

生活污水中四环素类抗生素抗性 基因污染的初步研究^①

朱 丹, 张 瑞, 杨 琳

大理大学 农学与生物科学学院, 云南 大理 671003

摘要: 抗生素抗性基因作为一种新型环境污染物质已成为环境领域的研究热点之一. 以生活污水处理系统进水、出水、曝气池、污泥 4 种代表性样品进行四环素类抗性细菌筛选, 并用 PCR 对抗性基因进行初步鉴定. 在对污水处理系统中 4 类样品进行细菌培养后, 筛选出抗性细菌 9 种(1S, 1L, 2R, 2S, 3Y, 3L, 4L, 4T, 4T₁). 进水、污泥、曝气池中抗性细菌相对数量较多, 出水中较少. 结果表明生活污水中存在四环素类抗性基因污染.

关键词: 四环素类抗生素抗性基因; 生活污水; PCR; 抗性基因污染

中图分类号: X171.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-5471(2017)02-0049-04

抗生素耐药性、抗性基因的检测和鉴定及其在全球范围内传播已成为国际关注的热点. 饮用水、医疗污水、畜禽水产养殖废水、地表水均检出抗性细菌与抗性基因^[1]. Jose^[2]认为抗生素抗性产生的原因主要是: ①自然界中产抗生素微生物自身具备抗生素抗性. 这是由于能够产生抗生素的微生物为了抵抗抗生素及其他物质对其自身造成危害而产生的; ②本来不具备抗性的微生物暴露在抗生素及其他污染物的环境下, 自我进化变异后产生抗生素抗性基因, 从而具备了抗生素抗性. 继水体抗生素抗性研究后, 污水处理厂污泥和土壤环境的抗生素抗性研究也相继开展. Zhang 等^[3]对中国、新加坡、美国、加拿大共 15 个污水处理厂中的 14 种四环素类抗性基因的检出、丰度和差异性进行了调研, 结果显示 *tetA*, *tetC*, *tetG*, *tetM*, *tetS* 和 *tetX* 在所有污水处理厂均可检出. Watkinson 等^[4]对污水中的大肠杆菌进行了研究, 发现四环素的耐药性最高.

国内抗生素抗性基因污染的研究相对集中于水产养殖、河流污染、动物粪便等^[5]. 对于污水处理系统这一综合抗生素抗性基因存储库的研究却很薄弱. 人畜服用的抗生素大多没有被充分吸收利用而随排泄物进入污水或直接排入环境. 进入水体的抗生素促进多种菌群对其产生耐药性进而产生各类抗性基因, 各种污水处理过程对抗生素抗性基因作用较小或根本不起作用, 从而造成一种新型环境污染. 鉴于云南省对环境抗生素抗性污染研究较少, 本文主要对大理市某生活污水处理厂污水样品进行细菌培养, 筛选抗性细菌, 对污水处理系统中各样品四环素抗性基因(四环素类: *tetM*, *tetO*, *tetQ*, *tetW*)进行研究和检测, 期望为污水处理系统抗生素抗性研究和进展提供帮助, 同时也为控制抗生素的合理选用提供一定对策, 有助于科学评价污水处理系统中抗性基因的污染危害性.

1 材料与方法

1.1 实验材料与设备

1.1.1 实验材料

氢氧化钠, 氯化钠, 冰醋酸, EDTA, 固体琼脂, 蛋白胨, 酵母膏, 琼脂糖, Tris 碱, IPTG, X-gal, 去

① 收稿日期: 2015-07-21

基金项目: 云南省教育厅科学研究基金项目(2013Y507).

作者简介: 朱 丹(1981-), 男, 贵州凯里人, 硕士, 讲师, 主要从事环境生物技术及水污染控制的研究.

离子水, 异丙醇, 溴化乙锭, 10×PCR buffer(不含 Mg^{2+}), 25 mmol/L $MgCl_2$, 10 mmol/L dNTP, 5U Tap 酶, 正向引物(10 μ mol/L), 反向引物(10 μ mol/L), 模板 DNA(75 ng), ddH₂O, 6×Loading buffer Dye, 100 bp Marker, 四环素, 革兰氏染液等.

