

城镇污水处理系统中4种抗生素 抗性基因的沿程变化

包樱钰¹ 谢辉² 陈吕军² 温东辉^{1,†}

1. 北京大学环境科学与工程学院, 北京 100871; 2. 清华大学环境学院, 北京 100084;

† 通信作者, E-mail: dhwen@pku.edu.cn

摘要 为探究抗生素抗性基因(ARGs)在城镇污水处理系统中的沿程变化, 针对4种关注度较高的 ARGs (*sulII*, *ermB*, *tetC* 和 *bla_{PSE-I}*) 和 I 型整合子的整合酶基因(*intI1*), 选取京津冀地区一座中小城镇的污水处理厂, 使用普通 PCR 和实时荧光定量 PCR 技术, 对各工艺单元的水样进行细胞内 ARGs 和 *intI1* 的定性及定量检测分析。结果表明, 4 种 ARGs 和 *intI1* 普遍存在于城镇污水处理系统中, 出水中 ARGs 和 *intI1* 的绝对丰度降低, 去除量在 1.26~2.30 logs 之间。相关性分析表明, *intI1* 和水质因子(pH, COD 和 NH₃-N)可能与 4 种 ARGs 的传播扩散有关。

关键词 抗生素抗性基因(ARGs); 城镇污水处理系统; A²/O 工艺; 实时荧光定量 PCR

Variations of 4 Antibiotic Resistance Genes in a Sewage Treatment Plant

BAO Yingyu¹, XIE Hui², CHEN Lüjun², WEN Donghui^{1,†}

1. College of Environmental Sciences and Engineering, Peking University, Beijing 100871; 2. School of Environment, Tsinghua University, Beijing 100084; † Corresponding author, E-mail: dhwen@pku.edu.cn

Abstract In order to understand the variations of antibiotic resistance genes (ARGs) in sewage treatment plants (STPs), the distribution and removal efficiencies of 4 subtypes of intracellular ARGs (*sulII*, *ermB*, *tetC* and *bla_{PSE-I}*) and class I integron integrase gene (*intI1*) in a middle-scale STP in Hebei Province were detected by PCR and real-time fluorescent quantitative PCR (qPCR). 4 ARGs and *intI1* were found in all water samples and 1.26–2.30 orders of magnitude of ARGs were removed by the STP. Correlation analysis showed that *intI1* and water quality factors including pH, COD, and NH₃-N might affect the distribution and diffusion of *tetC*, *ermB*, and *bla_{PSE-I}*. The final effluent of a STP may promote the spread of ARGs in surface water system.

Keywords antibiotic resistance genes (ARGs); sewage treatment plants (STPs); A²/O process; real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR)

由于环境选择压力(抗生素、重金属等)的存在, 抗生素抗性基因(antibiotic resistance genes, ARGs)得以迅速在环境中产生与传播^[1]。与化学污染物不同, ARGs具有遗传复制、水平转移(horizontal gene transfer, HGT)等生物学特性^[2-3], 一旦进入环境就很难控制和消除。因此, 近年来 ARGs 成为备受瞩目的一种新型污染物。研究表明, ARGs 在常规的城镇污水处理厂进、出水中普遍存在^[4-5]。城镇污

水处理系统中的抗生素、重金属、可移动遗传元件(mobile genetic elements, MGEs)和微生物等可能对 ARGs 的形成、水平转移和扩散起到促进作用^[6]。因此, 对城镇污水处理厂中 ARGs 赋存特征和去除效果展开研究十分必要。

京津冀地区是我国北方经济的重要核心区, 人口密集, 是抗生素排放强度较大的区域之一^[7], 存在潜在的 ARGs 污染风险。本研究选取京津冀地区

典型中小城镇的污水处理厂,采集沿程各工艺单元水样进行 ARGs 的定量检测分析,揭示城镇污水处理过程中 ARGs 的赋存情况,为京津冀地区 ARGs 污染的防控提供参考。

