

制药废水厂微生物群落和多种抗性基因相关性分析

袁立霞¹, 罗 晓^{1,2}, 张文丽¹, 蒋永丰¹

(1. 河北科技大学建筑工程学院, 河北石家庄 050018; 2. 河北科技大学环境科学与工程学院, 河北石家庄 050018)

摘 要: 为了研究多种生物处理工艺制药废水中微生物群落结构和抗性基因的分布特征、扩增情况及其相关性, 采用 Miseq 高通量测序分析技术和荧光定量 PCR 技术对制药废水厂中活性污泥进行检测。荧光定量结果表明: *sul1*, *sul2*, *tetO*, *tetQ*, *tetW*, *OXA-1* 和可移动遗传元件 *int1* 在制药废水厂中各个阶段均能被广泛地检测到, 总抗性基因浓度范围为 $3.09 \times 10^8 \sim 2.26 \times 10^9$ copies/g (干重), 基因总浓度上升了 7.3 倍。Miseq 测序结果表明: 制药废水中主要优势菌门为 *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Thermus* 和 *Gemmatimonadetes* 等门, 其平均总相对丰度比例占到 81.05%; 冗余分析显示, *Aeromicrobium* 与 *sul2* 呈较高度度的正相关性, 可能是 *sul2* 在微生物群落中存在的可能的主要菌群; *Rhodovulum* 和 *Rhodospirillaceae* 菌属与 *OXA-1* 和 *tetQ* 呈较高度度的正相关性, 这些菌属是这些 ARGs 分布的主要菌属; *Acinetobacter* 与 *tetO* 和 *tetW* 呈现较高度度的正相关性, 可能是 *tetO* 和 *tetW* 在微生物群落中存在的可能的主要菌属。因此, 相关抗性基因的增值和分布与相关特定菌属有关, 可以通过控制相关菌属的丰度来消减工业废水厂中的抗性基因。

关键词: 微生物生态学; 抗性基因; 荧光定量 PCR; Miseq; 微生物群落结构

中图分类号: X703 文献标志码: A

Correlation between antibiotic resistance genes and microbial communities in pharmaceutical wastewater

YUAN Lixia¹, LUO Xiao^{1,2}, ZHANG Wenli², JIANG Yongfeng²

(1. School of Civil Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang, Hebei 050018, China; 2. School of Environmental Science and Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang, Hebei 050018, China)

Abstract: In order to study the distribution, amplification and correlation of microbial community structure and resistance genes in pharmaceutical wastewater, a variety of biological treatment processes are used to treat pharmaceutical wastewater. Combining Miseq high throughput sequencing analysis technology and fluorescence quantitative PCR technology, activated sludge in pharmaceutical wastewater plants is detected. The results show that *sul1*, *sul2*, *tetO*, *tetQ*, *tetW*, *OXA-1* and *INT1* are widely detected at all stages of pharmaceutical wastewater treatment plant. The total resistance gene concentration ranges from 3.09×10^8 to 2.26×10^9 copies/g (dry weight), and the total gene concentration increases by 7.3 times. Miseq sequencing results show that the dominant bacteria in pharmaceutical wastewater are *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Thermus* and *Gemmatimonadetes*, with an average relative abundance ratio of 81.05%. Redundancy analysis shows that *Aeromicrobium*

收稿日期: 2018-08-30; 修回日期: 2018-12-13; 责任编辑: 王海云

基金项目: 国家自然科学基金(51508316)

第一作者简介: 袁立霞(1992—), 女, 河北沧州人, 硕士研究生, 主要从事工业废水中水处理微生物方面的研究。

通信作者: 罗晓教授。E-mail: luoxnk@126.com

袁立霞, 罗晓, 张文丽, 等. 制药废水厂微生物群落和多种抗性基因相关性分析[J]. 河北科技大学学报, 2019, 40(2): .

YUAN Lixia, LUO Xiao, ZHANG Wenli, et al. Correlation between antibiotic resistance genes and microbial communities in pharmaceutical wastewater[J]. Journal of Hebei University of Science and Technology, 2019, 40(2): .

is positively correlated with *sul2* to a high degree, which might be *sul2* existing in microbial communities. Among the possible major microflora, *Rhodovulum* and *Rhodospirillaceae* are highly positively correlated with *OXA-1* and *tetQ*, which are the main microflora of ARGs distribution. *Acinetobacter* has a high degree of positive correlation with *tetO* and *tetW*, which may be the main possible microflora of *tetO* and *tetW* in microbial community. The results show that appreciation and distribution of antibiotic resistance genes are connected with concerned specific bacterial genus. The controlled abundance of concerned bacterial genus could subduce resistance gene in industrial wastewater factory.

