

游离态四环素类抗生素抗性基因在土壤中的吸附

刘博^{1,2}, 周方¹, 刘翔¹, 李淼¹

(1. 清华大学环境学院, 北京 100084; 2. 国网山东省电力公司经济技术研究院, 山东 济南 251000)

摘要: 针对地下水抗生素抗性基因的来源和传播, 结合北京再生水入渗现场四环素类抗生素抗性基因的分布特征, 以 pUC18 质粒作为载体, 分别导入 *tetB*、*tetM*、*tetO* 和 *tetW* 基因片段作为模式抗性基因, 分析了游离态四环素类抗生素抗性基因在土壤中的吸附规律。结果表明, 对于四环素类抗生素抗性基因, 不同目的片段对其在包气带土壤介质中的平衡吸附量没有影响, 而底泥对携带 *tetO* 和 *tetW* 目的片段的质粒吸附量相对较高。

关键词: 四环素类抗生素抗性基因; 质粒; 吸附特性; 土壤

中图分类号: TU992 **文献标识码:** C **文章编号:** 1000-4602(2018)03-0091-06

Soil Adsorption Characteristics of Extracellular Tetracyclines Antibiotic Resistance Genes

LIU Bo^{1,2}, ZHOU Fang¹, LIU Xiang¹, LI Miao¹

(1. School of Environment, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 2. State Grid Shandong Electric Power Economic Research Institute, Jinan 251000, China)

Abstract: In this study, tetracyclines antibiotic resistance genes using pUC18 plasmids (pattern resistant genes were *tetB*, *tetM*, *tetO* and *tetW*) as carriers were considered as the targeted pollutants, and the adsorption and transformation characteristics from a reclaimed water infiltration site in Beijing were analyzed in the batch and column experiments. The results revealed that the adsorption of the plasmids with different target genes was similar in the vadose zone, whereas the adsorptions of *tetO* and *tetW* genes were higher in sediment soil.

Key words: tetracyclines antibiotic resistance genes; plasmid; adsorption characteristic; soil

随着再生水入渗补给地下水的广泛应用, 研究新兴污染物在补给过程中可能对土壤和地下水造成的污染是十分必要的。2006年, Pruden等人^[1]首次在水环境中检测到抗生素抗性基因(ARGs), 并将其定义为新兴污染物。已有的研究表明, 现行的污水处理工艺, 甚至包括紫外消毒等深度处理工艺对ARGs的削减效果十分有限, 在污水厂尾水中均检

测到不同丰度水平的ARGs^[2,3]。再生水中残留的ARGs等污染物在地表入渗过程中可能会随着补水进入到土壤甚至是地下水中。与其他污染物不同, ARGs具有遗传性^[4], 携带ARGs的质粒等遗传元件, 当其以游离态在土壤中存在时, 会附着于土壤颗粒及其有机质成分中而不易被DNA酶等分解, 因此能够在土壤中稳定存在, 并对环境造成持久性污染,

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(51378287)

通信作者: 刘翔 E-mail: x.liu@tsinghua.edu.cn

增大环境健康风险。

目前,关于 ARGs 的研究多集中于水体环境,而针对再生水入渗场地土壤中的相关报道并不多见。因此,随着对新兴污染物关注的提升以及对再生水利用的推广,入渗场地土壤中 ARGs 的分布特征及其在土壤中的传播扩散机制研究显得尤为迫切。

1 材料与方 法

1.1 供试DNA

以 pUC18 质粒作为载体,分别导入 *tetB*、*tetM*、*tetO* 和 *tetW* 基因片段作为模式抗性基因,质粒原液浓度约为 250 ng/ μ L,用 pH 值 = 7 的 Tris - HCl 缓冲液(10 mmol/L)稀释至 25 ng/ μ L,并分装保存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中。

1.2 土壤样品的采集与制备

潮白河再生水入渗工程于 2007 年开始运行,本次采样距该工程开始运行已有 8 年。根据河道沿河水质及周边环境情况,共设置 6 处水样采集点,包括再生水补给源(DB1)和 5 处地表水采样点(DB2 ~ DB6,分别距补给源 1、2、3、4、5.5 km)。

