



文章栏目：相关研究

DOI 10.12030/j.cjee.202212137 中图分类号 X703 文献标识码 A

杨正卿, 杨锋娟, 孔雨杰, 等. 纳米金属对污水处理系统中磺胺耐药基因和耐药菌的影响及其机理[J]. 环境工程学报, 2023, 17(6): 2088-2096. [YANG Zhengqing, YANG Fengjuan, KONG Yujie, et al. Effects and mechanisms of metallic nanoparticles on the fate of sulfanilamide antibiotic resistance genes and resistant bacteria in wastewater treatment system[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2023, 17(6): 2088-2096.]

纳米金属对污水处理系统中磺胺耐药基因和耐药菌的影响及其机理

杨正卿¹, 杨锋娟¹, 孔雨杰¹, 段毅^{1,2}, 高媛媛³, 唐振平³, 庄媛⁴, 周帅^{1,2,3,✉}

1. 南华大学土木工程学院, 衡阳 421001; 2. 南华大学污染控制与资源化技术湖南省高校重点实验室, 衡阳 421001; 3. 南华大学稀有金属矿产开发与废物地质处置技术湖南省重点实验室, 衡阳 421001; 4. 中国科学院生态环境研究中心, 中国科学院饮用水科学与技术重点实验室, 北京 100085

摘要 细菌耐药性和纳米材料污染为新兴环境问题。细菌耐药性遗传载体——耐药基因 (ARGs) 广泛存在于污水处理系统中, 且已被证明与金属纳米材料密切相关。采用实时荧光定量 PCR 技术, 探究了纳米零价铁 (nZVI) 和纳米氧化锌 (nZnO) 对污水处理系统中磺胺类耐药菌 (ARB) 和 ARGs 的分布特征的影响。结果表明, 50 mg·L⁻¹ nZVI 和 nZnO 暴露均有利于削减磺胺 ARB 浓度数。与对照组相比, nZVI 和 nZnO 暴露后污泥中 *sul1* 丰度增加了 0.25%~16.21%, 而 *sul2* 出现明显削减 (1.51%~15.47%)。此外, 50 mg·L⁻¹ nZVI 会导致游离态胞外 ARGs 大幅削减。nZVI 和 nZnO 暴露通过富集污水处理系统中的 *int11*、改变细胞膜通透性和调节细菌转录能力促进 *sul1* 的增殖。本研究结果阐明了典型纳米金属对污水处理系统中 ARB 和不同形态 ARGs 消长的影响及其机制, 可为制定有效调控和全面削减污水处理系统中耐药污染策略提供参考。

关键词 耐药基因 (ARGs); 耐药菌 (ARB); 纳米零价铁 (nZVI); 纳米氧化锌 (nZnO); 污水处理系统

细菌耐药性感染日益影响人类健康和经济发展^[1-2]。英国卫生部报告显示, 若不采取有效措施, 到 2050 年, 细菌耐药性将导致全球每年出现 1 000 万人死亡^[3]。耐药基因 (antibiotic resistance genes, ARGs) 是细菌获得耐药表型的关键遗传载体, 故被列为全球重要的新兴环境污染物之一^[4-6]。

城市水系统中的污水处理系统被证明是 ARGs 的重要储存库之一, 同时也是 ARGs 污染传播至受纳环境的主要来源^[7-8]。在污水处理系统中, ARGs 的产生和增殖与污水中选择压密切相关^[8-9]。已有研究报道了纳米银^[10-11]、纳米铜/氧化铜^[12-14]、纳米氧化锌 (nZnO)^[15] 和纳米零价铁 (nZVI)^[16-17] 等纳米金属及氧化物对污水处理系统活性污泥中总体 ARGs 分布与归趋的影响。MILLER 等^[10] 通过实时荧光定量聚合酶链反应 (qPCR) 证明, 环境浓度纳米银 (0.01~1.0 mg·L⁻¹) 对厌氧消化器中四环素和磺胺类 ARGs 的丰度无显著影响。MA 等^[11] 通过宏基因组测序分析发现, 经过 56 d 的纳米银 (0.1~20 mg·L⁻¹) 驯化, 活性污泥中绝大多数类型 ARGs 的分布无明显变化, 但可促使氨基糖苷类 ARGs (如 *strA*) 和吡啶黄类 ARGs (*acrB*) 分别提高 300%、50%。此外, ZHANG 等^[15] 发现, nZnO 颗粒导致污泥厌氧消化系统中可移动遗传元件 (mobile genetic elements, MGEs) 绝对丰度增加了

收稿日期: 2022-12-30; 录用日期: 2023-01-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (52100219); 湖南省教育厅项目 (21A0288); 污染控制与资源化研究国家重点实验室开放课题 (PCRRF21001)

第一作者: 杨正卿 (1998—), 男, 硕士研究生, 602511451@qq.com; ✉通信作者: 周帅 (1987—), 男, 博士, 副教授, zs402606665@126.com

354.70%, 因此可能会增加 ARGs 的传播风险。最近两项研究基于相关性分析得出, nZVI 主要通过改变 ARGs 潜在微生物寄主降低氯霉素废水处理系统^[16]和厌氧消化系统^[17]中 ARGs 的丰度。需要明确的是, 污水处理系统中 ARGs 根据其形态可分为污泥细胞内 ARGs (iARGs)、污泥细胞外附着态 ARGs (aeARGs) 和污水细胞外游离态 ARGs (feARGs)^[18-19]。ARGs 的赋存形态不同, 其增殖与传播方式亦不相同^[19-20]。iARGs 主要通过细胞分裂或水平接合进行增殖, 而 aeARGs 和 feARGs 主要来源于细胞死亡裂解或主动分泌, 并能借助转化和转导机制传播^[19, 21-22]。然而, 金属纳米粒子对污水处理系统中不同形态 ARGs 增殖与传播能力的影响及其机制尚未探明。

本研究采用抗生素敏感性测验和 qPCR 考察不同质量浓度 nZVI 和 nZnO 暴露对污水处理系统中典型磺胺类耐药菌 (ARB) 浓度和不同形态 ARGs 丰度的影响, 并通过检测细胞膜通透性、ARGs 表达水平及典型 MGEs (*intI1*) 分布特征阐明 nZVI 和 nZnO 暴露下 ARGs 的转变机制, 有助于揭示金属纳米粒子和细菌耐药性的双重新兴环境污染效应, 以期研发高效控制污水处理系统中耐药污染的策略提供参考。

