

超声/过氧化氢联合对水中四环素抗性基因的去 除研究

朱光平, 陈日萍, 薛晨晨, 白洁, 范宏亮, 吴南翔

杭州医学院(浙江省医学科学院), 浙江 杭州 310013

摘要:

[背景] 四环素抗性基因是新型环境污染物抗生素抗性基因(ARGs)中最具有代表性的一种,常在抗性菌(ARB)中存在,广泛分布于水环境中,对人类健康和生态环境的稳定造成了巨大的潜在危害。

[目的] 探索新的、有效去除水环境中四环素抗性基因的方法,分析四环素抗性基因去除效果的影响因素,为环境中ARGs的去除方法提供参考。

[方法] 构建含有 *tetA*、*tetR* 这两种四环素抗性基因的大肠杆菌(*E.coli*),并将其接种在无菌水中($D_{600}=1.0$),分别用超声、过氧化氢(又称双氧水, H_2O_2)及超声/ H_2O_2 联合对两种抗性 *E.coli* 的抗性基因进行去除。超声处理设为3个组,分别为20次(C20)、40次(C40)、80次(C80),0次(C0)作为对照组; H_2O_2 处理设为3个组,分别为10、20、60 $mg \cdot L^{-1}$,以不加 H_2O_2 作为对照组;超声/ H_2O_2 联合处理为两种单独处理组的9种组合形式,对于有 H_2O_2 参与的处理组,设30 min(T30)、60 min(T60)、120 min(T120)、240 min(T240)、360 min(T360)5个时间点采样,以0 min(T0)作为对照组。每种处理条件的样本量设为3个,通过处理前后目标 *tetA*、*tetR* 数量级的减少量,即处理后密度(ρ)与初始密度(ρ_0)比值的常用对数值 [$\lg(\rho/\rho_0)$]来评估每种方法的去除效果。

[结果] 超声单独作用于抗性 *E.coli* 时发现随着超声次数的增加, *tetA*、*tetR* 下降的数量越多,但总的下降幅度不大:C80时, *tetA*、*tetR* 分别下降0.62、0.17个数量级,且超声对 *tetA* 的去除效率明显高于 *tetR* ($P < 0.05$)。在电镜下观察超声处理后抗性细菌表面产生球形凸起,部分细菌结构破碎。 H_2O_2 单独作用于抗性 *E.coli* 时发现 H_2O_2 剂量与处理时间之间具有交互作用 ($P < 0.05$);不同 H_2O_2 剂量之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$), H_2O_2 对抗性 *E.coli* 中的 *tetA*、*tetR* 的去除效果呈现出低浓度要优于高浓度的现象。 H_2O_2 对 *tetA* 的去除作用随着时间的累积十分明显,最高可降低0.51个数量级(10 $mg \cdot L^{-1}$ H_2O_2 , 360 min);而其对 *tetR* 却呈现出反向的增加作用,最高可增加0.45个数量级(60 $mg \cdot L^{-1}$ H_2O_2 , 240 min)。超声、 H_2O_2 联合作用于抗性 *E.coli* 时发现超声处理与 H_2O_2 剂量之间具有交互作用 ($P < 0.001$),呈现出超声次数越多, H_2O_2 剂量越低,去除效果越好的趋势:*tetA* (C80, 10 $mg \cdot L^{-1}$ H_2O_2 , 30 min)、*tetR* (C40, 10 $mg \cdot L^{-1}$ H_2O_2 , 120 min) 最高分别减少1.15、0.56个数量级。超声、 H_2O_2 共同作用30 min后, *tetA*、*tetR* 的数量随时间的累积变化并不明显 ($P > 0.05$),但不同剂量的 H_2O_2 对两种抗性基因的去除效果差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。

[结论] 超声处理可对大肠杆菌造成机械损伤,导致大肠杆菌破碎、内容物流出。 H_2O_2 对水溶液中的四环素抗性基因 *tetA*、*tetR* 有明显的去除作用,对 *E.coli* 内的 *tetA* 有较为明显的去除效果,对 *tetR* 有反向增加的趋势。与单一方法相比,超声联合 H_2O_2 可实现低浓度 H_2O_2 对抗性 *E.coli* 内 *tetA*、*tetR* 的有效去除。

关键词: 抗生素抗性基因;抗性菌;超声; H_2O_2 ;联合处理;去除方法

Removal of tetracycline resistance genes in water by ultrasound/hydrogen peroxide ZHU Guangping, CHEN Riping, XUE Chenchen, BAI Jie, FAN Hongliang, WU Nanxiang (Hangzhou Medical College, Hangzhou, Zhejiang 310013, China)

Abstract:

[Background] Tetracycline resistance genes are the most representative new environmentally-polluting antibiotic resistance genes (ARGs), mostly in the form of antibiotic resistant bacteria (ARB), and are widely distributed in the water environment, posing potential harms to human