Keywords: Microbial ecology; antibiotic resistance genes; fluorescence quantitative PCR; Miseq; microbial community structure

由于抗生素广泛应用于人类和动物(畜禽/鱼)的疾病防治或动物的促进生长,大量残留抗生素进入环境,致使微生物在持续抗生素选择压力下产生了耐药性,形成了耐药菌^[1-2],其风险比抗生素药物本身的污染风险更高^[3],关于其行为特点和传播途径的研究日益增加。抗生素抗性细菌对抗生素的耐药性机理包括:细菌外膜不渗透性障碍、细菌外排泵系统、抗生素作用的靶位变化和抗生素的钝化失活等^[4]。抗性基因是抗性菌具有抗性的主要原因之一,它可以通过多种形式的可移动遗传元件如质粒、整合子、转座子、插入序列等,突破细菌的种属关系广泛传播,加重抗性污染。FORSBERG 等^[5]证明人类病原菌能传播抗性到土著细菌中,并且由土著细菌携带的抗性基因能转导到病原菌的宿主细胞。抗性能潜在地影响环境中的微生物群落结构并对公共健康产生威胁^[6],且碳青霉烯类抗生素耐药肠杆菌科细菌患病率上升迅速^[7],这将对环境和人类健康构成严重的威胁^[6,8]。

荧光定量 PCR 技术为研究环境中抗性基因和抗性微生物分布特征提供了有力的手段^[8]。已有研究表明制药废水处理系统的进水中往往含有高浓度的抗生素及生产原料和中间体^[9],对生物处理单元的微生物群落形成高强度选择性压力,为 ARGs 在污水中的持久存在和传播扩散提供了有利条件,并且制药废水处理系统出水中 ARGs 的浓度高于市政污水处理系统出水^[10-11]。22 种类型的 ARGs 能对 5 种类型的抗生素产生抗性,包括 *sul 1*, *sul 2* 和 *sul 3* 能对磺胺类抗生素产生抗性;*tetO*, *tetQ*, *tetW*, *tetM* 和 *tetT* 对四环素类抗生素产生抗性;*OXA-1* 和 *OXA-2* 能对 β -内酰胺类抗生素产生抗性。可移动遗传元件(例如 1 类整合子)有利于形成多重耐药性并且加速地表水、土壤^[12-13]和污水处理厂^[14]中抗性基因的传播,并且可移动遗传元件(1 类整合子)是细胞间转移抗性的指标^[15]。本文主要研究多种抗性基因在制药废水系统生物处理单元中增值和传播以及微生物群落的动态变化及两者的相关性。

选取河北省某抗生素生产废水为研究对象,通过现场采样分析,重点考察污泥中 β -内酰胺类、四环素类和磺胺类抗性基因及微生物群落结构在废水处理过程中的分布和相关性特征,揭示废水厂活性污泥中土著抗性基因的分布规律以及与微生物群落结构之间的互相作用,以为评估废水处理厂中抗性基因环境风险提供依据,并为制定有效的 ARGs(antibiotic resistance genes)环境污染控制方法提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集

河北省某制药废水处理厂,该厂设计处理水量 $300 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$,主要采用生物处理法处理生产废水,采样点和废水处理厂如图 1 所示。样品采用 500 mL 聚乙烯瓶,于 2018 年 1 月,采集不同污水处理单元活性污泥样品,分别标记为 J(综合调节池)、IC(厌氧塔)、SBR(间歇式曝气池)、A(A池)、O(O池)、C(污泥池)、CH

