

抗生素耐药基因在畜禽粪便-土壤系统中的 分布、扩散及检测方法

田甜甜¹ 王瑞飞^{1,2} 杨清香^{1,2*}

(1. 河南师范大学生命科学学院 河南 新乡 453007)

(2. 河南省高校资源微生物与功能分子重点实验室 河南师范大学 河南 新乡 453007)

摘要: 抗生素耐药基因作为一种新型的环境污染物已引起研究者的高度关注。畜禽养殖业长期将抗生素添加到饲料中,在促进动物生长、预防和治疗动物疾病等方面起了重要作用。这些抗生素大多数不能被动物完全吸收,在动物肠道中诱导出耐抗生素细菌和抗生素耐药基因,并随着粪便排出体外。畜禽粪便作为重要的抗生素、耐抗生素细菌和抗生素耐药基因储存库,通过堆粪、施肥等农业活动进入土壤环境中,可刺激土壤中耐抗生素细菌和抗生素耐药基因的富集。耐药基因借助于基因水平转移等方式在土壤介质中进一步传播扩散,甚至进入植物中随食物链传播,对生态环境和人类健康造成极大的威胁。为了正确评估抗生素耐药基因的生态风险,本文结合国内外相关研究,系统阐述了畜禽粪便-土壤系统中抗生素耐药基因的来源、分布及扩散机制,同时探讨了细菌耐药性的主要研究方法,指出堆肥化处理仍是目前去除抗生素耐药基因的主要手段,并对今后的研究方向进行展望。

关键词: 抗生素耐药基因, 畜禽粪便, 土壤, 检测方法

Distribution, spread and detection methods of antibiotic resistance genes in livestock manure and soil system

TIAN Tian-Tian¹ WANG Rui-Fei^{1,2} YANG Qing-Xiang^{1,2*}

(1. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang, Henan 453007, China)

(2. Key Laboratory for Microorganisms and Functional Molecules (Henan Normal University), University of Henan Province, Xinxiang, Henan 453007, China)

Abstract: There are increasing concerns about antibiotic resistance genes (ARGs) as emerging environmental contaminants. Antibiotics have been routinely utilized in livestock farming as feed additives to promote animal growth, prevent and treat diseases caused by various bacteria pathogens. Most of them could not be totally absorbed by animals but induce the development of antibiotic resistance bacteria (ARB) and ARGs in animal intestinal tracts. The residual antibiotics, ARB or ARGs

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 20677014, 21277041); Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (No. 20134104110006)

*Corresponding author: Tel: 86-373-3326340; E-mail: yangqx66@163.com

Received: November 03, 2015; Accepted: December 31, 2015; Published online (www.cnki.net): January 04, 2016
基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 20677014, 21277041); 教育部博士点基金项目(No. 20134104110006)

*通讯作者: Tel: 86-373-3326340; E-mail: yangqx66@163.com

收稿日期: 2015-11-03; 接受日期: 2015-12-31; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-01-04

are discharged with fecal. Therefore, animal wastes are important reservoirs of antibiotics, ARB, and ARGs. Antibiotic resistance may be transferred to the soil environment through composting and manure fertilization process. Furthermore, ARGs can disseminate in the environment by horizontal gene transfer, and even spread along the food chain, which poses a huge threat to the environment and human health. In this paper, the profiles of the occurrence, distribution and spread of ARGs in animal manure-soil system are reviewed in detail. The main detection methods of antibiotic resistance are discussed. Composting is still an effective way to reduce the spread of antibiotic resistance genes in animal manure and therefore should be an important consideration in the future.

Keywords: Antibiotic resistance genes, Manure, Soil, Detection methods

随着医学和生物技术的发展, 新型抗生素不断涌现, 为临床提供了更多的选择。抗生素的应用范围也由原来的人畜感染控制发展到水产养殖、饲料添加等。据统计, 我国抗生素年产量约为 21 万 t, 有 46.1% 的抗生素用于畜禽养殖业, 且其中将近一半用于动物生长促进剂^[1]。这些兽药抗生素大多数不能被动物完全吸收, 而是以原型或代谢物的形式排放到环境中, 对环境生物及生态产生深远影响, 并最终对人体健康产生危害^[2-3]。据研究报道, 肉用动物使用的抗生素有 30%–90% 以母体化合物的形式随粪便排出体外, 其中 β -内酰胺类和大环内酯类抗生素在粪便储存的过程中容易被降解, 而大多数抗生素会随着施肥过程进入土壤^[4]。最近的研究表明, 在不同地区畜禽粪便中所检测到的抗生素最高含量达到 mg/kg 级水平。例如, 在中国猪粪中检出的恩诺沙星、磺胺氯哒嗪和土霉素的浓度分别达到 33、4 和 59 mg/kg, 在德国猪粪中检测到的四环素和磺胺类抗生素分别达到 53 mg/kg 和 38 mg/kg, 而在澳大利亚猪粪中检测到的氯四环素和磺胺二甲嘧啶的浓度则达到 46 mg/kg 和 20 mg/kg^[4]。兽药抗生素主要通过堆粪、施肥等农业活动进入土层, 并且已经发现在土壤中有较高的残余, 其中四环素高达 300 μ g/kg, 磺胺类抗生素高达 11 μ g/kg^[5]。

抗生素滥用导致的最严重问题就是耐抗生素细菌的产生。据统计, 欧盟每年由于感染多重耐药性细菌而死亡的人数多达 25 000 人, 在美国每年多达 23 000 人^[6]。抗生素耐药性的产生和传播已经成为全球性的严峻问题, 各种“超级细菌”的频繁出现正在给人类敲响警钟, 挑战着临床医学。抗生素耐

