

刘 锐. 屠宰废水中抗生素抗性基因在废水处理各工艺中去除与累积效果的研究[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(23): 292-295.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.23.079

屠宰废水中抗生素抗性基因在废水处理各工艺中去除与累积效果的研究

刘 锐

(嘉兴职业技术学院, 浙江嘉兴 314036)

摘要:为探讨屠宰废水中抗生素抗性基因去除最佳处理工艺,采用荧光定量(PCR)技术检测屠宰废水处理工程各个环节中 *sul1*、*sul2*、*tetA*、*tetB* 和 *tetC* 等 5 种抗生素抗性基因绝对含量和相对丰度。结果表明,厌氧处理工艺和氧化塘工艺可以通过减少微生物量降低抗生素抗性基因的绝对含量,但也可以导致部分抗生素抗性基因相对丰度上升,而表面流人工湿地对于屠宰废水中抗生素抗性基因有有效的处理效果。

关键词:屠宰废水;抗生素抗性基因;PCR;表面流人工湿地

中图分类号: X703 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)23-0292-04

伴随着抗生素在养殖业和医疗业的大量使用,抗生素抗性基因(antibiotic resistance genes, ARGs)污染逐渐被人们重视。近年来我国浙江^[1]、上海^[2]、广东^[3-5]、河北^[6]等多个地区均有报道存在不同程度的抗生素抗性基因污染。尽管国内外对于抗生素抗性基因转移、去除开展了大量研究,但多局限于实验室内模拟阶段,工程实践方面报道较少,尤其对于抗生素抗性基因含量高于生活污水且低于养殖废水的屠宰废水,在污水处理工程中去除和累积情况未见报道。为此深入研究屠宰废水中抗生素抗性基因在污水处理各工艺中去除与累积效果,对于优化废水处理工艺和控制抗生素抗性基因污染具有重要意义。

本研究以 2 种磺胺类抗性基因(*sul1*、*sul2*)和 3 种四环素

类抗性基因(*tetA*、*tetB* 和 *tetC*)为研究对象,研究了其在屠宰废水处理工程中各个环节的绝对含量和相对丰度变化情况,以期寻找最佳的抗生素抗性基因处理工艺,为相关企业单位优化设计污水处理工艺提供理论依据,为浙江省“五水共治”提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 水样来源

水样样品来源于浙江中法农业科技发展有限公司屠宰废水处理工程,其工程按流程包括 3 000 m³ 厌氧沼气池、3 600 m³ 潜流人工湿地、3 600 m³ 氧化塘和 18 hm² 表面流人工湿地等 4 个主要处理环节。按照废水处理流程选取了屠宰废水原水(即厌氧沼气池入水,采样点编号 W1)、厌氧沼气池出水(即潜流人工湿地入水,采样点编号 W2)、潜流人工湿地出水(即氧化塘入水,采样点编号 W3)、氧化塘出水(即表面流人工湿地入水,采样点编号 W4)、表面流人工湿地出水(即工程最终出水,采样点编号 W5)等 5 个采样点,样品常温采集,保存于 4 ℃ 环境,采样时间为 2014 年 6 月至 2016 年 5

收稿日期:2016-07-13

基金项目:国家科技支撑计划(编号:2013BAD21B04)。

作者简介:刘 锐(1977—),男,河北魏县人,硕士,副教授,主要从事生态养殖及动物性食品安全方向研究。E-mail: liuzywj@163.com。

甾烯酮促进剂的筛选[J]. 化学与生物工程, 2013, 30(12): 55-58.

[12] 高兴强,冯建勋,花 强,等. 油水乳化体系中分枝杆菌转化植物甾醇产 9 α -羟基甾烯酮工艺研究[J]. 华东理工大学学报(自然科学版), 2014, 40(4): 433-437.

