化为可测量的代谢物水平变化。根据 OPLS-DA 模型的加权系数,使用 VIP 评分对 GBG 和 GAG 组的代谢产物鉴别贡献进行排序。纵坐标是代谢物名称,横坐标是代谢物对应的 VIP 值,右边的色块分别代表 GBG 和 GAG 组,灰色代表代谢物在该组中表达量高,黄色代表代谢物表达量低。结果显示,类

固醇和类固醇衍生品(Ganosporelactone A)、类黄酮(Prodelphinidin A1 和 Epicatechin)、酮类(Muramic acid)、羧酸和衍生品(N-Acetylaminoctanoic acid)、糖脂类(Gingerglycolipid C)显著下调。通过上述分析得到的差异代谢物具有一定的修饰功能。其中,飞燕草素(Prodelphinidin A1)被报道<sup>[20]</sup>为具有抗氧化活性物质。此外,表儿茶素(Epicatechin)被报道<sup>[21]</sup>为可显著增加黄酮类化合物的积累。因此,银杏叶提取液中显著差异代谢物可能将  $Fe^{3+}$  还原成  $Fe^{2+}$ 。改变  $Fe^{3+}/Fe^{2+}$  循环性能,即提高 nZVI 表面  $Fe^{2+}$  含量,可以显著提高 G-nZVI 活化 PS 的性能,成为提高 G-nZVI+PS 去除细菌 16S rRNA 基因和 *aac* (6')-Ib 效率的最重要贡献者。

为了解下调差异代谢物的分类情况以及主要参

与的生化代谢途径和信号转导途径,对鉴定到具有分类信息的代谢物,基于 KEGG 数据库进行分类注释(图 5)。结果显示,下调差异代谢物主要为黄酮类化合物、二萜类化合物(C20)和氰苷等,属于黄酮类、萜烯类、氨基酸类化合物。Zhang 等<sup>[22]</sup>发现激活黄酮类化合物可以通过谷胱甘肽-抗坏血酸途径显著改变代谢,维持抗氧化防御系统。此外,Ahmad

等<sup>[23]</sup>首次证明了从天然植物乌头中分离得到的二萜类生物碱具有显著的抗氧化和抗胆碱酯酶活性。这些抗氧化生物组分包覆在 G-nZVI 表面还可以保护颗粒,使其不与水或氧气反应,阻止 nZVI 氧化物的形成,延长 Fe<sup>2+</sup> 的有效释放时间。这些结果表明,黄酮类化合物、二萜类化合物(C20)和氰苷可能是改性 nZVI 的活性成分。