药性已被世界卫生组织(World health organization, WHO)列为 21 世纪人类健康所面临的最严重威胁之一, 并且抗生素耐药基因也作为一种新型的污染物被明确提出^[7], 引起环境研究领域的高度关注。畜牧业中抗生素的使用能够刺激农场环境中抗生素耐药性的发展和丰度的提高已经是不争的事实。畜禽粪便已成为抗生素和耐抗生素细菌的一个库, 通过施肥能够明显增加土壤中耐药微生物种群的选择性和耐药基因的水平^[4]。

抗生素耐药基因相对于耐抗生素细菌和抗生素本身来说是更严重的污染物, 抗生素在环境中的可降解性以及耐抗生素细菌在不同环境中适应性问题都对耐药性的传播起到限制作用。然而耐药基因具有水平转移和难被生物降解的特性, 即便携带耐药基因的细菌死亡或裂解, 耐药基因仍然可以在不同环境中传播。环境储库是临床致病菌新耐药基因的重要源, 而畜禽养殖粪便是耐药基因和选择元件的高输入生境, 对土壤的耐药水平起到重要作用。特别是多重耐药基因同时存在是目前临床治疗的最大挑战和威胁, 粪便能够诱导细菌产生位于转位元件上的多重耐药基因的各种组合, 并高效地通过宽宿主范围的质粒或其他接合元件在土壤或其他生境中的许多种群中传播和转移^[4]。本文系统阐述了畜禽粪便-土壤系统中抗生素耐药基因的来源、分布和扩散机制, 并探讨了细菌耐药性的主要研究方法, 以及抗生素耐药基因在环境中的消滅。

1 抗生素耐药基因的概念

抗生素是由细菌、真菌或放线菌等产生的次级

代谢产物及其衍生物,能够抑制甚至杀死其他敏感微生物。目前,畜禽养殖中常用的抗生素主要有四环素类、大环内酯类、氨基糖苷类、氯霉素类等天然抗生素,以及磺胺类、喹诺酮类等合成或半合成药物。环境中某些微生物携带或能够获得特定的基因,它们编码不同的蛋白质以去除抗生素的生物毒性效应,这些基因被认为是抗生素耐药基因^[8]。细菌的耐药性可分为“内源固有性耐药”和“外源获得性耐药”。内源性耐药包括细菌基因组上的耐药基因原型、准耐药基因以及未表达的耐药基因,可通过随机突变或抗生素选择压力表现出耐药性,能够将耐药基因遗传给下一代^[9]。外源获得性耐药,是由于抗生素的广泛使用促进了耐药基因在环境中的富集与迁移,使敏感菌获得耐药性。基因水平转移是细菌获得性耐药的重要途径,与之相关的可移动元件主要有质粒、转座子、插入序列共同区、基因盒、整合子和噬菌体等。有研究表明,携带耐药基因的可移动元件能够转移到人共生菌和人致病菌中,对人类生命健康造成极大的威胁^[10]。例如,金属 β -内酰胺酶NDM-1于2008年被发现于印度新德里,借助于质粒的水平转移,现已在世界各地的多种致病菌中均有病例报道^[11]。目前,环境中已发现多种多样的抗生素耐药基因,并建立了一些抗生素耐药基因数据库,如ARDB (Antibiotic resistance genes database)等^[12]。

2 畜禽粪便-土壤系统中抗生素耐药基因的来源、分布及扩散

目前,抗生素已广泛用于畜禽养殖业,长期以亚剂量治疗水平添加到饲料和饮水中,造成环境中严重的抗生素污染。我们研究组对河南省新乡地区8家养猪场和11家养鸡场饲喂抗生素的情况进行调研,发现除了一家养鸡场使用中药外,其余养殖场全部使用抗生素来预防和治疗疾病,主要涉及到四环素类、磺胺类、大环内酯类、喹诺酮类和 β -内酰胺类等共10种抗生素,且83.30%的养殖户对抗生素使用不合理和用量严重超标^[13]。有研究表明,在

畜禽养殖过程中添加亚剂量水平的抗生素能显著提高动物肠道中耐抗生素细菌的数量,增加粪便中抗生素残留量和抗生素耐药基因的丰度^[14]。我们从鸡粪和猪粪中分离到了高比例的耐药细菌和多重耐药细菌,且耐药细菌的存在和养殖场抗生素的使用存在一定的正相关^[13]。越来越多的研究者从畜禽粪便中检测到高丰度的耐药基因,如四环素类耐药基因 *tetQ*、*tetW*、*tetX*、*tet(32)*、*tetO*、*tetM*、*tetL* 和 *tetG* 等^[15],磺胺类耐药基因 *sul1*、*sul2* 和 *sul3* 等^[16],这表明畜禽粪便中存在丰富多样的耐药基因,多种耐药机制并存已成为一种普遍现象。不同种类的抗生素耐药基因在不同的动物养殖场分布不同。Mu 等^[16]研究了中国北方地区不同养殖场中四环素类、磺胺类、大环内酯类及质粒介导的喹诺酮类(Plasmid-mediated quinolone, PMQR)耐药基因的分布情况。结果发现,粪便中抗生素耐药基因总浓度由高到低依次为:鸡粪>猪粪>牛粪,且PMQR和*sul*耐药基因的分布最为普遍丰富。这主要有两个原因:(1)动物胃肠道中耐抗生素细菌和耐药基因的选择性进化^[17];(2)养鸡场饲养密度大、抗生素使用剂量相对较大,导致其粪便中抗生素和耐药基因残留水平高^[18]。此外,Qu 等^[19]采用比较宏基因组学的方法对鸡盲肠中微生物进行检测,发现了大量的转座酶基因,这些转座酶在一定程度上促进了耐药基因的水平转移,这也是鸡粪中抗生素耐药基因丰度高的一个重要原因。这表明畜禽粪便是重要的耐药基因储存库,粪便中耐药基因的丰度与养殖场中抗生素使用情况和动物类型等密切相关。

