



移动扫码阅读

孙敏,陈红.铁对污泥水热过程中抗性基因的削减影响[J].能源环境保护,2019,33(4):4-10.

SUN Min, CHEN Hong. Influence of iron on resistance genes reduction during the sludge hydrothermal process[J]. Energy Environmental Protection, 2019, 33(4): 4-10.

铁对污泥水热过程中抗性基因的削减影响

孙 敏, 陈 红

(东华大学 环境科学与工程学院, 上海 201620)

摘要:为研究不同形态的铁对剩余污泥水热反应过程中四环素抗性基因的削减影响,选取 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 和还原铁粉作为目标物,采用荧光定量 PCR 检测五种 TC-ARGs (tetA、tetC、tetG、tetM 和 tetX)、16S rRNA 及 intI1 7 种基因在水热反应前后的基因丰度变化。结果表明 Fe 能促进 ARGs 及 intI1 在水热反应过程中的削减,但不同形态 Fe 的促进效果不同,其中 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 的促进效果较还原铁粉明显,与空白组相比降低 0.038~0.743 个数量级。其中 tetA 的促进效果最为明显,可以多削减 0.566 个数量级。ARGs 的相对丰度会在水热后增加,但 Fe^{2+} 的增加幅度最小,仅比反应前增加 $3.91\text{E}-04 \sim 1.07\text{E}-03$ 。通过对 intI1 的检测发现,与 TC-ARGs 规律一致, Fe^{2+} 能明显促进其削减及控制相对丰度的增加,综合考虑 ARGs 及 intI1 的绝对丰度和相对丰度变化, Fe^{2+} 对水热反应中 ARGs 削减及控制作用最为明显。

关键词:四环素抗性基因;第一类整合子;铁;水热反应

中图分类号:X703 文献标志码:A 文章编号:1006-8759(2019)04-0004-07

Influence of iron on resistance genes reduction during the sludge hydrothermal process

SUN Min, CHEN Hong

(College of Environmental Science and Engineering, Donghua University, Shanghai 201620, China)

Abstract: In order to study the influence of different forms of iron on tetracycline resistance genes reduction during hydrothermal process of excess sludge, Fe^{2+} , Fe^{3+} and reduced iron powder were selected as objectives, and the abundance of TC-ARGs (tetA, tetC, tetG, tetM and tetX), 16S rRNA and intI1 before and after hydrothermal process was detected by realtime fluorescence quantitative PCR (RTFQ PCR). The results showed that different forms of iron promoted the reduction of ARGs and intI1 in different degrees. The gene abundance treated by Fe^{2+} and Fe^{3+} reduced more obviously than that treated by reduced iron powder, and was 0.038~0.743 order of magnitude lower than the blank group. The abundance of tetA was influenced most significantly, which reduced 0.566 order of magnitude more than that of other genes. The relative abundance of ARGs increased after hydrothermal process. The increase of relative abundance was the smallest when treated by Fe^{2+} , which was only $3.91\text{E}-04 \sim 1.07\text{E}-03$. The detection of intI1 indicated that Fe^{2+} could promote significantly the reduction of intI1 resistance genes and increasing of its relative abundance was the same as TC-ARGs. Considering the change of absolute abundance and relative abundance of ARGs and intI1, it was concluded that Fe^{2+} had the most obvious effect on the reduction and controlling of ARGs among all the forms of iron.

Key words: Tetracycline resistance gene; IntI1; Iron; Hydrothermal process

收稿日期:2019-04-24

基金项目:国家自然科学基金(51878136);江苏省自然科学基金(BK20160431)

第一作者简介:孙敏(1994-),女,贵州贵阳人,硕士在读,研究方向为水污染控制技术。E-mail:15000877903@163.com

0 引言

近年来,随着经济技术的快速发展,抗生素被广泛用于人类医疗、农业和畜禽养殖业。然而,抗生素的大量使用导致环境中的抗性细菌(ARB)大量增殖,抗性基因(ARGs)在环境中大量的富集和传播^[1]。环境中的抗性基因通过食物链及其他途径进入人体,将会对人体健康造成极大地威胁。研究表明,ARGs在水体环境中普遍存在,而污水处理厂作为污水的最终处理环节,汇集了各污染源排放的抗性基因(ARGs),是环境中抗性基因的重要储存库,同时也是削减抗性基因的重要途径。污水处理过程中的活性污泥中会富集大量的ARGs。据研究显示,污水处理过程中大部分的ARGs(>99%)均会转移到剩余污泥中^[2],Eric A等^[3]研究某污水处理厂抗性基因的污染水平,结果表明活性污泥中的抗性基因检出频率最高(0.86),因此,控制及削减污泥中的ARGs具有重要意义。