1 ARGs和基本理化指标的测定

选取河北省一座生活污水处理厂为研究对象,图1展示其污水处理工艺流程及采样点位(圆圈表示)。样品采集后,立即进行理化指标和 ARGs 的定量分析。分别采用电极法^[8]、重铬酸盐法^[8]、纳氏试剂分光光度法^[8]和钼酸铵分光光度法^[8]测定样品的 pH, COD, NH₃-N 和 TP, 结果见表1。对样品进行 DNA 提取后,使用普通 PCR 和实时荧光定量 PCR(qPCR)的 SYBR Green I 方法,对 *sulIII*, *tetC*,

ermB 和 *bla_{PSE-I}* 4 种 ARGs 以及 I 型整合子的整合酶基因 *intI1* 分别进行定性和定量分析,操作流程见文献[9]。此外,对 16S rDNA 进行定量测定,作为微生物总量的表征值。

2 结果与讨论

2.1 污水处理系统中 ARGs 的分布特征

2.1.1 ARGs 绝对丰度

图2(a)显示目标基因在污水处理系统各单元中的分布情况,4种 ARGs 和 *intI1* 在全部水样中均有检出,表明它们普遍存在于污水处理系统中。总进水中 *ermB* 的绝对丰度最高,目标基因绝对丰度分布在 $5.50 \times 10^5 \sim 9.93 \times 10^7$ copies/mL 之间。*ermB*, *tetC*, *bla_{PSE-I}* 和 *intI1* 的绝对丰度沿处理工艺流程大致呈降低趋势。消毒工艺出水中 *ermB*, *tetC*, *bla_{PSE-I}* 和 *intI1* 的绝对丰度显著升高,与 Yoon 等^[10]的研究结果一致。

进入 A²/O 处理单元后, *sulIII* 的绝对丰度显著升高,在厌氧区达到最大值。经过二次沉淀, *sulIII* 的绝对丰度进一步增加,是绝对丰度最高的 ARGs; 经过絮凝沉淀和消毒后,出水中 *sulIII* 的绝对丰度显著降低。

在总出水中,目标基因的绝对丰度排序为 *intI1* > *sulIII* > *ermB* > *tetC* > *bla_{PSE-I}*, 在 $3.40 \times 10^3 \sim 3.05 \times 10^6$ copies/mL 之间,所有 ARGs 和 *intI1* 在出水中的绝对丰度显著低于进水。

表 1 样品理化指标分析结果
Table 1 Physicochemical analysis results

采样点	pH	COD/(mg·L ⁻¹)	NH ₃ -N/(mg·L ⁻¹)	TP/(mg·L ⁻¹)
Inf	7.16	225.50±4.42	36.648±0.573	5.187±0.002
Pt	7.33	219.50±10.29	30.226±0.033	—
An	7.04	134.29±9.20	29.972±0.053	5.145±0.043
Ax	6.96	108.67±8.55	18.247±0.008	4.507±0.021
Ox	6.92	57.33±9.00	12.973±0.010	4.956±0.020
SC	7.42	22.67±0.82	7.355±0.001	0.730±0.001
Fs	7.62	25.67±2.94	6.806±0.006	0.425±0.000
Eff	7.56	16.38±2.83	7.613±0.184	0.561±0.001