畜禽粪便中的抗生素残留、耐药微生物和耐药基因常随着堆粪、施肥等农业活动进入土壤环境,导致耐药基因更广范围的传播和富集,影响土壤中的微生物群落和耐药水平。我们研究组对小麦根际土壤施加不同浓度的土霉素,发现小麦根际微生物群落结构中细菌和放线菌数量明显下降,真菌无明显变化,且土霉素的抑菌作用与其使用剂量呈一定的正相关,30 d内抑菌作用不消除^[20]。有研究表明,

将畜禽粪肥施加到农田土壤中可直接导致土壤中抗生素耐药基因水平的提高。例如, Heuer 等^[21]将磺胺类抗生素污染的粪肥反复施加到土壤中, 结果发现土壤中磺胺类耐药基因的丰度明显提高。Fang 等^[22]利用宏基因组的方法对鸡粪和施加鸡粪的蔬菜大棚土壤进行研究, 发现土壤中抗生素残留水平、抗生素耐药基因的丰度等与粪肥施加量存在显著的正相关。朱永官等^[15]采用高通量荧光定量 PCR 的方法对我国 3 个商业养猪场的粪便、堆粪及施加粪肥的土壤进行检测, 共发现五大类 149 种抗生素耐药基因, 其中 63 种耐药基因的丰度显著高于对照组(192–28 000 倍); 还发现了大量的 IS6 家族转座酶, 并且这些转座酶与耐药基因的丰度之间呈正相关(相关系数 0.96), 暗示转座酶是引起耐药基因富集的重要原因。目前, 关于土壤环境中耐抗生素细菌和耐药基因来源的研究多局限于抗生素污染的畜禽粪便。然而, 最近的研究发现, 即使是未曾饲喂抗生素的动物, 其粪便也会刺激土壤中耐抗生素细菌和耐药基因的产生。例如, Udikovic-Kolic 等^[23]利用功能宏基因组学方法研究了未曾使用抗生素的奶牛粪便对土壤微生物和耐药基因的影响, 结果表明, 施加粪肥可促进土壤中耐 β -内酰胺类抗生素细菌的增殖和编码 β -内酰胺酶基因的扩增, 且这些耐抗生素细菌和耐药基因均来自土著微生物。因此, 土壤环境中耐抗生素细菌和耐药基因的增加并不能完全归结于畜禽粪便中的抗生素残留, 也可能是动物粪便中其他组分的作用, 或者是土壤介质中某些因素(如重金属)的作用, 这为我们研究环境中耐药基因的发展提供了新的思路。有研究表明, 微生物对重金属抗性和抗生素耐药性的选择具有协同作用; 基于两者协同作用的遗传机理或生理机制, 即使是低浓度的重金属也能对土壤中多种抗生素耐药性发生选择作用^[24]。由此可见, 自然界中的选择性压力是人类所无法预知的, 理解抗生素耐药基因的环境行为十分必要, 如耐药基因对人类农业活动的响应, 耐药基因在环境中的迁移规律和迁移

概率等。

基因从粪便到土壤的水平转移是细菌耐药性扩散的重要途径。有研究表明, 土壤和畜禽粪便中的细菌群落存在巨大差异, 粪便中的可培养细菌在土壤中的存活时间只有几周到几个月, 但是基因的这种从粪便耐抗生素细菌到土壤土著细菌的水平转移会介导土壤中长期滞留耐药基因^[23]。已有研究证明粪便能刺激抗生素耐药基因在土壤中的水平转移。主要的宽宿主质粒如 IncP-1 和 IncQ 在粪便中丰度很高, 质粒 IncN 和 IncW 也经常检出, 质粒的多样性使耐药基因能够在不同的细菌种属之间进行水平转移^[25]。Inc18 型质粒是重要的耐药基因传送体, 可以介导染色体上大小达到 857 kb 的区域进行水平转移, 包括耐药基因和致病岛, 其宿主范围甚至可以从革兰氏阳性细菌到革兰氏阴性细菌, 使基因的水平转移在亲缘关系很远的种属之间发生成为可能^[26]。然而, 最近的研究表明, 土壤中丰富的抗生素耐药基因主要取决于微生物群落结构, 土壤中的可移动元件很少与耐药基因耦联进行水平转移^[27]。因此, 尽管土壤环境中存在丰富的耐药基因, 且耐药基因对自然选择具有快速应答能力, 耐药基因两侧可移动元件的缺乏在很大程度上限制了土著细菌中耐药基因的转移。但是, 一旦耐药基因存在于人类致病菌上, 如假单胞菌属 (*Pseudomonas* spp.), 这些具有抗生素耐药性的人类致病菌就很可能随着粪肥的施加进入食物链, 进而引发临床感染。