[13] Xu X W, Gao X Q, Feng J X, et al. Influence of temperature on nucleus degradation of 4-androstene-3,17-dione in phytosterol biotransformation by *Mycobacterium* sp. [J]. Letters in Applied Microbiology, 2015, 61(1): 63-68.

[14] 徐阳光,范雅敏,罗 兰,等. 分枝杆菌降解甾醇侧链中底物及其增溶剂的研究[J]. 化学反应工程与工艺, 2015, 31(5): 423-429.

[15] 李 楠,熊 彬,张云开,等. *L*-苯丙氨酸解氨酶产生菌分离及酶促反应研究[J]. 食品科学, 2005, 26(12): 74-77.

[16] 张成刚,王凤清,魏东芝. 分枝杆菌 *Mycobacterium Neoaurum* NwIB-013-甾酮- Δ^1 -脱氢酶基因的克隆表达[J]. 化学与生物工程, 2011, 28(7): 39-43.

[17] Xie R L, Shen Y B, Ning Q, et al. Genetic differences in *ksdD* influence on the ADD/AD ratio of *Mycobacterium neoaurum* [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2015, 42(4): 507-513.

[18] Yeh C H, Kuo Y S, Chang C M, et al. Deletion of the gene encoding the reductase component of 3-ketosteroid 9 α -hydroxylase in *Rhodococcus equi* USA-18 disrupts sterol catabolism, leading to the accumulation of 3-oxo-23,24-bisnorchole-1,4-dien-22-oic acid and 1,4-androstadiene-3,17-dione [J]. Microbial Cell Factories, 2014, 13(1): 130.

[19] 姚 笛,王 颖,王长远,等. 紫外诱变季也蒙毕赤酵母原生质体筛选木糖醇高产菌株[J]. 中国生物制品学杂志, 2015, 28(8): 861-865.

[20] 胡基华,陈静宇,曹 旭,等. 高产几丁质酶的粘质沙雷氏菌株的诱变选育[J]. 东北林业大学学报, 2016, 44(3): 106-109.

月,每月下旬采样1次。

1.2 实验试剂

Taq DNA 聚合酶、10 × PCR Buffer、MgCl₂、dNTP、DNA Marker、6 × DNA Loading Dye、10 × TAE、土壤基因组 DNA 快速抽提试剂盒、溴化乙锭、柱式 DNA 胶回收试剂盒、一步法快速感受态细胞制备试剂盒、SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒,以上均购于生工生物工程(上海)股份有限公司。pMD[®] 18-T Vector,购于宝生物工程(大连)有限公司。引物合成于生工生物工程(上海)股份有限公司,序列^[1]为:*sul1*-F: CACCGGAAACATCGCTGCA, *sul1*-R: AAGTTCGCCGCGAA GGCT, *sul2*-F: CTCGATGGAGGCCGGTAT, *sul2*-R: GGGA ATGCCATCTGCCCTTGA, *tetA*-F: GCTACATCCTGCTTGCCTTC, *tetA*-R: CATAGATCGCCGTGAAGAGG, *tetB*-F: CGAAGTAGG GGTGAGACGC, *tetB*-R: AGACCAAGACCCGCTAATGAA, *tetC*-F: TGCCTTGATGCAATTTCTATGC, *tetC*-R: GGAATGGT GCATGCAAGGAG, 16S rRNA-338F: ACTCCTACGGGAGGCA GCAG, 16S rRNA-518R: ATTACCGCGCTGCTGG。

