

刘苗苗, 张昱, 李栋, 等. 2010. 制药废水受纳河流中四环素抗药基因及微生物群落结构变化研究[J]. 环境科学学报, 30(8): 1551 - 1557
Liu M M, Zhang Y, Li D, et al. 2010. Changes of tetracycline resistance genes and microbial community structure in a river receiving pharmaceutical production wastewater[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 30(8): 1551 - 1557

制药废水受纳河流中四环素抗药基因及微生物群落结构变化研究

刘苗苗, 张昱*, 李栋, 李魁晓, 高迎新, 杨敏

中国科学院生态环境研究中心环境水质学国家重点实验室, 北京 100085

收稿日期: 2009-12-28 修回日期: 2010-03-26 录用日期: 2010-05-04

摘要: 考察了含有土霉素制药废水的污水处理厂排在冬季和夏季对受纳河流中四环素抗药基因及微生物群落结构的影响. 利用 PCR 方法, 对该河流中 16 种四环素抗药基因 (TRGs) 进行了检测, 其中 6 种在排放口及下游被检出. 通过 Real-time PCR 对其中的 3 种抗药基因 (*tet*(L)、*tet*(W) 和 *tet*(X)) 及总细菌的 16S rRNA 基因进行定量分析 (TRGs/16S rRNA 基因), 结果表明: *tet*(L)、*tet*(W) 和 *tet*(X) 与 16S rRNA 基因的比值在排放口和下游 ($3.34 \times 10^{-3} \sim 2.38 \times 10^{-1}$) 显著高于排放口上游 ($1.16 \times 10^{-5} \sim 2.38 \times 10^{-2}$), 表明污水排放造成了抗药基因的增加. 夏季河水中 TRGs/16S rRNA 基因明显低于冬季. 利用 PCR-DGGE 对不同河流沉积物中微生物群落结构进行了研究, 结果表明, 污水的排放显著改变了河流中的微生物群落结构, 一些代表性 TRGs 宿主细菌的条带在排放点和河流下游明显增加.

关键词: 制药废水; 四环素抗药基因; 微生物群落结构

文章编号: 0253-2468(2010)08-1551-07 中图分类号: X522 文献标识码: A

Changes of tetracycline resistance genes and microbial community structure in a river receiving pharmaceutical production wastewater

LIU Miaomiao, ZHANG Yu*, LI Dong, LI Kuixiao, GAO Yingxin, YANG Min

State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Research Center for Eco-Environmental Sciences, CAS, Beijing 100085

Received 28 December 2009; received in revised form 26 March 2010; accepted 4 May 2010

Abstract: Changes of tetracycline resistance genes and microbial community structure were investigated in a river receiving treated municipal wastewater containing oxytetracycline production waste streams. Among the sixteen tetracycline resistance genes (TRGs) studied, six TRGs were detected at the discharge site and downstream in the river. Real-time PCR results show that the abundance of three TRGs (*tet*(L), *tet*(W) and *tet*(X)) normalized to 16S rRNA genes (TRGs/16S rRNA genes) increased at the discharge site and downstream (from 3.34×10^{-3} to 2.38×10^{-1}), compared to the TRGs/16S rRNA genes in upriver samples (from 1.16×10^{-5} to 2.38×10^{-2}), which suggested that wastewater discharge affected the distribution of TRGs in the receiving river. The values of TRGs/16S rRNA genes in summer were lower than those in winter. At the same time, a remarkable change of the microbial community structures in the river sediments was found before and after wastewater discharge. According to PCR-DGGE analysis, bands of TRG host bacteria increased at both the discharge and downstream sites.

Keywords: pharmaceutical production wastewater; tetracycline resistance genes; microbial community structure

1 引言 (Introduction)

环境中抗生素、抗药菌及抗药基因的存在已经引起人们的广泛关注. 抗生素在环境中的存在能引起抗药菌的大量出现, 而普通抗药菌携带的抗药基因可以通过水平转移传播到病原菌中. 因此, 抗药

基因被看作一种新型污染物 (Rysz et al., 2004), 引起了越来越多的关注.