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2021.20591

基金项目

国家自然科学基金青年基金(21904118);浙江省自然科学基金(LY17B050008)

作者简介

朱光平(1994—),女,硕士生;
E-mail: ping0204zhu@163.com

通信作者

范宏亮, E-mail: hlfan@zju.edu.cn

伦理审批

不需要

利益冲突 无申报

收稿日期 2020-12-21

录用日期 2021-04-13

文章编号 2095-9982(2021)07-0775-06

中图分类号 R113

文献标志码 A

► 引用

朱光平, 陈日萍, 薛晨晨, 等. 超声/过氧化氢联合对水中四环素抗性基因的去 除研究 [J]. 环境与职业医学, 2021, 38 (7): 775-780.

► 本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2021.20591

Funding

This study was funded.

Correspondence to

FAN Hongliang, E-mail: hlfan@zju.edu.cn

Ethics approval

Not required

Competing interests

None declared

Received

2020-12-21

Accepted

2021-04-13

► To cite

ZHU Guangping, CHEN Riping, XUE Chenchen, et al. Removal of tetracycline resistance genes in water by ultrasound/hydrogen peroxide[J].

Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2021, 38(7): 775-780.

► Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2021.20591

health and ecological environment stability.

[Objective] This study explores a new and effective method for removing tetracycline resistance genes in the water environment, and analyzes the factors affecting the removal, in order to provide reference for the removal of ARGs in the environment.

[Methods] *Escherichia coli* (*E.coli*) containing tetracycline resistance genes *tetA* and *tetR* was constructed and inoculated in sterile water ($D_{600}=1.0$). The two resistance genes were removed by ultrasound, H_2O_2 , and ultrasound/ H_2O_2 , respectively. Three groups of ultrasonic treatment were set: 20 times (C20), 40 times (C40), and 80 times (C80), taking 0 times (C0) as the control group. Three groups of H_2O_2 treatment were set: 10, 20, and 60 $mg\cdot L^{-1}$, with 0 $mg\cdot L^{-1}$ H_2O_2 as the control group. Ultrasound/ H_2O_2 combined treatment was divided into nine combinations of the two separate treatments. For the H_2O_2 treatment groups, samples were collected at five time points: 30 min (T30), 60 min (T60), 120 min (T120), 240 min (T240), and 360 min (T360), and 0 min (T0) was used as the control group. The sample size of each treatment was 3. The removal effect of each treatment was evaluated by the reduction of the magnitude order of target *tetA* and *tetR* before and after treatment [logarithm base 10 of the ratio of the concentration after (ρ) to before (ρ_0)].

[Results] When resistant *E.coli* was treated by ultrasound alone, it was found that with increasing number of repetitions, more *tetA* and *tetR* decreased, but the overall decrease was not significant: When ultrasound was administered 80 times, *tetA* and *tetR* decreased by 0.62 and 0.17 orders of magnitude respectively, and the removal efficiency of ultrasound on *tetA* was significantly higher than that on *tetR* ($P<0.05$). Under electron microscope, the surface of resistant bacteria showed spherical protuberance and some bacterial structures were broken after the ultrasound treatment. When H_2O_2 acted on resistant *E.coli* alone, there was a significant interaction between H_2O_2 dose and treatment time ($P<0.05$), and a significant difference among different H_2O_2 doses ($P<0.05$). The removal effect of low-concentration H_2O_2 on *tetA* and *tetR* in resistant *E.coli* was better than that of high-concentration H_2O_2 . H_2O_2 removed *tetA* over time by up to 0.51 orders of magnitude (10 $mg\cdot L^{-1}$ H_2O_2 , 360 min), but increased *tetR* by up to 0.45 orders of magnitude (60 $mg\cdot L^{-1}$ H_2O_2 , 240 min). When the resistant *E.coli* was treated with ultrasound and H_2O_2 combination, there was a significant interaction between ultrasound treatment repetition and H_2O_2 dose ($P<0.001$). Higher ultrasound repetitions and lower H_2O_2 doses were associated with better removal effects: *tetA* (C80, 10 $mg\cdot L^{-1}$ H_2O_2 , 30 min) and *tetR* (C40, 10 $mg\cdot L^{-1}$ H_2O_2 , 120 min) decreased by 1.15 and 0.56 orders of magnitude, respectively. After the combined treatment for 30 min, the changes of *tetA* and *tetR* were not significant over time ($P>0.05$). However, different doses of H_2O_2 showed significant differences in the removal effect on the two resistance genes ($P<0.001$).