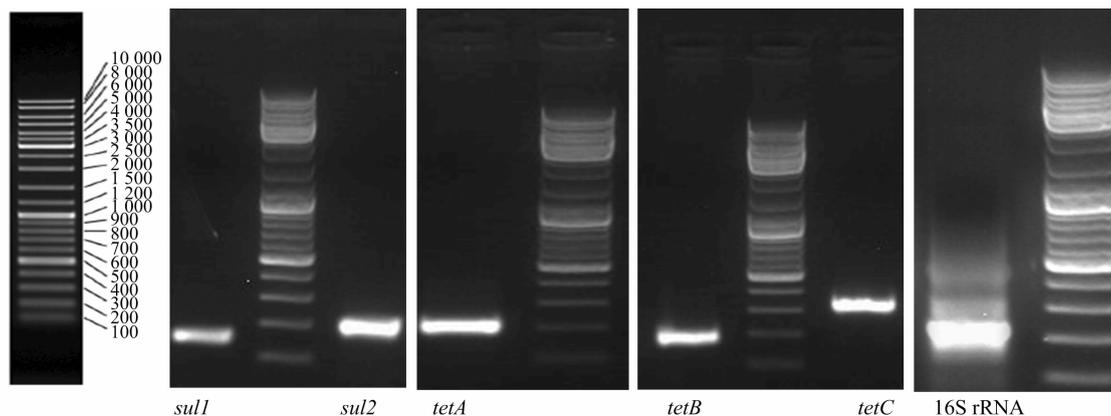


图1 PCR产物电泳图

1.4.2.3 PCR回收 依照柱式DNA胶回收试剂盒说明操作。

1.4.2.4 克隆测序 连接反应10 μL: Solution 5 μL, pMD[®] 18-T Vector 10 ng, PCR Product 5 μL, 4 °C 过夜连接。连接产物转化依照一步法快速感受态细胞制备试剂盒说明操作。质粒提取依照 SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒说明操作。

1.4.2.5 定量质粒信息 构建好的质粒经测序鉴定无误后用紫外分光光度计测定质粒 $D_{260\text{nm}}$ 的值,通过公式换算成拷贝数(copies/μL)。10倍梯度稀释构建好的各质粒,90 μL 稀释液+10 μL 质粒,做4~6个点,通过预试验选取合适标准品用于制备标准曲线。

1.4.3 荧光定量PCR检测 反应体系见表1,PCR循环条件见表2。完成后,把加好样品的96/384孔板放在LightCycler480 Software Setup(Roche)中进行反应。

2 结果与分析

由表3可见,5种抗生素抗性基因 *sul1*、*sul2*、*txtA*、*txtB* 和 *txtC* 在屠宰场废水原水中均有检出,其平均绝对含量分别为 5.18×10^5 、 1.48×10^5 、 6.71×10^5 、 5.77×10^3 和 9.77×10^5 copies/L,5种抗生素抗性基因中 *sul1*、*sul2*、*txtA* 和 *txtC* 平均绝对含量较高,说明含有 *sul1*、*sul2*、*txtA* 和 *txtC* 基因的宿主菌较含有 *txtB* 基因的宿主菌对各种环境耐受力更强。本次屠

1.3 试验仪器

洁净工作台、稳压稳流电泳仪、高速冷冻离心机、凝胶成像系统、微型电泳槽、PCR反应扩增仪、紫外分光光度计、微量移液器、3730XL 测序仪、LightCycler480 Software Setup。

1.4 试验方法

1.4.1 DNA抽提 依照土壤基因组DNA快速抽提试剂盒说明书操作。

1.4.2 标准品制备

1.4.2.1 普通PCR PCR反应体系25 μL:模板DNA 0.5 μL,引物F(10 μmol/L)0.5 μL,引物R(10 μmol/L)0.5 μL,dNTP(10 mmol/L)0.5 μL,*Taq* Buffer(10 ×)2.5 μL, MgCl₂(25 mmol/L)2 μL,*Taq* DNA 聚合酶(5 U/μL)0.2 μL, H₂O 18.3 μL。反应条件为:预变性95 °C 3 min;变性94 °C 30 s,退火56 °C 30 s,延伸72 °C 30 s,修复延伸72 °C 8 min,循环数35。