1 材料与方法

1.1 样品与材料

活性污泥取自某主体工艺为厌氧/缺氧/好氧-膜生物反应器的污水处理厂。活性污泥混合液挥发性悬浮物浓度 (MLVSS) 为 $2.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。nZVI 和 nZnO 等试剂购自阿拉丁 (Aladdin, 中国)。试剂级别均为分析纯。

1.2 暴露实验设计

将活性污泥静置后去上清液, 采用质量分数为 0.85% 的 NaCl 清洗 1 次。用量筒量取 300 mL 活性污泥混合液至 500 mL 锥形瓶中。参照某污水处理厂进水基质水平添加 CH_3COONa $171.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (相当于 COD 为 $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。然后, 投加适量预先超声分散 (5 min) 的 nZVI 和 nZnO 储备液至锥形瓶中, 使其最终质量浓度维持为 1 和 $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (分别代表污水处理厂中环境检出水平和污水生物处理胁迫实验质量浓度)^[23-25]。最后, 将其置于培养箱 (ZQZY-70BF, 中国) 中恒温振荡 ($20 \text{ }^\circ\text{C}$, $150 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$) 反应 12 h。运行模式参照某实际污水处理厂采用 6 h 厌氧+6 h 好氧的曝气方式, 曝气量控制为 $500 \text{ L}\cdot(\text{m}^3\cdot\text{min})^{-1}$ 。分别于 0.5、2、4、6、8、10 和 12 h 取污泥混合液用于 ARB 浓度检测及细胞膜完整性检测; 同时, 取污泥混合液进行离心, 获得的污泥沉淀和上清液保存于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$, 用于 RNA 和不同形态 DNA 提取。

1.3 ARB 浓度检测

采用琼脂稀释法^[26]检测 ARB 相对浓度。采用无菌 0.85% (质量分数) NaCl 溶液 10 倍梯度稀释活性污泥混合液至适当细菌浓度。取 1 mL 稀释后的样品涂布于含有磺胺 (终浓度为 $512 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 MH 琼脂上。抗生素浓度遵循临床和实验室标准协会指南^[27]的最低抑制浓度。同时, 取 1 mL 0.85% (质量分数) 无菌 NaCl 溶液涂布在无菌 MH 琼脂平板上用空白对照。最后, 将平板倒置于 $(36\pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ 生化培养箱培养 (48 ± 2) h。选取菌落数为 30~300 菌落形成单位的平板计数菌落总数。ARB 相对浓度为添加抗生素的实验组菌落数与抗生素空白组菌落数 (即异养菌浓度) 的比值。

1.4 不同形态 DNA 提取与检测

取 5 mL 污泥混合液离心 ($4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $4\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$) 处理 5 min, 保留污泥沉淀, 并将上清液转移至新的离心管中。采用离子交换树脂法^[28]提取污泥沉淀中的细胞外附着态 DNA (aeDNA)。首先, 向污泥沉淀加入适量离子交换树脂 ($70 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ MLVSS), 补充磷酸盐缓冲液至 5 mL; 置于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 磁力水浴槽内以 $600 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 处理 8 h 后, 并于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、以 $10\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min; 取上清液过 $0.22 \text{ }\mu\text{m}$ 滤膜, 即得 aeDNA 粗提取液。接着, 取污泥沉淀, 采用十二烷基硫酸钠 (SDS)-高盐法提取胞内 DNA (iDNA)^[29]。向污泥沉淀中加入 $810 \text{ }\mu\text{L}$ iDNA 抽提液和 $2 \text{ }\mu\text{L}$ 蛋白酶 K ($20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 标准品), 并于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、以 $225 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 水平振荡 30 min; 加入 $60 \text{ }\mu\text{L}$ 20% (质量分数) SDS, 置于 $65 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴锅中水浴 2 h; 室温离心 ($10\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、10 min) 后, 取上清液转移至新的 2 mL 离心管中; 向剩余沉淀加入 $180 \text{ }\mu\text{L}$ iDNA 抽提缓冲液和 $20 \text{ }\mu\text{L}$ 20% (质量分数) SDS, 重复上述处理 2 次; 合并 3 次处理获得的上

清液,即为 iDNA 粗提取液。最后,采用苯酚-氯仿法^[30]进一步纯化 aeDNA 和 iDNA 粗提取液。采用超微量分光光度计 (Nanodrop 2 000, 美国) 测定 DNA 浓度与纯度^[31-32]。纯化后 aeDNA 和 iDNA 样品保存于 -20 °C 冰箱。采用 0.22 μm 滤膜过滤上述污泥混合液离心获得的上清液。取 4 mL 滤液至 50 mL 离心管中,采用乙醇沉淀法^[33]分离游离态 DNA (feDNA)。首先,向离心管中添加 2 mL 醋酸铵 (终浓度 7.5 mol·L⁻¹) 和 12 mL 4 °C 预冷无水乙醇,颠倒混匀后于冰上静置 1 h。接着,于 4 °C、以 14 000 r·min⁻¹ 离心 30 min 后,小心移除上清液;加入 1 mL 4 °C 预冷的 70% (体积分数) 乙醇,并将乙醇与沉淀混合液转移到一个新的 2 mL 离心管中;重复此操作 1 次,使 feDNA 完全转移至 2 mL 离心管中。最后,将上述 DNA 悬浮液离心 (4 °C、14 000 r·min⁻¹、10 min) 后,用 70% (体积分数) 乙醇洗涤,并将 feDNA 沉淀悬浮于 50 μL 无菌无酶水中。利用 PicoGreen dsDNA Quantitation Kit (Invitrogen, 中国) 和多功能酶标仪 (BioTek, 美国) 测定 feDNA 浓度。