在众多的抗生素中, 由于四环素类抗生素使用时间长, 应用面广, 并且很难生物降解 (Kim et al., 2005), 环境中出现了大量的抗药基因, 近年来被广泛关注. 目前已经发现和确定了 35 种四环素类抗药

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 20877085, 921064); “863” 专项 (No. 2009AA063901)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 20877085, 921064) and “863” Projects (No. 2009AA063901)

作者简介: 刘苗苗 (1986—), 女, E-mail: lmmhit@163.com; * 通讯作者 (责任作者), E-mail: zhangyu@rcees.ac.cn

Biography: LIU Miaomiao (1986—), female, E-mail: lmmhit@163.com; * Corresponding author, E-mail: zhangyu@rcees.ac.cn

基因(*tet*)和3种氧四环素抗药基因(*otr*).四环素抗药基因根据细菌抗性机理主要分为3种:编码外排泵蛋白的基因(*tet*(A)等);编码核糖体保护蛋白的基因(*tet*(M)等);编码一种改变抗生素结构的酶的基因(*tet*(X)等)(Aminov *et al.*, 2001).Pruden 等(2006)调查了四环素和磺胺类药物的抗药基因在河流沉积物、牛奶场氧化塘、再生水出水和饮用水厂的进出水中的存在情况,结果表明抗药基因的污染非常普遍,*tet*(O)、*tet*(W)甚至在饮用水厂进出水中被检出.四环素抗药基因在猪场废水、猪场附近的河流和地下水 中都被检测到(Chee-Sanford *et al.*, 2001; Pei *et al.*, 2006; Mackie *et al.*, 2006),表明畜牧养殖等农业活动会给环境带来抗药基因的污染.城市污水处理厂抗药基因的研究表明,污水厂的进出水、活性污泥和浓缩污泥中都检出了四环素抗药基因,表明污水处理厂可能也是抗药基因的一个环境容纳库(Auerbach *et al.*, 2007).另一方面,抗生素生产废水也是抗生素、抗药菌和抗药基因进入环境的另一个重要途径,本课题组的前期工作表明,土霉素生产废水经过污水处理厂处理排放后,受纳河流仍然含有高浓度的土霉素污染(Li *et al.*, 2008).但是,土霉素废水的受纳河流中抗药基因的污染状况有待进一步研究.

在前期工作的基础上,本文选择北方某城市的抗生素生产废水受纳河流(MX河)作为研究对象.含土霉素生产废水的制药废水经过企业内部的污水处理厂处理之后进入该河流,然后河水与城市污水一起进入 QD 城市污水处理厂,处理之后再次排放到该受纳水体.本试验利用 PCR 和实时定量 PCR (Real-time PCR)考察了不同季节上游、制药废水和城市污水排放口和下游河流中典型四环素抗药基因的存在和变化,并利用聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)研究了污水排放对河流沉积物中微生物群落结构的影响.

2 材料方法 (Materials and methods)

2.1 样品采集

本试验的采样点设置在 MX 河企业废水排放口的上游、企业废水排放口 (Industrial Wastewater, 简称 IW)、QD 城市污水厂排放口 (简称 MWTP)、MWTP 下游 1km(下游 1)、下游 3km(下游 2)处(如图 1).于 2008 年冬季(12 月)和 2009 年夏季(7 月)在各取样点分别采集了河水水样 2L,河流沉积物样品 1kg.样品于 4℃ 冰盒中保存并带回实验室,于 4℃ 冷库中保存,并在两天内完成预处理.

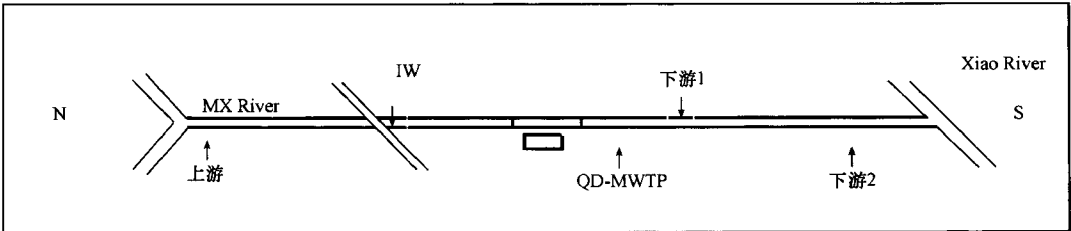


图 1 河流采样点设置示意图
Fig. 1 Map of the river sampling sites

测定了河流水样的常规物理化学指标,包括温度、pH 值、DO、COD_{Mn}、氨氮、总氮(国家环保局《水和废水监测分析方法》编委会, 2002.).河水的物理化学指标如表 1 所示.