[Conclusion] Ultrasonic treatment can cause mechanical damage to *E.coli*, resulting in *E.coli* fragmentation and entocyte outflow. H_2O_2 has an obvious removal effect on tetracycline resistance genes *tetA* and *tetR* in sterile water, as well as an obvious removal effect on *tetA* and a reverse increasing effect on *tetR* in *E.coli*. Compared with single treatment, ultrasound combined with low-concentration H_2O_2 can effectively remove *tetA* and *tetR* in resistant *E.coli* with a higher efficiency.

Keywords: antibiotic resistance gene; resistant bacteria; ultrasound; H_2O_2 ; combined treatment; removal method

由于抗生素的普适性和全球微生物的流动性, 环境中抗性菌 (antibiotic resistant bacteria, ARB) / 抗生素抗性基因 (antibiotic resistance genes, ARGs) 大量产生且广泛蓄积, 促使“超级细菌”的产生, 对生态稳定和人类健康造成了巨大的潜在危害^[1]. 近年来, ARGs 的去除成为研究的热点问题^[2]. ARB 作为 ARGs 的主要载体, 菌体特有的细胞壁为 ARGs 在各种不利环境中提供了“保护”, 导致常规的水处理技术如紫外照射、氯化消毒、臭氧氧化等需消耗大部分剂量用以去除细菌细胞壁、细胞膜, 极大地影响了其对 ARGs 的去除效果^[3]. 研究表明, 超声能通过机械冲击、空化作用等破除细菌结构^[4-5], 而过氧化氢 (又称双氧水, H_2O_2) 是水处理工艺中常用的氧化剂, 其产生的 $HO\cdot$ 可对细菌的 ARGs 片段造成破坏, 通过文献查阅发现, 多数研究中 H_2O_2 的使用剂量比较大^[6-7]. 对此, 本研究拟引入超声法以尽可能减少细菌细胞壁、细胞膜等的影响, 联合传统的 H_2O_2 去除技术, 以期在较低的 H_2O_2 浓度范围内探究超声联合 H_2O_2 对水中菌内四环素抗性基因 *tetA*、*tetR* 的去除效果, 为发展新的、更高效节能的 ARGs 去除工艺提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

Hiief UNICON[®] qPCR SYBR Green Master Mix (抗体法, Low Rox) (上海翊圣科技有限公司, 中国), KOD One[™] PCR Master Mix (东洋纺生物科技有限公司, 日本), GeneRed Nucleic Acid Dye、高纯度质粒大提试剂盒、血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒 (TIANGEN, 中国), pMD-19T (Simple)、DNA Ligation Kit Ver.2.1 (Takara, 日本), 30% (质量分数) H_2O_2 (分析纯) (生工生物工程股份有限公司, 中国), 牛肝过氧化氢酶 (2 000~5 000 $U\cdot mg^{-1}$) (Sigma, 美国), 超声波细胞粉碎机 (宁波新芝生物科技股份有限公司, 中国), 荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems, 美国), 扫描电子显微镜 (JEOL, 日本)。

1.2 方法

1.2.1 抗性菌株的构建与培养 通过 PCR 技术从购买的 RP4 质粒上扩增出 *tetA*、*tetR* 完整片段, 连接至 pMD-19T 载体上, 经测序验证后转化至感受态大肠杆菌中, 涂布于 LB (Luria-Berteni) 固体培养基 (LB 板) 上, 于细菌培养箱中过夜培养, 挑选白色菌落接种于 LB 液

体中,反复两次,经PCR验证后于37°C,220转·min⁻¹条件下在恒温摇床中培养16h,取800μL菌液与200μL灭菌甘油混匀,装于1.5mL冻存管中在-80°C冰箱保存,在使用时重新复苏。

1.2.2 去除体系的构建 (1) 超声处理:取在恒温摇床培养16h的LB菌液10mL于50mL离心管中,1789×g水平离心10min,倒掉上清液,用无菌水震荡清洗两次,备用。本研究以50mL的离心管为基本单元,每个离心管的菌液体积为10mL,菌液初始密度通过 $D_{600}=1.0$ 来保持恒定,约为 1.0×10^9 CFU·mL⁻¹[8],使用JY92-II超声波细胞粉碎机对菌液进行处理,处理条件为功率200W,超声3s,停顿8s计为1次,整个超声过程在冰上进行,以消除超声产生的热效应。取超声0次(C0)、20次(C20)、40次(C40)、80次(C80)的水样1mL在电镜下观察,进行PCR检测。(2) H₂O₂处理:将构建的pMD-19T/*tetA*、pMD-19T/*tetR*质粒溶于10mL水溶液中,使其初始密度分别为0.53、0.85ng·μL⁻¹。取30%(质量分数)的H₂O₂溶液89.1、178.2、534.6μL于溶液内,使H₂O₂质量浓度分别为10、20、60mg·L⁻¹[9],混匀后开始计时,于0min(T0)、30min(T30)、60min(T60)、120min(T120)、240min(T240)、360min(T360)时取20μL水样,立即加入2000~5000U·mg⁻¹牛肝过氧化氢酶20μL·mL⁻¹以中和未消耗的H₂O₂,保存于-20°C。每个时间点仅从每个体系取样一次,以维持体系的稳定性。水溶液中抗性大肠杆菌的去除与抗性质粒的去除类似,每种处理条件下取样1mL,保存于-20°C条件下。(3) 超声/H₂O₂联合处理:超声处理过后,待体系恢复室温后加入H₂O₂,于T0、T30、T60、T120、T240、T360时取1mL水样,立即加入牛肝过氧化氢酶终止H₂O₂的反应,保存于-20°C。