1.4.2.2 PCR电泳 2%琼脂糖凝胶,1 × TAE,150 V,100 mA,20 min电泳观察(图1)。

表1 PCR反应体系

反应成分	浓度	体积(μL)
SybrGreen qPCR Master Mix	2 ×	10.0
引物 F	10 μmol/L	0.4
引物 R	10 μmol/L	0.4
ddH ₂ O		7.2
Template(DNA)		2.0
合计		20.0

表2 PCR反应条件

程序	温度(°C)	时间(s)
预变性	95	180
变性	95	15
退火	57	20
延伸	72	30
循环数	40	

宰废水抗性基因平均绝对含量与之前报道的养殖废水中含量^[7-11]相当,说明屠宰废水和养殖废水一样是抗生素抗性基因主要污染源之一。

2.1 厌氧处理对5种抗生素抗性基因的绝对含量和相对丰度的影响

从厌氧池进出水中可见,水质中 *sul1*、*sul2*、*txtA*、*txtB* 和

txtC 5种抗生素抗性基因平均绝对含量均有所下降(图2、表3),基于水量平衡计算可得5种抗生素抗性基因平均去除率分别为43.06%、28.35%、67.64%、31.65%和43.31%。但从5种抗生素抗性基因平均相对丰度分析(图3、表3),仅有*txtA*基因呈现下降趋势,*sul1*、*sul2*、*txtB*和*txtC*基因平均相对丰度呈现上升趋势,由此推断厌氧处理可以通过减少微生物

生物量降低抗生素抗性基因绝对含量,且对*txtA*基因有一定的处理效果,但厌氧处理可能对于*sul1*、*sul2*、*txtB*和*txtC*基因存在潜在的累积风险。厌氧处理过程中水力停留时间(SRT)、温度、pH值等工艺参数是否对于抗生素抗性基因降解和吸附产生影响,以及如何改善厌氧处理工艺流程提高对于*sul1*、*sul2*、*txtB*和*txtC*的去除效率有待进一步研究。

表3 废水处理各环节中5种抗生素抗性基因平均绝对含量和平均相对丰度变化情况

采样点	<i>sul1</i>		<i>sul2</i>		<i>txtA</i>		<i>txtB</i>		<i>txtC</i>	
	平均绝对含量 (copies/ μ L)	平均相对丰度	平均绝对含量 (copies/ μ L)	平均相对丰度						
W1	5.18×10^5	0.015 288	1.48×10^5	0.007 688	6.71×10^5	0.012 574	5.77×10^3	0.000 066 1	9.77×10^5	0.020 619
W2	2.95×10^5	0.030 456	1.06×10^5	0.014 548	2.17×10^5	0.008 553	3.94×10^3	0.000 356 0	5.54×10^5	0.024 284
W3	8.40×10^5	0.039 205	3.05×10^5	0.011 974	3.79×10^5	0.007 021	1.71×10^4	0.000 132 0	1.55×10^6	0.024 880
W4	1.88×10^5	0.085 714	2.49×10^5	0.093 805	6.81×10^4	0.010 507	2.48×10^2	0.000 048 9	4.92×10^4	0.012 260
W5	1.46×10^3	0.005 737	3.00×10^3	0.015 704	1.46×10^3	0.006 250	2.90×10^2	0.000 034 7	1.83×10^2	0.000 832