表 1 冬季和夏季河水的物理化学指标

Table 1 Physical and chemical indexes of the river water in winter and summer												
采样点	温度/℃		pH 值		DO/(mg·L ⁻¹)		COD/(mg·L ⁻¹)		NH ₄ ⁺ -N/(mg·L ⁻¹)		TN/(mg·L ⁻¹)	
	冬季	夏季	冬季	夏季	冬季	夏季	冬季	夏季	冬季	夏季	冬季	夏季
上游	16	30	8.05	-	6.38	6.00	21.26	17.70	0.69	0.53	6.26	9.44
IW	16	30	7.96	7.74	4.26	3.73	20.33	159.40	1.25	16.84	6.12	36.86
MWTP	16	30	7.98	8.01	6.19	5.81	75.85	35.80	69.70	44.30	75.67	49.72
下游 1	16	30	7.63	8.33	7.03	6.55	160.51	41.10	60.86	20.67	68.56	95.70
下游 2	16	30	7.55	8.38	7.06	6.15	173.91	38.00	64.89	19.99	68.24	90.60

通过 SPE (Ben *et al.*, 2008) 和 LC-MS (Hamscher *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2008) 的方法, 测定了各取样点夏季河水中土霉素及其 3 种主要降解产物 (4-Epi-OTC、 α -Apo-OTC、 β -Apo-OTC) 的浓度. 夏季上游河水中 4 种物质的浓度之和为 $0.025 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 排放口及下游河水中 4 种物质浓度之和的范围是 $(0.231 \sim 0.293) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 表明经过废水排放, 排放口及下游河流中土霉素及其降解产物的浓度显著增高, 并接近或高于目前报道的 OTC 的最低抑制浓度 (MIC_{50} , 约 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) (Halling-Sørensen, *et al.*, 2002).

2.2 PCR

取各采样点的 10 mL 水样, 以 $0.22 \mu\text{m}$ 的聚碳酸酯膜过滤, 收集河水中的生物样品, 于 -80°C 保存. 取各采样点的沉积物样品 0.5 g , -20°C 保存. 聚碳酸酯滤膜上的生物样品和河流沉积物样品 (0.25 g) 分别通过蛋白酶 K 法 (SEI *et al.*, 2000) 和土壤 DNA 提取试剂盒 (MP Biomedicals, LLC) 提取 DNA.

对 16 种四环素抗药基因进行 PCR 检测, 包括 *tet*(A), *tet*(B), *tet*(D), *tet*(E), *tet*(G), *tet*(K), *tet*(L), *tet*(M), *tet*(O), *tet*(Q), *tet*(T), *tet*(W), *tet*(X), *tet*(Z), *tet*(B(P)), *otr* C. 反应体系含有 $2.5 \mu\text{L}$ $10 \times$ Buffer, $2 \mu\text{L}$ dNTP, $0.5 \mu\text{L}$ ($20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的上下游引物, $0.125 \mu\text{L}$ *ex Taq* 酶 (上海生工公司), $1 \mu\text{L}$ 样品; 加灭菌超纯水至 $25 \mu\text{L}$. 反应程序如下: 94°C 预变性 7 min; 94°C 变性 45 s, 退火 45 s, 72°C 延伸 1 min 循环 35 次; 72°C 延伸 10 min. 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检验扩增结果. 不同 TRGs 的退火温度参考文献 (Aminov *et al.*, 2001, 2002; Kim *et al.*, 2004), 并经过预实验确定.

2.3 Real-Time PCR

使用 ABI-7300 定量 PCR 仪, 通过 Sybr-Green 的方法对各取样点的河水及沉积物中的 3 种抗药基因 (*tet*(L)、*tet*(W) 和 *tet*(X) 和总细菌 (16S rRNA 基因) 进行了拷贝数的定量分析. $25 \mu\text{L}$ 反应体系: $12.5 \mu\text{L}$ SYBR Premix Ex Taq ($2 \times$), $0.5 \mu\text{L}$ Rox Reference Dye ($50 \times$) (Takara 公司), $0.25 \mu\text{L}$ $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的上下游引物 (同普通 PCR), $1 \mu\text{L}$ DNA 模板. *tet*(L)、*tet*(W) 和 *tet*(X) 的反应程序相同: 95°C 30 s; 45 个循环的 95°C 10 s, 60°C 15 s (Pei *et al.*, 2006; Koike *et al.*, 2007), 72°C 延伸 15 s, 并于 $80 \sim 83^\circ\text{C}$ 26 s 收集荧光信号, 以减少引物二聚体的干扰; 溶解程序为: 95°C 15 s, 60°C 1 min, 95°C

15 s, 60°C 15 s.

通过对 PCR 产物进行克隆, 并测序, 得到带有 *tet*(L)、*tet*(W) 和 *tet*(X) 特征片段的单菌落, 用质粒提取试剂盒 (天根, 普通质粒小提试剂盒, 离心柱型) 提取其中的质粒 DNA. 核酸蛋白测定仪 (NanoDrop 1000, 美国) 测定质粒 DNA 的浓度. 质粒 DNA 梯度稀释至 10^{-1} 倍到 10^{-8} 作为定量 PCR 标准曲线的模板.