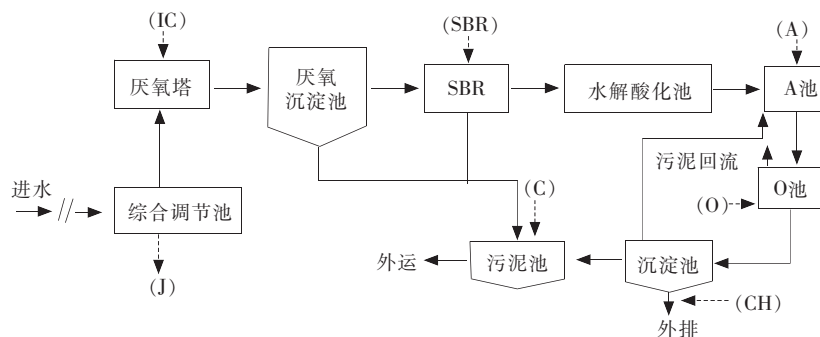


图 1 采样点和废水处理厂工艺流程

Fig.1 Sampling point and process flow of wastewater treatment plant

(出水)取样结束后,于冰盒中运送回实验室,离心(5 min, 11 000 r · min⁻¹)后称取 5 g 冷冻于-80 °C 冰箱中,以备 DNA 提取。

1.2 水样分析

按照《水和废水监测分析方法》^[16]国家标准方法分析常规化学指标,测定水中 COD_{Cr} 和氨氮,测定结果见表 1。

表 1 样品和相关水质信息

Tab.1 Sample and related water quality information of pharmaceutical wastewater treatment plant

水质参数	J	IC	SBR	A	O	C	CH
$\rho(\text{COD})/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	7 128	5 508	486	317.52	220	150	142
$\rho(\text{氨氮})/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	186.6	85.3	502.3	690.4	503.9	483.7	449.3
pH	8.92	8.16	8.70	9.0	8.88	8.90	8.75

1.3 DNA 提取及 PCR 的扩增

DNA 的提取采用 PowerSoil[®] DNA Isolation Kit 试剂盒,按照试剂盒的流程提取 DNA。以所提取各样品 DNA 为模板,对其 16S rDNA V4 区进行扩增。反应体系为 30 μL ,上游引物为 520F(5'-AYTGGGYD-TAAAGNG-3'),下游引物 802R(5'-TACNVGGGTATCTAATCC-3')。PCR 扩增管中添加:1)DNA 模板 0.5 μL ;2)正向引物 0.6 μL ,反向引物 0.6 μL ;3)灭菌水 22.4 μL ;4)dNTP 2.4 μL ;5)缓冲液 3 μL ;6)ExTap 酶 0.5 μL 。PCR 反应程序:1)94 °C 条件下预变性 10 min,然后进行 30 个循环(循环过程为 94 °C 变性 1 min,55 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1 min);2)72 °C 延伸 10 min。

扩增结束后,运用 1% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 扩增产物进行检测,使用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒 (AXYGEN)切胶回收 DNA。PCR 扩增后的条带亮度明显,位置清晰,可直接用于后续测序分析。委托北京理化分析测试中心进行 Illumina Miseq 高通量测序。

1.4 抗性基因的定性检测

采用 PCR 方法检测抗性基因,所用引物序列见表 2。抗性基因定性检测反应体系为 10 μL Green qPCR Master Mix,0.5 μL 引物(F),0.5 μL 引物(R),DNA 模板 1 μL ,加灭菌水至 20 μL 。反应程序为 94 °C 5 min;94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 5 min,并在 4 °C 下保存。每次运行使用无菌水做阴性对照,PCR 产物以 1% 的琼脂糖凝胶电泳分析。

表 2 抗性基因所用的引物序列

Tab.2 Primer sequences used for resistance genes

目的基因	抗性机制	引物序列(5'-3')	引物长度/(bp)	退火温度/°C	参考文献
16S rRNA	NA	CGGTGAATACGTTTCYCGG	143	55	[17]
		GGWTACCTTGTTACGACTT			
int1	NA	CCTCCGCACGATGATC	280	55	[18]
		TCCACGCATCGTCAGGC			
OXA-1	酶改性	TATCTACAGCAGCGCCAGTG CGCATCAAATGCCATAAGTG	199	60	[19]
sul I	酶改性	CACCGGAAACATCGCTGCA GGGCGTATCCACAATGTTAAC	158	57	[20]
sul II	NA	CTCCGATGGAGGCCGGTAT GGGAATGCCATCTGCCTTGA	190	60	[20]
tetO	修饰作用位点	GATGGCATAACAGGCACAGACC GCCCAACCTTTTGCTTCACTA	172	57	[20]
tetQ	修饰作用位点	AGAATCTGCTGTTTGCCAGTG CGGAGTGTCAATGATATTGCA	169	63	[21]
tetW	核糖体蛋白保护	GAGAGCCTGCTATATGCCAGC GGGCGTATCCACAATGTTAAC	168	60	[21]