为了研究入渗区土壤中四环素类抗性基因和抗性菌的存在丰度,选择场地中两种不同类型土壤进行研究。一种是底泥土壤(潮白河入渗流域,采样深度为 10 cm),该层土与入渗所用的地表水直接接触,含有丰富有机质;另外一种为包气带土壤(潮白河入渗流域,采样深度为 30 cm),该层或处于底泥层之下或直接与地表水接触,这两种土壤均易受污染,因此选择此两种土壤作为研究介质。另外,选择上游非入渗区的土壤作为对照土。

1.3 试验方法

1.3.1 吸附动力学试验

在 5 mL 离心管中分别加入 2.5 mL 四种质粒,根据土水比试验所确定的最佳土水比(携带四环素类 ARGs 质粒载体在底泥中的吸附选择 1 : 100,在包气带土壤中的吸附选择 1 : 50)加入相应量的土壤样品,每组试验设计 2 个平行样。将离心管置于 Mobio 水平旋转仪上,在 200 r/min 下水平振荡,分别在 5、10、15、30 min,以及 1、2、3、4、5 h 取下样品,在 8 000 r/min 下离心 10 min,抽取 10 μ L 上清液过 0.22 μ m 滤膜后检测相应指标。

1.3.2 吸附特性试验

在 5 mL 离心管中分别加入不同量的 *tetB*、*tetM*、*tetO* 和 *tetW* 质粒,补充 Tris - HCl 溶液(10 mmol/L)

使总体积为 2.5 mL,吸附试验初始浓度梯度分别为 5、10、15、20 和 25 ng/ μ L。按照最佳土水比在离心管中加入相应量的底泥和包气带土壤,每组试验设置 2 个平行样。将离心管置于 Mobio 水平旋转仪上,在 200 r/min 下水平振荡 2.5 h,然后在 8 000 r/min 下离心 10 min,取上清液经 0.22 μ m 滤膜过滤后待测。每组试验均设计了 2 组不投加土壤的样品作为对照组。

最后,测定上清液在 260 nm 下的吸光度以确定平衡时剩余溶液中质粒的平衡浓度。

2 结果与讨论

2.1 潮白河入渗区四环素类 ARGs 的分布

2.1.1 地表水中四环素类 ARGs 的存在丰度

在 6 处采样点中除了 *tetB* 基因的检出率为 83.3% 之外,其余 3 种基因在地表水中的检出率均为 100%。4 种目的基因在各采样点的绝对量丰度如图 1 所示。

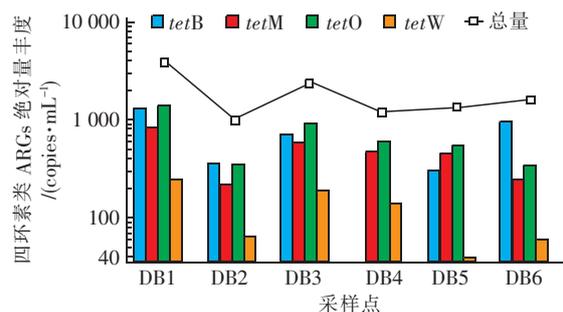


图 1 地表水中四环素类 ARGs 的绝对量丰度

Fig. 1 Absolute abundance of tetracyclines ARGs in surface water

由图 1 可知,进水中四环素类 ARGs 的总绝对量丰度较高,随着水体的流动,ARGs 总丰度由进水的 3 800 copies/mL 降低至 1 600 copies/mL,降低了 57.9%。DB2 ~ DB6 采样点处,各基因绝对量丰度分布比较均匀,在所有样品中,*tetO* 基因的存在水平普遍较高,为 346 ~ 927 copies/mL,平均值为 557 copies/mL;最低的为 *tetW* 基因,其存在水平在 39.7 ~ 189 copies/mL 之间,平均值为 98.9 copies/mL,这与马业萍^[2]的研究结果基本一致。

抗性基因相对量是引入 16S rDNA 作为内参基因,考察不同样本单位菌体中目标 ARGs 所占的比例,可以用来比较不同样本中目标基因的存在水平。潮白河入渗区地表水中 4 种四环素类 ARGs 的相对量丰度如图 2 所示。可以看出,不同采样点各基因

的相对量分布比较均匀,数量级为 $10^{-5} \sim 10^{-4}$ 。采样点 DB6 处四环素类 ARGs 相对量丰度所含的 *tetB* 基因最高,为 5.52×10^{-4} 。DB2 处四环素类 ARGs 相对量丰度所含的 *tetW* 基因最低,为 1.56×10^{-5} 。4 种四环素 ARGs 相对量丰度的平均值分别是:*tetB* 为 2.56×10^{-4} 、*tetM* 为 1.76×10^{-4} 、*tetO* 为 2.38×10^{-4} 和 *tetW* 为 4.28×10^{-5} 。