按照上述反应体系和反应条件, 标准样品和实际样品同时进行测定, 所有样品至少进行两次平行测定.

2.4 PCR-DGGE

利用对应大肠杆菌 16S rRNA 序列 V3 区 341 和 534 位点的通用引物 341F 和 534R 对各取样点河流沉积物的 DNA 样品进行 PCR 扩增, 其中 341F 的 5' 端添加了一个 40 bp 长度的 GC 夹 ($5' \text{-CGCCCGC-CGCGCGCGCGCGGGCGGGCGGGGACCGGGGG-}$) (Muyzer *et al.*, 1993). Touchdown 方法被用来进行 PCR 扩增, 具体反应程序如下: 95°C 10 min, 95°C 1 min, 65°C 45 s (每循环降低 0.5°C), 72°C 1 min 循环 20 次, 95°C 1 min, 55°C 45 s, 72°C 1 min 循环 10 次, 最后 72°C 延伸 5 min. 扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳确认.

约 $30 \mu\text{L}$ 的 PCR 产物加入 10% ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的聚丙烯酰胺凝胶中 (聚丙烯酰胺: 双丙烯酰胺 = 37.5:1 摩尔比), 变性梯度凝胶中, 变性剂的梯度范围为 40% 到 60%, 在 $0.5 \times$ Tris-乙酸-EDTA (TAE) 缓冲液中进行 DGGE (Bio Rad, 美国). 电泳时电压为 180 V, 温度为 60°C , 时间为 6 h. 凝胶用 EB 染色 30 min 后, 在紫外下成像 (科创百方, KCB10-2800). 通过 Quantity One 软件对 DGGE 的条带进行分析, 并利用 UPGMA 方法对各个样品进行聚类分析. 同时对各样品中的代表性条带进行切胶. 切胶条带中加入 $20 \sim 40 \mu\text{L}$ TE 缓冲液, -20°C 冷冻过夜, 冻融之后作为模板进行 PCR 扩增, 引物为 341F 和 534R. 经 1% 琼脂糖凝胶电泳确认过的 PCR 产物进行克隆, 挑取阳性克隆子送至奥科公司测序. 测序结果在 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) 上进行序列同源性检索比对.

3 结果 (Results)

3.1 抗药基因的 PCR 检测结果

首先利用 PCR 扩增对 2008 年 12 月采集的河

流中 3 种不同抗药机制的 16 种四环素抗药基因进行了筛选,结果如表 2 所示. 在制药废水 (IW) 排放口和城市污水处理厂 (MWTP) 排放口分别检出了 6 种 (*tet*(K), *tet*(L), *tet*(M), *tet*(Q), *tet*(W) 和 *tet*(X) 和 3 种 (*tet*(K), *tet*(Q), *tet*(W) 四环素抗药基因. 下游的两个采样点也检出了上述 6 种抗药基因. 相对于排放口上游河水, 含制药废水的污水排放造成了河流中抗药基因的出现或增加. 而这些被检测

到的基因在下游距排放口不同距离河流中依然存在. PCR 检测为阳性的基因扩增片段经过克隆测序后与 Genebank 进行比对, 扩增片段被确认为目标基因, 并作为后续 Real-time PCR 的标准样品. 需要指出的是, 由于普通 PCR 的灵敏度有限, 可能会出现假阴性的结果, 还需要通过 3.2 节中的 Real-time PCR 的方法将对已检测到的具有代表性的几种抗药基因进行拷贝数的定量分析.

表 2 四环素抗药基因的 PCR 检测结果
Table 2 Results of PCR detection for 16 TRGs

采样点	<i>tet</i> (A)	<i>tet</i> (B)	<i>tet</i> (D)	<i>tet</i> (E)	<i>tet</i> (G)	<i>tet</i> (K)	<i>tet</i> (L)	<i>tet</i> (M)	<i>tet</i> (O)	<i>tet</i> (Q)	<i>tet</i> (T)	<i>tet</i> (W)	<i>tet</i> (X)	<i>tet</i> (Z)	<i>tet</i> (B(p))	Otr C
上游	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IW	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
MWTP	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
下游 1	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
下游 2	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-

注: ‘+’代表 PCR 结果为阳性; ‘-’代表 PCR 结果为阴性.

3.2 3 种抗药基因的定量结果

四环素抗药基因根据细菌抗药机理主要分为 3 类. 已有的研究表明: *tet*(L) 是外排泵机制, *tet*(W) 是核糖体保护蛋白机制, 而 *tet*(X) 是酶抑制机制 (Roberts, 2005). *tet*(L)、*tet*(W) 在各种环境中被检

测到的频率较高 (Peak *et al.*, 2007), 关于 *tet*(X) 的研究虽然不多, 但在本工作排放口和下游的多数样品中都被检测到; 它们代表了酶抑制机制, 因此选择这 3 种基因作为代表进行拷贝数的定量分析.