1.5 抗性基因的定量检测

采用 SYBR-Green 实时定量 PCR 方法对各基因进行定量分析,检测仪器为 StepOne 型荧光定量 PCR 仪(ABI,美国)。PCR 产物经过克隆测序确认后,使用生工质粒提取试剂盒 SK1131 从阳性克隆子中提取质粒,用作标准曲线。使用 NanoDrop 微量分光光度计(Thermo Scientific,美国)测定质粒浓度。制作标准曲线时按照 10 倍梯度浓度稀释构建好的各质粒,于 90 μL 稀释液中加入 10 μL 质粒,做 4~6 个点,通过预实验选取合适标准品用于制备标准曲线。标准质粒、环境样品、阴性对照均做 3 个平行,取平均值进行计算。

质粒拷贝数换算公式为

$$Q = [C \times 10^{-9} \times 6.02 \times 10^{23}] / [N \times 660],$$

式中: Q 为质粒拷贝数, $\text{copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; C 为质粒浓度, $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; N 为克隆产物碱基数($\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$); M_1 为载体碱基数 2692bp(pMD 18-T); M_2 为载体碱基数为 3023bp(pGEMX-T Easy)。

荧光定量 PCR 反应体系为 12.5 μL 2 \times SYBR, 1.0 μL DNA($10\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), 0.5 μL 引物 F($10\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 0.5 μL 引物 R($10\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 10.5 μL 水, 总体积 25.0 μL 。荧光定量 PCR 反应程序为 1) 50 $^{\circ}\text{C}$, 2 min; 2) 95 $^{\circ}\text{C}$, 5 min; 3) 95 $^{\circ}\text{C}$, 20 s; 4) 退火, 30 s; 5) 72 $^{\circ}\text{C}$, 31 s; 6) Plate read, 重复 1)~5), 39 次重复; 7) Melt-curve 分析 60 $^{\circ}\text{C}$ to 95 $^{\circ}\text{C}$ 。每隔 0.2 $^{\circ}\text{C}$ 采集一次荧光以生成溶解曲线, 根据溶解曲线的变化检测扩增结果的特异性。退火温度和反应时间根据引物不同进行调整。

1.6 统计分析

抗性基因浓度结果和群落结构使用 OriginPro 8.6 软件(Origin Lab Corporation, USA)进行分析; 使用 MOTHUR 软件计算各个样本 Alpha 多样性指标, 以反映本次测序深度、物种均匀性等; 使用 R 软件对样本绘制热图并分析; ARGs 与群落结构相关性使用 CANOCO 5.0(Microcomputer Power, Ithaca, NY) 软件分析, 基因相关性使用 SPSS 19.0 软件进行相关性分析。