多重耐药基因在细菌细胞内往往以耐药基因岛或耐药基因盒的方式聚集存在。这些耐药基因盒主要位于转座子或质粒的整合子上, 而很少在染色体的整合子上, 暗示了抗生素对耐药基因可移动性的选择作用^[4]。I 型整合子普遍携带耐药基因盒或耐药基因岛, 是引起细菌多重耐药的重要原因。例如, 在中国猪源大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) 中, I 型整合子携带有耐药基因岛, 包含 *aadA1*、*aadA2*、*aadA23B*、*blaP1a-aadA2-ereA*、

dfrA1-aacA4-catB3、*dfrA1-aadA1* 和 *dfrA1-orfC* 等耐药基因^[28]。I 型整合子通过位点特异性重组位于 Tn402 样转座子上, 促进了抗生素耐药基因在环境中的转移。畜禽粪便中的抗生素物质能够提高整合酶和转座酶的活性, 因此施加粪肥也能在一定程度上促进多重耐药基因在环境中的扩散。猪粪中常常检测到临床致病菌菌株的整合子, 且在施肥数月后仍然在土壤中滞留。这种携带与整合子相关的耐药基因的细菌传输可以发生在人和牛之间, 这就使我们不得不关注这些携带耐药基因的转座子及整合子对人类健康的威胁。有些土壤和粪便中的耐抗生素细菌与人类的病原菌近缘, 例如不动杆菌属 (*Acinetobacter* spp.), 使得基因交换更加容易。另外, 一个细菌种群捕获抗生素耐药基因后通常会在相应的抗生素选择压力下占优势, 同时说明种群对外源 DNA 进入细胞的容忍度增加, 若遇到其他抗生素的选择压力, 就会产生正反馈, 而更容易产生多重抗生素耐药性^[4]。然而关于多重抗生素耐药及耐药基因在畜禽粪便、土壤中的分布、传播及机制研究还缺乏系统性。

畜禽粪便常作为有机肥施用于农田土壤来促进农作物的生长, 大面积的使用必然会造成农田系统中大量的抗生素残留和抗生素耐药基因污染, 如不及时处理可能随食物链传播, 严重威胁人体健康。有研究表明, 农作物生长在含抗生素的土壤中, 可吸收并富集抗生素。例如, Dolliver 等^[29]研究了玉米、马铃薯和莴苣对猪粪中所添加抗生素的吸收情况, 结果显示, 生长 45 d 的 3 种作物中均检测到相应的抗生素, 且随粪肥中抗生素浓度的升高而增加。王瑾等^[30]对施加猪粪和不施加猪粪的韭菜中抗生素残留进行检测, 结果在施粪组韭菜根部检测到抗生素残留, 而对照组未检测到。人们长期食用这些具有抗生素残留的蔬菜, 对身体健康造成一定的安全隐患。另外, 我们从施加畜禽粪便的芹菜、小白菜和黄瓜中均检测到了高比例的耐 β -内酰胺类内生菌, 发现土壤中的抗生素耐药基因有明显向着植

物内生菌系统转移的倾向^[31]。Wang 等^[32]将生菜和莴苣种植在施加粪肥的土壤中, 发现土壤中抗生素耐药基因的丰度明显降低, 并在植物内生菌和叶际微生物中检测到抗生素耐药基因和 I 类整合子。这些耐抗生素的植物内生菌很可能来自土壤土著细菌, 并在植物组织内定殖, 促使抗生素耐药基因从土壤转移到植物中。同时, 蔬菜中 I 类整合子的高发生率促进了植物体内抗生素耐药基因的扩散。然而, 耐抗生素细菌和抗生素耐药基因能否直接从粪便转移到植物内仍不清楚, 抗生素耐药基因在畜禽粪便、土壤、植物之间的传输机制仍不够系统化, 有待于进一步研究。

3 环境中抗生素耐药基因的主要研究方法

3.1 基于培养方法的耐药微生物的分离鉴定

传统的抗生素耐药性研究方法主要是基于微生物培养, 通过抗生素耐药表型来评价其耐药性。细菌药敏试验是最为常用的研究方法, 根据其试验效果可分为测量药物最低抑菌浓度 (Minimal inhibitory concentration, MIC) 的琼脂稀释法和肉汤稀释法, 测量含药纸片抑菌圈直径的 K-B 琼脂扩散法, 以及稀释法和扩散法相结合的 E-test 试验。K-B 琼脂法是目前使用最为广泛的药敏试验, 是将浸有抗生素的纸片贴在涂布有细菌的琼脂平板上, 抗生素在琼脂平板上呈梯度性扩散, 培养后细菌在纸片周围形成一个抑菌圈, 最后测定抑菌圈的直径即可评估其药敏性, 但是该法不能直接读取细菌的 MIC 值^[33]。肉汤稀释法可测定 MIC 值和最低杀菌浓度 (Minimal bactericidal concentration, MBC), 但该方法费力, 适合少量菌株的药敏测定。琼脂稀释法可测定细菌的 MIC 值, 结果准确可靠, 适合做大量菌株的药敏试验。E-test 法结合了扩散法和稀释法的优点, 弥补了 K-B 琼脂法不能测量 MIC 值的缺点, 且操作简便, 但是成本高, 常用作真菌的药敏试验^[34]。

根据所分离微生物的耐药性, 利用各种分子生物学方法或者对耐抗生素细菌进行全基因组测序可以获得该菌株抗生素耐药基因的全部信息以及

耐药机制。

3.2 基于 PCR 技术的耐药基因的检测

传统的微生物培养方法在细菌耐药性的研究中发挥了巨大的作用,但是环境中可培养微生物仅占环境中微生物总数的 0.5%–1.0%,该方法遗漏了大量耐药微生物和耐药基因。近些年来,各种分子生物学技术的快速发展,在方法学上为耐药基因的研究提供了更广泛的思路。聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)是一种能够在生物体外快速扩增特定 DNA 片段的分子生物学技术,可以直接检测微生物或环境样品中的耐药基因,不需要对微生物进行分离培养。由于该方法灵敏、快速、准确,可以在数小时内将目的基因放大到几百万倍,已广泛用于生命科学领域的研究中,是现阶段耐药基因检测的主要手段。然而,普通 PCR 方法只能检测到环境中耐药基因的存在与否,很难实现基因的定量分析。实时荧光定量 PCR (Real-time quantitative PCR, RTQ-PCR)通过将荧光基团加入 PCR 反应体系中,借助于荧光信号的积累实时监测 PCR 进程,最后通过标准曲线对未知的模板进行定量分析。RTQ-PCR 重复性好、稳定性强,且具有实时性,实现了自动化操作,是 PCR 从定性到定量的飞跃,目前已广泛用于耐药基因的定量分析。PCR 和 RTQ-PCR 技术的关键是根据已知的抗生素耐药