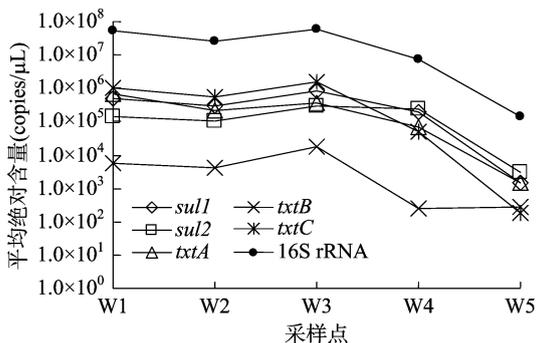


图2 废水处理各环节中5种抗生素抗性基因及16S rRNA平均绝对含量变化情况

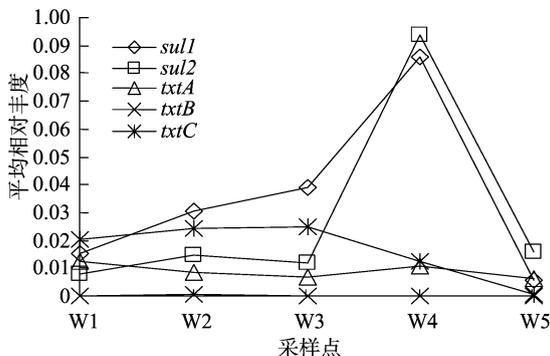


图3 废水处理各环节中5种抗生素抗性基因平均相对丰度变化情况

2.2 潜流人工湿地对5种抗生素抗性基因的绝对含量和相对丰度的影响

从潜流人工湿地进出水中可见,水质中*sul1*、*sul2*、*txtA*、*txtB*和*txtC*这5种抗生素抗性基因平均绝对含量均有所上升(图2、表3)。从基因平均相对丰度分析,*sul2*和*txtA*基因呈现下降趋势,*txtB*和*txtC*基因平均相对丰度没有明显变化,而*sul1*基因平均相对丰度呈现上升趋势(图3、表3)。上述结果说明,被测污水工程中潜流人工湿地对于*sul2*和*txtA*基因有一定去除效果,对于*sul1*、*txtB*和*txtC*基因没有明显去除能力,但由于潜流人工湿地运行引起微生物生物量增加,使得抗生素抗性基因的绝对含量呈现上升趋势。一般研究报道认为

潜流人工湿地可以有效降低抗生素抗性基因的绝对含量和相对含量^[10-11],但结论大多来源于实验室模拟条件和工程实例中污水含抗生素抗性基因含量较高的情况,本次针对污水处理工程中潜流人工湿地对抗生素抗性基因检测结果显示,其处理效果并不理想,在污水处理工程中是否存在湿地使用时间及其他工艺运行参数影响潜流人工湿地对抗生素抗性基因去除效果有待进一步研究。

2.3 氧化塘对5种抗生素抗性基因的绝对含量和相对丰度的影响

从氧化塘进出水中可见,水质中*sul1*、*sul2*、*txtA*、*txtB*和*txtC*这5种抗生素抗性基因平均绝对含量均有所下降(图2、表3),计算可得氧化塘对于5种抗生素抗性基因平均去除率分别为77.59%、18.34%、82.05%、98.55%和96.82%。但出水中仅*txtB*和*txtC*基因平均相对丰度呈现下降趋势,*sul1*、*sul2*和*txtA*这3种抗生素抗性基因平均相对丰度呈现上升趋势(图3、表3)。研究表明,氧化塘对于不同抗生素抗性基因相对丰度影响不一,joy等研究表明氧化塘可以有效降低*ermB*和*ermF*的丰度^[12],而Barkovskii等研究认为氧化塘处理可以降低*tetB*和*txtL*基因的相对丰度,但对*tetG*、*tetM*、*tetO*和*txtX*基因的相对丰度没有影响甚至有所提高,究其原因可能是这些基因常位于转移元件上,在处理过程中发生了基因的水平转移^[13]。本次检测结果说明,氧化塘可以通过减少微生物生物量降低抗生素抗性基因绝对含量,氧化塘工艺对于*txtB*和*txtC*基因去除效果较好,而对于*sul1*、*sul2*和*txtA*基因可能存在累积风险。