1.5 RNA 提取及反转录

通过 TRIzol 试剂 (Invitrogen, 中国) 抽提活性污泥中的 RNA。取 2 mL 活性污泥离心 (4 °C、8 000 r·min⁻¹、5 min) 后弃上清液,加入 1 mL TRIzol 试剂涡旋后,室温静置 1 h。于 4 °C、12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,将上清液转移至新离心管;加入 0.2 mL 氯仿后,室温静置 2 min。将上述混合液离心 (4 °C、12 000 r·min⁻¹、5 min) 后,取 0.5 mL 上层水相至新离心管;加入 0.5 mL 异丙醇,于 -20 °C 放置 20 min。离心 (4 °C、12 000 r·min⁻¹、20 min) 后弃上清液,加入 1 mL 75% (体积分数) 预冷 (4 °C) 乙醇;颠倒混匀后离心 (4 °C、8 000 r·min⁻¹、5 min) 后弃上清液,并于室温风干。最后,加入 30 μL 无 RNA 酶去离子水溶解 RNA 沉淀。采用超微量分光光度计 (Nanodrop 2 000, 美国) 测定 RNA 初始浓度及纯度。采用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒 (Takara, 中国) 对 RNA 进行反转录。先将 2 μL RNA 和 2 μL 5×gDNA Eraser Buffer、1 μL gDNA Eraser 及适量 RNase Free ddH₂O (总体积 10 μL) 添至 200 μL PCR 反应管 1 内,吸打混匀。置于 PCR 仪 (Eppendorf, 德国) 中 42 °C 反应 2 min 后,将混合液转至反应管 2 中。再加入 4 μL 5×PrimeScript®Buffer2、1 μL PrimeScript®RT Enzyme MixI、4 μL RNase Free ddH₂O 和 1 μL RT Primer Mix,吸打混匀后将 PCR 反应管 2 置于 PCR 仪,于 37 °C 下反应 15 min。最后在 85 °C 反应 5 s 进行反转录,生成 cDNA 于 -20 °C 保存。

1.6 ARGs 丰度检测

采用 qPCR 定量分析污水处理系统典型磺胺类 ARGs (*sul1* 和 *sul2*) 和 *int11* 的丰度和表达水平。反应体系 (20 μL) 为: 10 μL SuperReal PreMix Plus (TIANGEN, 中国), 0.6 μL 正引物和反引物, 2 μL DNA 模板和 6.8 μL ddH₂O。反应条件为: 95 °C 预变性 1~2 min, 95 °C 变性 30 s, 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 40 个循环。*sul1*、*sul2*、*int11* 和 16S rDNA 的引物序列和退火温度参见文献^[34-36]。所有样品一式 3 份。

1.7 细胞膜完整性检测

采用 LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kits (Invitrogen, 中国) 检测细菌细胞膜完整性。取 0.5 mL 污泥混合液离心 (4 °C、8 000 r·min⁻¹、5 min) 弃上清液后,加入 1 mL 质量分数为 0.85% 的 NaCl 缓冲液,于 10 000 r·min⁻¹ 下离心 15 min。污泥沉淀重悬于适量 0.85% (质量分数) NaCl 缓冲液 (OD₆₀₀ 约为 0.05) 后,取 100 μL 上述污泥混合液与等体积染料,吸打混匀后室温孵育 15 min。采用多功能荧光酶标仪 (BioTek, 美国) 测定样品的荧光值。激发波长设置为 485 nm, 发射波长为 530 nm 和 630 nm。所有样品一式 3 份。

1.8 数据分析

ARGs 相对丰度为单位质量 (ng) DNA 中 ARGs 拷贝数与 16S rDNA 拷贝数之比。所有图形均使用 Origin 20.0 进行绘制。图中误差棒表示 2 次或 3 次实验数据的标准差。

2 结果与讨论

2.1 nZVI 和 nZnO 暴露下 ARB 相对浓度

nZVI 和 nZnO 暴露已被证明能有效抑制鲍曼不动杆菌、金黄色葡萄球菌、拟杆菌、芽孢杆

菌、棒状杆菌、硫假单胞菌等 ARB 生长^[37-39]。然而, nZVI 和 nZnO 暴露对污水处理系统中 ARB 的影响尚未可知。因此, 将活性污泥暴露于不同浓度 (1 和 50 mg·L⁻¹) nZVI 和 nZnO, 于不同时间 (0.5、2、4、6、8、10 和 12 h) 进行取样检测。如图 1 所示, 不同浓度 nZVI 和 nZnO 暴露下污泥中磺胺类 ARB 的相对浓度为 0.65%~21.04%, 且经 nZVI 和 nZnO 暴露后有所下降。具体而言, 经过 4 h nZVI 和 nZnO 暴露后 ARB 相对浓度的水平出现大幅上升, 至 5.65%~18.34%, 随后下降至初始水平并保持稳定。对比 nZVI 和 nZnO 暴露组与对照组数据发现, ARB 变化可能主要由异养菌浓度的波动所致。进一步分析不同浓度 nZVI 和 nZnO

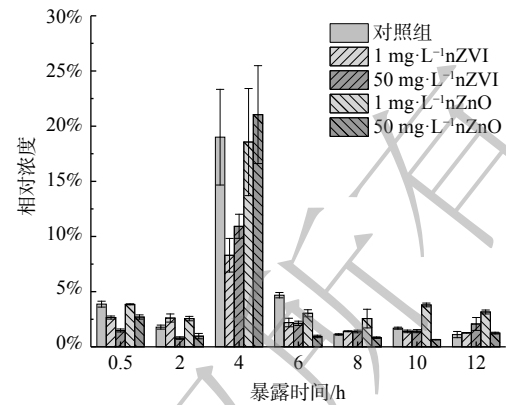


图 1 nZVI 和 nZnO 暴露下磺胺类 ARB 浓度的变化
Fig. 1 Changes of sulfonamides ARB concentration under nZVI and nZnO exposure

对 ARB 的影响发现, 在 0~6 h (除 4 h), 1 mg·L⁻¹ nZVI 暴露下 ARB 相对浓度明显高于 50 mg·L⁻¹ nZVI; 而在 8~12 h, 50 mg·L⁻¹ nZVI 暴露下的 ARB 相对浓度逐渐超过 1 mg·L⁻¹ nZVI。这可能是因为 nZVI 在好氧处理阶段 (6~12 h) 更易于氧化, 从而降低了对 ARB 的抑制作用^[40]。此外, 1 mg·L⁻¹ nZnO 在暴露期间对 ARB 无明显影响, 而 50 mg·L⁻¹ nZnO 在暴露期 (除 4 h 外) 会明显抑制 ARB 增殖。