2 结果讨论与分析

2.1 微生物菌群耐药基因定量检测

利用荧光定量 PCR 的方法检测抗性基因的分布特征、变化情况和相对表达量, 水处理阶段 ARGs 分布结果如图 2 所示。

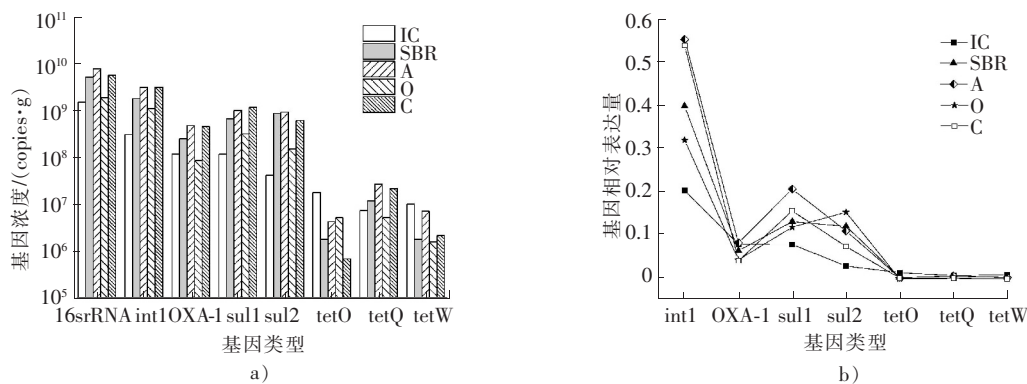


图 2 水处理阶段 ARGs 分布

Fig.2 Distribution of ARGs in water treatment stage

由图 2 a)可知,目标基因出现并大量存在于废水厂各个阶段。有着较高检出频率的 ARGs(OXA-1, sul1 和 tetW)是携带三大类抗生素抗性的主要基因类型^[22]。从 IC 池到 C 池,总抗性基因浓度范围为 $3.09 \times 10^8 \sim 2.26 \times 10^9$ copies/g(以下均为干重),基因总浓度上升了 7.3 倍。Int1 整合子是捕获、整合并功能性地表达与抗生素抗性有关的基因,主要作用是传播抗生素抗性^[23]。int1 整合子是废水厂中基因相对丰度较高的基因,且和 16 S rRNA 基因呈显著性正相关($R^2 = 0.921, p = 0.028$),说明在废水厂的各个处理单元中检测到 int1 整合子。这和 GUO 等^[24]发现从污水厂中分离的 int1 整合子肠杆菌科细菌耐药率高达 45.9% 的发现一致。而且,int1 整合子和 OXA-1 和 sul1 呈显著性正相关($R^2 = 0.956, p = 0.011; R^2 = 0.990, p = 0.001$)。序列分析说明 sul1 基因位于 int1 整合子的保守段(3'-CS)^[25-26],这解释了样本中磺胺类抗性基因

的丰度($4.08 \times 10^7 \sim 1.17 \times 10^9$ copies/g)。β-内酰胺酶编码基因 OXA-1 广泛存在于制药废水厂不同阶段分离的整合酶阳性染色体中^[27-28],而 OXA-1 基因偶尔与 *sul1* 基因位于 I 类整合子上,该基因表明在制药废水厂中,*sul1* 和 OXA-1 的显性亚型部分是由第 I 类整合传播所造成的。此外,*tetW* 和 *intI I* (I 类整合酶基因)也在几个市政污水处理厂的处理单元中检测到^[29]。

基因相对表达量是样本中目的基因的绝对拷贝数相对于内参基因 16SrRNA 绝对拷贝数的变化,代表的是微生物群落中所含的抗性基因数量,可定量表示抗生素对抗性基因的诱导率,相对定量反映样品中抗性基因的分布情况^[30]。从图 2 b)中可看出,OXA-1,*sul1* 和 *sul2* 为废水厂微生物群落中表达量、抗生素对抗性基因的诱导率较高的抗性基因,而四环素类 *tetO*,*tetQ* 和 *tetW* 表达量较低。

2.2 微生物群落多样性分析

利用 Miseq 高通量测序分析技术在门水平上对测序结果进行归类,分析所取 7 个污泥样品的菌群组成及相对丰度差异,结果如图 3 所示。

由图 3 可见,在门级别,制药废水厂各样品中共统计到 38 个菌门。在污泥样品中,变形菌门(Proteobacteria),拟杆菌门(Bacteroidetes),厚壁菌门(Firmicutes),栖热菌门(Thermus),芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)等为优势菌门,平均总相对丰度比例占到 81.05%。从图中看出,从进水(J)到出水(CH),Proteobacteria 和 Firmicutes 相对丰度均有所降低,而其他菌门的丰度均不同程度的升高。从整体来看,Proteobacteria 和 Bacteroidetes 的相对丰度为先降低后增加,氨氮的去除率为先增加后降低,这和康晓荣^[31]的 Proteobacteria 和 Bacteroidetes 随着总氮和总磷去除率的提高,其丰度也相应增加,具有重要的硝化及反硝化脱氮除磷作用的结论有差异,原因有待分析。Firmicutes 在 J,IC 和 CH 中丰度较高,分别为 16.81%,13.59%和 8.19%。Thermus 在 SBR,A,O 和 C 中丰度较高,分别为 9.35%,8.34%,7.54%和 9.10%。Gemmatimonadetes 在 SBR,A,O 和 C 中丰度较高,分别为 8.20%,6.36%,6.91%和 8.60%。

变形菌门在所有活性污泥样品中所占的比例最多,占每个活性污泥样品细菌总相对丰度的 29.48%~78.95%范围内,为主要优势菌门。这与 LIU 等^[25]研究结果一致,其通过构建实验室规模生物造粒流化床反应器对不同时期的微生物群落进行多样性分析,所得的 18 个分类操作单元中,有 11 个属于变形菌门,表明变形菌门在污水处理中属于较优势的细菌类群。这说明不仅仅是污水处理,制药废水处理中的优势菌门也为变形菌门。

2.3 微生物群落和抗性基因相关性分析

微生物群落结构会影响 ARGs 的产生和丰度^[32],但是微生物群落结构在环境样本中对 ARGs 扩增影响的研究还是有限的。通过高通量测序和荧光定量方法来分析污水处理系统中微生物群落和抗性基因分布及其相关性。