说明: —表示未测定。

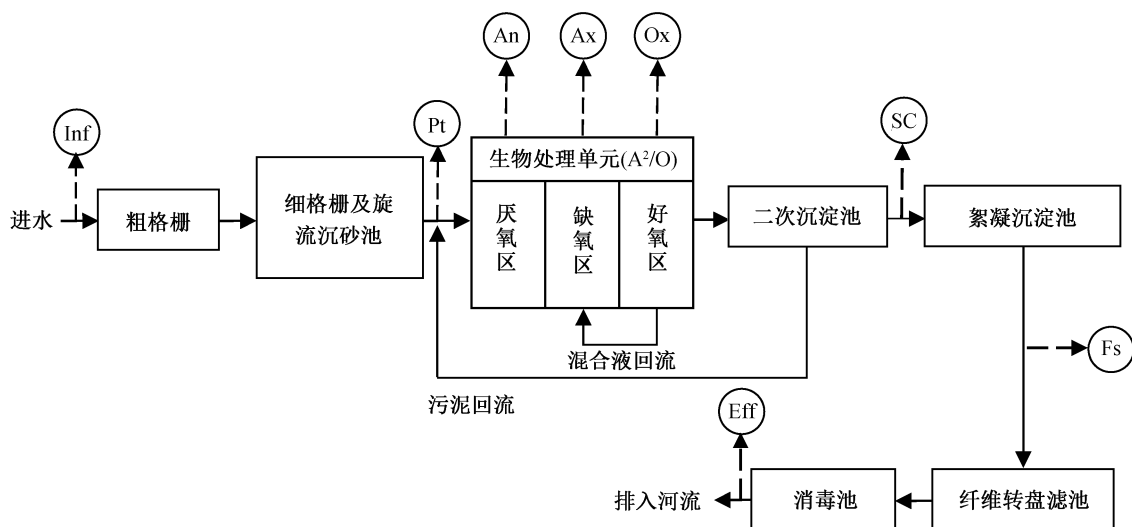


图1 污水处理工艺流程及采样点

Fig. 1 Municipal wastewater treatment process and sampling sites

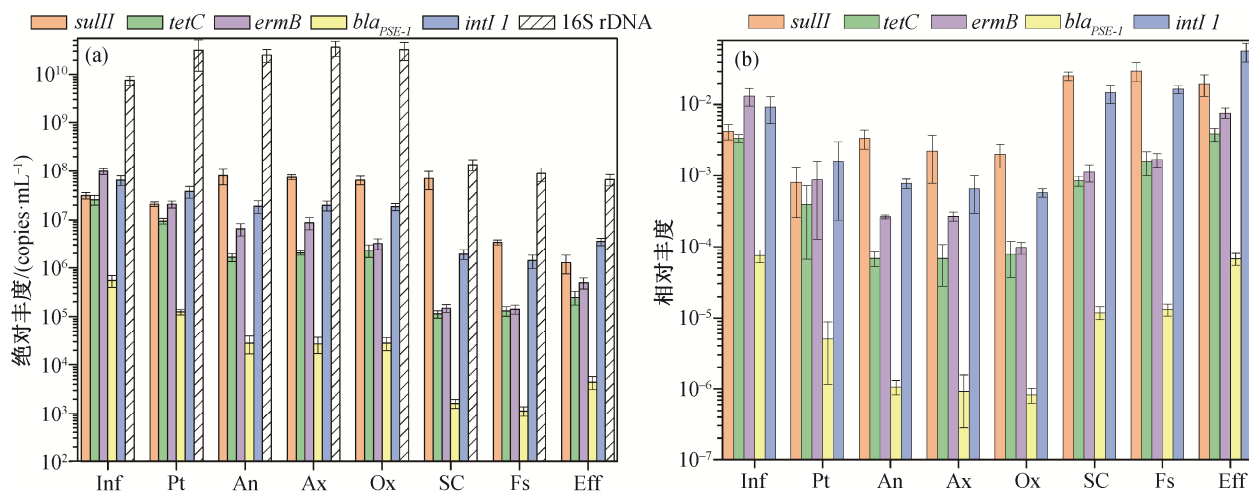


图 2 目标基因在各处理单元中的绝对丰度(a)和相对丰度(b)

Fig. 2 Absolute abundances (a) and relative abundances (b) of target genes in the sewage treatment process

2.1.2 ARGs 相对丰度

图 2(b)显示目标基因在污水处理系统各单元中的相对丰度(即目标基因与 16S rDNA 拷贝数之比)。对比图 2(a)与(b)可知, ARGs 及 *intI1* 在绝对丰度和相对丰度上的变化趋势不同。这是由单位体积水样的微生物量差异引起的^[11], 仅关注绝对丰度无法体现 ARGs 在微生物基因组中的占比情况, 因此对 ARGs 及 *intI1* 的相对丰度进行分析十分必要。

总进水中各目标基因的相对丰度在 10^{-5} ~ 10^{-2} 之间, 与绝对丰度结果一致, 进水中相对丰度最高的为 *ermB*。 *ermB*, *tetC*, *bla_{PSE-I}* 与 *intI1* 的相对丰度

变化趋势大致相同: 经过细格栅和旋流沉砂池、 A^2/O 各处理阶段, 上述基因在微生物群落基因组中的占比逐渐下降; 经过二次沉淀、絮凝沉淀和消毒后, 相对丰度呈上升趋势。 *sulII* 相对丰度的变化趋势与上述基因有较大的差异。在 A^2/O 的厌氧区中, *sulII* 相对丰度升高。经过二次沉淀和絮凝沉淀, *sulII* 相对丰度呈上升趋势。消毒处理后, *sulII* 相对丰度降低, 但仍显著高于总进水。