2.2 nZVI 和 nZnO 暴露下不同形态 ARGs 的丰度

nZVI 和 nZnO 暴露下 3 种不同形态 ARGs 的分布情况如图 2 所示。污泥中 aeARGs 和 iARGs 的相对丰度分别为 $3.34 \times 10^{-2} \sim 2.83 \times 10^{-1}$ copies·copies⁻¹ 16S rDNA 和 $2.31 \times 10^{-2} \sim 9.12 \times 10^{-2}$ copies·copies⁻¹ 16S rDNA, 且在暴露于 nZVI 和 nZnO (除 6 h 外) 后持续降低。经过 12 h nZVI 和 nZnO 暴露, 磺胺类 aeARGs 和 iARGs 的相对丰度分别降低了 32.02%~71.69% 和 5.29%~20.55%。显然, nZVI 和 nZnO 暴露对 aeARGs 分布的扰动作用明显强于 iARGs。需要指出的是, nZVI 和 nZnO 暴露后 *sul1* 相对丰度削减率低于对照组 0.25%~16.21% (除 1 mg·L⁻¹ nZnO 外), 而 *sul2* 相对丰度的则高于对照组 1.51%~15.47%。这说明纳米金属及其氧化物暴露对 aeARGs 和 iARGs 的削减能力可能取决于 ARGs 的类型。污泥厌氧消化过程中添加 nZVI^[17, 41-42] 或 nZnO^[43] 有利于提高 *sul1*、*sul2*、*tetX* 和 *gyrA* 的相对丰度, 但同时会削减 *tetM*、*ermX*、*ermf* 和 *tet36* 的相对丰度。此外, 相较对照组而言, nZVI 和 nZnO 暴露 12 h 后的 iARGs 相对丰度下降了 6.42%~10.47%, 而 aeARGs 仅在 1 mg·L⁻¹ nZVI 和 nZnO 暴露组分别下降 5.31% 和 11.15%。进一步对比发现, 50 mg·L⁻¹ nZVI 暴露下 aeARGs 丰度的削减比例比 1 mg·L⁻¹ nZVI 低 5.51%~33.15%; 相反, 50 mg·L⁻¹ nZVI 暴露下 iARGs 丰度的削减幅度明显高于 1 mg·L⁻¹ nZVI (图 2(a)~(b))。此外, 50 mg·L⁻¹ nZnO 暴露对 aeARGs 和 iARGs 相对丰度的削减比例均小于 1 mg·L⁻¹ nZnO 暴露 (图 2(a)~(d))。

由图 2(e) 和 (f) 可知, nZVI 和 nZnO 暴露后 feARGs 相对丰度为 $1.53 \times 10^{-2} \sim 3.32 \times 10^{-1}$ copies·copies⁻¹ 16S rDNA, 且随暴露时间增加逐渐降低。此外, 与对照组相比, nZVI 和 nZnO 暴露明显促进了 feARGs 的增殖。在河水^[44] 或海水^[45] 中添加 nZnO 已被证明有利于 *sul1* 富集。进一步对比不同浓度 nZVI 和 nZnO 暴露下 feARGs 的变化可知, nZVI 暴露对 feARGs 的影响呈现低促高抑规律; 而 50 mg·L⁻¹ nZnO 暴露会持续刺激 feARGs 增殖 (图 2(e)~(f))。这可能是由于 50 mg·L⁻¹ nZnO 能导致 ARB 大量裂解 (图 1), 进而使 iARGs 释放, 转变成 feARGs。

2.3 nZVI 和 nZnO 暴露下 ARGs 和 ARB 的动态转变机制

1) ARGs 可移动性。磺胺类 ARGs 的动态转变通常与可移动遗传元件——*intI1* 密切相关^[19, 46]。因此, 重点探究了 nZVI 和 nZnO 暴露下 *intI1* 的分布特征。如图 3 所示, nZVI 和 nZnO 暴露 12 h 后, 胞外附着态、胞内和胞外游离态 *intI1* 的相对丰度分别降低了 37.70%~67.65%、34.06%~60.30% 和 16.01%~68.87%。然而, nZVI 和 nZnO 暴露 12 h 后 *intI1* 的相对丰度高于对照组。同时, 胞外附着态 *sul1* 的相对丰度与 *intI1* 相对丰度呈现显著相关性 (图 4)。这说明 nZVI 和 nZnO 胁迫可能通过富