1.2.3 DNA的提取与保存 依据血液/细胞/组织基因组DNA提取试剂盒说明书提取水样中的DNA,取1mL未经处理的水样DNA作为总*tetA*、*tetR*量的参照,取经过超声20次、40次、80次的水样作为超声/H₂O₂处理组的另一对照。提取DNA后,将其保存在-20°C。

1.2.4 PCR分析 用高纯度质粒大提试剂盒提取质粒,用Nano Drop 2000分光光度计(V1.0)测定核酸浓度与纯度,选择 $D_{260/280}$ 为1.8~2.0的质粒作为标准品,系列稀释为10¹~10⁶,按照荧光定量试剂盒说明书配置成20μL qPCR反应(SYBR Green Master Mix 10μL;正向引物0.4μL;反向引物0.4μL;模板DNA 2μL;ddH₂O 7.2μL),得出标准曲线用以确定水样中*tetA*、*tetR*的

密度。引物由杭州擎科生物技术有限公司设计并合成,各引物序列见表1。反应条件为:95°C预变性5min;95°C变性30s,57.4°C退火延伸30s,72°C延伸30s,35个循环;72°C最后延伸7min。

表1 实时荧光定量PCR的引物序列
Table 1 Primer sequences for real-time PCR

基因名称	引物序列	片段长度/bp
<i>tetA</i>	正向: 5'-TCTGGTTCACCTCGAACGACG-3'	167
	反向: 5'-TGATGGCGTAGTCGACAGTG-3'	
<i>tetR</i>	正向: 5'-CGATCAGAAATGAGCGCCAG-3'	178
	反向: 5'-GTAGACGGTCTGACGACACG-3'	

1.3 实验设计

首先构建含有*tetA*、*tetR*的大肠杆菌(*E.coli*),并将其接种在无菌水中($D_{600}=1.0$),将加入抗性*E.coli*的水溶液置于不同超声频率下处理,超声频数分别为C0、C20、C40、C80,处理完毕后取1mL菌液保存于-20°C。加入10、20、60mg·L⁻¹ H₂O₂进行处理,收集超声处理前、后的菌液,收集时间为T30、T60、T120、T240、T360,各取1mL菌液保存于-20°C,取未经任何处理的菌液1mL,用于计算总*tetA*、*tetR*的量。将提取的质粒稀释于无菌水中,接受相同条件下H₂O₂的处理,验证超声破壁后H₂O₂直接作用于水溶液中*tetA*、*tetR*片段的效果。每组实验重复3次。

1.4 统计学分析

利用Excel、SPSS 16.0、Graphpad prism 8.0.2 (263)对数据进行统计分析,对超声处理的数据采用单因素*t*检验;对有时间因素参与统计分析的数据用重复测量的多因素方差分析,用两因素方差分析进行多因素组内、组间差异性分析,用Turkey检验对检测水准进行校正,检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧)。去除效果以处理前后抗性基因的减少量,即处理后的密度(ρ)与初始密度(ρ_0)比值的常用对数值 $[\lg(\rho/\rho_0)]$ 来体现。

2 结果

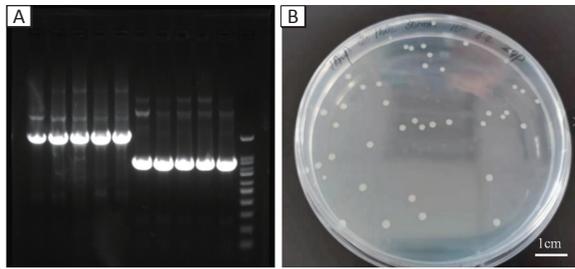
2.1 抗性*E.coli*的构建与培养

图1A为*tetA*、*tetR*与pMD-19T成功连接后的结果图,通过蓝白斑实验(图1B)挑选成功转化的抗性*E.coli*大量培养,进行抗性质粒的提取和后续抗性*E.coli*的去除实验。