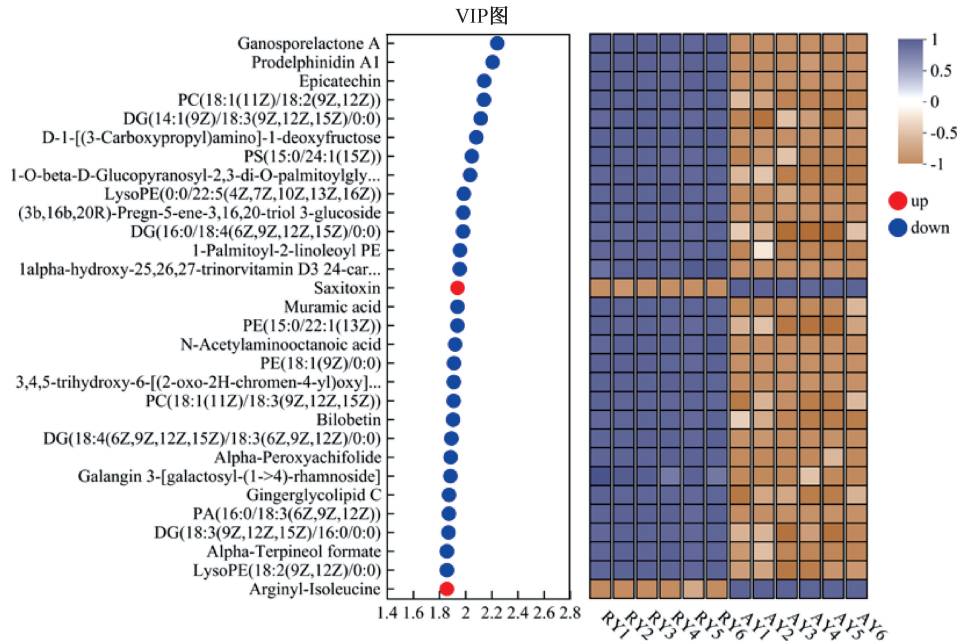


图 4 GBG 和 GAG 中代谢物投影评分的可变重要性

Figure 4 Variable importance in projection (VIP) scores of metabolites in GBG and GAG

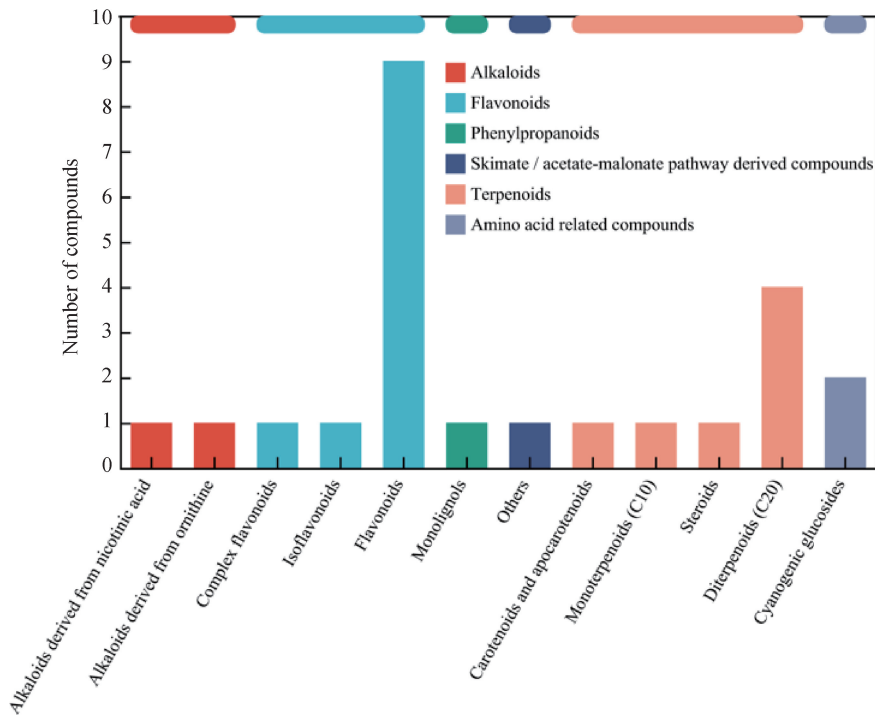


图 5 差异代谢物的化合物分类图

Figure 5 Compound classifications of differential metabolites

### 2.3.3 基于 KEGG 数据库的功能通路分析

明确下调代谢产物的修饰作用后,为了进一步了解银杏叶提取液对 nZVI 的改性作用,对下调代谢产物的功能通路进行了分析。下调的代谢物主要参与类黄酮生物合成、单萜生物合成、氨基酸生物合成、类固醇生物合成等功能通路。黄酮类是一种多羟基化的生物大分子,由于其独特的分子结构和分子内(间)氢键,能使覆盖在颗粒表面的多羟基化生物大分子克服颗粒之间的范德华力和磁吸引力,对颗粒起分散剂的作用<sup>[24]</sup>,颗粒的分散度提高有利于与细菌 16S rRNA 基因和 *aac(6')-Ib* 接触得更充分,实现对细菌 16S rRNA 基因和 *aac(6')-Ib* 更高的去除率。此外也有研究<sup>[25]</sup>发现,氨基酸生物合成通路中的脯氨酸能够通过其含量的积累及与可溶性糖等物质间的相互作用来发挥其抗氧化保护能力,从而实现对细菌 16S rRNA 基因和 *aac(6')-Ib* 更高的去除率。