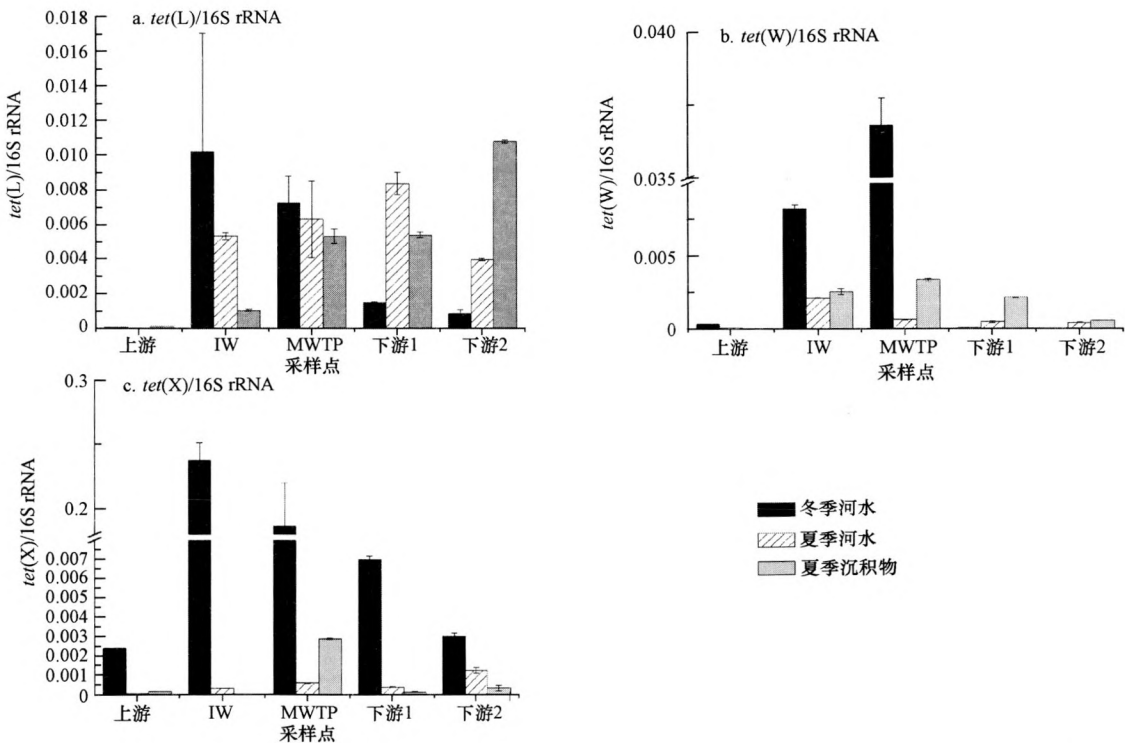


图 2 冬季和夏季各取样点的河水和河流沉积物中 3 种抗药基因 (a. *tet*(L); b. *tet*(W); c. *tet*(X)) 相对于 16S rRNA 基因的丰度
Fig. 2 Abundance of TRGs (a. *tet*(L); b. *tet*(W); c. *tet*(X)) normalized to 16s rRNA genes in water and sediment samples in winter and summer

为了考察含制药废水的污水排放对河流中抗药基因的影响,对冬季河水、夏季河水和沉积物中的上述 3 种 TRGs 与 16S rRNA 基因的比例进行了比较(图 2).在排放口上游的河水及沉积物中,3 种抗药基因相对于 16S rRNA 基因的丰度都显著低于排放口和下游河流.上游的冬季河水、夏季河水、夏季沉积物中 TRGs/16S rRNA 基因的范围分别为 $6.08 \times 10^{-5} \sim 2.38 \times 10^{-2}$, $1.16 \times 10^{-5} \sim 5.01 \times 10^{-4}$, $1.48 \times 10^{-5} \sim 1.48 \times 10^{-3}$;而在 IW 和 MWTP 的排放口,冬季河水、夏季河水、夏季沉积物中 TRGs/16S rRNA 基因的范围分别为 $7.24 \times 10^{-3} \sim 2.38 \times 10^{-1}$, $8.37 \times 10^{-3} \sim 5.04 \times 10^{-2}$, $3.34 \times 10^{-3} \sim 2.88 \times 10^{-2}$.与上游相比,IW 和 MWTP 排放口的抗药基因增加了 10~1000 倍,表明废水排放可能增加环境中抗药基因的数量.排放口和下游河流的沉积物中,抗药基因明显高于上游;Engemann *et al.* (2008) 研究表明,抗药基因可能通过水平转移(Horizontal Gene Transfer),或者通过抗药菌的吸附沉积转移到生物膜上,这与本文的结果一致.此外,下游的河水主要用于农田灌溉,农田灌溉后抗药菌和抗药基因的命运值得关注.