目前,污泥的处理技术主要有厌氧消化、堆肥和干化。然而,有研究表明污泥堆肥在一定程度上会使ARGs丰度增加^[4,5]。由于厌氧消化可以通过水解的方式使细胞破裂,释放胞内DNA,再破坏其结构,从而削减剩余污泥中的ARGs^[6,7]。然而ARGs的削减效果与厌氧消化的反应条件(温度、pH、反应时间等)密切相关,且高温厌氧消化的效果好于中温厌氧消化^[8],初始pH越偏离中性条件^[9]、污泥停留时间越长^[10],ARGs的削减效果越好。所以厌氧消化能在一定程度上削减污泥中的ARGs,但反应时间较长,且需要优化反应条件,成本较高。水热反应目前主要用于材料合成及污泥减量等,有研究表明,水热法对污泥进行预处理能够有效的降低污泥的ARGs含量。Pei等^[11]发现污泥经过水热反应后,污泥中TC-ARGs丰度明显降低。水热法既能有效的削减污泥中的ARGs,又能实现污泥减量,提高污泥的脱水性能^[12],是一种高效、经济的削减污泥中ARGs的方法。

由于生物法除磷的效率较低,目前国内大多数污水处理厂采用化学除磷的方式降低污水中的磷含量。高颖等^[13]发现,向生物处理系统中投加 Fe^{3+} 能明显提升系统的除磷效果,且未对系统本身的除磷效果产生抑制。汪恩等^[14]通过向污水中投加 $FeSO_4$ 后,系统的除磷效率明显提高。T.Almeelbi等^[15]的研究表明,纳米铁能够有效的

去除污水中的磷,用Fe强化除磷的同时会使Fe大量的在污泥中富集。研究表明,零价铁的存在会影响污泥厌氧消化过程中ARGs的削减效率^[16,17],然而,污泥中存在Fe时对污泥水热处理过程中ARGs的削减影响还有待研究。

本研究选取使用较为广泛的 $FeSO_4$ 、 $FeCl_3$ 和零价铁粉作为目标物,考察不同形态的Fe对剩余污泥水热处理过程中ARGs及一类整合子基因(int1)削减的影响,分析铁的投加对污水处理厂中抗生素抗性基因的控制的影响,为控制ARGs向环境中的扩散奠定理论基础。

1 实验部分

1.1 实验药剂与仪器

天根土壤基因组DNA提取试剂盒;罗氏Fast Start Essential DNA Green Master;生工1×TE缓冲液,10% SDS溶液,饱和酚(pH 7.9 ± 0.2),RNaseA,蛋白酶K; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (分析纯); $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (分析纯);还原铁粉等。

电子天平:奥豪斯仪器上海有限公司AR114;超净工作台:力辰科技VD-650;实时荧光定量PCR。

扩增仪:罗氏Roche Lightcycler 96;电感耦合等离子光谱发生仪:Agilent 720ES等。

1.2 水热体系

实验污泥取自上海松江污水处理厂二沉池的剩余污泥,新鲜污泥先置于4℃下静置沉淀4h,排除上清液,使污泥的TSS约为9.15 g/L。

实验设置4组反应器:空白、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 及 Fe^0 ,采用100 mL的高压反应釜。取约为70 mL污泥置入反应釜,3个反应组分别加入适量的硫酸亚铁、氯化铁和还原铁粉,使反应组中的铁含量为300 mg/L。盖上反应釜釜盖。拧紧气阀,使水热釜处于密闭状态。将高压反应釜放入烘箱中,160℃反应2h。待反应结束后,使用自来水使反应釜加速冷却至室温,所得到的泥水混合物即为待测产物。

1.3 检测分析方法

1.3.1 DNA提取

污泥相:取一定量的泥水混合液,在6 000 rpm离心10 min,倒掉上清液,取0.25 g污泥,采用TI-ANamp Siol DNAKit(TIANGEN)进行DNA提取,提取步骤参照试剂盒操作说明书,所提取的DNA使用Qubit 2.0核酸蛋白测定仪(Invitrogen)检测其纯度和浓度。