2.2 超声处理

图2为超声作用于四环素抗性*E.coli*的结果图,可见随着超声次数的增加,*tetA*、*tetR*下降的数量越多

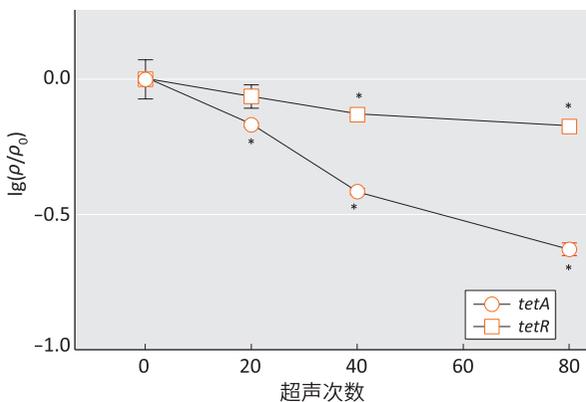
但幅度不大 ($P < 0.05$), 超声对 *tetA* 的去除效果优于 *tetR*。



[注] A: 电泳图, 左为 *tetA*, 中为 *tetR*, 右为 marker, *tetA*、*tetR* 分别对应 1000、800 bp 的条带。B: 蓝白斑实验。

图1 pMD-19T 与 *tetA*、*tetR* 成功连接后琼脂糖凝胶电泳图和蓝白斑实验

Figure 1 Agarose gel electrophoresis and blue-white screening after successful connection of pMD-19T with *tetA* and *tetR*

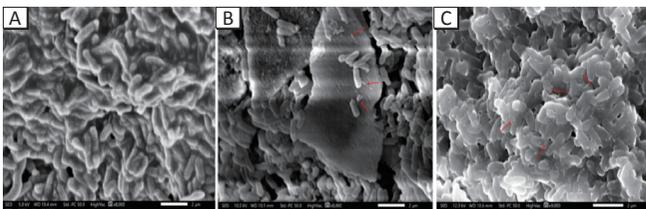


[注] *: 与对照组 (C0) 相比, $P < 0.05$ 。

图2 超声处理抗性 *E. coli* 结果图 ($n=3$)

Figure 2 Results of ultrasonic treatment of resistant *E. coli* ($n=3$)

图3为经过超声处理后抗性菌液在电镜下的视图, 可见超声处理后, 多数细菌表面产生球形凸起, 部分细菌结构破碎。



[注] A: 对照组; B: C80组, 箭头所示为 *E. coli* 的细菌碎片; C: C80组, 箭头所示为 *E. coli* 表面产生球形凸起。

图3 *E. coli* 超声处理后在电镜下的视图

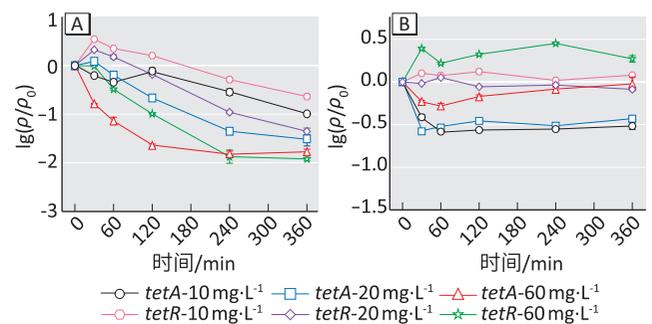
Figure 3 *E. coli* under electron microscope after ultrasonic treatment

2.3 H₂O₂ 处理

2.3.1 H₂O₂ 处理水溶液中的 *tetA*、*tetR* 图4A为 H₂O₂ 单独作用于抗性基因 *tetA*、*tetR* 的效果图, 经过统计分析可知 H₂O₂ 剂量与处理时间之间存在交互作用 ($P < 0.001$), *tetA*、*tetR* 数量会随着 H₂O₂ 剂量的增大和时

间的累积而减少 ($P < 0.05$), 但减少的趋势逐渐减慢, 最终趋于平缓。与 *tetR* 相比, *tetA* 的去除效率更高, 在 10、20 mg·L⁻¹ H₂O₂ 作用 0~120 min 时, *tetR* 的数量有轻微的上升, 但整体去除效果仍十分明显。通过检测数据可知, 在 60 mg·L⁻¹ H₂O₂ 作用 360 min 时 *tetA*、*tetR* 的去除效果最好, 分别减少了 1.77 和 1.99 个数量级。

2.3.2 H₂O₂ 处理 *E. coli* 内的 *tetA*、*tetR* 图4B为 H₂O₂ 作用于抗性 *E. coli* 的效果图。经过统计分析发现 H₂O₂ 剂量与处理时间之间具有交互作用 ($F=44.26$, $P < 0.05$), 不同 H₂O₂ 剂量之间有差异 ($F=667.8$, $P < 0.05$)。从图中可见 H₂O₂ 对抗性 *E. coli* 中的 *tetA*、*tetR* 呈现出低浓度去除效果要优于高浓度的现象。整体上, H₂O₂ 对 *tetA* 的去除作用随着时间的累积而增强, 而其对 *tetR* 却呈现出反向的增加作用, 且这种现象并没有随着时间的累积而有所改变。