首先对制药废水厂的 5 个样本进行主成分分析如图 4 a)所示,然后选取抗性基因 *int1*,OXA-1,*sul1*,*sul2*,*tetO*,*tetQ* 和 *tetW* 作为环境因子,结合各样本微生物群落结构,选取制药废水厂中 15 种相对丰度较高的菌属作为样本,利用冗余分析(RDA)方法研究微生物与环境因子的相关性,结果见图 4 b)。

对 7 个样本进行主成分分析,结果(见图 4 a))表明,PC1(主成分 1)表示两组间差异中可以解释全面分析结果的 56.67%,PC2(主成分 2)表示两组间差异中可以解释全面分析结果的 31.61%,两点之间的距离越近,表明两个样本之间的微生物群落结构相似度越高,差异越小。从图 4 a)中可以看出,A,O 和 C 这 3 个样本分布较近,菌群相似度较高;J 与 CH 样本与其他样本单元分布较远,微生物群落结构相似度较低,有明显的差异性,说明制药废水厂中进水、出水和废水处理单元的微生物群落菌群有较大的不同。A,O 和 C 这 3 个样本与 IC 和 SBR 样本分布相对较远,说明 IC,SBR 和 A,O 和 C 3 个样本菌群有较大的不同。且每组样本与样本之间的距离呈现一定的变化规律。

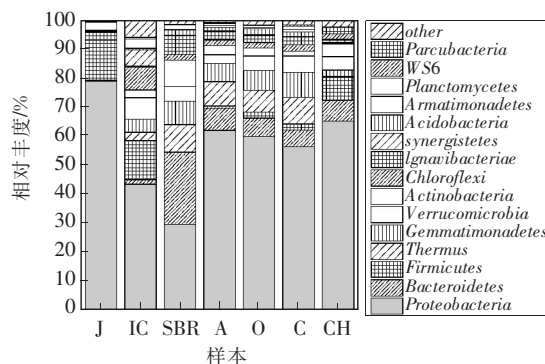


图 3 门水平下微生物群落相对丰度

Fig.3 Relative abundance of portal in all samples

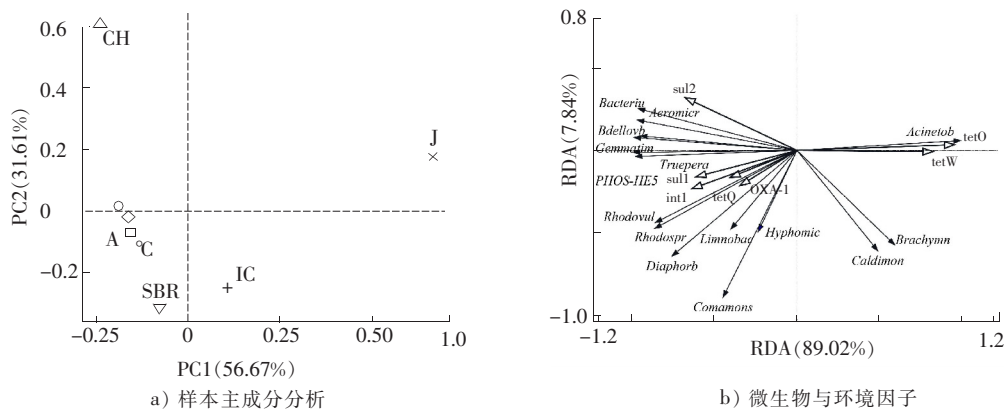


图 4 废水厂微生物相关性分析结果

Fig.4 Results of microorganism RDA analysis in wastewater plant

对 A, O, C, IC 和 SBR 单元中前 15 种相对丰度较高的菌属进行冗余分析, 结果表明(见图 4 b)), 主轴 1 和主轴 2 共解释了微生物群落结构和水质、抗性基因参数的 96.86%。从图 4 b) 来看, *Aeromicrobium* 与 *sul2* 呈较高程度的正相关性, 可能是 *sul2* 在微生物群落中存在的可能的主要菌群; *Rhodovulum* 和 *Rhodospirillaceae* 菌属与 OXA-1 和 *tetQ* 呈较高程度的正相关性, 这些菌属是这些 ARGs 分布的主要菌属; *Acinetobacter* 与 *tetO* 和 *tetW* 呈现较高程度的正相关性, 可能是 *tetO* 和 *tetW* 在微生物群落中存在的可能的的主要菌属。

