

DOI: 10.13671/j.hjkxxb.2019.0296

陈惠鑫, 佟娟, 陈奕童, 等. 2019. 再生水补给型城市景观水体中抗生素抗性基因的污染特征——以圆明园为例[J]. 环境科学学报, 39(12): 4057-4063

Chen H X, Tong J, Chen Y T, et al. 2019. Pollution characteristics of antibiotic resistance genes in urban landscape water supplied by reclaimed water: Taking Yuanmingyuan as an example[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 39(12): 4057-4063

再生水补给型城市景观水体中抗生素抗性基因的污染特征

——以圆明园为例

陈惠鑫¹, 佟娟², 陈奕童¹, 程荣^{1,*}, 郑祥^{1,*}

1. 中国人民大学环境学院, 北京 100872
2. 中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085

摘要: 由于抗生素抗性基因(Antibiotic Resistance Genes, ARGs)对环境和人类健康存在潜在威胁而逐渐受到人们的重视, 高人口密度城市中典型景观水体是 ARGs 储存库和传播媒介. 本研究采用实时荧光定量 PCR 技术, 研究了圆明园不同点位的 ARGs 污染情况和分布特征. 结果表明: 园区中 ARGs 的绝对丰度范围在 n.d.(未检出) ~ 1.08×10^9 copies \cdot L⁻¹ 之间; 园区进水口目标 ARGs 的丰度低于末端, 表明封闭的水体可能为 ARGs 的积累提供了理想培养基. 在所检测基因中, 磺胺类 ARGs 占主导, ARGs 的绝对丰度依次为: *suII* > *suI* > *mefA* > *tetQ* > *tetM* > *ermB*. 磺胺类 ARGs 与指示微生物粪大肠菌群和大肠杆菌间存在显著相关性, 表明指示微生物在 ARGs 的传播中可能起着关键作用.

关键词: 抗生素抗性基因(ARGs); 城市景观水体; 分布特征; 指示微生物

文章编号: 0253-2468(2019)12-4057-07 中图分类号: X524 文献标识码: A

Pollution characteristics of antibiotic resistance genes in urban landscape water supplied by reclaimed water: Taking Yuanmingyuan as an example

CHEN Huixin¹, TONG Juan², CHEN Yitong¹, CHENG Rong^{1,*}, ZHENG Xiang^{1,*}

1. School of Environment and Natural Resources, Renmin University of China, Beijing 100872
2. Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085

Abstract: Antibiotic Resistance Genes (ARGs) are gaining more and more attention because of their potential threat to the environment and human health. The typical landscape water in high population density cities is the medium for the source and spread of ARGs. In this study, quantitative real-time PCR technology was used to study the contamination and distribution of ARGs at in Yuanmingyuan. The results show that the absolute abundance of ARGs in the park ranged from n.d. to 1.08×10^9 copies \cdot L⁻¹. The abundance of ARGs in the inlet of the park is lower than the end, indicating that the closed water may provide an ideal medium for the accumulation of ARGs. The absolute abundance of ARGs is: *suII* > *suI* > *mefA* > *tetQ* > *tetM* > *ermB*. Sulfonamide ARGs predominated among the genes tested in this study and there was a significant correlation between sulfonamide ARGs and the indicated microbial fecal coliforms (FC) and *Escherichia coli* (E.coli), indicating that the microbes may play a key role in the spread of ARGs.

Keywords: antibiotic resistance genes; landscape water; distribution; fecal indicator microorganisms

1 引言(Introduction)

抗生素目前被广泛应用于人类和动物感染性疾病的控制, 并可作为亚治疗剂和促生长剂添加在饲料中(Chee-Sanford *et al.*, 2009). 中国是全球最大的抗生素生产和消费国(余忻, 2014), 抗生素的广

泛使用导致其在土壤、地表水、地下水及饮用水等各种环境介质中的频繁检出(Qiao *et al.*, 2018). 环境中残留的抗生素不仅对环境造成污染, 还会诱导抗生素抗性细菌(Antibiotic Resistant Bacteria, ARB) 和抗生素抗性基因(Antibiotic Resistance Genes, ARGs) 的产生, ARGs 可通过基因的水平转移进行

收稿日期: 2019-05-30 修回日期: 2019-07-21 录用日期: 2019-07-21

基金项目: 中央高校建设世界一流大学(学科) 和特色发展引导专项资金资助

作者简介: 陈惠鑫(1996—) 女, E-mail: chx6297@163.com; * 责任作者, E-mail: chengrong@ruc.edu.cn; zhengxiang7825@163.com

传播, 从而对生态环境和人类健康造成威胁(Furuya *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2013). 细菌的存在是 ARGs 传播的重要载体(Rysz *et al.*, 2004). 因此, 关注微生物在 ARGs 传播中发挥的作用具有重要意义. 但是, 目前研究对于抗性基因与微生物, 尤其是与反映水体中微生物污染状况的指示微生物之间的相关性研究尚缺乏统一认识.