## 3 讨论与结论

G-nZVI+PS 体系对细菌 16S rRNA 基因和 *aac(6')-Ib* 具有良好的去除性能,这是由于银杏叶提取液中糖类、酚类、黄酮类、脂肪胺、二萜类生物碱等抗氧化物质主要通过参与类黄酮生物合成、单萜生物合成、氨基酸生物合成、类固醇生物合成等功能通路涂敷在 G-nZVI 表面形成稳定的配合物。首先,配合物中的抗氧化活性成分有助于将  $Fe^{3+}$  还原成  $Fe^{2+}$ ,不断释放的  $Fe^{2+}$  活化 PS 产生更多的自由基。其次,配合物通过静电排斥和空间排斥来分散稳定 G-nZVI 粒子,从而减少粒子团聚,提高金属纳米粒子的利用性,提供了更多的  $Fe^{2+}$  来活化 PS 提高系统中自由基的生成,这对于有效去除污染物非常重要。再次,nZVI 很容易与氧反应,这些氧化层抑制了 nZVI 表面的氧化位点活性,并阻止了电子从 nZVI 表面转移到 PS 上。因此,富含萜类生物组分的配合物包覆在 G-nZVI 表面可以保护颗粒,使其不与水或氧气反应,阻止 nZVI 氧化物的形成,延长  $Fe^{2+}$  的有效释放时间。这些结果表明,黄酮类化合物、二萜类化合物(C20)、氰苷等抗氧化活性组分可能是改性 nZVI 的活性成分。基于以上原因,G-nZVI+PS 体系将产生更多的活性氧来提高对目标基因去除。但本研究对于一些具体的反应细节和中间产物的鉴定仍不够明确,接下来,作者将进一步深化研究 PS 被活化后产生的自由基与 ARGs 的具体作用方式、基因片段的断裂和降解路径等方面的内容。

## 参考文献(References)

- [ 1 ] TAGLIABUE A, RAPPUOLI R. Changing priorities in vaccinology: Antibiotic resistance moving to the top[J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9:1068.
- [ 2 ] LUO L, WANG Z M, HUANG X, et al. The fate of antibiotic resistance genes in wastewater containing microalgae treated by chlorination, ultra-violet, and Fenton reaction[J]. *Water Research*, 2024, 254: 121392.
- [ 3 ] LEI L S, CHEN N, CHEN Z Y, et al. Dissemination of antibiotic resistance genes from aboveground sources to groundwater in livestock farms[J]. *Water Research*, 2024, 256: 121584.
- [ 4 ] WU Y, NIU Q Q, LIU Y W, et al. Chlorinated organophosphorus flame retardants induce the propagation of antibiotic resistance genes in sludge fermentation systems: Insight of chromosomal mutation and microbial traits[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2024, 476: 134971.
- [ 5 ] FIORENTION A, ESTEBAN B, GARRIDO-CARDENAS J A, et al. Effect of solar photo-Fenton process in raceway pond reactors at neutral pH on antibiotic resistance determinants in secondary treated urban wastewater[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2019, 378: 120737.
- [ 6 ] FIORENTINO A, RIZZO L, GUILLOTEAU H, et al. Comparing  $TiO_2$  photocatalysis and UV-C radiation for inactivation and mutant formation of *Salmonella typhimurium* TA102[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2017, 24(2): 1871-1879.
- [ 7 ] ZHENG H, BAO J G, HUANG Y, et al. Efficient degradation of atrazine with porous sulfurized  $Fe_2O_3$  as catalyst for peroxymonosulfate activation[J]. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2019, 259(15): 118056.
- [ 8 ] 刘影. 活性炭基催化剂在柴油吸附脱硫中的应用研究[D]. 青岛:青岛科技大学, 2014.
- [ 9 ] LUO J Y, ZHU Y, ZHANG Q, et al. Promotion of short-chain fatty acids production and fermented sludge properties via persulfate treatments with different activators: Performance and mechanisms [J]. *Bioresource Technology*, 2020, 295: 122278.
- [ 10 ] LUO J Y, ZHANG Q, ZHAO J N, et al. Potential influences of exogenous pollutants occurred in waste activated sludge on anaerobic digestion: A review[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 383: 121176.
- [ 11 ] MCGEE E J T, DIOSADY L L. Prevention of iron-polyphenol complex formation by chelation in black tea[J]. *LWT*, 2018, 89: 756-762.
- [ 12 ] ZHANG M, CHEN X Q, ZHOU H, et al. Degradation