基因序列设计引物和 PCR 条件,进而成功扩增出耐药基因。对于环境样品,通常先提取出高质量的宏基因组 DNA,然后以该 DNA 样品作为模板,用设计的耐药基因引物对其进行 PCR 扩增,将扩增产物连接载体后将其转化到 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中,最后通过测序的方法来验证和检测环境中是否含有该耐药基因。目前,环境中一些高丰度、高检出率的耐药基因及其引物如表 1 所示。但是,无论是普通 PCR 还是 RTQ-PCR 都还局限于已知序列的单一耐药基因检测,不能发现新基因;并且要对大量基因同时检测需要大量的工作,还需要测序分析来进一步确认。

3.3 基因芯片技术

药敏试验、PCR 法及 RTQ-PCR 都只能对少量样品进行耐药性分析,而基因芯片技术可以克服此缺点,对大量样品同时检测多种抗生素耐药基因。基因芯片技术是 20 世纪 80 年代末发展起来的,是将数以万计、甚至百万计的 DNA 探针固定于固相载体上形成 DNA 微阵列,将样品核酸用荧光或同位素等方法标记,并通过与芯片探针杂交来检测样本内的多种特定 DNA 序列,通过计算机分析,即可得到样品中大量基因序列特征和基因表达信息。由于基因芯片进行一次杂交即可获得样品中大量序列信息,且具有灵敏、准确、多参数同步分析、

表 1 环境中高检出率的耐药基因引物信息
Table 1 PCR primers of antibiotic resistance genes with high frequency in the environment

目标基因 Target gene	耐药机制 Resistance mechanism	PCR 引物序列 Primer sequence (5'→3')	产物大小 Product size (bp)	参考文献 Reference
<i>tetM</i>	Protection	F: ACAGAAAGCTTATTATATAAC R: TGGCGTGTCTATGAIGTTTAC	171	[35]
<i>tetO</i>	Protection	F: ACGGARAGTTTATTGTATAACC R: TGGCGTATCTATAATGTTGAC	171	[35]
<i>tetQ</i>	Protection	F: AGAATCTGCTGTTTGGCAGTG R: CGGAGTGTCAATGATATTGCA	169	[35]
<i>tetW</i>	Protection	F: GAGAGCCTGCTATATGCCAGC R: GGGCGTATCCACAATGTAAAC	168	[35]
<i>tetG</i>	Efflux	F: GCAGAGCAGGTCGCTGG R: CCYGCAAGAGAAGCCAGAAG	134	[36]

(待续)

				(续表)
<i>tetH</i>	Efflux	F: CAGTGAAAATTCACTGGCAAC R: ATCCAAAGTGTGGTTGAGAAT	185	[36]
<i>tetC</i>	Efflux	F: GCGGGATATCGTCCATTCCG R: GCGTAGAGGATCCACAGGACG	207	[36]
<i>tet(X)</i>	Deactivate	F: CAATAATTGGTGGTGGACCC R: TTCTTACCTTGGACATCCCCG	468	[16]
<i>sul1</i>	Protection	F: CGCACC GGAAACATCGCTGCAC R: TGAAGTTCGCGCAAGGCTCG	163	[16]
<i>sul2</i>	Protection	F: TCCGGTGGAGGCCGGTATCTGG R: CGGGAATGCCATCTGCCTTGAG	191	[16]
<i>sul3</i>	Protection	F: TCCGTTTCATTGTTACGCGC R: TTACACCAGCGCAATTGGTGCAG	128	[16]
<i>dfrA1</i>	Protection	F: AGCATTACCCAACCGAAAAGT R: TGTCAGCAAGATAGCCAGAT	273–292	[37]
<i>dfrA7</i>	Protection	F: AAATGGCGTAATCGGTAATG R: GTGAACAGTAGACAAATGAAT	151–170	[37]
<i>oqxA</i>	Efflux	F: CTCGGCGCGATGATGCT R: CCACTCTTCACGGGAGACGA	392	[38]
<i>oqxB</i>	Efflux	F: TCCTGATCTCCATTAACGCCCA R: ACCGGAACCCATCTCGATGC	131	[38]
<i>qepA</i>	Efflux	F: CCAGCTCGGCAACTTGATAC R: ATGCTCGCCTTCCAGAAAA	570	[38]
<i>aac(6)-Ib-cr</i>	Deactivate	F: TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA R: CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	482	[38]
<i>qnrS</i>	Protection	F: GCAAGTTCATTGAACAGGGT R: TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG	428	[38]
<i>aadA1</i>	Deactivate	F: ATCTGGCTATCTTGCTGACA R: TATGACGGGCTGATACTGG	284	[39]
<i>aacC2</i>	Deactivate	F: ACCCTACGAGGAGACTCTGAATG R: CCAAGCATCGGCATCTCATA	384	[39]
<i>aacC4</i>	Deactivate	F: ATGACCTTGCGATGCTCTATG R: CGAATGCCTGGCGTGTTT	486	[39]
<i>aphA3</i>	Deactivate	F: TGACTGGGCACAACAGACAA R: CGGCGATACCGTAAAGCAC	697	[39]
<i>arm-A</i>	Protection	F: ATGATAAGAATGATGTTGTTAAG R: TTATTTCTGAAATCCACTAGTAATTA	774	[40]
<i>rmt-B</i>	Protection	F: ATGAACATCAACGATGCCCTC R: TTATCCATTCTTTTTATCAAGTATAT	756	[40]
<i>blaCTX-M</i>	Deactivate	F: ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC R: ATCACKCGGRTCGCCNGGRAT	336	[41]
<i>blaTEM</i>	Deactivate	F: TCGGGGAAATGTGCG R: GGAATAAGGGCGACA	195	[41]
<i>blaSHV-1</i>	Deactivate	F: TGATTATCTGCGGGATACG R: TTAGCGTTGCCAGTGCTCG	100	[41]
<i>ermB</i>	Protection	F: CCGATACCGTTTACGAAATTGG R: TACTTTGGCGTGTTTCATTGC	190	[16]
<i>ermC</i>	Protection	F: GAAATCGGCTCAGGAAAAGG R: TAGCAAACCCGTATTCCACG	293	[16]