1.1.2 仪器及设备

超净工作台, 苏州安泰; LRH 系列生化培养箱, 上海一恒; 电热恒温水浴锅, 高压灭菌锅, 上海博讯; 超纯水仪, 南京易普易达; 梯度 PCR 扩增仪, 离心机, 德国 EPPENDORF; 凝胶电泳仪, 北京六一; 凝胶成像分析仪, 英国 SYNGFNF 等.

1.2 实验用培养基配置

LB 培养基(加四环素): 蛋白胨 10 g/L, 酵母膏 5 g/L, 氯化钠 10 g/L, 琼脂 15 g/L, 加纯水 800 mL 溶解, 调节 pH 至 7.5 定容至 1L, 高压灭菌(121 $^{\circ}C$, 30 min), 灭菌后待培养基冷却至 65 $^{\circ}C$ 左右加入四环素使用液, 倒平板常温冷却, 于 4 $^{\circ}C$ 保存备用, 培养基抗生素质量浓度添加为 0.02 mg/mL.

1.3 实验方法

1.3.1 样品采集

预实验样品 2013 年 8 月采集于云南省大理市某生活污水处理厂, 正式实验样品采集于 2013 年 12 月, 对采集所得样品进行编号, 其中 1 号为活性污泥, 2 号为曝气池水, 3 号为出水, 4 号为进水, 实验样品采集后于 4 $^{\circ}C$ 保存.

1.3.2 抗四环素抗性细菌筛选

将样品稀释液各 1 mL 分别涂布接种至 LB 平板培养基上, 37 $^{\circ}C$ 恒温培养 20 h, 观察菌落生长情况, 挑取分离抗性细菌进一步纯化. 得到高纯度抗性细菌菌体 9 株(1S,1L,2R,2S,3Y,3L,4L,4T,4T₁).

1.3.3 抗四环素抗性细菌 DNA 提取

采用 CTAB 法提取抗性细菌基因组 DNA.

1.3.4 PCR 反应程序及其产物鉴定

引物序列: 实验中选择 4 种常见的四环素类抗性基因(*tetM*, *tetO*, *tetQ*, *tetW*)进行检测, 待测基因的引物来源于文献[6,7], 引物序列表及 PCR 反应体系见表 1, 表 2.

表 1 引物序列表

基因	引物	序列 5'→3'	扩增片段	参考文献
<i>tetO</i>	<i>tetF</i>	GATGGCATACAGGCACAGACC	172	[6]
	<i>tetR</i>	GCCCAACCTTTTGCTTCACTA		
<i>tetM</i>	<i>tetF</i>	ACAGAAAGCTTATTATATAAC	171	[7]
	<i>tetR</i>	TGGCGTGTCTATGATGTTAC		
<i>tetQ</i>	<i>tetF</i>	AGAATCTGCTGTTTGCCAGTG	169	[7]
	<i>tetR</i>	CGGAGTGTCAATGATATTGCA		
<i>tetW</i>	<i>tetF</i>	GAGAGCCTGCTATATGCCAGC	168	[7]
	<i>tetR</i>	GGGCGTATCCACAATGTTAAC		

表 2 PCR 反应体系^[1]

试 剂	体积/ μ L	试 剂	体积/ μ L
10 ×PCR buffer(不含 Mg^{2+})	2.0	反向引物(10 μ mol/L)	1.0
25 mmol/L $MgCl_2$	0.8	模板 DNA(75 ng)	1.0
10 mmol/L dNTP	2.0	ddH ₂ O	16.9
5U Tap 酶	0.3	Total	25.0
正向引物(10 μ mol/L)	1.0		