在我国环渤海区域, 以污水处理厂出水等非正规水源补给为主的河、湖逐渐成为城市群景观水体的主导类型; 而随着“海绵城市”建设的全国推进, 以污水处理厂尾水为补给水源的城市湿地公园近年来亦大量涌现. 城市景观水体在生态生境、城市景观、游憩活动等多种生态经济服务中发挥着重要的作用. 圆明园作为再生水补给型城市景观水体的典型代表, 其用水均来自清河污水处理厂处理后的再生水(彭自然等, 2011), 日用水量达 $2 \times 10^4 \sim 3 \times 10^4 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$. 大量文献研究指出, 污水处理厂现有的处理工艺并不能完全去除抗生素, 出水中残留的抗生素、ARB 和 ARGs 可导致在下游环境中的传播(Rizzo *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014). 此外, 由于圆明园的水文系统处于封闭状态, 缺乏流动, 封闭的湖泊可能会为 ARGs 的积累提供适宜的传播条件. 随着滞留时间的增加, 污染物的循环放缓, 其对生态系统和人类健康造成的生态风险很可能高于其他流动性强的自然水体. 然而, 目前的研究多集中于城市河流、水库中 ARGs 的分布情况(Jiang *et al.*, 2014; Qiu *et al.*, 2019), 关于典型景观水体 ARGs 的分布状况同样值得关注.

因此, 本研究选取北京市典型景观水体圆明园, 通过荧光定量 PCR 技术, 分析圆明园内抗生素抗性基因的污染特征. 本研究选取了 2 种大环内酯类(*mefA* 和 *ermB*)、2 种四环素类(*tetM* 和 *tetQ*) 和 2 种磺胺类(*sulI* 和 *sulII*) ARGs, 1 种可转移元件 *intI1* 进行研究. 并通过传统微生物学方法, 分析园区内 3 种指示微生物的浓度水平, 明确 ARGs 和指示微生物的相关性, 以期为城市景观水体 ARGs 的削减和相关风险评估提供基础科学研究支撑.

2 材料与方法(Materials and methods)

2.1 样品采集与处理

圆明园地处温带属季风性气候, 夏季炎热多雨. 园区在 2018 年 7 月未有再生水进入, 无法考察再生水补水条件下园区内 ARGs 的丰度水平, 因此

本研究选择有再生水补入的 9 月开展调查. 此外, 圆明园内约有 27 个大小不同的湖泊, 水系情况复杂. 随着城市发展和环境的恶化, 圆明园历史上的供水渠道现在都已断绝, 如今圆明园使用的仅为从园区北侧入水口进入园内的再生水. 基于圆明园的水系流向, 我们从圆明园进水口开始采集样品, 采样点覆盖园区内最大的湖泊——福海, 重要景观水域——鉴碧亭、凤麟洲, 生态修复区域——方河, 采样点如图 1 所示. 其中, 采样点 S1 是园区进水口, S2 和 S3 分别位于后海和福海, S4 位于鉴碧亭, S5 是凤麟洲, S6 位于末端方河. 所有水样均采用采水器在从距离水面 0.5 m 处采集样品, 并保存于无菌聚乙烯瓶中. 采集后立即保存于 4 °C 冰箱, 迅速送至实验室后在 24 h 内进行处理. 水样的温度和 pH 用便携式仪器(YSI, 美国) 在野外现场测定. 水样带回实验室后, 用纳氏试剂比色法测定氨氮($\text{NH}_3\text{-N}$); 过硫酸钾氧化紫外分光光度法测定总氮(TN); 钼酸铵分光光度法测定水样中的总磷(TP); 快速消解分光光度法测定化学需氧量(COD); 用总有机碳分析仪(岛津 TOC-L, 日本) 测定水样中的总有机碳(TOC).

目前, 国内外主要以指示菌的浓度水平来反映水体中微生物的污染状况. 美国、世界卫生组织、欧盟采用的细菌指示微生物为大肠杆菌(*Escherichia coli*, 简称 EC)、肠球菌(*Enterococcus*, 简称 ENT), 而我国目前常采用的是粪大肠菌群(Fecal Coliform, 简称 FC). 因此, 本研究指示微生物以 FC、EC 和 ENT 作为监测指标, 培养方法参照我国行业标准 HJ-T347—2007 滤膜法、美国环保署(USEPA) 标准 EPA Method1603 和 EPA Method1600.