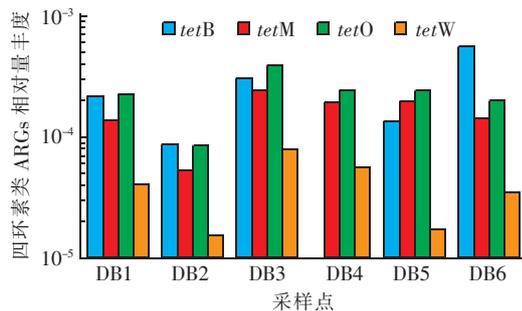


图 2 地表水中四环素类 ARGs 的相对量丰度

Fig. 2 Relative abundance of tetracyclines ARGs in surface water

2.1.2 土壤中四环素类 ARGs 的存在丰度

在 3 个土壤样品中均检出 4 种四环素类 ARGs, 检出率均为 100%。4 种目标基因在土壤样品中的绝对量丰度如图 3 所示。

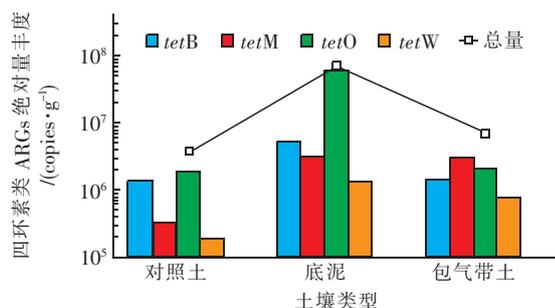


图 3 土壤中四环素类 ARGs 的绝对量丰度

Fig. 3 Absolute abundance of tetracyclines ARGs in soil

从图 3 可以看出,3 种土壤中四环素类 ARGs 绝对量丰度高且变化幅度大,其数量级在 $10^5 \sim 10^7$ copies/g 之间。入渗场地内的底泥和包气带土样中 4 种基因的绝对量丰度均高于对照土,底泥、包气带土、对照土的四环素类 ARGs 总绝对量丰度值分别为 7.27×10^7 、 6.79×10^6 和 3.91×10^6 copies/g。底泥中不同种四环素类 ARGs 的绝对量丰度均最高。四环素类 ARGs 在土壤中绝对量丰度最低的是对照土中的 *tetW* 基因,为 1.97×10^5 copies/g; 绝对量丰度最高的是底泥土壤中的 *tetO* 基因,为 6.99×10^7 copies/g。不同土壤中,*tetO* 基因的丰度普遍较高。

tetB、*tetM*、*tetO*、*tetW* 基因的绝对量丰度平均值分别为 2.68×10^6 、 2.14×10^6 、 2.24×10^7 、 8.30×10^5 copies/g。

图 4 为四环素类 ARGs 的相对量丰度。可以看出,土壤四环素类 ARGs 的相对量丰度分布在 $10^{-5} \sim 10^{-3}$ 数量级。土壤中 *tetB*、*tetM*、*tetO*、*tetW* 基因的相对量丰度平均值分别为 5.93×10^{-4} 、 7.83×10^{-4} 、 2.13×10^{-3} 和 1.86×10^{-4} 。不同土壤中四环素类 ARGs 相对量丰度最高的是底泥中的 *tetO* 基因,为 3.07×10^{-3} ; 相对量丰度最低的为底泥中的 *tetW* 基因,为 6.04×10^{-5} 。此外,包气带土壤样品中的四环素类 ARGs 相对量丰度普遍高于底泥的,这可能是由于底泥中所含有的微生物量远高于其他土壤,所以即使四环素类 ARGs 绝对量丰度水平最高,其所对应的相对量水平仍相对较低。