上清液:取 3 mL 上清液于 10 mL 离心管中,加入 184 μL 10 %SDS 混匀,再加入 37 μL 蛋白酶 k (10 mg/L)、2 μL RNaseA (20 $\mu\text{g/L}$) 混匀,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下水浴反应 1 h。然后再向离心管中加入 740 μL 氯化钠溶液 (5 mol/L)、512 mL CTAB/NaCl 溶液 (7 : 25, m/m), 混匀后 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 10 min。而后向其中加入等体积的氯仿/异戊醇 (24 : 1, v/v), 12 000 rpm 离心 5 min; 取上清液至新的离心管中, 加入等体积的酚/氯仿/异戊醇 (25 : 24 : 1, v/v), 12 000 rpm 离心 5 min; 取上清液至新的离心管中, 加入 0.6 倍体积的异丙醇, 将溶解在溶液中 DNA 析出, 摇匀后 12 000 rpm 离心 5 min, 倒掉上清液, 加入 TE 溶液溶解 DNA, 所得溶液即为 DNA 溶液。

1.3.2 TC-ARGs、intI1 及 16S rRNA 基因的检测

本研究共选取 tetA、tetC、tetG、tetM 和 tetX 基因作为研究对象, 其中 tetA、tetC 和 tetG 为外排泵

基因, tetM 为核糖体保护基因, 而 tetX 则属于酶修饰基因^[18]。此外, 本研究同时检测了对抗生素抗性基因的水平转移具有重要作用第一类整合子 intI1 以及 16S rRNA 基因。目标基因使用 qPCR 进行定量检测分析, 所用扩增引物序列、扩增子大小和退火温度参见表 1^[16]。

qPCR 反应体系包括 10 μL FastStartEssential DNA Green Master (Roche), 正反引物 (4 $\mu\text{mol/L}$) 各 1.5 μL , 1 μL DNA 样品和 6 μL ddH₂O 共 20 μL 。qPCR 热循环反应程序如下: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 共 40 个循环, 退火 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 以此同时, 利用熔解曲线分析扩增产物的特异性。每组样品做 3 个平行样, 使用无菌水作为阴性对照^[16]。

委托生工生物工程(上海)有限公司合成目标基因标准品, 按梯度稀释后进行 qPCR 反应, 得到各基因的标准曲线。

表 1 qPCR 反应的基因引物信息^[16]

目标基因	引物	引物序列	产物长度	退火温度
tet A	FW	GCTACATCCTGCTTCGCTTC	210	65
	RV	CATAGATCGCCGTGAAGAGG		
tetX	FW	CAATAATTGGTGGTGGACCC	468	60
	RV	TTCTTACCTTGGACATCCCG		
tet G	FW	GCTCGGTGGTATCTCTGCG	468	60
	RV	AGCAACAGAATCGGGAAC		
tet C	FW	CTTGAGAGCCTTCAACCCAG	418	63
	RV	ATGGTCGTCTACTACTGCGC		
tetM	FW	GTGGACAAAGGTACAACGAG	406	63
	RV	CGGTAAAGTTCGTACACAC		
intI1	FW	CCTCCCGCACCATGATC	280	60
	RV	TCCACGCATCGTCAGGC		
16S rRNA	FW	AGGAAGGTGGGGATGAC	117	57
	RV	CGGCTTCTGGGATTGG		

2 结果与分析

2.1 TC-ARGs 的绝对丰度变化

图 1 是水热反应前后各反应器中四环素抗性基因的绝对丰度变化情况, 由图 1 可知, 原污泥中表征微生物总量的 16S rRNA 基因丰度大约是 $1.9\text{E}+10$ copies/g, 目标 TC-ARGs 的丰度为 $1.60\text{E}+6 \sim 1.20\text{E}+8$ copies/g。其中, tetA 的基因丰度最高, 达 $1.2\text{E}+08$ copies/g, 其余的均低于 $1\text{E}+07$ copies/g。而上清液中的中 ARGs 含量均较低, 较对应泥相中的 ARGs 低 1~2 个数量级。