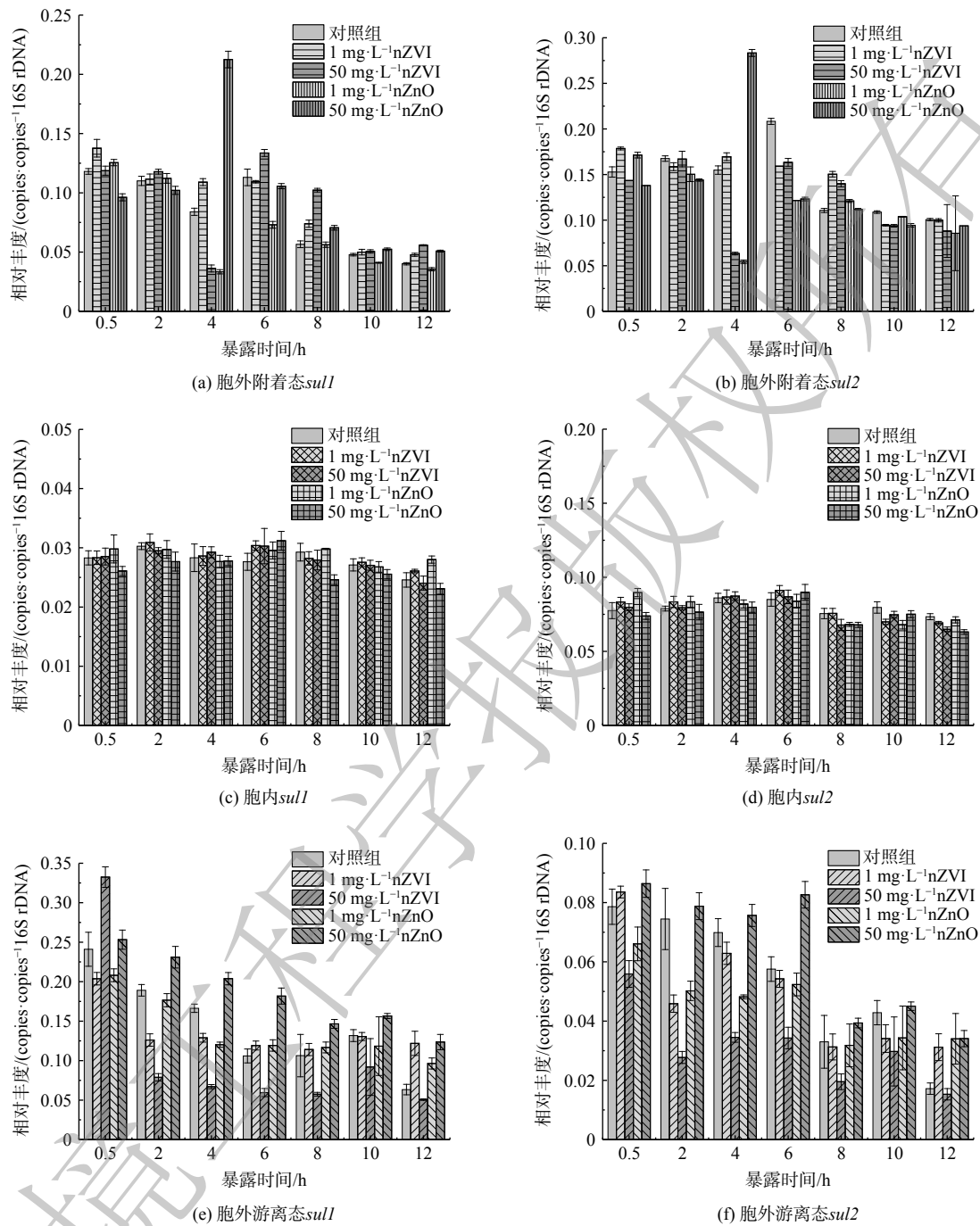


图2 nZVI和nZnO暴露下ARGs丰度的变化

Fig. 2 Changes of ARGs abundance under nZVI and nZnO exposure

集 *int11* 促进 *sul1* 增殖。在粪便堆肥过程中, nZVI 和 nZnO 暴露下 *int11* 与 ARGs 具有明显的正相关性^[42]。

2) 细胞膜通透性。nZVI 和 nZnO 暴露下污泥中细菌的活细胞比例如图 5 所示。在 4 h 时, 污泥细菌活细胞比例发生急剧下降 (50.22%~55.30%), 这在一定程度上解释了同时段发生的污泥 aeARGs 丰度增加的现象 (图 2 (a)~(b))。值得注意的是, 在 8~12 h 暴露期间 (好氧阶段), 1 mg·L⁻¹ nZVI 使污泥中细菌的活细胞比例分别降低了 22.38%~28.00%, 而 50 mg·L⁻¹ nZVI 暴露组活细胞比例无明显变化。这可能是因为在有氧状态下更易于氧化, 从而失去了抑菌能力^[40]。