[注] 图A: *tetA*、*tetR* 处理时间与 H₂O₂ 剂量之间存在交互作用, $F=101.40$, $P < 0.001$, $F=141.50$, $P < 0.001$; 同一时间不同 H₂O₂ 剂量组之间均具有差异, $P < 0.05$ 。图B: H₂O₂ 剂量与处理时间之间具有交互作用 ($F=44.26$, $P < 0.05$), 不同 H₂O₂ 剂量之间有差异 ($F=667.8$, $P < 0.05$)。

图4 H₂O₂ 对水溶液 (A) 和 *E. coli* (B) 中 *tetA*、*tetR* 的去除效果 ($n=3$)

Figure 4 Removal of *tetA* and *tetR* in sterile water (A) and *E. coli* (B) by H₂O₂ ($n=3$)

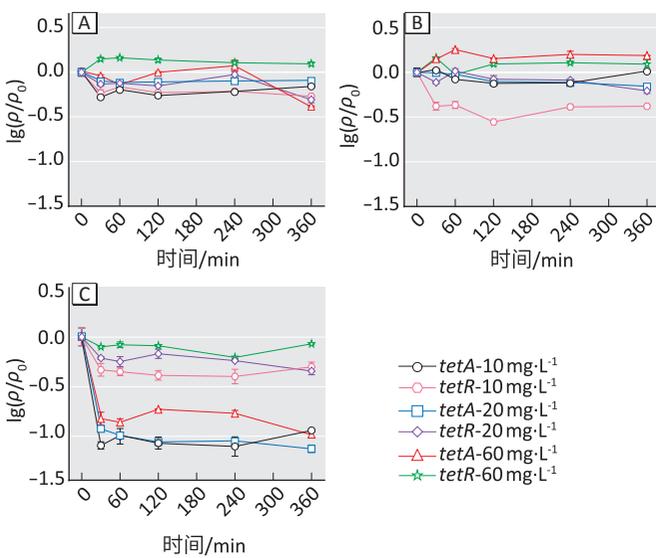
2.4 超声/H₂O₂ 联合处理 *E. coli* 内的 *tetA*、*tetR*

图5显示超声/H₂O₂ 联合作用于抗性 *E. coli* 随处理时间的变化关系, 可发现在共同作用的前 30 min 已决定了整个去除体系的发展趋势, 以 30 min 为节点, 在 30 min 以后超声/H₂O₂ 的联合作用随时间的累积变化并不明显 ($P > 0.05$), 但不同剂量的 H₂O₂ 对两种抗性基因的去除效果呈现出差异 ($P < 0.001$)。

通过与图4B相比, 可发现超声与 H₂O₂ 共同作用时, 并没有改变 H₂O₂ 低浓度去除效果优于高浓度的现象, 但超声的介入有效抑制了 *tetR* 基因反向增加的趋势。整体上可得出, 超声与 H₂O₂ 的联合作用 (图6) 对 *tetA*、*tetR* 的去除效果要优于单一方法 (图2,

图4B)。在本次实验中, 超声、H₂O₂及其联合作用最多可使抗性 *E. coli* 中的 *tetA* 基因减少 1.15 个数量级 (C80, 10 mg·L⁻¹ H₂O₂, 30 min), *tetR* 基因减少 0.56 个数量级 (C40, 10 mg·L⁻¹ H₂O₂, 120 min)。

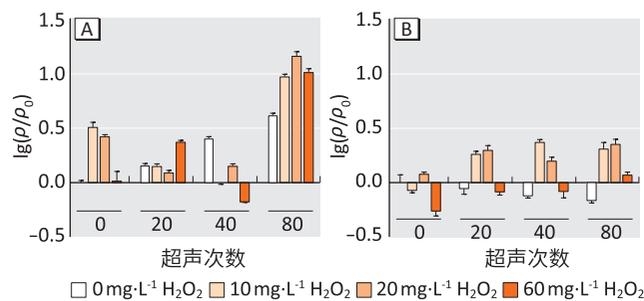
图 6 为超声/H₂O₂ 联合作用于抗性 *E. coli* 360 min 的结果图。经过统计分析发现, 超声处理与 H₂O₂ 剂量之间具有交互作用 ($F=230.60, P<0.001$), H₂O₂ 的作用规律不明显, 体系整体呈现出超声次数越多, 去除效果越好的趋势。相比于 *tetR* 基因, *tetA* 的这种趋势尤为明显。



[注] 图 A、B、C 分别为超声 20、40、80 次后加入 H₂O₂ 后的效果图。 *tetA*、*tetR* 处理时间与 H₂O₂ 剂量之间存在交互作用, $P<0.05$; 同一时间不同 H₂O₂ 剂量组之间差异均具有统计学意义, $P<0.001$ 。