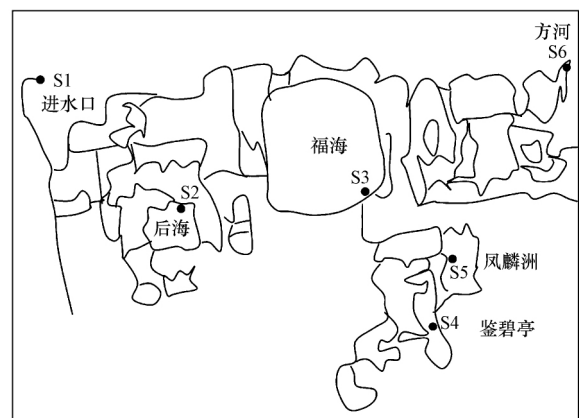


图 1 圆明园采样点空间位置示意

Fig.1 Sketch of sampling sites in Yuanmingyuan

2.2 水样 DNA 提取

将样品通过 0.2 μm 聚偏二氟乙烯膜过滤后, 用铝箔纸(避光)包裹置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存. 提取 DNA 时, 用预先灭菌的剪刀将滤膜剪成片, 置于 Lysing Matrix E tube 离心管中后, 加入配套的 978 μL PBS 缓冲液. 依据 Fast DNA SPIN 试剂盒(MP bio, 美国)中的方法提取总 DNA. 提取后的 DNA 通过紫外分光光度计检测其浓度和纯度.

2.3 荧光定量 PCR

使用 StepOne Plus 实时荧光定量 PCR 仪(ABI,

美国)对目标基因进行 SYBR Green 绝对定量 PCR 反应. 每个样品 3 个平行. 所用引物见表 1. 在无菌 96 孔板中配置 20.0 μL 的 PCR 反应体系: $2\times$ SYBR 10 μL ; 前引物、后引物各 0.4 μL ; DNA 样品 1 μL ; ROX 染料 0.4 μL ; 无菌水 7.8 μL . PCR 反应条件为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性时间 30 s; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性时间 5 s; $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火延伸 30 s, 总共 40 个循环. 程序质粒标准曲线的校准曲线呈现良好的线性关系($R^2 = 0.99$). PCR 扩增效率范围为 95%~110%, 表明 qPCR 的扩增效率满足要求.

表 1 ARGs 所用引物序列

Table 1 Primer sequences used for PCR amplification of ARGs

目的基因	引物序列(5'-3')	片段长度/bp	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$	文献
<i>tetA</i>	F: GCTACATCCTGCTTGCCTTC R: CATAGATCGCCGTGAAGAGG	210	55	Ng, 2001 Wu, 2010
<i>tetQ</i>	F: AGAATCTGCTGTTTGCCAGTG R: CGGAGTGTCAATGATATTGCA	169	63	Aminov, 2001
<i>sulI</i>	F: CACCGGAAACATCGCTGCA R: AAGTTCCGCCGCAAGGCT	158	60	Luo, 2010
<i>sulIII</i>	F: CTCCGATGGAGGCCGTAT R: GGGAATGCCATCTGCCTTGA	190	60	Luo, 2010
<i>mefA</i>	F: AGTATCATTAATCACTACTGTC R: TTCTTCTGTTACTAAAAGTGG	348	45	Sutcliffe, 1996
<i>ermB</i>	F: GATACCGTTTACGAAATTGG R: GAATCGAGACTTGAGTGTGC	364	58	Chen, 2007
<i>int11</i>	F: GGCTTCGTGATGCCTGCTT R: CATTCTGGCCGTGTTCT	146	55	Luo, 2010
16S rRNA	F: CGCTGAATACGTTTCYCGG R: GGWTACCTTGTTACGACTT	143	55	Aminov et al., 2007

2.4 16S rRNA 荧光定量 PCR

采用 StepOne Plus 荧光定量 PCR 仪测定样品的 16S rRNA 基因, 采用标准质粒外标法对其丰度进行绝对定量. 标准质粒原始浓度为 2.81×10^{10} copies $\cdot \text{L}^{-1}$. 将以 10 倍浓度梯度稀释的质粒用于制作绝对定量标准曲线, 标准曲线范围: $2.81 \times 10^4 \sim 2.81 \times 10^9$ copies $\cdot \text{L}^{-1}$. PCR 扩增的总反应体系为 20 μL . 反应体系中各试剂的最终浓度为: $2\times$ 的 SYBR Premix Ex TaqTM 试剂; $10\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的上下游引物; $10\text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的 DNA 模板; ROX 染料. PCR 反应条件为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下预变性 30 s; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s; 退火时间 30 s; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸时间 30 s. 依据仪器程序自动添加的熔解曲线进行分析.

2.5 数据分析

基因的相对拷贝数由公式(1)计算, 绝对丰度由公式(2)计算(Looft et al., 2012; 张丹丹等, 2018).

$$C = 10 \left[\frac{(31 - C_T)}{3} \right] \quad (1)$$

$$A_{\text{ARG}} = \frac{C_{\text{ARG}}}{C_{16\text{S rRNA}}} \times A_{16\text{S rRNA}} \quad (2)$$

式中, C 为基因的相对拷贝数, C_T 为 PCR 反应收集到特定荧光时的循环次数, C_{ARG} 为样本中 ARGs 的相对拷贝数, $C_{16\text{S rRNA}}$ 为样本中 16S rRNA 基因的相对拷贝数. 样本中 ARGs 的相对丰度即为 $\frac{C_{\text{ARG}}}{C_{16\text{S rRNA}}}$; A_{ARG} 为样本中 ARGs 的绝对丰度 (copies $\cdot \text{L}^{-1}$), $A_{16\text{S rRNA}}$ 为样本中 16S rRNA 基因的绝对丰度 (copies $\cdot \text{L}^{-1}$).