2.4 表面流人工湿地对5种抗生素抗性基因的绝对含量和相对丰度的影响

从表面流人工湿地进出水中可见,水质中*sul1*、*sul2*、*txtA*和*txtC*这4种抗生素抗性基因的平均绝对含量和平均相对丰度均呈现下降趋势,4种抗生素抗性基因平均去除率分别为99.23%、98.79%、97.86%和99.63%,但*txtB*基因的平均绝对含量和平均相对丰度均未发生明显变化(图2、图3、表3)。一般认为表面流人工湿地可以通过吸附、过滤、氧化、沉淀、微生物分解、转化、植物遮蔽等作用机理除去抗性基因^[10,14],本次检测结果证明了上述观点,但本次检测结果也表明表面流

人工湿地对于绝对含量相对较低的 *txtB* 基因去除效果不佳, 由于 *txtB* 基因在屠宰废水中含量不高, 因此屠宰废水处理工程实例中可以采用表面流人工湿地作为有效降低抗生素抗性基因含量的工艺流程。

3 结论与讨论

从本次研究结果分析, 目前, 浙江中法农业科技发展有限公司屠宰废水处理工程可以有效去除大部分抗生素抗性基因, 工程中不同的处理流程对于不同的抗生素抗性基因处理效果不同, 厌氧处理工艺和氧化塘工艺可以通过减少微生物生物量有效地降低抗生素抗性基因的绝对含量, 但可能存在某些抗生素抗性基因累积风险, 而表面流人工湿地对于屠宰废水中抗生素抗性基因的绝对含量和相对丰度有有效的处理效果。研究表明, 在传统生物污水处理工艺基础上增加消毒工艺、高级氧化工艺等深度处理工艺可以更有效地消减抗生素抗性基因含量^[15], 为此建议企业在现有基础上增加深度处理工艺。

目前, 我国对于污水中抗生素抗性基因排放并无要求, 但考虑到抗生素抗性基因对人类带来的风险, 建议在经济条件允许的条件下, 企业尽量选择对于抗生素抗性基因处理效果好的污水处理工艺, 以便应对抗生素抗性基因污染。同时, 国家相关部门应尽快制定养殖业中合理使用抗生素的标准并出台抗生素及抗生素抗性基因污染治理的政策和法规, 以便规范养殖业健康良性发展并改善我国现阶段污染状况。

鉴于污水工程是抗生素抗性基因转移和传递的重要污染源, 建议未来关于抗生素抗性基因研究重点放在: (1) 抗生素抗性基因环境传播机制; (2) 污水处理过程中抗生素浓度、重金属含量及微生物群落与抗生素抗性基因的关系; (3) 污水处理工艺参数对抗生素抗性基因去除和累积的影响。

嘉兴市是国家首批海绵城市建设试点城市, 建议地方各级有关部门提高对抗生素抗性基因污染治理的重视程度, 加大对于抗生素抗性基因治理应用性研究成果的推广力度, 以便实现海绵城市对污染物削减率目标, 更好地为浙江省“五水共治”提供经验和技术支持。

参考文献:

7[1] 刘锐. 嘉兴市抗生素抗性基因的污染现状调查[J]. 东北农

(上接第287页)

[15] 马丽红, 黄懿梅, 李学章, 等. 两种添加剂对牛粪堆肥中氮转化及相关微生物的影响[J]. 干旱地区农业研究, 2010, 28(1): 76-82.

[16] Morel J L, Colin F, Germon J C, et al. Methods for the evaluation of the maturity of municipal refuse compost[M]. London, UK: Elsevier Applied Science Publishers, 1985.

[17] Wang P, Changa C M, Watson M E, et al. Maturity indices for composted dairy and pig manures [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2004, 36(5): 767-776.

[18] 沈其荣, 王瑞宝, 王岩, 等. 堆肥制作中的生物化学变化特征[J]. 南京农业大学学报, 1997, 20(2): 51-57.

[19] Riffaldi R, Levi - Minizi R, Pera A, et al. Evaluation of compost maturity by means of chemical and microbial analyses[J]. Waste Manage Res, 1986, 4(1): 387-396.

业科学, 2016, 41(2): 109-112.