总出水中, 目标基因的相对丰度分布在 6.76×10^{-5} ~ 5.71×10^{-2} 之间, *sulII*, *tetC* 和 *intI1* 的相对丰度高于进水, 说明污水处理后, 这几类基因在微生物

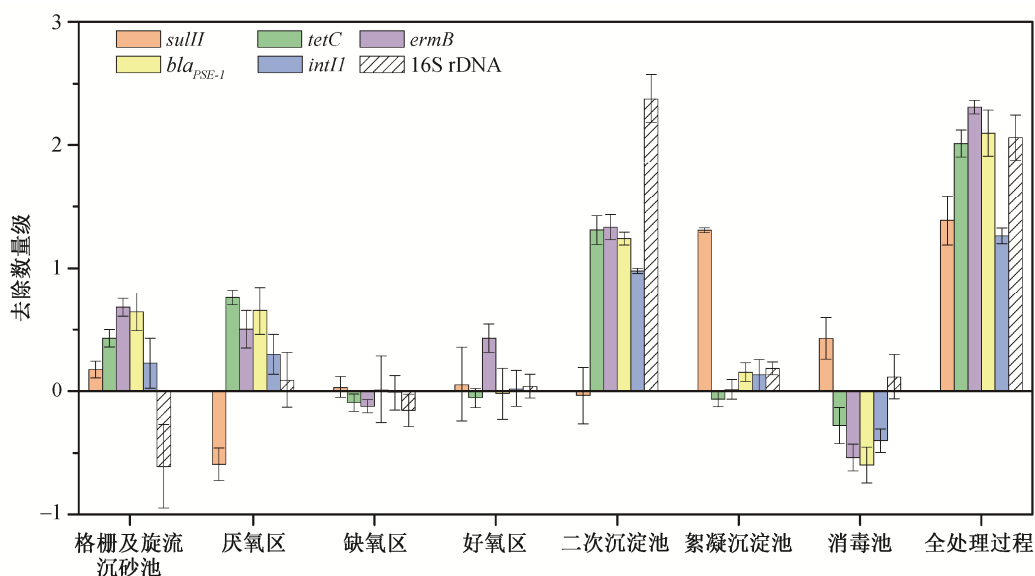


图 3 目标基因在各处理单元中的去除情况

Fig. 3 Removals of target genes by each unit in the sewage treatment process

群落基因组中的占比增大。有研究证明,污水处理系统是受纳水体下游 ARGs 的主要来源^[12-13],因此城镇污水处理系统对于受纳地表水的 ARGs 输入及其生态风险不容小觑。

2.2 污水处理系统对 ARGs 和 *intI1* 的去除效果

图3显示各污水处理单元及污水处理全程对目标基因的去除情况。不同工艺单元对各目标基因的去除效果有明显差异,且存在去除量为负的现象。生物处理单元中微生物群落的变化可能是导致本研究中 ARGs 去除或富集效果各异的重要原因^[14]。Xu 等^[15]和 Börjesson 等^[16]认为,二沉池内 ARGs 附着在生物质上,并随之脱离液相进入污泥中,使水相中的 ARGs 减少。剩余污泥的外运是 ARGs 进入自然环境的潜在途径^[6,17],因此对剩余污泥的合理处置是十分必要的。 ClO_2 消毒仅对 *sulII* 和微生物总量有一定的削减作用,不能有效地控制其他目标基因。经过全部工艺后,目标基因的削减量在 1.26~2.30 logs 之间,顺序为: *ermB* > *bla_{PSE-1}* > *tetC* > *sulII* > *intI1*。

2.3 相关性分析

2.3.1 目标基因之间的相关性

表2列出目标基因绝对丰度之间的相关性分析结果。*intI1* 与 *ermB*, *tetC*, *bla_{PSE-1}* 之间均存在显著的正相关关系($P < 0.001$)。*intI1* 是 I 型整合子中编码整合酶的基因,整合子几乎存在于各种可移动遗传元件和染色体上,与 ARGs 在环境中的传播、扩散联系十分紧密^[18-19]。I 型整合子可能是这几类抗性基因传播扩散的重要机制。