2 实验结果

2.1 四环素类抗性细菌的筛选

本次实验采集大理市下关镇某污水处理厂 4 类样品, 利用添加四环素的 LB 抗性培养基对污水处理厂

进水、出水、曝气池水、污泥中抗性菌进行培养及抗性情况进行研究. 实验结果发现, 所采集的水样和污泥样品在添加四环素的 LB 培养基上均有生长, 说明被检测的样品中存在抗四环素的抗性细菌. 对其进行筛选纯化, 得到高纯度抗性细菌菌体 9 株, 分别命名为 1S, 1L, 2R, 2S, 3Y, 3L, 4L, 4T 与 4T₁ (其中: 1, 2, 3, 4 分别为活性污泥, 曝气池水, 出水, 进水; L, R, S, Y, T 分别为菌落序号).

2.2 抗性细菌菌落形态及革兰氏染色分析

观察纯化出的 9 株抗性菌菌落形态并进行革兰氏染色, 结果见表 3. 从表 3 可以看出, 筛选出的 9 株抗性细菌中除 1S, 2R 与 4T₁ 外, 均为革兰氏阴性菌. 此外, 从菌体形态来看, 3Y, 3L, 4T, 4L 均为杆菌, 而 1L, 1S, 2R, 2S 与 4T₁ 均为球菌.

表 3 不同抗性细菌形态特征

编号	菌落形态	革兰氏染色	菌体形态
1L	点状, 乳白色, 边缘规则, 不透明	—	球菌
1S	点状, 乳白色, 边缘规则, 稍透明	+	球菌
2R	边缘不规则, 乳白色, 不透明	+	球菌
2S	点状, 乳白色, 边缘规则, 稍透明	—	球菌
3Y	点状, 乳白色偏黄, 边缘规则, 不透明	—	杆菌
3L	点状, 乳白色, 不透明, 边缘规则	—	杆菌
4T	点状, 乳白色, 不透明, 边缘规则	—	杆菌
4T ₁	点状, 乳白色, 不透明, 边缘规则	+	球菌
4L	点状, 乳白色, 不透明, 边缘规则	—	杆菌

2.3 四环素抗性菌 PCR 结果分析

为了进一步确定筛选出的 9 株抗性细菌具有四环素抗性基因, 对菌株培养液进行培养并提取 DNA, 进行 PCR 实验. 结果见表 4. 由表 4 可知, 菌株 1L, 4T 与 4T₁ 含有 4 种四环素抗性基因 (*tetM*, *tetO*, *tetQ*, *tetW*), 而 1S, 2S, 3L, 3Y 与 4L 检测出 *tetM* 与 *tetO* 基因.

表 4 细菌抗性基因检测结果

菌种	<i>tetM</i>	<i>tetO</i>	<i>tetQ</i>	<i>tetW</i>
1L	+	+	+	+
1S	+	+	—	—
2S	+	+	—	—
2R	/	/	/	/
3L	+	+	—	—
3Y	+	+	—	—
4L	+	+	—	—
4T	+	+	+	+
4T ₁	+	+	+	+

注: 1) “+”为阳性, “—”为阴性; 2) 由于菌 2R 未能提出 DNA 所以未检出四环素类抗性基因, 但根据其生长状况判断应具备四环素抗性.

3 讨 论

3.1 结 论

- 1) 本实验从某污水处理厂样品中共分离得抗性细菌 9 株: 1S, 1L, 2R, 2S, 3Y, 3L, 4L, 4T, 4T₁.
- 2) 革兰氏染色结果发现 1L, 2S, 3Y, 3L, 4T, 4L 为革兰氏阴性菌; 而 1S, 2R, 4T₁ 为革兰氏阳性菌.
- 3) 通过 PCR 实验发现 1L, 4T, 4T₁ 均检出 4 种四环素类抗性基因, 1S, 2S, 3L, 3Y, 4L 只检出 *tetM*, *tetO*, 菌 2R 由于未能提出 DNA 所以未检出四环素类抗性基因. 由于污水厂样品中已检出四环素类抗性基因, 且大部分 *tet* 基因都能与基因移动单元(如能转移的质粒、转座子、整合子等)相连, 使 *tet* 基因可在种间甚至属间进行转移, 造成携带有 *tet* 基因的细菌容易在人体、动物、环境中广泛存在, 并通过基因水平转移等方式, 侵染到其他共生菌甚至病原菌中^[8]. 因此, 如果直接将含有抗性基因的污水排入天然水体, 势

必使得抗性基因进入环境, 引发污染.