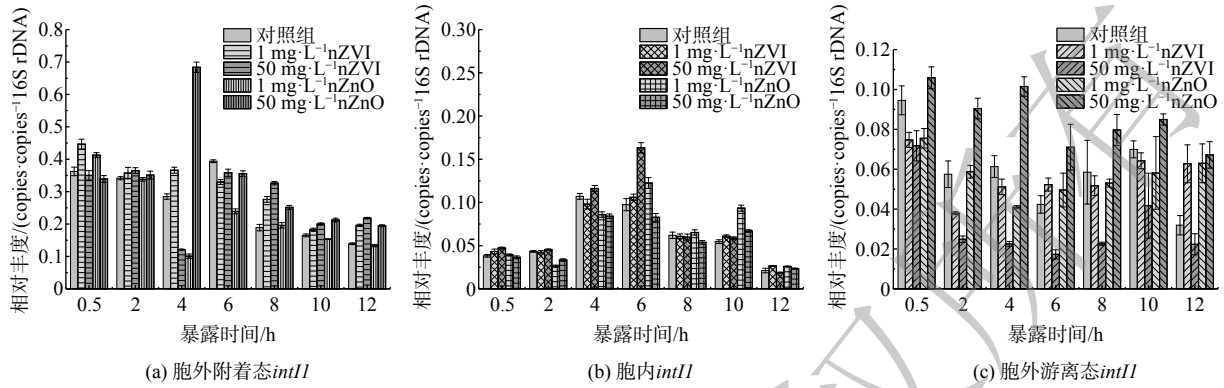


图 3 nZnVI 和 nZnO 暴露下 *intII* 丰度的变化

Fig. 3 Changes of *intII* abundance under nZnVI and nZnO exposure

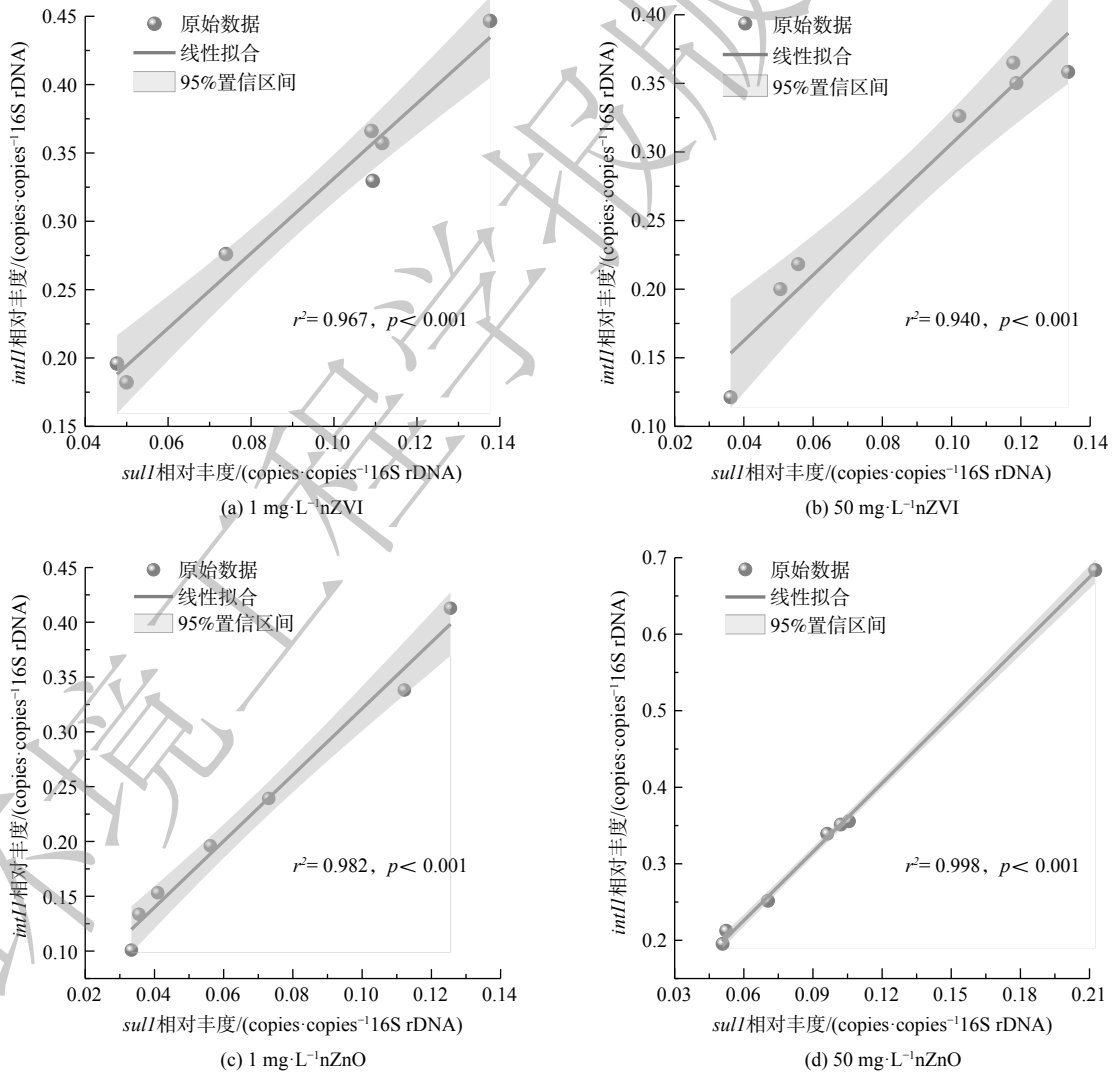


图 4 nZnVI 和 nZnO 暴露下胞外附着态 *sulI* 和 *intII* 丰度的相关性分析

Fig. 4 Correlation analysis of the abundance of absorbed extracellular *sulI* and *intII* under nZnVI and nZnO exposure

3) ARGs 转录水平。转录可能是病原菌调控 ARGs 丰度水平以抵御抗生素攻击的方式之一^[47-48]。由图 6 可知, nZVI 和 nZnO 暴露会显著改变 *sul1* 和 *sul2* 的表达水平。如 1 mg·L⁻¹ nZVI 与 nZnO 暴露 4 h 后 *sul1* 表达水平分别是对照组的 1.30 和 1.62 倍, 而 50 mg·L⁻¹ nZVI 和 nZnO 暴露导致 *sul1* 表达水平急剧下降为对照组的 0.66 和 0.73 倍。此外, nZVI 和 nZnO 对 *sul1* 和 *sul2* 表达水平的影响会随时间发生波动。再者, nZVI 和 nZnO 对 *sul1* 表达水平的扰动幅度也明显高于 *sul2*。因此, nZVI 和 nZnO 暴露能调控污泥中细菌内 ARGs 的转录过程, 且因 ARGs 类型不同而迥异。

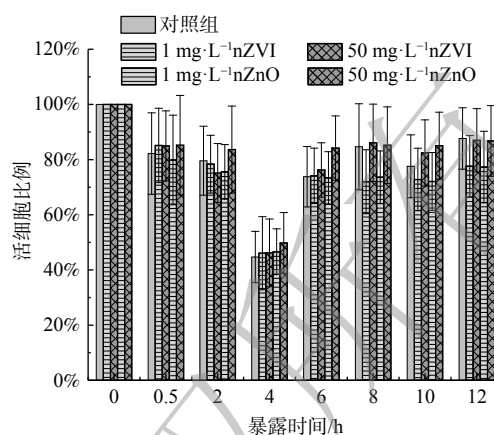


图 5 nZVI 和 nZnO 暴露下活细胞比例的变化
Fig. 5 Changes in the proportion of living cells exposed to nZVI and nZnO

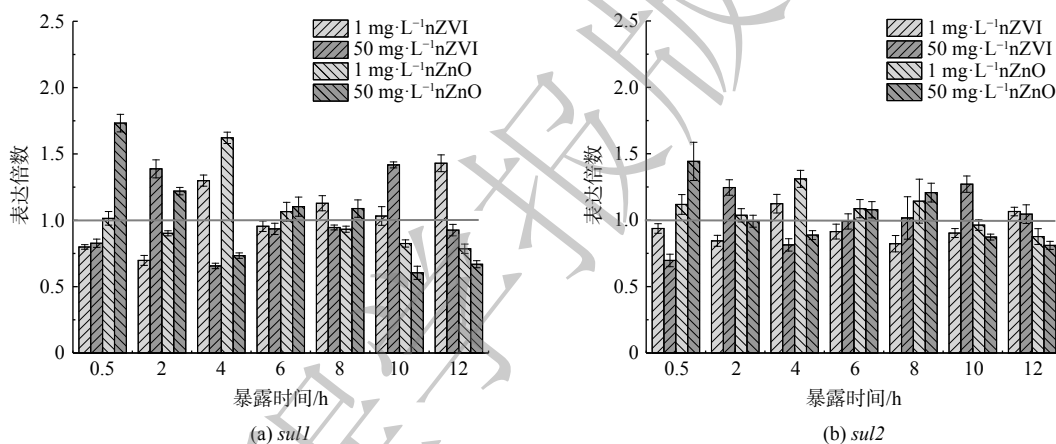


图 6 nZVI 和 nZnO 暴露下 ARGs 表达的变化
Fig. 6 Changes of ARGs expression under nZVI and nZnO exposure