利用 Microsoft Excel 2010 进行计算分析, Origin Pro9.0 制图, 采用 SPSS 22.0 中的配对 T 检验和相关性分析进行数据相关性的分析. 当 p 值小于 0.05 时, 均认为存在显著相关性. 使用 Canoco 5 进行 ARGs 和环境因子的相关性分析.

3 结果与讨论(Results and discussion)

3.1 圆明园水体中不同种类 ARGs 分布特征

本研究所测的大环内酯类、四环素类和磺胺类 ARGs 在圆明园水体中均有检出,说明圆明园水环境已受到 ARGs 污染(图 2a)。圆明园中 ARGs 的绝对丰度在 n.d.(未检出) $\sim 1.08 \times 10^9$ copies $\cdot L^{-1}$ 间,其中 *sulII* 绝对丰度为 $3.15 \times 10^5 \sim 1.08 \times 10^9$ copies $\cdot L^{-1}$, *sulII* 在检测 ARGs 中占据主导地位,即 ARGs 的绝对丰度依次为: *sulII* $>$ *sulI* $>$ *mefA* $>$ *tetQ* $>$ *tetM* $>$ *ermB* (图 2b)。这一结果与上海城市河网(朱春红, 2018)、北京温榆河(Liu *et al.*, 2019) 中 ARGs 的检出结果一致;区别于海河流域(杨继平等, 2017) 海河流域的结果显示 *sulI* 的丰度高于其余 ARGs。*sulII* 为圆明园优势 ARGs,推测一方面是与 *sulI* 和 *sulII* 位于不同的移动元件上有关: *sulI* 位于整合子上,而 *sulII* 位于宿主广泛的质粒上;两种磺胺类 ARGs 均编码于革兰氏阴性肠道菌中对磺胺类耐药的二氢叶酸合成酶(DHPS)上,但是 *sulII* 的 DHPS 似乎在区分底物方面非常敏锐,使得 *sulII* 的分布更为广泛(Su *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2016)。另一方面,刘璐等(2018)研究发现,高浓度的氮磷对 *sulI* 基因有显著的抑制作用,由于 9 月园区部分点位氮磷浓度达劣五类水平,由此可能也抑制了园内 *sulI* 基因的

浓度水平。

园区内大环内酯类和四环素类 ARGs 较磺胺类相比低 1~2 个数量级,这可能与本地抗生素的使用类型、残留的环境选择压力相关。通常认为,环境中存在的抗生素对 ARGs 的诱导、产生和维持都存在影响(沈群辉等, 2012; 马业萍, 2015)。Zhang 等(2015)的研究指出,中国磺胺类、四环素类和大环内酯类抗生素的消耗量占总使用量的 38%。而人类和动物消耗的抗生素很大一部分随排泄物进入到生活污水中(Sarmah *et al.*, 2006)。圆明园的景观用水均来自清河污水处理厂处理后的再生水,清河污水处理厂也是北京市污水处理厂中规模较大的,主要收集清河流域排放的生活污水。而现有的污水处理工艺对抗生素的去除效果有限,大量未被去除的抗生素经城市污水厂进入水环境中(徐建等, 2018)。因此,圆明园内磺胺类 ARGs 的检出,也表明该区域磺胺类抗生素的广泛使用。而 ARGs 的检出除了与该地抗生素的用药习惯有关外,也可能是由于可移动遗传元件促进的 ARGs 的传播和扩散。本研究也证实了 *sulI* 与 *intI1* 间显著相关性($p < 0.05$),这与先前 Luo 等(2010)的研究结果相似,表明 *sulI* 受 *intI1* 的促进传播,其主要原因是 *sulI* 基因序列位于 *intI1* 基因盒序列中(Nigro *et al.*, 2013)。