3.2 建 议

本实验利用选择性培养基(添加四环素)对生活污水处理系统 4 类水样进行抗性细菌筛选, 再通过 PCR 技术对该抗性细菌抗性基因进行研究. 初步表明生活污水处理系统中确实存在抗四环素类的抗性细菌. 生活中各方面因素的综合作用下更将加快抗性基因的传播, 加重环境的压力^[9]. 我国有关微生物的抗生素抗性研究多数集中于临床微生物中抗性的定性分析方面, 对于土壤环境中微生物抗生素抗性的来源、传播和扩散机制的研究相对较少, 生活污水环境中的抗生素污染亦未引起足够重视, 当前新形势下开展抗生素抗性基因在环境中的来源、分布、传播、扩散机制以及控制对策等研究十分必要, 应进一步加强对环境中微生物抗性的研究.

参考文献:

- [1] 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.
- [2] JOSE L M. Natural Antibiotic Resistance and Contamination by Antibiotic Resistance Determinants; the Two Ages in the Evolution of Resistance to antimicrobials [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 3(1): 1—3.
- [3] ZHANG X X, ZHANG T. Occurrence, Abundance, and Diversity of Tetracycline Resistance Genes in 15 Sewage Treatment Plants across China and Other Global Locations [J]. *Environ Sci Technol*, 2011, 45(7): 2598—2604.
- [4] WATKINSON A J, MICALIZZI G B, GRAHAM G M, et al. Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* in Wastewaters, Surface Waters, and Oysters from an Urban Riverine System [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(17): 5667—5670.
- [5] 王志刚, 陈 宏, 陈玉成, 等. 电解氧化法去除养殖废水中抗生素和激素研究 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2013, 35(5): 131—136.
- [6] LUO Y, MAO D, RYSZ M, et al. Trends in Antibiotic Resistance Genes Occurrence in the Haihe River, China [J]. *Environ Sci. Technol*, 2010, 44(19): 7220—7225.
- [7] AMINOV R I, GARRIGUES-JEANJEAN N, MACKIE R I. Molecular Ecology of Tetracycline Resistance; Development and Validation of Primers for Detection of Tetracycline Resistance Genes Encoding Ribosomal Protection Proteins [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(1): 22—32.
- [8] 邹世春, 李 青, 贺竹梅. 禽畜养殖场土壤抗生素抗性基因污染的初步研究 [J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 2012, 51(6): 87—91.
- [9] 吴 楠, 乔 敏, 朱永官. 猪场土壤中 5 种四环素抗性基因的检测和定量 [J]. *生态毒理学报*, 2009, 4(5): 705—710.

Tentative Research on Tetracycline Resistance Genes in Domestic Sewage

ZHU Dan, ZHANG Rui, YANG Lin

College of Agriculture and Biological Sciences, Dali University, Dali Yunnan 671003, China

Abstract: Antibiotic resistance genes (ARGs) recently have been identified as emerging contaminants. To study the pollution of antibiotic resistance genes in domestic sewage, samples have been taken from inlet, outlet, aeration tank and sludge of water treatment plant. The antibiotic resistance bacteria have been screened by LB media with tetracycline and PCR tests have been done to determine the ARGs. 9 strains of resistant bacteria have been screened from samples. The level of resistant bacteria from outlet is lower compared to those from inlet, aeration and sludge, which indicates the domestic sewage have been polluted by ARGs.

Key words: Antibiotic resistance genes (ARGs); domestic sewage; PCR; ARGs

责任编辑 周仁惠