由图 1 可知, 经水热处理后, 污泥中的 ARGs 丰度均明显下降, 而上清液中的 ARGs 丰度均明显上升, 污泥相及上清液的总量呈下降趋势, 这可

能由于水热反应过程中微生物破裂将胞内 DNA 释放到上清液中, 使得污泥相的 ARGs 大幅减少, 而上清液的 ARGs 大幅增加。Fe 的引入使得 16S rRNA 基因及大部分的 TC-ARGs (除 tetX 外) 的削减效果提高。其中, 引入 Fe 的反应体系中的 16S rRNA 基因的削减效果均好于空白组, 这表明 Fe 促进了水热反应对微生物的破坏, 有利于微生物总量的削减。如表 2 所示, 引入 Fe 的反应体系中的 16S rRNA 基因的削减量较空白组的高出 0.012~1.44 个数量级, 其中 Fe³⁺ 的促进作用最为明显, 削减量是空白组的 27.54 倍。目标基因 TC-ARGs 的变化特征各有差异, 对于 tetA、tetC 和 tetG 等外排泵基因, Fe 的引入对 ARGs 的削减均有一定的促进作用, 去除范围为 0.257~1.292 个数量

级,其中 tetA 的促进效果最为明显,较空白组的削减量高出 0.313~0.566 个数量级,且离子态 Fe 的促进效果高于零价铁粉,可能是由于零价铁粉不能直接与微生物反应,需要进一步反应溶解后才能与微生物结合。对于核糖体保护基因 tetM,与其他 TC-ARGs 不同,水热反应后目标抗性基因主要集中于污泥相中,上清液中的抗性基因含量远

低于污泥中的抗性基因。且不同形态的铁表现出的促进作用不同,其中,Fe²⁺和 Fe³⁺表现出促进作用,而零价铁则表现出明显的抑制作用。然而,对于酶修饰基因 tetX,Fe 对抗性基因的削减则表现出明显的抑制作用,引入 Fe 的反应组的削减量较空白组降低 0.642~0.698 个数量级,且 Fe²⁺的抑制效果最为明显。