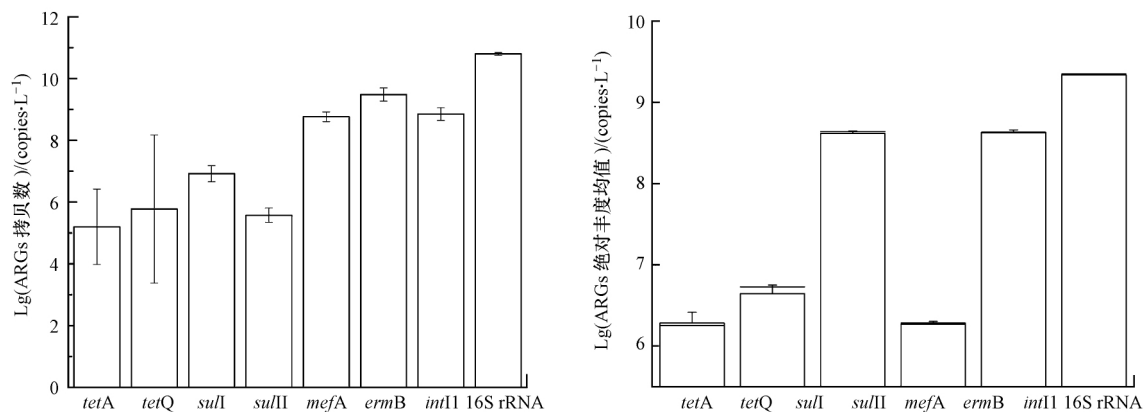


图 2 圆明园内 ARGs 的丰度分布(a) 及 ARGs 的绝对丰度(b)

Fig.2 Distribution of ARGs in Yuanmingyuan(a) and absolute abundance of ARGs(b)

3.2 圆明园水体中 ARGs 的空间分布特征

图 3 为各采样点 ARGs 的变化情况。结果显示,不同点位 ARGs 的丰度存在差异。ARGs 的浓度水平除受抗生素使用量的影响外,还与细菌生物量、水生植物等多种因素有关。由于细菌的存在是 ARGs

传播的重要载体,Wu(2010)的研究指出,ARGs 的拷贝数与 16S rRNA 的基因拷贝数显著相关,因此推测从园区进水口至末端 ARGs 出现升高后降低可能是由于细菌含量变化引起的。有研究表明,人工湿地中 ARGs 去除差异可能和水生植物的种类有关

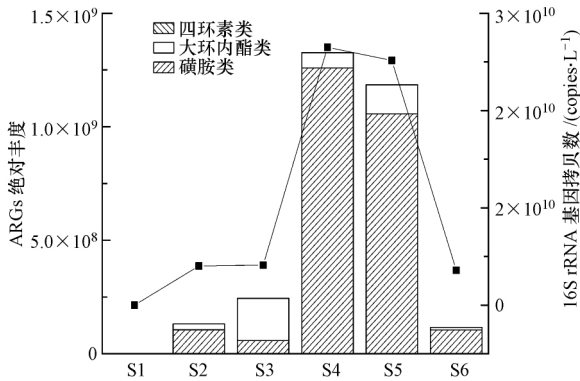


图3 各采样点 ARGs 绝对丰度的变化

Fig.3 The variation of absolute abundance of ARGs in each sample

(Chen, 2013; Fang *et al.*, 2017), 即种植的水生植物可能对水体中 ARGs 的去除有一定的效果。采样点 S1 位于园区进水口附近, 为净化水源, 附近种植有水生植物, 而 S4 (鉴碧亭) 和 S5 (凤麟洲) 处种植

的黄花鸢尾、千屈菜等水生植物受人为破坏严重, 使得园内 ARGs 污染主要在鉴碧亭和凤麟洲区域。此外, 园区进水口目标 ARGs 的丰度低于末端, 表明封闭的水体可能会为 ARGs 的积累提供适宜环境。

3.3 圆明园水体中 ARGs 与环境因子的相关性

圆明园水体环境因子检测结果如表 2 所示。由表 2 可知, 同一时间内各采样点水温变化不大, 所有采样点的 pH 均在 7~9 之间。园区 COD 为 14.68~60.12 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 根据《地表水环境标准》(GB3838—2002) 9 月圆明园 COD 均值超 V 类水质标准, COD 在 S5 处达到最大值, 可能是由于人们在园区游览中, 存在向水体中投入饵料的行为, 使得水体受到有机污染, COD 值升高。此外, 进水口处 TN 污染严重, 而在园区末端 TN 值有明显下降, 这可能与园区内植物的吸收利用有关。磷作为水体富营养化的关键因素, 9 月园区除 S3 外 TP 浓度都较低, S3 处 TP 含量升高的原因可能与福海区域底泥磷的释放有关。

表 2 圆明园水质参数统计特征

Table 2 Summary statistics of measured parameters in Yuanmingyuan

采样点	水温/ $^{\circ}\text{C}$	pH	化学需氧量/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	总有机碳/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	总氮/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	氨氮/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	总磷/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
S1	26.5±0.99	7.41±0.40	52.58±1.81	32.55±5.63	11.38±1.47	0.13±0.06	0.11±0.02
S2	26.3±1.2	8.61±0.72	45.21±2.05	15.51±0.48	1.78±0.51	0.14±0.04	0.03±0.06
S3	25.5±1.06	8.11±0.08	35.21±3.12	12.17±2.69	2.79±0.82	0.28±0.10	1.76±0.36
S4	23.9±0.25	7.55±0.22	14.68±2.74	25.63±3.03	1.31±0.71	0.16±0.04	0.06±0.03
S5	26.1±1.7	8.08±0.24	60.12±2.04	24.21±1.81	1.20±0.1	0.15±0.07	0.01±0.11
S6	27.1±1.34	8.64±0.59	57.32±3.09	17.86±1.74	0.68±0.53	0.10±0.03	0.08±0.03