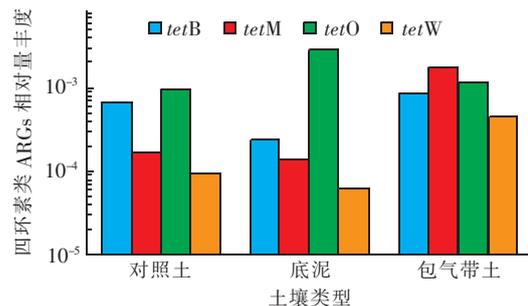


图 4 土壤中四环素类 ARGs 的相对量丰度

Fig. 4 Relative abundance of tetracyclines ARGs in soil

比较 3 个样本中四环素类 ARGs 的相对量丰度,可以看出入渗场地的底泥和包气带土壤整体上高于对照土,这可能是由于入渗补水携带外源 ARGs 进入土壤中,造成其在土壤中滞留、丰度升高,或者受入渗补水的影响加速了土壤中本底 ARGs 的传播扩散。

研究区域所在地下水中仅检出 3 种四环素类 ARGs (*tetB*、*tetO* 和 *tetW*), 未检出 *tetM* 基因。与地表水相比,地下水中各四环素类 ARGs 的绝对量丰度降低 1~2 个数量级。

对再生水、地表水、入渗场地土壤(底泥、包气带)、地下水中 *tetB*、*tetM*、*tetO* 和 *tetW* 四种基因的相对量丰度作图,可反映四环素类 ARGs 在入渗场地中垂直方向的变化,结果如图 5 所示(地表水相对量丰度取采样点 DB2~DB6 相应基因的中位数)。可以看出,包气带土壤中四环素类 ARGs 相对量丰度普遍较高,地下水中 4 种四环素类 ARGs 的相对

量丰度均最低,说明土壤中四环素类 ARGs 所占比例较高,这可能是由于在入渗过程中四环素类 ARGs 尚未进入地下水中,土壤对目标基因具有吸附、截留等作用使其在土壤中滞留。

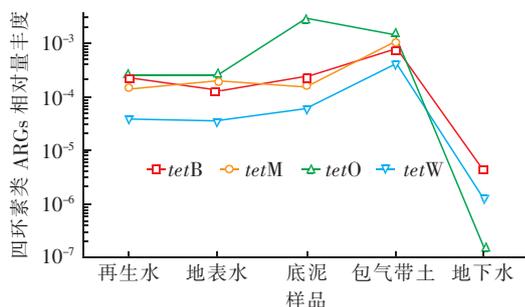


图 5 四环素类 ARGs 在垂直方向的变化

Fig. 5 Vertical variations of tetracyclines ARGs

2.2 游离态四环素类 ARGs 在土壤中的吸附试验

2.2.1 吸附动力学试验

使用双室一级动力学方程描述质粒载体在底泥以及包气带土壤中的吸附量随着时间的变化,线性拟合的结果如图 6 所示,选用方差参数(r^2)评价拟合效果。

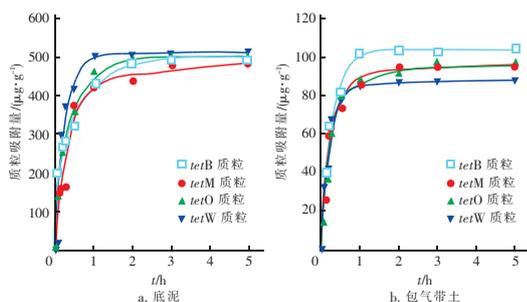


图 6 土壤对质粒载体的吸附动力学双室一级拟合曲线

Fig. 6 Double-room kinetics simulation of adsorption process in soil

拟合效果 r^2 表明,双室模型对吸附过程有较好

的拟合效果。从图 6 可以看出,无论是底泥或者包气带土壤,代表快吸室的速率 k_1 远大于代表慢吸室的速率 k_2 ,整合 8 组拟合结果,基本上 k_1 是 k_2 的 40 倍。其中,底泥对 *tetW* 质粒、包气带土壤对 *tetB* 和 *tetO* 质粒的吸附, k_1 与 k_2 之间相差 2 个数量级。对比分析快吸附贡献率 f_1 ,8 组拟合数据的 f_1 在 0.539 ~ 0.927 之间,底泥对 *tetW* 质粒的吸附试验中 f_1 值最高。快吸附所占比例最低的是携带 *tetO* 片段质粒载体在土壤中的吸附,对应的 f_1 值分别是 0.590 和 0.534,但仍以快吸附为主。