至今为止,已有不少关于环境中四环素抗药基因丰度的报道(Peak *et al.*, 2007; Pei *et al.*, 2006).Pei 等(2006)的研究表明,Cache La Poudre 河流中, $tet(W)/16S$ rRNA 基因的数量在 $8.0 \times 10^{-8} \sim 8.0 \times 10^{-7}$.Peak 等(2007)发现,在低浓度($0.83 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)、中浓度($2.3 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)和高浓度($8.8 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)四环素污染的饲养场氧化塘中, $tet(L)/16S$ rRNA 基因分别为 5.0×10^{-7} 、 5.0×10^{-6} 、

1.0×10^{-5} , $tet(W)/16S$ rRNA 基因分别为 3.0×10^{-5} 、 5.0×10^{-4} 、 8.0×10^{-4} .本文中排放口及下游河流中 $tet(L)/16S$ rRNA 基因为 $1.36 \times 10^{-3} \sim 8.37 \times 10^{-3}$, $tet(W)/16S$ rRNA 基因值为 $1.72 \times 10^{-5} \sim 4.79 \times 10^{-5}$,甚至高于上述饲养场氧化塘中的丰度,这可能与河水含有较高含量 OTC 有关.同时,关于 $tet(X)$ 的定性检测和定量分析目前文献中还鲜有报道,本研究中 $tet(X)$ 在多数取样点都被检出,而且相对丰度较高,值得关注.

通过夏季和冬季的比较,考察了季节对河流中抗药基因的影响.图 2 表明除了下游河流的 $tet(L)$ 和 $tet(W)$ 之外,冬季河水中的 TRGs/16S rRNA 基因的丰度均明显高于夏季,可能与土霉素浓度、环境条件、基因类型等因素有关.Peark *et al.* (2007) 曾报道不同季节抗药基因的数量和变化有显著差别:存在四环素污染的条件下,饲养场氧化塘中 6 种四环素抗药基因相对于 16S rRNA 基因的丰度在秋季比夏季高出 10~100 倍,而无四环素污染的情况下,秋季和夏季变化不大.

3.4 PCR-DGGE 对河流沉积物细菌群落结构的解析

为考查污水排放对河流微生物群落结构的影响,本文利用 PCR-DGGE 对河流不同采样点沉积物中的细菌群落结构变化进行了分析.利用聚类分析绘制的相似性树状图(图 3b)可以看出:和上游相比,排放口及下游河流沉积物中的微生物群落结构变化显著;下游和排放口之间具有相似性,表明废水排放对下游河流中的微生物群落结构产生影响;而下游 2 沉积物中的群落结构与上游最为相似,表

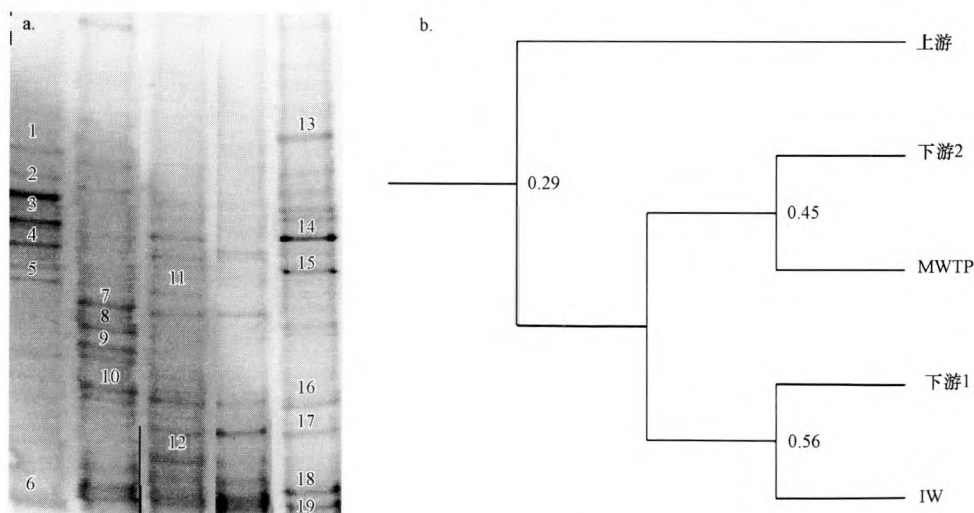


图 3 DGGE 条带(a)及相似性分析(b)的结果

Fig. 3 Results of DGGE(a) and similarity analysis(b)