2.3.2 水质因子与目标基因的相关性

表3列出水质因子与目标基因之间的相关性分析结果。结果表明,*sulII* 和微生物总量分别与 pH 显著负相关($P < 0.05$),4 个目标基因(*tetC*, *ermB*, *bla_{PSE-1}* 和 *intI1*)分别与两个水质因子(COD 和 $\text{NH}_3\text{-N}$)之间呈显著的正相关关系($P < 0.05$),总 ARGs 与 $\text{NH}_3\text{-N}$ 显著正相关($P < 0.05$),微生物总量与 TP 显著正相关($P < 0.01$)。Nölvak 等^[20]、奚慧^[21]和杜雪^[22]的研究结果分别表明 ARGs 与 pH, $\text{NH}_3\text{-N}$ 及 COD 之间正相关,本文结果与之一致,可能的原因为碳、氮和磷等营养元素促进微生物的生长繁殖,从而有助于 ARGs 的扩散^[23]。上述研究结果说明对污水处理厂基本水质指标(pH, COD 和 $\text{NH}_3\text{-N}$ 等)的监测可能

表2 目标基因之间的相关性分析
Table 2 Correlation between the target genes' absolute abundances

目标基因	<i>sulII</i>	<i>tetC</i>	<i>ermB</i>	<i>bla_{PSE-1}</i>	总 ARGs	<i>intI1</i>
<i>tetC</i>	-0.178					
<i>ermB</i>	-0.142	0.986***				
<i>bla_{PSE-1}</i>	-0.165	0.990***	0.999***			
总 ARGs	0.534	0.730*	0.761*	0.745*		
<i>intI1</i>	-0.016	0.953***	0.914***	0.916***	0.780*	
16S rDNA	0.528	-0.008	-0.084	-0.094	0.290	0.286

注:***表示在 0.001(双侧)水平上显著相关,**表示在 0.01(双侧)水平上显著相关,*表示在 0.05(双侧)水平上显著相关,下同。

表3 水质因子与目标基因之间的相关性分析
Table 3 Correlation between the target genes' absolute abundances and water quality factors

水质因子	<i>sulII</i>	<i>tetC</i>	<i>ermB</i>	<i>bla_{PSE-1}</i>	总 ARGs	<i>intI1</i>	16S rDNA
pH	-0.769*	-0.189	-0.190	-0.172	-0.672	-0.409	-0.811*
COD	0.043	0.800*	0.732*	0.730*	0.668	0.920***	0.443
$\text{NH}_3\text{-N}$	0.162	0.766*	0.726*	0.719*	0.736*	0.891**	0.422
TP	0.741	-0.199	-0.216	-0.232	0.292	0.086	0.936**

有助于预测 ARGs 的丰度水平,可为揭示污水处理系统的 ARGs 污染风险提供帮助。

3 结论

本研究采集一座中小型生活污水处理厂中各工艺单元水样,进行 4 种 ARGs 的定性和定量检测分析,揭示城镇污水处理过程中 ARGs 的分布和变化规律,得到如下结论。

1) *sulII*, *ermB*, *tetC*, *bla_{PSE-1}* 与 I 型整合子普遍存在于城镇污水处理系统中。进水中 *ermB* 的绝对和相对丰度最高,出水中 *intI1* 的绝对和相对丰度最高。总出水中目标基因的绝对丰度分布在 $3.40 \times 10^3 \sim 3.05 \times 10^6$ copies/mL 之间,相对丰度分布在 $6.76 \times 10^{-5} \sim 5.71 \times 10^{-2}$ 之间。

2) 污水处理降低 4 种 ARGs 和 I 型整合子的绝对丰度(去除量在 1.26~2.30 logs 之间),提高 *sulII*, *tetC* 和 *intI1* 的相对丰度。

3) 相关性分析表明, *ermB*, *tetC* 和 *bla_{PSE-1}* 之间以及 I 型整合子与 *ermB*, *tetC*, *bla_{PSE-1}* 之间均存在显著的正相关关系($P < 0.0001$); pH, COD 和 $\text{NH}_3\text{-N}$ 等水质因子与 ARGs、I 型整合子和微生物量之间存在一定的相关性($P < 0.005$)。