从图 6 还可以看出,底泥和包气带土壤对携带不同目的基因片段的 pUC18 质粒载体的吸附全部经历了快吸附和慢吸附过程。底泥对 *tetB*、*tetM*、*tetO* 和 *tetW* 质粒载体在前 1 h 内的吸附量分别达到平衡吸附量的 86.5%、86.9%、91.8% 和 94.8%,2 h 时均达到吸附平衡;在包气带土壤中,4 种质粒载体在 1 h 内分别达到平衡吸附量的 92.6%、91.5%、91.6% 和 93.9%,1.5 h 时接近平衡。为了确保携带不同目的片段的质粒载体均能够达到吸附平衡状态,并且避免载体长时间吸附而被土壤中的 DNA 酶等降解,本试验中两种土壤的吸附平衡时间均选取 2.5 h,这与胞外 DNA 分子在土壤中的吸附平衡时间一致^[5,6]。

综上所述,土壤对携带四环素类抗生素抗性基因片段的质粒载体的吸附以快吸附为主,特别是初始阶段,快吸附作用占有绝对优势。

2.2.2 等温吸附试验

使用线性模型、Freundlich 模型和 Langmuir 模型对质粒载体在两种土壤中吸附平衡结果进行拟合,底泥和包气带土壤的吸附拟合参数见表 1,拟合曲线见图 7。

表 1 土壤对质粒载体的吸附等温线模型拟合参数

Tab. 1 Adsorption isotherm fitting parameters of plasmids in soil

项 目	物 质	线性模型		Freundlich 模型			Langmuir 模型		
		$K_d/(mL \cdot g^{-1})$	r^2	K_f	n	r^2	$q_m/(\mu g \cdot g^{-1})$	$K_L/(mL \cdot \mu g^{-1})$	r^2
底泥	<i>tetB</i> 质粒	25.46	0.842	47.09	0.776	0.997	1 512.9	0.023	0.995
	<i>tetM</i> 质粒	27.74	0.889	54.87	0.749	0.987	1 400.1	0.029	0.988
	<i>tetO</i> 质粒	28.03	0.891	68.73	0.668	0.995	967.01	0.053	0.997
	<i>tetW</i> 质粒	28.26	0.721	74.45	0.644	0.996	976.99	0.051	0.997
包气带	<i>tetB</i> 质粒	5.345	0.741	24.32	0.465	0.990	142.35	0.108	0.997
	<i>tetM</i> 质粒	5.196	0.844	22.76	0.479	0.988	142.36	0.110	0.995
	<i>tetO</i> 质粒	4.960	0.839	22.10	0.475	0.979	136.09	0.101	0.993
	<i>tetW</i> 质粒	4.795	0.731	23.43	0.442	0.976	124.81	0.118	0.991