图 5 超声/H₂O₂ 联合作用于 *E. coli* 的结果 (n=3)

Figure 5 Results of combined ultrasound/H₂O₂ treatment on *E. coli* (n=3)



[注] *tetA* (A)、*tetR* (B) 超声次数与 H₂O₂ 剂量之间有显著的交互作用, $F=230.60, P<0.001$, 组内、组间同一变量两两比较均具有显著性差异, $P<0.05$ 。

图 6 超声/H₂O₂ 联合作用于抗性 *E. coli* 360 min 的效果图 (n=3)
Figure 6 Effects of combined ultrasound/H₂O₂ treatment on resistant *E. coli* for 360 min (n=3)

3 讨论

本次研究发现超声处理可对大肠杆菌结构造成

破坏和损伤, 导致大肠杆菌破碎、内容物流出。H₂O₂ 对水溶液中的四环素抗性基因 *tetA*、*tetR* 有明显的去除作用, 但对 *E. coli* 内的 *tetA*、*tetR* 的去除作用不大。与单一方法相比, 超声联合 H₂O₂ 可实现低浓度 H₂O₂ 对抗性 *E. coli* 内 *tetA*、*tetR* 的有效去除。

近年来, 水体中 ARB 与 ARGs 的去除一直是热点问题, 不少研究报道了不同水处理工艺对 ARB 的去除作用^[10-11], 其中多数是通过常规的消毒过程如氯化、紫外照射、臭氧氧化等, 仅有少数文献论述了不同工艺在水/废水处理过程中因为 ARGs 残留而导致的其转移潜力增强的问题^[10, 12]。研究表明, 传统工艺常用的氧化剂在环境耐受的剂量范围内很难实现明显的去除效果, 其往往大量消耗在 ARB 细胞结构的破坏上, 直接导致遗传物质的释放, 特别是水中的 ARGs, 它们可能转移到植物^[13] 或随着废水再利用回归环境^[14-15]。而高剂量氧化剂的单独使用不仅极大地增加了成本, 不能实现预期的经济效益, 残留在水体中的氧化剂还可能对水中的动植物造成伤害^[13]。

在本研究中, 超声处理对 *tetA*、*tetR* 的去除效果并不明显, 但通过扫描电镜观察, 可以证明超声对 ARB 细胞结构具有良好的破坏作用, 这与 Wang 等^[16] 的研究结果一致。本研究将 H₂O₂ 直接作用于水中的抗性质粒, 去除效果十分显著, 但将 H₂O₂ 作用于菌液时, 效果却大打折扣。通过文献调研发现, 即使将氧化剂的剂量提高数倍, 仍然可能得不到预期的效果。Cengi 等^[6] 在研究不同氧化剂对合成污染牛粪中 ARGs 的去除效果时发现, 尽管 H₂O₂ 和 Fe²⁺ 的浓度非常高 (分别为 1 700、280 mg·L⁻¹), 但经过 24 h 处理后的效果并不明显。Ferro 等^[7] 的研究也发现高剂量的氧化剂不会导致 ARB 的失活和 ARGs 的去除。Koivunen 等^[12] 的研究表明: 一般情况下, 氧化剂首先会攻击微生物的细胞壁、细胞膜或运输系统, 然后才会攻击生物内部, 如 RNA 和 DNA。因此推测, 抗性 *E. coli* 细胞壁、细胞膜等结构极大地降低了 H₂O₂ 的有效作用。基于上述情况, 本研究用超声联合 H₂O₂ 对抗性 *E. coli* 内的 *tetA*、*tetR* 进行去除, 结果证明, 超声消除了 *E. coli* 细胞壁、细胞膜的影响, 使较低浓度的 H₂O₂ 就可实现抗性基因的去除。这赋予了超声/H₂O₂ 联合工艺在实际应用中的意义, 同时也可避免高浓度的氧化剂对水体中的动植物造成伤害^[13]。

当然, 在研究中还存在以下问题: 当 H₂O₂ 加入体系后, 其会与菌内过氧化氢酶生成氧气^[17], 这可能会

影响 H₂O₂ 对 ARGs 的有效作用；本实验的检测方法主要以 qPCR 为主，引物可检测的片段仅为目标基因全长的一部分，这也可能是检测到的 *tetR* 基因（序列短）出现反向增加的部分原因，实际去除效果可能与检测到的有些出入。

综上所述，超声/H₂O₂ 联合作用较单一方法能够实现一定程度的增效，两种方法在现实生活的水处理方法中都有应用，这拉近了实验室研究到最终水厂应用的距离，具有一定的推广前景。本课题组将会在接下来的研究中更深入地探讨相关问题，以期能为去除环境中 ARGs 的方法提供更多参考。