参考文献

- [1] Sharma V K, Johnson N, Cizmas L, et al. A review of the influence of treatment strategies on antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes. *Chemosphere*, 2016, 150(70): 2–14
- [2] Zhang X X, Zhang T, Fang H. Antibiotic resistance genes in water environment. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 82(3): 397–414
- [3] 罗义, 周启星. 抗生素抗性基因(ARGs)——一种新型环境污染物. *环境科学学报*, 2008, 28(8): 13–19
- [4] Wen Qinxue, Yang Lian, Duan Ruan, et al. Monitoring and evaluation of antibiotic resistance genes in four municipal wastewater treatment plants in Harbin, Northeast China. *Environmental Pollution*, 2016, 212: 34–40
- [5] Mcconnell M M, Truelstrup Hansen L, Jamieson R C, et al. Removal of antibiotic resistance genes in two tertiary level municipal wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*, 2018, 643: 292–300
- [6] Guo Jianhua, Li Jie, Chen Hui, et al. Metagenomic analysis reveals wastewater treatment plants as hot-spots of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements. *Water Research*, 2017, 123(4): 68–78
- [7] Zhang Qianqian, Ying Guangguo, Pan Changgui, et al. Comprehensive evaluation of antibiotics emission and fate in the river basins of China: source analysis, multimedia modeling, and linkage to bacterial resistance. *Environmental science & technology*, 2015, 49(11): 72–82
- [8] 国家环保局水和废水监测分析方法编委会. 水和废水监测分析方法. 第四版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002
- [9] 张衍, 陈吕军, 谢辉, 等. 两座污水处理系统中细胞态和游离态抗生素抗性基因的丰度特征. *环境科学*, 2017, 38(9): 273–280
- [10] Yoon Y, Chung H J, Wen Di D Y, et al. Inactivation efficiency of plasmid-encoded antibiotic resistance genes during water treatment with chlorine, UV, and UV/H₂O₂. *Water Research*, 2017, 123(7): 83–93
- [11] 杨继平. 天津海河流域抗生素抗性基因分布特征及与指示微生物的关系[D]. 南昌: 南昌大学, 2017
- [12] Lorenzo P, Adriana A, Jessica S, et al. Antibiotic resistance in urban and hospital wastewaters and their impact on a receiving freshwater ecosystem. *Chemosphere*, 2018, 206: 70–82
- [13] Mcconnell M M, Hansen L T, Neudorf K D, et al. Sources of antibiotic resistance genes in a rural river system. *Journal of Environmental Quality*, 2018, 47(5): 997–1005
- [14] Narciso-Da-Rocha C, Rocha J, Vaz-Moreira I, et al. Bacterial lineages putatively associated with the dissemination of antibiotic resistance genes in a full-scale urban wastewater treatment plant. *Environment International*, 2018, 118(1): 79–88
- [15] Xu Yanbin, Hou Maoyu, Li Yafei, et al. Distribution of tetracycline resistance genes and AmpC β -lactamase genes in representative non-urban sewage plants and correlations with treatment processes and heavy metals. *Chemosphere*, 2017, 170(2): 74–81
- [16] Börjesson S, Mattsson A, Lindgren P E, et al. Genes encoding tetracycline resistance in a full-scale municipal wastewater treatment plant investigated during one year. *Journal of Water and Health*, 2010, 8(2): 247–256
- [17] 张明美. 污水处理系统中抗生素抗性基因污染研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2013
- [18] Ma Liping, Li A D, Yin Xiaole, et al. The prevalence of integrons as the carrier of antibiotic resistance genes in natural and man-made environments. *Environmental science & technology*, 2017, 51(10): 5721–5728
- [19] 苏志国, 张衍, 代天娇, 等. 环境中抗生素抗性基因与 I 型整合子的研究进展. *微生物学通报*, 2018, 45(10): 153–169
- [20] Nölvak H, Truu M, Oopkaup K, et al. Reduction of antibiotic resistome and integron-integrase genes in laboratory-scale photobioreactors treating municipal wastewater. *Water Research*, 2018, 142(3): 63–72
- [21] 奚慧. 上海城市典型水体中抗生素抗性基因时空分布特征及其影响研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2018
- [22] 杜雪. 南昌市四种典型地表水体抗生素污染特征与生态风险评估[D]. 南昌: 南昌大学, 2015
- [23] Yuan Qingbin, Guo Meiting, Yang Jian. Monitoring and assessing the impact of wastewater treatment on release of both antibiotic-resistant bacteria and their typical genes in a Chinese municipal wastewater treatment plant. *Environ Sci Process Impacts*, 2014, 16(8): 1930–1937