高度并行性和快速全自动分析的特点,研究者常将其用于样品中大量耐药基因的检测。目前,通过基因芯片技术对耐药基因的检测可从两方面实现:一是借助寡核苷酸芯片检测基因组序列的亚型或突变位点;二是通过基因表达谱芯片检测药物诱导基因表达的改变^[42]。基因芯片技术可对抗生素使用前细菌基因的表达水平进行监测,分析不同抗生素作用下的差异基因,从而了解抗生素作用的目标基因、分子机制和特征转录谱。利用基因芯片技术找到耐抗生素细菌的耐药基因,可针对其设计新型抗生素,改善临床上耐药细菌的治疗效果。基因芯片技术应用于环境抗生素耐药基因的检测时,需要设计和制作包含目前所有已知耐药基因探针的芯片,通过提取高质量的宏基因组 DNA,并与芯片杂交进而测定环境中存在的抗生素耐药基因类型和丰度。该技术可以获得环境中耐药基因比较全面的信息。然而,基因芯片技术在实际应用中也存在一些不足之处。首先,基因芯片需要根据已知的耐药基因序列设计出相应的特异性强的探针,不能发现新的耐药基因类型,且制作复杂、费用昂贵;其次,该技术本身存在一些问题,如假阳性、假阴性、特异性、芯片质量问题等;最后,基因芯片数据分析较为复杂,分析前需要进行数据精简和数据标准化,分析结果需要检验和生物学分析。

3.4 宏基因组学

1998年,Handelsman等^[43]首次提出了宏基因组(Metagenome)的概念,是指从一个特定环境提取出的所有微生物DNA的总和,既包括可培养微生物又包括不可培养的微生物。宏基因组学(Metagenomics)是将环境中所有微生物的遗传信息看作一个整体,研究微生物与自然环境或生物体之间关系的一门应用科学。由于环境中微生物多样性极其丰富,99%以上无法在实验室条件下分离培养,因此宏基因组学的发展跨越了微生物研究的瓶颈,极大地拓展了微生物学的研究思路和研究方法,是重新认识微生物多样性、从环境中获得新耐药基因

的一个重要手段。利用宏基因组学研究耐药基因主要包括以下几个步骤:环境样品的获取,宏基因组DNA的提取,宏基因组文库的构建,用抗生素对宏基因组文库进行耐药性筛选,耐药基因的鉴定与功能分析。利用宏基因组文库进行抗生素耐药性功能筛选,可直接为基因耐药表型的筛选提供有利的证据,且可发现新的耐药基因。然而,此方法也存在一定的缺陷:(1)该方法存在一定的宿主偏好性和异源表达缺陷^[44]。功能筛选依赖于耐药基因在外源宿主中的表达,如果耐药基因在异源宿主中不表达或表达活性低,就很难筛选到相应的耐药基因^[45]。(2)土壤环境是一个巨大的抗生素耐药基因储存库,其微生物群落具有丰富的遗传多样性,所构建的宏基因组文库只能代表土壤微生物中极小一部分^[46]。(3)一些耐药基因并不存在于染色体DNA上,而是随着可移动元件在环境中进行水平转移,如质粒、转座子和整合子等。因此,利用宏基因组文库进行筛选可能会遗失一些耐药基因。(4)利用宏基因组文库检测耐药基因,要正确辨别耐药基因的普遍性和高丰度。例如,大肠埃希氏菌中的*ampC*、铜绿假单胞菌中的*mexAB*以及粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)中*aac(6)-II*,都属于这些种属微生物的核心基因组,控制其固有的耐药表型^[8]。如果在宏基因组学中检测到这些基因,且在非可移动元件携带的情况下,就只能反映这些微生物的群落大小水平。

高通量测序技术是宏基因组学最为成熟的关键技术,能同时对数百万个DNA分子进行测序,被广泛应用于基因组学、测全序、表观基因组学以及功能基因组学^[47]。通过对环境样品提取总DNA测全序,与已知的抗生素耐药基因数据库进行序列比对,从而鉴定耐药基因。然而,此方法的数据分析复杂,并且由于通量的限制,定量性差,不容易检测到丰度较低的微生物。