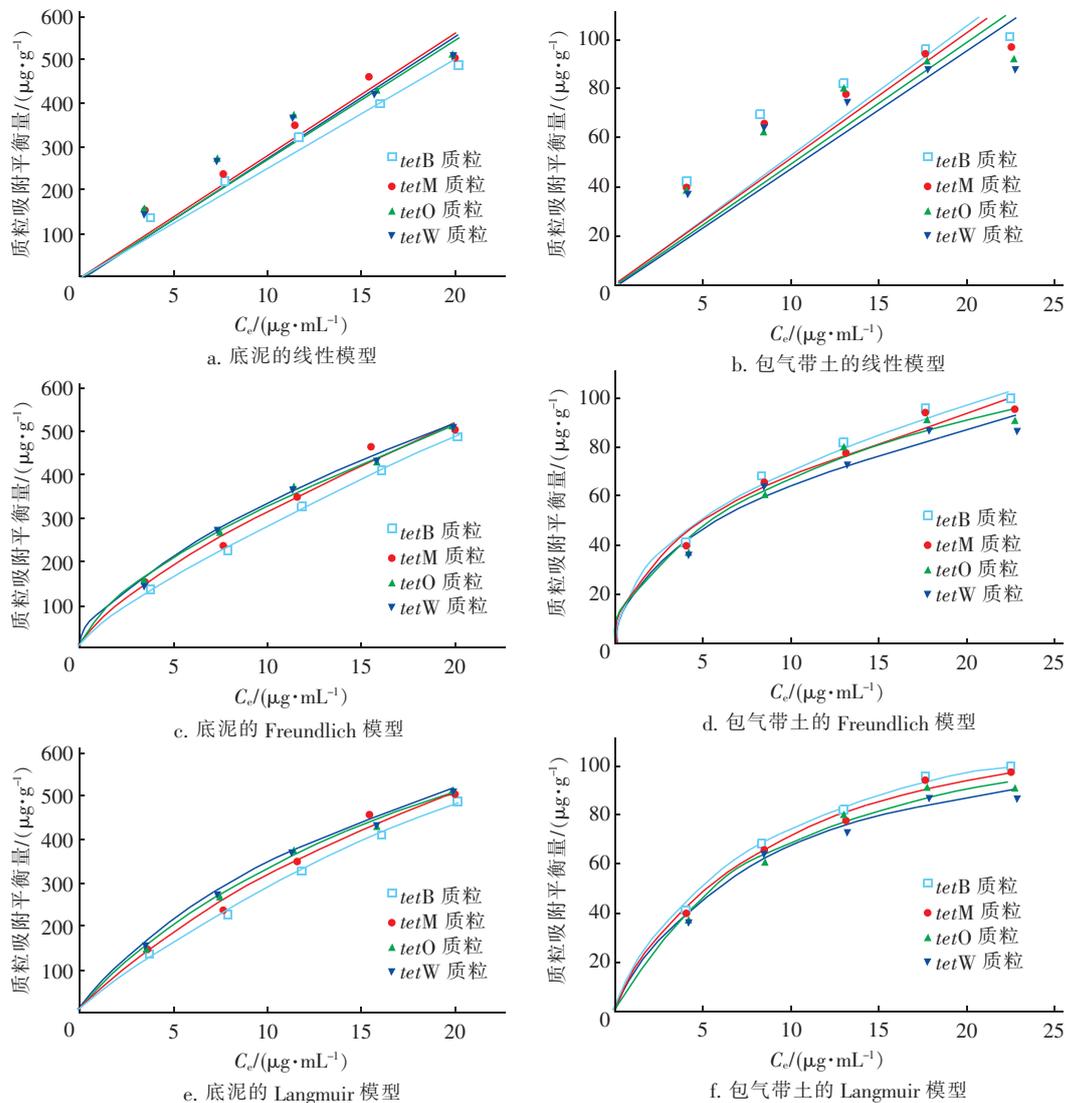


图 7 质粒载体在土壤中的吸附拟合模型

Fig. 7 Adsorption isotherm of plasmids in soil

由表 1 可知,相对于线性模型, Freundlich 模型和 Langmuir 模型的拟合效果较好,拟合方差参数 r^2 可达到 0.9 以上,且 Langmuir 拟合效果相对更好,与质粒 eDNA 在海河底泥中的吸附拟合模型一致^[7,8]。Langmuir 模型的吸附强度参数表明,在两种土壤中 4 种四环素类 ARGs 质粒的参数变化范围为 $3.4 \times 10^{-4} \sim 0.008$,属于易吸附类型。

底泥对携带 *tetB* 和 *tetM* 目的片段质粒载体的各吸附参数值比较接近,并且 *tetO* 和 *tetW* 的相应值比较接近。根据 Freundlich 模型拟合参数值,底泥对 *tetB* 质粒和 *tetM* 质粒的吸附平衡系数 K_f 值分别为 47.09 和 54.87,相应的 *tetO* 质粒和 *tetW* 质粒的该值分别为 68.73 和 74.45。系数 K_f 的差异说明,

相比于对 *tetB* 质粒和 *tetM* 质粒的吸附能力,底泥对携带 *tetO* 和 *tetW* 目的片段的质粒载体的吸附能力较高。

包气带土壤对携带 *tetB*、*tetM*、*tetO* 和 *tetW* 质粒的吸附能力十分接近,Langmuir 吸附模型下的最大吸附量分别为 142.35、142.36、136.09 和 124.81 $\mu\text{g}/\text{g}$,并且表征吸附能力强弱的吸附系数 K_L 处于 0.101 ~ 0.118 $\text{mL}/\mu\text{g}$ 之间。在 Freundlich 模型下也具有类似的拟合结果。

从图 7 可以看出,在底泥中,随着液相初始浓度的升高,底泥对质粒载体的吸附量逐渐增大,接近于线性变化。尽管载体上导入了不同的四环素抗性基因目的片段,但是底泥的吸附特性没有显著差异。

在相同初始浓度下, *tetB*、*tetM*、*tetO*、*tetW* 吸附平衡量相差 5 ~ 30 $\mu\text{g/g}$ 。另外, 4 种质粒平衡时的液相浓度 (C_e) 与初始浓度 (C_0) 的比值比较相近, 例如当 $C_0 = 15 \mu\text{g/mL}$ 时, 携带 *tetB*、*tetM*、*tetO* 和 *tetW* 基因质粒的 C_e/C_0 值分别为 78.0%、76.9%、75.5% 和 75.3%。