环境中 ARGs 的存在不仅与抗生素有关, 环境因子同样会影响 ARGs 的水平。因此, 本研究将各环境因子和目标 ARGs 的浓度进行冗余分析 (Redundancy analysis, RDA), 结果如图 4 所示。TN 与目标 ARGs (除 *tetQ* 外) 间的夹角较小, 呈现出显著相关性 ($p < 0.01$), 表明氮的存在对 ARGs 在环境中的迁移和转化有显著的影响。Liaqat 等 (2016) 研究指出, 氮通过为微生物提供能量进而影响环境中微生物含量, 从而导致 ARGs 变化。在本研究中, 尽管 TOC、TP 和目标 ARGs 并未表现出显著相关性, 但 Demaneche 等 (2001) 的研究指出, TOC 与 ARGs 的产生和传播有关, 并且可保护其免受降解; 而磷等无机盐和细胞结构组成、能量转移等功能有关, 因此 ARGs 的变化与氮磷等营养元素、有机物等存在一定的相关性。综上, 由于环境因子可极大地影响微生物群落组成, 因此它们将会引起城市水体环境

中 ARGs 的变化。

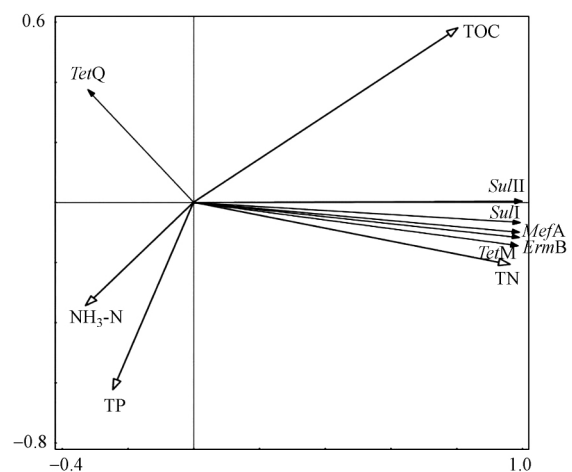


图4 ARGs 与环境因子的 RDA 分析

Fig.4 Redundancy analysis (RDA) of ARGs and environmental factors

3.4 圆明园水体中 ARGs 与指示微生物的相关性

各采样点 3 种指示微生物的平均浓度如图 5 所示.由图可知,不同点位的微生物赋存状况不同.S1、S3、S4、S5 的 FC 浓度最高,为 $50 \sim 1.85 \times 10^3$ CFU·L⁻¹;而采样点 S2 的 EC 浓度最高,为 8.5×10^2 CFU·L⁻¹;园区末端 S6 的 ENT 污染严重,浓度为 2.15×10^3 CFU·L⁻¹.根据我国《地表水环境质量标准》(GB 3838—2002)的规定,Ⅲ类水 FC 浓度限值为 10000 CFU·L⁻¹(国家环保总局,2002).因此,圆明园内 FC 浓度在Ⅲ类水质标准允许范围内.此外,3 种指示菌的变化趋势存在一致性.以区段为尺度分析空间差异性显示,园区末端方河指示菌污染状况显著高于进水口区段.这一结果的得出是由于微生物在末端的蓄积作用导致的(Brookes *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2017).

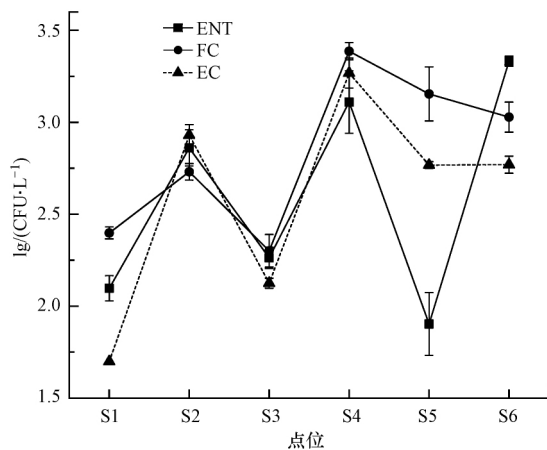


图 5 圆明园指示微生物浓度分布图

Fig.5 Concentration of indicator microorganisms in Yuanmingyuan

研究发现 6 种 ARGs 中, *suI* 和 *suIII* 与粪大肠菌群和大肠杆菌具有显著相关性(表 3).其余 ARGs 与 3 种指示菌均未见相关性.此结果的出现可能是由于 ARGs 可借助可移动遗传元件(如质粒、转座子、整合子以及插入序列等)在不同的微生物个体间进行基因水平转移(Ma *et al.*, 2017).例如, *tetE* 基因被发现存在于渔业养殖环境菌 *Aeromonas* spp 的可转移性质粒上,已被证明可以转移到 *Escherichia coli* 上(Agersø *et al.*, 2007); *ermB* 基因可以通过质粒和转座子从其主要宿主菌葡萄球菌、链球菌和肠球菌向其他菌属转移(张卓然等, 2007).但已有研究表明,经排泄进入环境的肠道菌可能会与土著菌发生 ARGs 的水平转移,进而使得抗性在环境中传播(高盼盼等, 2011; 张婉茹等,

2014).因此,关注肠道菌群和抗性基因之间相关性的研究仍然十分必要.