总之,现代分子生物学技术的发展为分析环境中抗生素耐药性和抗生素耐药基因提供了众多的

可能性。多种方法的配合、计算机技术、生物信息技术的融入和应用应该是今后发展的重要方向。

4 抗生素耐药基因在环境中的削减及展望

堆肥化处理是去除畜禽粪便中抗生素耐药基因的一种有效手段。利用堆肥过程产生的高温,可有效去除耐药微生物和耐药质粒,并降解粪便中残留的抗生素,减少耐药基因的水平转移。影响堆肥化处理的因素主要是粪肥类型的不同和粪肥处理工艺的差异。不同的粪肥类型具有不同的物理化学性质(如总氮、总磷、有机碳、重金属等),其中微生物种类和丰度也不相同。粪肥处理过程中存在多种调控因素,如堆肥的温度、高温持续时间、pH、含水量、生物量以及供氧量等。在堆肥过程中添加微生物菌剂如嗜热菌剂,可显著提高堆肥的温度,延长高温持续时间,增强耐药基因的去除效果。此外,邹威等^[48]提出在堆肥过程中加入能直接杀灭肠道微生物的化学抑制剂(如吡啶、石灰氮、胺类等),可降低抗生素耐药基因的污染水平。田哲等^[49]提出了采用热处理工艺降低抗生素压力和厌氧堆肥化工艺来增强耐药基因控制的建议。然而,鉴于土壤特定的理化性质及其微生物多样性,针对土壤中耐药基因和耐药微生物的消减方法尚不成熟,很难大规模应用于环境中。因此,目前仍采用传统的堆肥法,需要进一步探讨新型消减技术。此外,研究耐药基因消减过程中微生物群落结构、耐药基因的丰度和多样性及可移动元件的变化,可进一步明确基因的垂直转移和水平转移在耐药基因传播中的作用。

环境中耐抗生素细菌的增多、细菌耐药性的不断进化和耐药基因的水平转移,使抗生素耐药基因引发的环境问题不断恶化。为了有效遏制抗生素耐药基因在环境中的传播扩散,当前的关键问题是明确不同环境中耐药基因的来源和分布特征,正确评估微生物机体中耐药机制发生的可能性,以及此种机制下的耐药基因在自然环境中的迁移规律和迁移概率,以尽早采取针对性措施解决日趋严重的细菌耐药问题。

参考文献

- [1] Hviistendahl M. China takes aim at rampant antibiotic resistance[J]. *Science*, 2012, 336(6083): 795
- [2] Vaclavik E, Halling-Sørensen B, Ingerslev F. Evaluation of manometric respiration tests to assess the effects of veterinary antibiotics in soil[J]. *Chemosphere*, 2004, 56(7): 667-676
- [3] de Liguoro M, Cibin V, Capolongo F, et al. Use of oxytetracycline and tylosin in intensive calf farming: evaluation of transfer to manure and soil[J]. *Chemosphere*, 2003, 52(1): 203-212
- [4] Heuer H, Schmitt H, Smalla K. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2011, 14(3): 236-243
- [5] Thiele-Bruhn S, Beck IC. Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass[J]. *Chemosphere*, 2005, 59(4): 457-465
- [6] Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 13(1): 42-51
- [7] Pruden A, Pei RT, Storteboom H, et al. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern Colorado[J]. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40(23): 7445-7450
- [8] Martínez JL, Coque TM, Baquero F. What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(2): 116-123
- [9] Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2010, 74(3): 417-433
- [10] Allen HK, Donato J, Wang HH, et al. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(4): 251-259
- [11] Rolain JM, Parola P, Cornaglia G. New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1): towards a new pandemic?[J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2010, 16(12): 1699-1701
- [12] Liu B, Pop M. ARDB—antibiotic resistance genes database[J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(S1): D443-D447
- [13] Qi SY, Ren SW, Li XL, et al. Multidrug-resistant bacteria in livestock feces[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33(13): 3970-3977 (in Chinese)
祁诗月, 任四伟, 李雪玲, 等. 禽畜养殖粪便中多重抗生素抗性细菌研究[J]. *生态学报*, 2013, 33(13): 3970-3977
- [14] Looft T, Johnson TA, Allen HK, et al. In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(5): 1691-1696
- [15] Zhu YG, Johnson TA, Su JQ, et al. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(9): 3435-3440
- [16] Mu QH, Li J, Sun YX, et al. Occurrence of sulfonamide-, tetracycline-, plasmid-mediated quinolone- and macrolide-resistance genes in livestock feedlots in Northern China[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2015, 22(9): 6932-6940
- [17] Kyselková M, Jirout J, Vrchotová N, et al. Spread of tetracycline resistance genes at a conventional dairy farm[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 536
- [18] Zhao L, Dong YH, Wang H. Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinces of China[J]. *Science of the Total Environment*, 2010, 408(5): 1069-1075
- [19] Qu A, Brulc JM, Wilson MK, et al. Comparative metagenomics reveals host specific metaviromes and horizontal gene transfer elements in the chicken cecum microbiome[J]. *PLoS One*, 2008, 3(8): e2945
- [20] Yang QX, Zhang J, Zhu KF, et al. Influence of oxytetracycline on the structure and activity of microbial community in wheat rhizosphere soil[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2009,