[2] 沈群辉, 冀秀玲, 傅淑珺, 等. 黄浦江水域抗生素及抗性基因污染初步研究[J]. 生态环境学报, 2012, 21(10): 1717-1723.

[3] 梁惜梅, 聂湘平, 施震. 珠江口典型水产养殖区抗生素抗性基因污染的初步研究[J]. 环境科学, 2013, 34(10): 4073-4080.

[4] 杨颖. 北江水环境中抗生素抗性基因污染分析[D]. 广州: 中山大学, 2010: 36-60.

[5] 张瑞泉, 应光国, 丁永祯, 等. 广东西枝江-东江流域抗生素抗性基因污染特征研究[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(12): 2471-2479.

[6] 徐艳, 张远, 郭昌胜, 等. 石家庄汪洋沟地区抗生素、抗性细菌和抗性基因污染特征[J]. 农业环境科学学报, 2014, 33(6): 1174-1182.

[7] 文汉卿, 史俊, 寻昊, 等. 抗生素抗性基因在水环境中的分布、传播扩散与去除研究进展[J]. 应用生态学报, 2015, 26(2): 625-635.

[8] 翟文超, 罗义, 赵静, 等. 抗生素抗性基因在典型行业和市政污水中的污染特征及消减研究进展[J]. 环境化学, 2014, 33(2): 206-216.

[9] 冀秀玲, 刘芳, 沈群辉, 等. 养殖场废水中磺胺类和四环素抗生素及其抗性基因的定量检测[J]. 生态环境学报, 2011, 20(5): 927-933.

[10] 郑加玉, 刘琳, 高大文, 等. 四环素抗性基因在人工湿地中的去除及累积[J]. 环境科学, 2013, 34(8): 3102-3107.

[11] 张子扬, 刘舒巍, 张璐. 人工湿地去除畜禽养殖废水中磺胺类抗生素抗性基因研究[J]. 环境科学与管理, 2016, 41(5): 89-92.

[12] Joy S R, Bartelt - Hunt S L, Snow D D, et al. Fate and transport of antimicrobials and antimicrobial resistance genes in soil and runoff following land application of swine manure slurry[J]. Environmental Science & Technology, 2013, 47(21): 12081-12088.

[13] Barkovskii A L, Manoylov K M, Bridges C. Positive and negative selection towards tetracycline resistance genes in manure treatment lagoons[J]. Journal of Applied Microbiology, 2012, 112(5): 907-919.

[14] 杨芳. 人工湿地中抗生素耐药菌和耐药基因环境行为研究[D]. 广州: 暨南大学, 2013: 49-50.

[15] 窦春玲, 郭雪萍, 尹大强. 污水处理厂抗生素抗性基因分布和去除研究进展[J]. 环境化学, 2013, 32(10): 1885-1893.

[20] 李杰, 郁继华, 冯致, 等. 不同微生物菌剂对牛粪好氧堆肥的影响[J]. 干旱区资源与环境, 2014, 28(2): 109-113.

[21] 张相锋, 王洪涛, 聂永丰, 等. 猪粪和锯末联合堆肥的中试研究[J]. 农村生态环境学报, 2002, 18(4): 19-22.

[22] 王岩, 李玉红, 李清飞. 添加微生物菌剂对牛粪高温堆肥腐熟的影响[J]. 农业工程学报, 2006, 22(增刊2): 220-223.

[23] Jimenez E I, Garcia V P. Composting of domestic refuse and sewage sludge. i. evaluation of temperature, pH, C/N ratio and cation - exchange capacity [J]. Resources Conservation and Recycling, 1991, 6(1): 45-60.

[24] 艾平, 张衍林, 李善军, 等. 农业废弃物处理技术的分析[J]. 环境整治, 2010(1): 59-63.

[25] Domeizel M, Khalil A, Prudent P. UV spectroscopy: a tool for monitoring humification and proposing an index of the maturity of compost[J]. Bioresource Technology, 2004, 94(2): 177-184.