表 3 ARGs 丰度与指示微生物间的相关性分析

指标	<i>tetM</i>	<i>tetQ</i>	<i>mefA</i>	<i>ermB</i>	<i>suI</i>	<i>suII</i>
FC	0.314	0.759	0.029	0.314	0.886*	0.886*
EC	0.086	0.516	0.086	-0.029	0.600	0.829*
ENT	-0.257	-0.273	-0.257	-0.371	0.086	0.200

注: * 表示显著相关($p < 0.05$).

4 结论(Conclusions)

1) 在检测的目标 ARGs 中,磺胺类 ARGs 在圆明园中呈现最高的绝对丰度.

2) 园区进水口目标 ARGs 的丰度低于末端,表明封闭的水体可能为 ARGs 的积累提供了适宜环境.

3) 环境因子中的总氮可显著影响 ARGs 在城市景观水体中的传播; *suI* 和 *suIII* 与粪大肠菌群和大肠杆菌存在显著相关性,说明指示菌在 ARGs 的空间分布及扩散的过程中可能发挥着至关重要的作用.

参考文献(References):

- Agersø Y, Bruun M S, Dalsgaard I, *et al.* 2007. The tetracycline resistance gene *tet(E)* is frequently occurring and present on large horizontally transferable plasmids in *Aeromonas* spp. from fish farms [J]. *Aquaculture*, 266(1): 47-52
- 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): 22-23
- Aminov R I, Mackie R I, Koike S, *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 monitoring and source tracking of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater adjacent to swine production facilities over a 3-year period. [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 73(15): 4813
- Brookes J D, Antenucci J, Hipsey M, *et al.* 2004. Fate and transport of pathogens in lakes and reservoirs [J]. *Environment International*, 30(5): 741-759
- Chee-Sanford J C, Mackie R I, Koike S, *et al.* 2009. Fate and transport of antibiotic residues and antibiotic resistance genes following land application of manure waste [J]. *Journal of Environmental Quality*, 38(3): 1086-1108
- Chen H, Zhang M. 2013. Effects of advanced treatment systems on the removal of antibiotic resistance genes in wastewater treatment plants from Hangzhou, China [J]. *Environmental Science and Technology*, 47: 8157-8163