3 结论

nZVI 和 nZnO 暴露有效降低了污水处理系统中磺胺类 ARB 相对浓度, 且 nZVI 表现出更强的削减效果。nZVI 和 nZnO 暴露可有效削减磺胺类 aeARGs 和 feARGs 的相对丰度, 对 iARGs 的影响较小。nZVI 和 nZnO 暴露可能通过诱导污泥中的 *intI1* 增殖、改变细胞膜通透性和调节细菌转录水平加剧 ARGs 的传播与扩散风险。典型纳米金属对污水处理系统中 ARB 和不同形态 ARGs 消长的影响及其机制可为制定有效调控和全面削减污水处理系统中耐药污染策略提供参考。

参考文献

- [1] Science/AAAS Custom Publishing Office and Shanghai Jiao Tong University. 125 questions: Exploration and discovery [EB/OL]. [2021-05-14]. <https://www.science.org/content/resource/125-questions-exploration-and-discovery>.
- [2] PEHRSSON E C, TSUKAYAMA P, PATEL S, et al. Interconnected microbiomes and resistomes in low-income human habitats[J]. *Nature*, 2016, 533(7602): 212-216.
- [3] O'NEILL J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations [R]. 2016. O'Neill J.
- [4] PRUDEN A, PEI R, STORTEBOOM H, et al. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern Colorado[J]. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40(23): 7445-7450.
- [5] SANDERSON H, FRICKER C, BROWN R S, et al. Antibiotic resistance genes as an emerging environmental contaminant[J]. *Environmental Reviews*, 2016, 24(2): 205-218.
- [6] UNEP. Frontiers 2017: Emerging Issues of Environmental Concern [R]. Kenya: United Nations Environment Programme, 2017.
- [7] 王荣昌, 王超颖, 曾旭. 污水处理过程中抗生素抗性基因的检测及其水平转移机制的研究进展[J]. *环境化学*, 2017, 36(12): 2567-2573.
- [8] ULUSEKER C, KASTER K M, THORSEN K, et al. A review on occurrence and spread of antibiotic resistance in wastewaters and in wastewater treatment plants: mechanisms and perspectives[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 717809.
- [9] 李超, 鲁建江, 童延斌, 等. 喹诺酮抗性基因在城市污水处理系统中的分布及去除[J]. *环境工程学报*, 2016, 10(3): 1177-1183.
- [10] MILLER J H, NOVAK J T, KNOCKE W R, et al. Effect of silver nanoparticles and antibiotics on antibiotic resistance genes in anaerobic digestion[J]. *Water Environment Research*, 2013, 85(5): 411-421.
- [11] MA Y, METCH J W, YANG Y, et al. Shift in antibiotic resistance gene profiles associated with nanosilver during wastewater treatment [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2016, 92(3).
- [12] FU J J, HUANG D Q, LU Z Y, et al. Comparison of the dynamic responses of different anammox granules to copper nanoparticle stress: Antibiotic exposure history made a difference[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 333: 125186.
- [13] HUANG H, ZHENG X, YANG S, et al. More than sulfidation: Roles of biogenic sulfide in attenuating the impacts of CuO nanoparticle on antibiotic resistance genes during sludge anaerobic digestion[J]. *Water Research*, 2019, 158: 1-10.
- [14] ZHANG Y, WANG L, XIONG Z, et al. Removal of antibiotic resistance genes from post-treated swine wastewater by mFe/nCu system[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2020, 400: 125953.
- [15] ZHANG Y, XU R, XIANG Y, et al. Addition of nanoparticles increases the abundance of mobile genetic elements and changes microbial community in the sludge anaerobic digestion system[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 405: 124206.
- [16] LI J, GUO N, ZHAO S, et al. Mechanisms of metabolic performance enhancement and ARGs attenuation during nZVI-assisted anaerobic chloramphenicol wastewater treatment[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 419: 126508.
- [17] ZHANG Y, YANG Z, XIANG Y, et al. Evolutions of antibiotic resistance genes (ARGs), class 1 integron-integrase (intI1) and potential hosts of ARGs during sludge anaerobic digestion with the iron nanoparticles addition[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 724: 138248.
- [18] ZAREI-BAYGI A, SMITH A L. Intracellular versus extracellular antibiotic resistance genes in the environment: Prevalence, horizontal transfer, and mitigation strategies[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 319: 124181.
- [19] ZHOU S, ZHU Y, YAN Y, et al. Deciphering extracellular antibiotic resistance genes (eARGs) in activated sludge by metagenome[J]. *Water Research*, 2019, 161: 610-620.
- [20] MAO D, LUO Y, MATHIEU J, et al. Persistence of extracellular DNA in river sediment facilitates antibiotic resistance gene propagation[J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(1): 71-78.
- [21] DONG P, WANG H, FANG T, et al. Assessment of extracellular antibiotic resistance genes (eARGs) in typical environmental samples and the transforming ability of eARG[J]. *Environment International*, 2019, 125: 90-96.
- [22] DOMINIAC D M, NIELSEN J L, NIELSEN P H. Extracellular DNA is abundant and important for microcolony strength in mixed microbial biofilms[J]. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(3): 710-721.
- [23] ZHENG X, WU R, CHEN Y. Effects of ZnO nanoparticles on wastewater biological nitrogen and phosphorus removal[J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45(7): 2826-2832.
- [24] ZHOU L, ZHUANG W, WANG X, et al. Potential effects of loading nano zero valent iron discharged on membrane fouling in an anoxic/oxic membrane bioreactor[J]. *Water Research*, 2017, 111: 140-146.
- [25] CHEN P J, TAN S W, WU W L. Stabilization or oxidation of nanoscale zerovalent iron at environmentally relevant exposure changes bioavailability and toxicity in medaka fish[J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(15): 8431-8439.
- [26] WIEGAND I, HILPERT K, HANCOCK R E W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances[J]. *Nature Protocols*, 2008, 3(2): 163-175.
- [27] PATEL J B, COCKERILL F, BRADFORD P, et al. Clinical and laboratory standards institute[J]. Performance standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 2017: 42-45.
- [28] PALMGREN R, NIELSEN P H. Accumulation of DNA in the exopolymeric matrix of activated sludge and bacterial cultures[J]. *Water Science and Technology*, 1996, 34(5-6): 233-240.
- [29] ZHOU J, BRUNS M A, TIEDJE J M. DNA recovery from soils of diverse composition[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(2): 316-322.
- [30] CORINALDESI C, DANOVARO R, DELL'ANNO A. Simultaneous recovery of extracellular and intracellular DNA suitable for molecular studies from marine sediments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(1): 46-50.
- [31] 萨姆布鲁克. 分子克隆实验指南: 下册 [M]. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [32] ZHANG Y, NIU Z, ZHANG Y, et al. Occurrence of intracellular and extracellular antibiotic resistance genes in coastal areas of Bohai Bay (China) and the factors affecting them[J]. *Environmental Pollution*, 2018, 236: 126-136.
- [33] GREEN M R, SAMBROOK J. Precipitation of DNA with ethanol[J]. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016, 2016(12): pdb.prot093377.
- [34] PEI R, KIM S C, CARLSON K H, et al. Effect of river landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG)[J]. *Water research*, 2006, 40(12): 2427-2435.
- [35] LUO Y I, MAO D, RYSZ M, et al. Trends in antibiotic resistance genes occurrence in the Haihe River, China[J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44(19): 7220-7225.
- [36] FIERER N, JACKSON J A, VILGALYS R, et al. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays[J]. *Applied and environmental microbiology*, 2005, 71(7): 4117-4120.
- [37] SHAHBAZI S, SHIVAEI A, NASIRI M, et al. Zinc oxide nanoparticles impact the expression of the genes involved in toxin-antitoxin systems in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2022, 11: 1.
- [38] ABDELGHAFAR A, YOUSEF N, ASKOURA M. Zinc oxide nanoparticles reduce biofilm formation, synergize antibiotics action and attenuate *Staphylococcus aureus* virulence in host; an important message to clinicians[J]. *BMC Microbiology*, 2022, 22(1): 1-17.
- [39] QIU X, ZHOU G, WANG H. Nanoscale zero-valent iron inhibits the