表 3 DGGE 主要条带测序结果及同源性分析
Table 3 Sequencing results of DGGE

条带存在样品	条带号	比对结果	相似性
上游	1	Uncultured gamma proteobacterium	94%
上游	2	Uncultured Comamonadaceae bacterium	94%
上游	3	Uncultured Acidobacteria bacterium	93%
上游、下游 1、	4	Acinetobacter	100%
上游	5	Erythromicrobium ramosum	100%
上游	6	Exiguobacterium	99%
IW、MWTP、下游 1、	7	Uncultured Actinobacteria bacterium	99%
IW	8	Uncultured Firmicutes bacterium	99%
IW	9	Uncultured OP8 bacterium	100%
IW	10	Ralstonia	98%
MWTP	11	Clostridium	100%
MWTP	12	Prauserella	96%
下游 2	13	Clostridium	100%
MWTP、下游 2	14	Uncultured Acidobacteria bacterium	93%
下游 2	15	Uncultured bacterium gene	99%
MWTP、下游 1、下游 2	16	Uncultured Clostridium	99%
MWTP、下游 1、下游 2	17	C. sticklandii small subunit ribosomal RNA	100%
IW、MWTP、下游 2	18	Uncultured Peptostreptococcaceae bacterium	99%
IW、MWTP、下游 1、下游 2	19	Thioclava	99%

明经过河流的自净作用,河流的生态环境得到了一定程度的恢复.对 DGGE 谱图(图 3a)中 19 个主要条带进行了切胶测序,结果如表 3 所示.

在河流的上游沉积物中,1~6 号条带分别与未培养 γ 变形菌(*Uncultured gamma proteobacterium*)、丛毛单胞菌(*Uncultured Comamonadaceae bacterium*)、酸杆菌(*Uncultured Acidobacteria bacterium*)、不动杆菌(*Acinetobacter*)、赤单胞菌(*Erythromicrobium*)、微小杆菌(*Exiguobacterium*)相似.除了 4 号条带在下游 1km 处出现,其它条带在排放口和下游均消失.

在 IW 排放口,出现了上游基本不存在的未培养放线菌(*Uncultured Actinobacteria*)、厚壁菌(*Uncultured Firmicutes bacterium*)、青枯菌(*Ralstonia*)(分别对应 7~10 号条带)和梭菌(*Clostridium*)、消化链球菌(*Uncultured Peptostreptococcaceae bacterium*)、硫球形菌(*Thioclava*)(分别对应 16、18、19 号条带),表明企业废水排放对河流沉积物中的微生物群落造成了显著的影响.其中 16、18 和 19 号条带在 MWTP 排放口和下游 1km、3km 持续出现,7 号条带在下游 3km 处才消失,表明企业废水排放对沉积物中微生物造成的影响比较持久.在 MWTP 排放口,出现了 11、12、14、17 号条带,分别与梭菌属(*Clostridium*)、

假诺卡氏菌属(*Prauserella*)、酸杆菌、斯氏梭菌(*C. sticklandii*)相对应,而在 IW 排放口出现的 8~10 号条带变暗,表明这些微生物相对丰度可能变少.

在下游 1km 和 3km 处,与 MWTP 排放口一致的有 4、7、14、16~19 号条带对应的不动杆菌、放线菌、酸杆菌、梭菌、消化链球菌和硫球形菌,表明该城市污水的排放对下游河流中微生物群落结构的影响很大.

企业废水和城市污水厂的成分都比较复杂,因此影响微生物群落结构的因素较多.但是,从上述实验结果中可以看出含较高浓度残留抗生素废水的排放可能对微生物群落结构造成了一定的影响.在 Roberts(2005)列举的四环素抗药基因的宿主中,就包括了本研究中发现的不动杆菌、放线菌、青枯菌和梭菌(分别对应着条带 4、7、10、11、13、16、18),其中除了 4 号条带出现在上游和下游 1 中之外,其它条带都出现在排放口和下游样品中.