- of p-nitrophenol by heat and metal ions co-activated persulfate[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2015, 264: 39-47.
- [13] YAN J C, HAN L, GAO W G, et al. Biochar supported nanoscale zerovalent iron composite used as persulfate activator for removing trichloroethylene[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 175: 269-274.
- [14] SHI D Y, ZHANG X, WANG J J, et al. Highly reactive and stable nanoscale zero-valent iron prepared within vesicles and its high-performance removal of water pollutants[J]. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2018, 221: 610-617.
- [15] 李俊驰. 银杏叶多糖的提取、纯化、结构、化学修饰及抗氧化活性研究[D]. 重庆:重庆师范大学, 2023.
- [16] VASILIEVA T, SIGAREV A, KOSYAKOV D, et al. Formation of low molecular weight oligomers from chitin and chitosan stimulated by plasma-assisted processes[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 163: 54-61.
- [17] YIN M, ZHANG Y, LI H. Advances in research on immunoregulation of macrophages by plant polysaccharides[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 145.
- [18] 吴媛媛. 绿色合成纳米零价铁激活过硫酸盐降解水中磺胺甲基噁唑的机理研究[D]. 太原:太原理工大学, 2020.
- [19] 李奉楠. 基于银杏酸控制的银杏茶加工方法及对生物活性成分的影响[D]. 镇江:江苏大学, 2023.
- [20] RAO S, SANTHAKUMAR A B, CHINKWO K A, et al. Q-TOF LC/MS identification and UHPLC-Online ABTS antioxidant activity guided mapping of barley polyphenols[J]. *Food Chemistry*, 2018, 266: 323-328.
- [21] ZHANG M Y, WANG D J, GAO X X, et al. Exogenous caffeic acid and epicatechin enhance resistance against *Botrytis cinerea* through activation of the phenylpropanoid pathway in apples[J]. *Scientia Horticulturae*, 2020, 268: 109348.
- [22] ZHANG X, HERGER A G, REN Z, et al. Resistance effect of flavonols and toxicology analysis of hexabromocyclododecane based on soil-microbe-plant system[J]. *Chemosphere*, 2020, 257: 127248.
- [23] AHMAD H, AHMAD S, SHAH S A A, et al. Antioxidant and anticholinesterase potential of diterpenoid alkaloids from *Aconitum heterophyllum* [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2017, 25(13): 3368-3376.
- [24] ZHAO X, LIU W, CAI Z, et al. An overview of preparation and applications of stabilized zero-valent iron nanoparticles for soil and groundwater remediation[J]. *Water Research*, 2016, 100: 245-266.
- [25] 周泳臣, 刘颖, 郑文忠, 等. 复合茶树接穗与接穗母本的代谢物差异分析[J]. *西北植物学报*, 2022, 42(10): 1654-1662.
- ZHOU Y C, LIU Y, ZHENG W Z, et al. Analysis of metabolite difference between scion and scion female parent of compound tea plant[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2022, 42(10): 1654-1662.

(责任编辑:唐慧 郭芸婕)