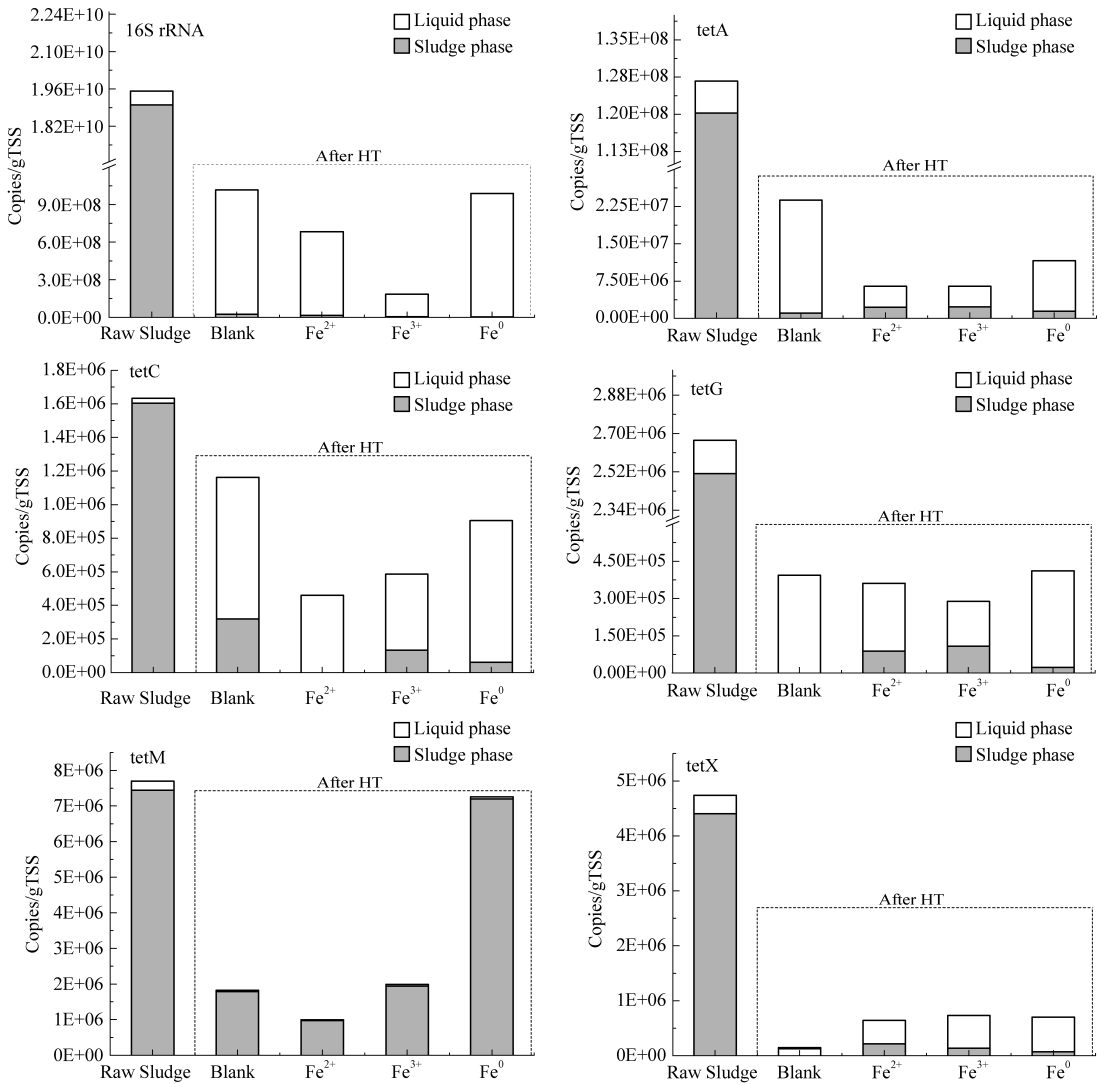


图 1 16S rRNA 基因及 TC-ARGs 水热前后丰度变化

表 2 水热后体系中总 ARGs 的削减量

log C ₀ /C	16S rRNA	tetA	tetC	tetG	tetM	tetX
原泥水热	1.283	0.726	0.148	0.831	0.625	1.510
Fe ²⁺	1.456	1.292	0.550	0.869	0.888	0.868
Fe ³⁺	2.026	1.292	0.445	0.967	0.688	0.812
Fe ⁰	1.295	1.039	0.257	0.812	0.026	0.829

综上所述,水热反应能够有效的削减污泥中的抗性基因,但是其上清液中的 ARGs 丰度会大幅增加,对于 tetA、tetC 和 tetG 等外排泵基因,Fe

能促进水热过程中 ARGs 的削减,其中 Fe²⁺和 Fe³⁺表现出的促进作用更为明显。对于核糖体保护基因 tetM,Fe²⁺和 Fe³⁺表现出促进作用,而零价铁则

表现出明显的抑制作用。而对于酶修饰基因 tetX, Fe 则均表现出抑制作用。

2.2 TC-ARGs 的相对丰度变化

TC-ARGs 的相对丰度是 TC-ARGs 与 16S rRNA 的绝对丰度的比值,能够直观地表示目标 ARGs 在微生物基因组中的比例,对控制 ARGs 在环境中的扩散具有重要意义。图 2 是水热反应前后四环素抗性基因相对丰度的变化情况。由图可知,原污泥中的 TC-ARGs 的相对丰度均较低,约为 $8.44\text{E}-05 \sim 7.09\text{E}-03$,水热反应后,目标 TC-ARGs 的相对丰度均大幅对升高,为 $5.31\text{E}-03 \sim 2.37\text{E}+00$,由此可推测,水热反应使大部分的微生物细胞破裂,使其胞内 DNA 释放到胞外,并通过

高温高压使其结构破坏,从而降低 DNA 含量。但目标抗性基因较其他功能基因来说更难被降解,所以在目标 ARGs 绝对丰度降低的同时,相对丰度呈现明显的上升趋势。污泥相中的优势 ARGs 为 tetA 和 tetM, Fe 会使污泥中的优势 ARGs 的相对丰度明显升高,尤其是还原铁粉,相对于空白分别提高了 $4.81\text{E}-01$ 和 $2.37\text{E}+00$ 。

对于上清液,由 2.1 节可知,目标 ARGs 的绝对丰度明显升高,但由图 2 可知, Fe^{2+} 和 Fe^0 反应组的目标 ARGs 的相对丰度低于原始污泥。整个反应体系中 Fe^{2+} 和 Fe^0 反应组的目标抗性基因的相对丰度均低于对照组,而 Fe^{3+} 组的相对丰度明显高于空白组。