参考文献

- [1] 朱光平, 吴南翔, 范宏亮. 环境中抗生素抗性基因的去方法 [J]. 环境与职业医学, 2019, 36 (12) : 1168-1174.
ZHU GP, WU NX, FAN HL. Removal of antibiotic resistance genes in environment [J]. Environ Occup Med, 2019, 36 (12) : 1168-1174.
- [2] DAVIES J, DAVIES D. Origins and evolution of antibiotic resistance [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2010, 74 (3) : 417-433.
- [3] 智建辉, 宋晟宇, 段雅欣. 城镇污水处理厂进水抗生素抗性基因的控制与削减研究 [J]. 水资源开发与管理, 2018 (11) : 22-27.
ZHI JH, SONG SY, DUAN YX. Research on control and reduction of antibiotic resistance genes in urban wastewater treatment plants [J]. Water Resour Dev Manage, 2018 (11) : 22-27.
- [4] 杨永青, 许继飞, 董泰音, 等. 水体和土壤环境中抗生素抗性基因 (ARGs) 的污染特征和消除 [J]. 北方农业学报, 2018, 46 (3) : 76-82.
YANG YQ, XU JF, DONG TY, et al. Pollution property and reduction of antibiotic resistance genes (ARGs) in aquatic and soil environment [J]. J North Agric, 2018, 46 (3) : 76-82.
- [5] SARKINAS A, SAKALAUSKIENE K, RAISUTIS R, et al. Inactivation of some pathogenic bacteria and phytoviruses by ultrasonic treatment [J]. Microb Pathog, 2018, 123 : 144-148.
- [6] CENGI ZM, USLU MO, BALCI OGLUI. Treatment of *E.coli* HB101 and the *tet M* gene by Fenton's reagent and ozone in cow manure [J]. J Environ Manage, 2010, 91 (12) : 2590-2593.
- [7] FERRO G, GUARINO F, CASTIGLIONE S, et al. Antibiotic resistance spread potential in urban wastewater effluents disinfected by UV/H₂O₂ process [J]. Sci Total Environ, 2016, 560-561 : 29-35.
- [8] POGLIANO J, HO TQ, ZHONG Z, et al. Multicopy plasmids are clustered and localized in *Escherichia coli* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98 (8) : 4486-4491.
- [9] FERRO G, GUARINO F, CICATELLI A, et al. β -lactams resistance gene quantification in an antibiotic resistant *Escherichia coli* water suspension treated by advanced oxidation with UV/H₂O₂ [J]. J Hazard Mater, 2017, 323 : 426-433.
- [10] YUAN QB, GUO MT, YANG J. Fate of antibiotic resistant bacteria and genes during wastewater chlorination : implication for antibiotic resistance control [J]. PLoS One, 2015, 10 (3) : e0119403.
- [11] CZEKALSKI N, IMMINGER S, SALHI E, et al. Inactivation of antibiotic resistant bacteria and resistance genes by ozone : from laboratory experiments to full-scale wastewater treatment [J]. Environ Sci Technol, 2016, 50 (21) : 11862-11871.
- [12] KOIVUNEN J, HEINONEN-TANSKI H. Inactivation of enteric microorganisms with chemical disinfectants, UV irradiation and combined chemical/UV treatments [J]. Water Res, 2005, 39 (8) : 1519-1526.
- [13] SICHEL C, FERNÁNDEZ-IBÁÑEZ P, DE CARA M, et al. Lethal synergy of solar UV-radiation and H₂O₂ on wild *Fusarium solani* spores in distilled and natural well water [J]. Water Res, 2009, 43 (7) : 1841-1850.
- [14] CHEN J, YING GG, WEI XD, et al. Removal of antibiotics and antibiotic resistance genes from domestic sewage by constructed wetlands : effect of flow configuration and plant species [J]. Sci Total Environ, 2016, 571 : 974-982.
- [15] 朱光平, 薛晨晨, 范宏亮, 等. 环境中抗生素抗性基因研究进展 [J]. 预防医学, 2020, 32 (11) : 1121-1125.
ZHU GP, XUE CC, FAN HL, et al. Research progress of antibiotic resistance genes in environment [J]. J Prev Med, 2020, 32 (11) : 1121-1125.
- [16] WANG M, LI R, ZHAO Q. Distribution and removal of antibiotic resistance genes during anaerobic sludge digestion with alkaline, thermal hydrolysis and ultrasonic pretreatments [J]. Front Environ Sci Eng, 2019, 13 (3) : 43.
- [17] GUO C, WANG K, HOU S, et al. H₂O₂ and/or TiO₂ photocatalysis under UV irradiation for the removal of antibiotic resistant bacteria and their antibiotic resistance genes [J]. J Hazard Mater, 2017, 323 : 710-718.

(英文编辑：汪源；责任编辑：丁瑾瑜)