- 21(7): 954-959
- [21] Heuer H, Solehati Q, Zimmerling U, et al. Accumulation of sulfonamide resistance genes in arable soils due to repeated application of manure containing sulfadiazine[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(7): 2527-2530
- [22] Fang H, Wang H, Cai L, et al. Prevalence of antibiotic resistance genes and bacterial pathogens in long-term manured greenhouse soils as revealed by metagenomic survey[J]. Environmental Science & Technology, 2015, 49(2): 1095-1104
- [23] Udikovic-Kolic N, Wichmann F, Broderick NA, et al. Bloom of resident antibiotic-resistant bacteria in soil following manure fertilization[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(42): 15202-15207
- [24] Seiler C, Berendonk TU. Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture[J]. Frontiers in Microbiology, 2012, 3: 399
- [25] Palmer KL, Kos VN, Gilmore MS. Horizontal gene transfer and the genomics of Enterococcal antibiotic resistance[J]. Current Opinion in Microbiology, 2010, 13(5): 632-639
- [26] Manson JM, Hancock LE, Gilmore MS, et al. Mechanism of chromosomal transfer of *Enterococcus faecalis* pathogenicity island, capsule, antimicrobial resistance, and other traits[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(27): 12269-12274
- [27] Forsberg KJ, Patel S, Gibson MK, et al. Bacterial phylogeny structures soil resistomes across habitats[J]. Nature, 2014, 509(7502): 612-616
- [28] Stokes HW, Gillings MR. Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2011, 35(5): 790-819
- [29] Dolliver H, Kumar K, Gupta S. Sulfamethazine uptake by plants from manure-amended soil[J]. Journal of Environmental Quality, 2007, 36(4): 1224-1230
- [30] Wang J, Han JZ. Effects of heavy metals and antibiotics on soil and vegetables[J]. Journal of Ecology and Rural Environment, 2008, 24(4): 90-93 (in Chinese)
王瑾, 韩间众. 饲料中重金属和抗生素对土壤和蔬菜的影响[J]. 生态与农村环境学报, 2008, 24(4): 90-93
- [31] Yang QX, Ren SW, Niu TQ, et al. Distribution of antibiotic-resistant bacteria in chicken manure and manure-fertilized vegetables[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2014, 21(2): 1231-1241
- [32] Wang FH, Qiao M, Chen Z, et al. Antibiotic resistance genes in manure-amended soil and vegetables at harvest[J]. Journal of Hazardous Materials, 2015, 299: 215-221
- [33] McGill K, Kelly L, Madden RH, et al. Comparison of Disc diffusion and epsilometer (E-test) testing techniques to determine antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* isolates of food and human clinical origin[J]. Journal of Microbiological Methods, 2009, 79(2): 238-241
- [34] Zhou N, Zhang JX, Fan MT, et al. Research progress in antimicrobial susceptibility tests and their applications in bacteria[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(9): 459-464 (in Chinese)
周宁, 张建新, 樊明涛, 等. 细菌药物敏感性实验方法研究进展[J]. 食品工业科技, 2012, 33(9): 459-464
- [35] Aminov RI, Garrigues-Jeanjean N, Mackie RI. 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, 2001, 67(1): 22-32
- [36] Aminov RI, Chee-Sanford JC, Garrigues N, et al. Development, validation, and application of PCR primers for detection of tetracycline efflux genes of Gram-negative bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(4): 1786-1793
- [37] Selvam A, Xu DL, Zhao ZY, et al. Fate of tetracycline, sulfonamide and fluoroquinolone resistance genes and the changes in bacterial diversity during composting of swine manure[J]. Bioresource Technology, 2012, 126: 383-390
- [38] Xiong WG, Sun YX, Ding XY, et al. Responses of plasmid-mediated quinolone resistance genes and bacterial taxa to (fluoro) quinolones-containing manure in arable soil[J]. Chemosphere, 2015, 119: 473-478
- [39] Tang JY, Wang HN, Zhang PJ, et al. Phenotypic and aminoglycosides genotypic antimicrobial resistance characterization of *Escherichia coli* isolated from 95 pig farms[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2008, 39(4): 472-477 (in Chinese)
汤景元, 王红宁, 张鹏举, 等. 95个猪场大肠杆菌耐药表型及氨基糖苷类药物耐药基因型调查[J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(4): 472-477
- [40] Peng JH, Hou YQ, Xie DS, et al. Studies of 16S rRNA methylase gene and aminoglycoside modifying enzyme gene in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Laboratory Medicine, 2015, 30(6): 613-616 (in Chinese)
彭敬红, 侯彦强, 谢多双, 等. 铜绿假单胞菌16SrRNA 甲基化酶基因和氨基糖苷修饰酶基因的研究[J]. 检验医学, 2015, 30(6): 613-616
- [41] Knapp CW, Zhang W, Sturm BSM, et al. Differential fate of erythromycin and beta-lactam resistance genes from swine lagoon waste under different aquatic conditions[J]. Environmental Pollution, 2010, 158(5): 1506-1512
- [42] Ji F. Application of genechips in the detection of bacteria and drug resistance[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2011, 32(2): 240-242 (in Chinese)
季芳. 基因芯片在细菌及其耐药检测中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(2): 240-242
- [43] Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products[J]. Chemistry & Biology, 1998, 5(10): R245-R249
- [44] Su JQ, Huang FY, Zhu YG. Antibiotic resistance genes in the environment[J]. Biodiversity Science, 2013, 21(4): 481-487 (in Chinese)
苏建强, 黄福义, 朱永官. 环境抗生素抗性基因研究进展[J]. 生物多样性, 2013, 21(4): 481-487
- [45] Monier JM, Demanèche S, Delmont TO, et al. Metagenomic exploration of antibiotic resistance in soil[J]. Current Opinion in Microbiology, 2011, 14(3): 229-235
- [46] Su JQ, Wei B, Xu CY, et al. Functional metagenomic characterization of antibiotic resistance genes in agricultural soils from China[J]. Environment International, 2014, 65: 9-15
- [47] Wang XC, Yang ZR, Wang M, et al. High-throughput sequencing and its application[J]. China Biotechnology, 2012, 32(1): 109-114 (in Chinese)
王兴春, 杨致荣, 王敏, 等. 高通量测序技术及其应用[J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(1): 109-114
- [48] Zou W, Luo Y, Zhou QX. Pollution and environmental regulation of antibiotic resistance genes (ARGs) in livestock manure[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2014, 33(12): 2281-2287 (in Chinese)
邹威, 罗义, 周启星. 畜禽粪便中抗生素抗性基因(ARGs)污染问题及环境调控[J]. 农业环境科学学报, 2014, 33(12): 2281-2287
- [49] Tian Z, Zhang Y, Yang M. Control of tetracyclines and resistance genes in animal manure by composting[J]. Microbiology China, 2015, 42(5): 936-943 (in Chinese)
田哲, 张昱, 杨敏. 堆肥化处理对畜禽粪便中四环素类抗生素及抗性基因控制的研究进展[J]. 微生物学通报, 2015, 42(5): 936-943