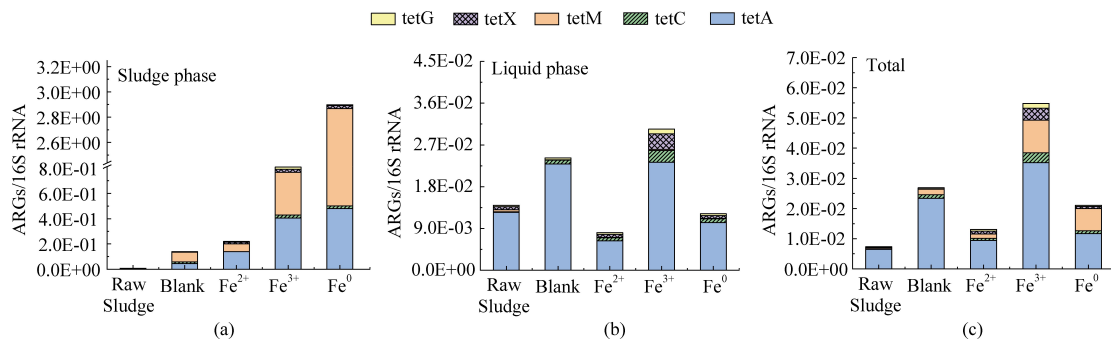


图 2 水热反应前后 ARGs 的相对丰度

综上所述,污泥相中的 TC-ARGs 的相对丰度在水热后明显提高, Fe 能增加其相对丰度,其中 Fe^0 的趋势最为明显。而在总量上, Fe^{3+} 的抑制作用最明显。综合考虑绝对丰度和相对丰度, Fe^{2+} 更有利于水热反应对目标 TC-ARGs 的削减。

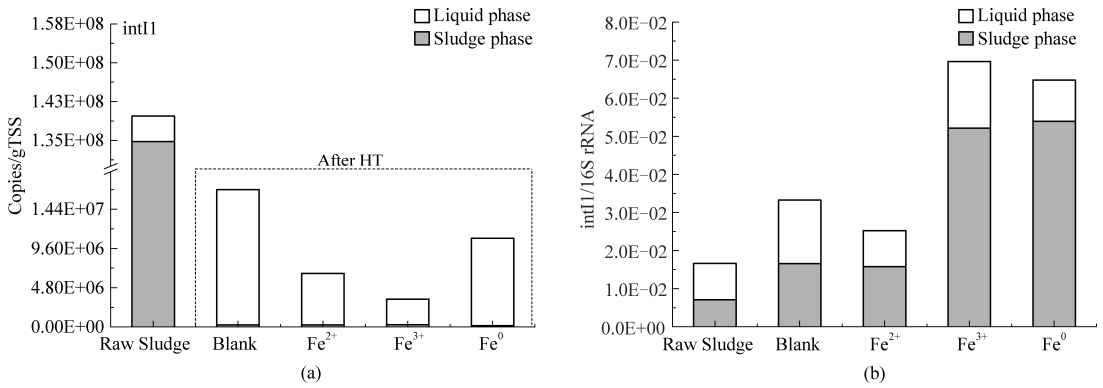
2.3 第一类整合子基因 (intI1) 的丰度变化

基因水平转移是环境中抗性基因的重要传播途径^[19]。基因的水平转移包括质粒 DNA 接合作用、胞外 DNA 转换作用以及噬菌体 DNA 转导作用^[20]。整合子可特异性捕获或切除基因盒导致基因盒的移动,也可在接合性质粒、转座子、整合型噬菌体或细菌染色体间移动,并且通过这些可移动元件在同种和不同种菌属间传播^[21]。整合子根据其编码整合酶的 DNA 序列不同可分为 9 类^[22],其中以 I 类整合子最为常见^[23]。第一类整合子的基因丰度可表示污泥中抗性基因水平转移

的能力。

图 3 为水热反应前后 intI1 基因相对丰度的变化情况,从图 3(a)中可以看出,经水热反应后,污泥中的 intI1 含量明显降低,各反应组的丰度均比原泥低了 8 个数量级。与目标 TC-ARGs 的规律相似,水热反应后,液相中的 intI1 含量较反应前的高,但不同形态的 Fe 对 intI1 的削减均有促进作用。由图 3(b)可知,水热后 intI1 的相对丰度均高于原污泥,其中 Fe^{3+} 和还原铁粉的相对丰度最高,分别为 $6.16\text{E}-02$ 和 $6.48\text{E}-02$,而 Fe^{2+} 反应组的相对丰度最低 ($2.52\text{E}-02$)。

综上所述, Fe 对 intI1 在水热过程中的削减有促进作用,不同形态的铁表现出不同的削减效率,其中 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 的促进效果最好。但综合相对基因丰度, Fe^{2+} 对控制 ARGs 向环境中扩散最有效。