3 结 论

采用高通量测序技术和荧光定量 PCR 技术, 通过检测废水厂活性污泥中抗生素抗性基因的绝对丰度和微生物菌群的相对丰度, 进而综合分析制药废水处理厂中某些抗生素抗性基因和微生物群落结构的特征, 结果显示: *sul1*, *sul2*, *tetO*, *tetQ*, *tetW*, OXA-1 和可移动遗传元件 *int1* 在制药废水厂中各个阶段的检出频率均为 100%, 从 IC 池到 C 池, 总抗性基因浓度范围为 $3.09 \times 10^8 \sim 2.26 \times 10^9$ copies/g(干重), 基因总浓度上升了 7.3 倍; 在污泥样品中, 变形菌门(*Proteobacteria*), 拟杆菌门(*Bacteroidetes*), 厚壁菌门(*Firmicutes*), 栖热菌门菌门(*Thermus*), 芽单胞菌门(*Gemmatimonadetes*)等为优势菌门, 平均总相对丰度比例占到 81.05%; *Aeromicrobium* 与 *sul2* 呈较高程度的正相关性, 可能是 *sul2* 在微生物群落中存在的可能的的主要菌群; *Rhodovulum* 和 *Rhodospirillaceae* 菌属与 OXA-1 和 *tetQ* 呈较高程度的正相关性, 这些菌属是这些 ARGs 分布的主要菌属; *Acinetobacter* 与 *tetO* 和 *tetW* 呈现较高程度的正相关性, 可能是 *tetO* 和 *tetW* 在微生物群落中存在的可能的的主要菌属。因此, 相关抗性基因的增值和分布与相关特定菌属有关, 可以通过控制相关菌属的丰度来消减工业废水厂中的抗性基因, 为以后控制制药废水厂中抗生素抗性基因的传播提供了理论基础。

参考文献/References:

- [1] HE L Y, YING G G, LIU Y S, et al. Discharge of swine wastes risks water quality and food safety: Antibiotics and antibiotic resistance genes from swine sources to the receiving environments [J]. *Environment International*, 2016, 92-93: 210.
- [2] RODRIGUEZ-MOZAZ S, CHAMORRO S, MARTI E, et al. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river [J]. *Water Research*, 2015, 69: 234-242.
- [3] NAQUIN A, SHRESTHA A, SHERPA M, et al. Presence of antibiotic resistance genes in a sewage treatment plant in Thibodaux, Louisiana, USA [J]. *Bioresource Technology*, 2015, 188(11): 79-83.
- [4] TONG Z, ZHANG X X, LIN Y. Plasmid metagenome reveals high levels of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in activated sludge [J]. *Plos One*, 2011, 6(10): e26041.
- [5] FORSBERG K J, REYES A, WANG B, et al. The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens [J]. *Science*, 2012, 337(6098): 1107-1111.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 王玉倩, 薛秀花. 实时荧光定量 PCR 技术研究进展及其应用 [J]. 生物学通报, 2016, 51(2): 1-6.
WANG Y Q, XUE X H. The application and development of real-time fluorescent quantitative PCR [J]. Bulletin of Biology, 2016, 51(2): 1-6.
- [9] AYDIN S, INCE B, INCE O. Development of antibiotic resistance genes in microbial communities during long-term operation of anaerobic reactors in the treatment of pharmaceutical wastewater [J]. Water Research, 2015, 83(4): 337-344.
- [10] LIU M, ZHANG Y, YANG M, et al. Abundance and distribution of tetracycline resistance genes and mobile elements in an oxytetracycline production wastewater treatment system [J]. Environmental Science & Technology, 2012, 46(14): 7551.
- [11] GUO X, YAN Z, ZHANG Y, et al. Behavior of antibiotic resistance genes under extremely high-level antibiotic selection pressures in pharmaceutical wastewater treatment plants [J]. Science of the Total Environment, 2017, 612: 119-128.
- [12] WANG F H, QIAO M, LV Z E, et al. Impact of reclaimed water irrigation on antibiotic resistance in public parks, Beijing, China [J]. Environmental Pollution, 2014, 184(1): 247-253.
- [13] XU Z, LI L, SHIRTLIFF M E, et al. Resistance class 1 integron in clinical methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* strains in southern China, 2001-2006 [J]. Clinical Microbiology & Infection, 2011, 17(5): 714-718.
- [14] BEN-SHAHAR O, OBARA I, ARY A W, et al. Antimicrobial resistance of integron-harboring *Escherichia coli* isolates from clinical samples, wastewater treatment plant and river water [J]. Science of the Total Environment, 2012, 414(414): 680-685.
- [15] LING A L, PACE N R, HERNANDEZ M T, et al. Tetracycline resistance and Class 1 integron genes associated with indoor and outdoor aerosols [J]. Environmental Science & Technology, 2013, 47(9): 4046-4052.
- [16] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M].第 4 版. 北京:中国环境科学出版社, 2002.
- [17] GAZE W H, ZHANG L, ABDOUSLAM N A, et al. Impacts of anthropogenic activity on the ecology of class 1 integrons and integron-associated genes in the environment [J]. Isme Journal, 2011, 5(8): 1253.
- [18] CHEN H, ZHANG M. Occurrence and removal of antibiotic resistance genes in municipal wastewater and rural domestic sewage treatment systems in eastern China [J]. Environment International, 2013, 55(4): 9.
- [19] 翟文超. 抗生素抗性基因在抗生素制药废水处理过程中的分布特征及控制原理研究 [D]. 天津, 南开大学, 2014.
ZHAI Wenchao. The Fate and Control Principle of Antibiotic Resistance Genes in Pharmaceutical Wastewater Treatment Systems[D]. Tianjin: Nankai University, 2014.
- [20] LUO Y, 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.
- [21] AMINOV R I, GARRIGUESJEANJEAN N, MACKIE R I. Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2001, 67(1): 22.
- [22] WANG J, MAO D, MU Q, et al. Fate and proliferation of typical antibiotic resistance genes in five full-scale pharmaceutical wastewater treatment plants [J]. Science of the Total Environment, 2015, 526(4): 366-373.
- [23] PEAK N, KNAPP C W, YANG R K, et al. Abundance of six tetracycline resistance genes in wastewater lagoons at cattle feedlots with different antibiotic use strategies [J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(1): 143-151.
- [24] GUO X, XIA R, HAN N, et al. Genetic diversity analyses of class 1 integrons and their associated antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae strains recovered from aquatic habitats in China [J]. Letters in Applied Microbiology, 2011, 52(6): 667-675.
- [25] LIU Y J, WANG X C, YUAN H L. Characterization of microbial communities in a fluidized-pellet-bed bioreactor for wastewater treatment [J]. Desalination, 2009, 249(1): 445-452.
- [26] HOA P T P, NONAKA L, VIET P H, et al. Detection of the *su1*, *su2*, and *su3* genes in sulfonamide-resistant bacteria from wastewater and shrimp ponds of north Vietnam [J]. Science of the Total Environment, 2008, 405(1/2/3): 377-384.
- [27] MOURA A, PEREIRA C, HENRIQUES I, et al. Novel gene cassettes and integrons in antibiotic-resistant bacteria isolated from urban wastewaters [J]. Research in Microbiology, 2012, 163(2): 92-100.
- [28] TENNSTEDT T, SZCZEPANOWSKI R, BRAUN S, et al. Occurrence of integron-associated resistance gene cassettes located on antibiotic resistance plasmids isolated from a wastewater treatment plant [J]. Fems Microbiology Ecology, 2010, 45(3): 239-252.
- [29] DU J, REN H, GENG J, et al. Occurrence and abundance of tetracycline, sulfonamide resistance genes, and class 1 integron in five wastewater treatment plants [J]. Environmental Science & Pollution Research, 2014, 21(12): 7276-7284.
- [30] 王丽梅, 罗义, 毛大庆, 等. 抗生素抗性基因在环境中的传播扩散及抗性研究方法 [J]. 应用生态学报, 2010, 21(4): 1063-1069.
WANG Limei, LUO Yi, MAO Daqing et al. Transport of antibiotic resistance genes in environment and detection methods of antibiotic resistance, 2010, 21(4): 1063-1069.
- [31] 康晓荣. 超声联合碱促进剩余污泥水解酸化及产物研究 [D]. 哈尔滨, 哈尔滨工业大学, 2013.
KANG X R. Study on hydrolysis and acidification of activated sludge enhanced by ultrasound combined with alkaline [D]. Harbin institute of technology, 2013.
- [32] YANG Y, LI B, ZOU S, et al. Fate of antibiotic resistance genes in sewage treatment plant revealed by metagenomic approach [J]. Water Research, 2014, 62(7): 97-106.