从图 7 还可以看出, 在所给的初始浓度范围下, 当 $C_0 > 20 \mu\text{g/mL}$ 时, 包气带土壤对质粒载体的吸附趋于平衡。另外, 不同目的片段的导入对其在包气带土壤中的吸附没有显著影响, 推测原因可能是由于 4 种质粒的分子质量基本相同。已有的研究表明, 在其他条件均相同的情况下, DNA 分子质量与分子结构是影响吸附量的主要因素^[9]。因此在本试验的结果中, 尽管载体上携带有不同的四环素类 ARGs, 但是其吸附量比较接近并且没有明显差别。

3 结论

① 检测北京市潮白河入渗区地表水和土壤中 4 种四环素类 ARGs 的存在水平, 在地表水中, *tetB* 的检出率为 83.3%, 其余 3 种基因的检出率均为 100%, 绝对量丰度存在范围为 39.7 ~ 1 600 copies/mL, 大致符合沿程递减规律, 四环素类 ARGs 总绝对量丰度降低了 57.9%; 土壤中 4 种四环素类 ARGs 的检出率均为 100%, 绝对量丰度高且变化幅度大, 其数量级在 $10^5 \sim 10^7$ copies/g 之间, ARGs 在 3 种土壤中的绝对量丰度均符合底泥 > 包气带土 > 对照土。

② 双室一级动力学模型能够较好地拟合底泥及包气带土壤介质对游离态四环素类 ARGs 质粒的吸附过程, 拟合相关系数 $r^2 > 0.9$ 。吸附均经历了快吸附、慢吸附两个过程, 其中以快吸附为主。游离态 ARGs 质粒在土壤中的吸附平衡时间为 2.5 h。

③ Langmuir 模型对游离态 ARGs 质粒在底泥和包气带土壤介质中的吸附特性拟合效果最佳, 吸归属于易吸附类型。底泥对游离态 ARGs 质粒的吸附能力显著高于包气带土壤介质。对于四环素类抗性基因, 不同目的片段对其在包气带土壤介质中的平衡吸附量没有影响, 而底泥对携带 *tetO* 和 *tetW* 目的片段的质粒吸附量相对较高。

参考文献:

[1] Pruden A, Pei R, Storteboom H, et al. Antibiotic resist-

ance genes as emerging contaminants: Studies in northern Colorado[J]. Environ Sci Technol, 2006, 40(23): 7445 - 7450.

- [2] 马业萍. 再生水入渗过程抗生素及抗性基因的分布及关联性分析[D]. 北京: 清华大学, 2015.
- [3] Rizzo L, Manaia C, Merlin C, et al. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review[J]. Sci Total Environ, 2013, 447: 345 - 360.
- [4] 罗义, 周启星. 抗生素抗性基因(ARGs)——一种新型环境污染物[J]. 环境科学学报, 2008, 28(8): 1499 - 1505.
- [5] 蔡鹏. 土壤活性颗粒与 DNA 的相互作用及其对 DNA 稳定性、细胞转化和 PCR 扩增的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2007.
- [6] Cai P, Huang Q Y, Zhang X W. Interactions of DNA with clay minerals and soil colloidal particles and protection against degradation by DNase[J]. Environ Sci Technol, 2006, 40(9): 2971 - 2976.
- [7] 冯凌, 罗义. 底泥水体中适用于 PCR 的不同形态 DNA 的提取方法[J]. 生态毒理学报, 2010, 5(2): 280 - 286.
- [8] Mao D, Luo Y, Mathieu J, et al. Persistence of extracellular DNA in river sediment facilitates antibiotic resistance gene propagation[J]. Environ Sci Technol, 2014, 48(1): 71 - 78.
- [9] Pietramellara G, Franchi M, Gallori E, et al. Effect of molecular characteristics of DNA on its adsorption and binding on homoionic montmorillonite and kaolinite[J]. Biology and Fertility of Soils, 2001, 33(5): 402 - 409.



作者简介: 刘博(1991 -), 女, 山东临沂人, 硕士, 主要研究方向为地下水与土壤环境。

E-mail: liubo9011@163.com

收稿日期: 2017-08-04