4 结论(Conclusions)

- 1)含有土霉素的污水排放使得受纳河流的河水和沉积物中四环素抗药基因相对丰度与上游相比明显增加.
- 2)废水排放后的河流沉积物中的微生物群落

结构发生改变,一些与 TRGs 宿主细菌相对应的条带(如不动杆菌、放线菌、青枯菌和梭菌)在排放点和河流下游明显增加。

致谢:感谢中国科学院生态环境研究中心的张海峰、丁然和沈菊培博士在样品采集、分析测试和论文修改中的贡献。

责任作者简介:张昱(1973—),女,博士,副研究员。主要研究方向为水处理中微生物原理与水质安全保障技术研究,主持“863”、国家自然科学基金等项目。

参考文献(References):

- Aminov R I, Garrigues-Jeanjean N, Mackie R I. 2001. Molecular ecology of tetracycline resistance: Development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1):22—32
- Aminov R I, Chee-Sanford J C, Garrigues N, *et al.* 2002. Development, validation, and application of PCR primers for detection of tetracycline efflux genes of gram-negative Bacteria [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4):1786—1793
- Auerbach E A, Seyfried E E, McMahon K D. 2007. Tetracycline resistance genes in activated sludge wastewater treatment plants [J]. *Water Research*, 41:1143 — 1151
- Ben W W, Qiang Z M, Adams C, *et al.* 2008. Simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines and tiamulin in swine wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 1202(2): 173—180
- Chee-Sanford J C, Aminov R I, Krapac I J, *et al.* 2001. Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4):1494—1502
- Engemann C A, Adams L, Knapp C W, *et al.* 2006. Disappearance of oxytetracycline resistance genes in aquatic systems [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 263:176—182
- Engemann C A, Keen P L, Knapp C W, *et al.* 2008. Fate of tetracycline resistance genes in aquatic systems: Migration from the water column to peripheral biofilms [J]. *Environmental Sciences and Technology*, 42:5131—5136
- 国家环保局《水和废水监测分析方法》编委会. 2002. 水和废水监测分析方法(第4版) [M]. 北京:中国环境科学出版社
- State Environmental Protection Administration of China. 2002. Monitoring and analysis methods of water and wastewater (4th edition) [M]. Beijing: China Environmental Science Press (in Chinese)
- Halling-Sørensen B, Sengeløv G, Tjørnelund J. 2002. Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria including selected tetracycline resistant bacteria [J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 42:263—271
- Hamscher G, Sczesny S, Hoper H, *et al.* 2002. Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Analytical Chemistry*, 74: 1509—1518
- Kim S, Eichhorn P, Jensen J N, *et al.* 2005. Removal of antibiotics in wastewater: Effect of hydraulic and solid retention times on the fate of tetracycline in the activated sludge process [J]. *Environmental Science and Technology*, 39:5816—5823
- Kim S R, Nonaka L, Suzuki S, *et al.* 2004. Occurrence of tetracycline resistance genes *tet* (M) and *tet* (S) in bacteria from marine aquaculture sites [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 237:147—156
- Koike S, Krapac I G, Oliver H D, *et al.* 2007. Monitoring and source tracking of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater adjacent to swine production facilities over a 3-Year Period [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 73:4813—4823
- Li D, Yang M, Hu J Y, *et al.* 2008. Determination and fate of oxytetracycline and related compounds in oxytetracycline production wastewater and the receiving river [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(1):80—86
- Li D, Yang M, Hu J Y, *et al.* 2009. Antibiotic-resistance profile in environmental bacteria isolated from penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river [J]. *Environmental Microbiology*, 11(6):1506—1517
- Mackie R I, Koike S, Krapac I, *et al.* 2006. Tetracycline residues and tetracycline resistance genes in groundwater impacted by swine production facilities [J]. *Animal Biotechnology*, 17:157—176
- Muyzer G, Waal E C, Uitterlinden A G, *et al.* 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction genes coding for 16S rRNA [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 695—700
- Peak N, Knapp C W, Richard K Y, *et al.* 2007. Abundance of six tetracycline resistance genes in wastewater lagoons at cattle feedlots with different antibiotic use strategies [J]. *Environmental Microbiology*, 9(1):143—151
- Pei R, Kim S C, Carlson K H, *et al.* 2006. Effect of river landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG) [J]. *Water Research*, 40: 2427—2435
- Pruden A, Pei R, Storteboom H, *et al.* 2006. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: Studies in Northern Colorado [J]. *Environmental Science and Technology*, 40:7445—7450
- Roberts M C. 1996. Tetracycline resistance determinants: Mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 19(1):1—24
- Roberts M C. 2005. Update on acquired tetracycline resistance genes [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 245:195—203
- Sei K, Asano K, Tateishi N, *et al.* 2000. Development of simple methods of DNA extraction from environmental samples for monitoring microbial community based on PCR [J]. *Water Treatment Biology*, 36:193—204
- Smith M S, Yang R K, Knapp C W, *et al.* 2004. Quantification of tetracycline resistance genes in feedlot lagoons by real-time PCR [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:7372—7377