- horizontal gene transfer of antibiotic resistance genes in chicken manure compost[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 422: 126883.
- [40] 陆贤, 郭美婷, 张伟贤. 纳米零价铁对耐四环素菌耐药特性的影响[J]. *中国环境科学*, 2017, 37(1): 381-385.
- [41] WANG P, CHEN X, LIANG X, et al. Effects of nanoscale zero-valent iron on the performance and the fate of antibiotic resistance genes during thermophilic and mesophilic anaerobic digestion of food waste[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 293: 122092.
- [42] WANG Q, GU J, WANG X, et al. Effects of nano-zerovalent iron on antibiotic resistance genes and mobile genetic elements during swine manure composting[J]. *Environmental Pollution*, 2020, 258: 113654.
- [43] HUANG H, CHEN Y, YANG S, et al. CuO and ZnO nanoparticles drive the propagation of antibiotic resistance genes during sludge anaerobic digestion: possible role of stimulated signal transduction[J]. *Environmental Science:Nano*, 2019, 6(2): 528-539.
- [44] 陈芋如. 纳米颗粒物对河口水环境中微生物群落及抗生素抗性基因的影响[D]. 上海: 华东师范大学, 2020.
- [45] CHEN Y, GUO X, FENG J, et al. Impact of ZnO nanoparticles on the antibiotic resistance genes (ARGs) in estuarine water: ARG variations and their association with the microbial community[J]. *Environmental Science:Nano*, 2019, 6(8): 2405-2419.
- [46] NG C, TAY M, TAN B, et al. Characterization of metagenomes in urban aquatic compartments reveals high prevalence of clinically relevant antibiotic resistance genes in wastewaters[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2200.
- [47] DAR D, SHAMIR M, MELLIN J R, et al. Term-seq reveals abundant ribo-regulation of antibiotics resistance in bacteria[J]. *Science*, 2016, 352(6282): aad9822.
- [48] LIU Z, KLUMPER U, LIU Y, et al. Metagenomic and metatranscriptomic analyses reveal activity and hosts of antibiotic resistance genes in activated sludge[J]. *Environment International*, 2019, 129: 208-220.
- (责任编辑: 靳炜)

Effects and mechanisms of metallic nanoparticles on the fate of sulfanilamide antibiotic resistance genes and resistant bacteria in wastewater treatment system

YANG Zhengqing¹, YANG Fengjuan¹, KONG Yujie¹, DUAN Yi^{1,2}, GAO Yuanyuan³, TANG Zhenping³, ZHUANG Yuan⁴, ZHOU Shuai^{1,2,3,*}

1. School of Civil Engineering, University of South China, Hengyang 421001, China; 2. Hunan Province Key Laboratory of Pollution Control and Resources Reuse Technology, University of South China, Hengyang 421001, China; 3. Hunan Province Key Laboratory of Rare Metal Mineral Exploitation and Geological Disposal of Wastes, University of South China, Hengyang 421001, China; 4. Key Laboratory of Drinking Water Science and Technology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

*Corresponding author, E-mail: zs402606665@126.com

Abstract Antibiotic resistance and nanomaterials contaminants are important emerging environmental issues worldwide. Antibiotic resistance vectors—antibiotic resistance genes (ARGs) widely exist in wastewater treatment systems and have been proved to be closely related to metal nanoparticles. The influences of nano zero valent iron (nZVI) and nano zinc oxide (nZnO) on the distribution of antibiotic resistant bacteria (ARB) and different forms of ARGs in wastewater treatment system were investigated by quantitative real-time PCR. The results showed that 50 mg·L⁻¹ nZVI and nZnO exposure was beneficial to the reduction of ARB concentration. Compared with the control group, the abundance of *sull* in the sludge after exposure to nZVI and nZnO increased by 0.25%~16.21%, while *sul2* decreased significantly (1.51%~15.47%). In addition, 50 mg·L⁻¹ nZVI led to a significant reduction in free extracellular ARGs. nZVI and nZnO exposure can promote the proliferation of *sull* by enriching *intI1*, changing the permeability of cell membrane and regulating the transcription ability of bacteria. The present study was helpful for clarifying the effects and mechanisms of metal nanoparticles on the fate of ARB and different forms of ARGs in the wastewater treatment system, which may lay the foundation for effective regulation and mitigation strategies of antibiotic resistance in the wastewater treatment system.

Keywords antibiotic resistance genes (ARGs); antibiotic resistant bacteria (ARB); nano-zerovalent iron (nZVI); zinc oxide nanoparticle (nZnO); wastewater treatment systems