- Chen J, Yu Z, Michel F C, *et al.* 2007. Development and application of real-time PCR assays for quantification of erm genes conferring resistance to macrolides-lincosamides-streptogramin B in livestock manure and manure management systems [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14): 4407-4416
- Demaneche S, Jocteur-Monrozier L, Quiquampoix H, *et al.* 2001. Evaluation of Biological and Physical Protection against Nuclease Degradation of Clay-Bound Plasmid DNA [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1): 293-299
- Fang H, Zhang Q, Nie X, *et al.* 2017. Occurrence and elimination of antibiotic resistance genes in a long-term operation integrated surface flow constructed wetland [J]. *Chemosphere*, 173: 99-106
- Furuya E Y, Lowy F D. 2006. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 4(1): 36
- 高盼盼, 罗义, 毛大庆. 2011. 天津水产产业磺胺类耐药细菌及其分布 [J]. *生态毒理学报*, 6(1): 74-79
- 国家环保总局, 国家质量监督检验检疫总局. 2002. 地表水环境质量标准(GB3838-2002) [S]. 北京: 中国标准出版社
- Jiang Y, Li M, Guo C, *et al.* 2014. Distribution and ecological risk of antibiotics in a typical effluent - receiving river (Wangyang River) in north China [J]. *Chemosphere*, 112: 267-274
- Liaquat A, Chen J, Wang Y, *et al.* 2016. Nutrient-induced antibiotic resistance in *Enterococcus faecalis* in the eutrophic environment [J]. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 7: 78-83
- 刘璐, 刘萱, 王华, 等. 2018. 水环境因子对磺胺类抗性基因 *Sul1* 含量的影响 [J]. *农业环境科学学报*, 37(3): 515-519
- Liu X, Zhang G, Liu Y, *et al.* 2019. Occurrence and fate of antibiotics and antibiotic resistance genes in typical urban water of Beijing, China [J]. *Environmental Pollution*, 246: 163-173
- Looft T, Johnson T A, Allen H K E A. 2012. Infeed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(5): 1691-1696
- Luo Y, Mao D, Rysz M, *et al.* 2010. Trends in antibiotic resistance genes occurrence in the Haihe River, China [J]. *Environmental Science and Technology*, 44(19): 7220-7225
- Luo Y, Mao D, Rysz M, *et al.* 2010. Trends in antibiotic resistance genes occurrence in the Haihe River, China [J]. *Environ Sci Technol*, 44: 7220-7225
- Ma L, Li A, Yin X, *et al.* 2017. The prevalence of integrons as the carrier of antibiotic resistance genes in natural and man-made environments [J]. *Environmental Science & Technology*, 51(10): 5721-5728
- Mulvey M, Martin M I, Alfa M, *et al.* 2001. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes [J]. *Molecular and Cellular Probes*, 15(4): 209-215
- Nigro P, Pompilio G, Capogrossi M C. 2013. Cyclophilin A: a key player for human disease [J]. *Cell Death & Disease*, 4(10): e888
- 彭自然, 何文辉, 高佳慧, 等. 2011. 圆明园景观水体生态修复过程中水质变化的初步研究 [J]. *上海海洋大学学报*, 20(03): 457-461
- Qiao M, Ying G, Singer A C, *et al.* 2018. Review of antibiotic resistance in China and its environment [J]. *Environment International*, 110: 160-172
- Qiu W, Sun J, Fang M, *et al.* 2019. Occurrence of antibiotics in the main rivers of Shenzhen, China: Association with antibiotic resistance genes and microbial community [J]. *Science of the Total Environment*, 653: 334-341
- Rizzo L, Manai C, Merlin C, *et al.* 2013. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review [J]. *Science of the Total Environment*, 447: 345-360
- Rysz M, Alvarez P J J. 2004. Amplification and attenuation of tetracycline resistance in soil bacteria: aquifer column experiments [J]. *Water Research*, 38(17): 3705-3712
- Sarmah A K, Meyer M T, Boxall A B A. 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment [J]. *Chemosphere*, 65(5): 725-759
- 沈群辉, 冀秀玲, 傅淑珺, 等. 2012. 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*, 21(10): 1717-1723
- Su H, Ying G, Tao R, *et al.* 2012. Class 1 and 2 integrons, sul resistance genes and antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolated from Dongjiang River, South China [J]. *Environmental Pollution*, 169: 42-49
- Sutcliffe J, Grebe T, Tait-Kamradt A, *et al.* 1996. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(11): 2562-2566
- Wang F, Qiao M, Lv Z, *et al.* 2014. Impact of reclaimed water irrigation on antibiotic resistance in public parks, Beijing, China [J]. *Environmental Pollution*, 184: 247-253
- Wang Y, Chen Y, Zheng X, *et al.* 2017. Spatio-temporal distribution of fecal indicators in three rivers of the Haihe River Basin, China [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(10): 9036-9047
- Wei Q, Jiang X, Li M, *et al.* 2013. Diversity of Gene Cassette Promoter Variants of Class 1 Integrons in Uropathogenic *Escherichia coli* [J]. *Current Microbiology*, 67(5): 543-549
- Wu Nan, Qiao M, Zhang B, *et al.* 2010. Abundance and diversity of tetracycline resistance genes in soils adjacent to representative swine feedlots in China [J]. *Environmental Science and Technology*, 44(18): 6933-6939
- 徐建, 胡鹏, 吕佳佩, 等. 2018. 水环境中抗生素和抗性基因污染特征及控制措施 [J]. *科技导报*, 36(15): 13-23
- 杨继平, 邱志刚, 袁兆康, 等. 2017. 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 [J]. *环境与健康杂志*, 34(4): 313-316
- 余忻. 2014. 抗生素废水的生物毒性与微生物耐药性及其控制技术 [D]. 北京: 清华大学
- 张丹丹, 郭亚平, 任红云, 等. 2018. 福建省敖江下游抗生素抗性基因分布特征 [J]. *环境科学*, 39(6): 2600-2606
- Zhang Q, Ying G, Pan C, *et al.* 2015. A comprehensive evaluation of antibiotics emission and fate in the river basins of China: Source analysis, multimedia modelling, and linkage to bacterial resistance [J]. *Environmental Science & Technology*, 49(11): 6772-6782
- Zhang X H, Xu Y B, He X L, *et al.* 2016. Occurrence of antibiotic resistance genes in landfill leachate treatment plant and its effluent-receiving soil and surface water [J]. *Environ Pollut*, 218: 1255-1261
- 张婉茹, 那广水, 陆紫皓, 等. 2014. 北黄海岸海域磺胺类抗生素及其抗性 *Escherichia coli* 分布 [J]. *应用与环境生物学报*, 20(3): 401-406
- 张卓然, 夏梦岩, 倪语星. 2007. 微生物耐药的基础与临床 [M]. 北京: 人民卫生出版社
- 朱春红. 2018. 上海市城市河网抗生素、抗性基因时空分布特征及其与环境因子相关性研究 [D]. 上海: 华东师范大学