图3 水热前后 *intI1* 的绝对丰度 (a) 与相对丰度 (b)

3 结论

(1) 水热反应后污泥中 16S rRNA 和 TC-ARGs 基因丰度均明显下降,比反应前降低 0.026–1.510 个数量级。铁的引入对目标基因(除 *tetX* 外)在水热过程中的削减均有促进作用,其中 Fe²⁺ 和 Fe³⁺ 的促进效果较还原铁粉的明显,与空白组相比降低 0.038–0.743 个数量级。对于酶修饰基因 *tetX* 均表现出抑制作用,较空白组高出 0.642–0.698 个数量级。

(2) 经水热反应后污泥中的 16S rRNA 和 TC-ARGs 的相对丰度均显著增加,从剩余污泥中的 8.44E-05~7.09E-03 增加至 5.31E-03~2.37E+00。泥相中铁会促进 ARGs 相对丰度的增加,且还原铁粉的促进作用最强。综合上清液及泥相中 ARGs 的相对丰度变化,发现 Fe²⁺ 和还原铁粉在总量上能够抑制水热反应 TC-ARGs 的相对丰度的增加,总 ARGs 分别比空白组低 1.20E-02 和 5.00E-04。

(3) 污泥水热反应过程中 *intI1* 的变化规律 TC-ARGs 规律相似,水热反应后污泥中丰度显著降低(约 7 个数量级),而上清液丰度显著升高,占整体 *intI1* 的 99% 以上。整个系统中绝对丰度减小 1–2 个数量级,铁的引入会促进 *intI1* 的削减,其中 Fe²⁺ 和 Fe³⁺ 的促进效果最明显,分别较空白组降低 0.51 和 0.62 个数量级。反应后各反应组中 *intI1* 的相对丰度均有所增加,但 Fe²⁺ 增加趋势最小,表明 Fe²⁺ 对水热反应过程中 ARGs 削减及控制最有利。

参考文献

[1] Cabello F C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture; a growing problem for human and animal health and for the environment [J]. *Environmental Microbiology*, 2006, 8 (7):

1137–1144.

[2] Burch T.R., Sadowsky M.J., Lapara T.M. Aerobic digestion reduces the quantity of antibiotic resistance genes in residual municipal wastewater solids [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2013, 4: Article17.

[3] Eric A, Erin E, Seyfried, et al. Tetracycline resistance genes in activated sludge wastewater treatment plants [J]. *Water Res*, 2007, 41 (5): 1143–1151.

[4] Su J Q, Wei B, Ou-Yang W Y, et al. Antibiotic resistome and its association with bacterial communities during sewage sludge composting [J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49 (12): 7356–7363.

[5] Zhang J, Chen M, Sui Q, et al. Impacts of addition of natural zeolite or a nitrification inhibitor on antibiotic resistance genes during sludge composting [J]. *Water Research*, 2016, 91 (9): 339–349.

[6] Miller J, Novak J T, Pruden A, et al. Effect of nanosilver and antibiotic loading on Fate of antibiotic resistance genes in thermophilic and mesophilic anaerobic digesters [J]. *Proceedings of the Water Environment Federation*, 2012 (2): 1221–1234.

[7] Miller J H, Novak J T, Knocke W R, et al. Survival of antibiotic resistant bacteria and horizontal gene transfer control antibiotic resistance gene content in anaerobic digesters [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7 (18): 263.

[8] Zhang T, Yang Y, Pruden A. Effect of temperature on removal of antibiotic resistance genes by anaerobic digestion of activated sludge revealed by metagenomic approach [J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2015, 99 (18): 7771–7779.

[9] 钱燕云, 郑吉, 徐莉柯, 等. 温度对厌氧环境下污泥中抗生素抗性基因行为特征的影响 [J]. *生态毒理学报*, 2015, 10 (5): 47–55.

[10] Ma Y, Wilson C A, Novak J T, et al. Effect of various sludge digestion conditions on sulfonamide, macrolide, and tetracycline resistance genes and class I Integrons [J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45 (18): 7855–7861.

[11] Pei J, Yao H, Wang H, et al. Comparison of ozone and thermal hydrolysis combined with anaerobic digestion for municipal and pharmaceutical waste sludge with tetracycline resistance genes [J]. *Water Research*, 2016, 99: 122–128.

[12] 甘雁飞, 周宁娟, 张若晨, 等. 废水处理厂剩余污泥水热减