

不同环境介质中抗生素耐药性的检测方法研究进展

吴楠¹ 杨静慧^{2*} 张伟玉¹ 杨帆¹ 曾明³

(1. 天津农学院工程技术学院 天津 300384)

(2. 天津农学院园艺园林学院 天津 300384)

(3. 天津科技大学海洋与环境学院 天津 300457)

摘要: 抗生素在医疗和畜禽养殖业的大量使用增加了环境中抗生素抗性微生物(ARB)和抗性基因(ARGs)的丰度与多样性,加速了抗生素耐药性在环境中的传播,给人类公共健康造成潜在威胁。但目前对于环境中耐药性的污染现状缺少足够的信息,相关研究方法亟待优化和完善。本文通过综述环境中抗生素耐药性的国内外研究现状,探讨了不同环境(水、土壤、空气等)样品的采集方法以及耐药性的检测方法——传统微生物培养法和分子生物学方法(如定性与定量PCR、DNA 杂交及微阵列技术、宏基因组学方法等),旨在为多环境介质中抗生素耐药性的研究提供科学依据和技术支持。

关键词: 抗生素抗性基因, 定量 PCR, 抗性组学, 宏基因组学, 高通量测序

Progress in detection methods of antibiotic resistance in different environmental matrices

WU Nan¹ YANG Jing-Hui^{2*} ZHANG Wei-Yu¹ YANG Fan¹ ZENG Ming³

(1. College of Engineering and Technology, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China)

(2. College of Horticulture and Landscape, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China)

(3. College of Marine and Environment, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The overuse of antibiotics in medicine, livestock and poultry systems leads to an increase in abundance and diversity of antibiotic resistance bacteria (ARB) and antibiotic resistance genes (ARGs) in the environment, accelerating the environmental dissemination of antibiotic resistance and posing a potential threat to public health. But there is a lack of sufficient information on the current situation of antibiotic resistance pollution in environment, and the relevant research methods need to be optimized and improved. In this paper, we review recent progress of antibiotic resistance in environment, and discuss the collection methods of different environmental (water, soil and air)

Foundation item: Tianjin Research Program of Application Foundation and Advanced Technology (No. 14JCYBJC43700, 15JCYBJC53700); Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, State Education Ministry; National Natural Science Foundation of China (No. 51308392)

*Corresponding author: Tel: 86-22-23781291; E-mail: jinghuiyang2@aliyun.com

Received: January 10, 2016; Accepted: March 29, 2016; Published online (www.cnki.net): April 08, 2016

基金项目: 天津市应用基础与前沿技术研究计划一般项目(No. 14JCYBJC43700, 15JCYBJC53700); 教育部留学回国人员科研启动基金资助项目; 国家自然科学基金项目(No. 51308392)

*通讯作者: Tel: 86-22-23781291; E-mail: jinghuiyang2@aliyun.com

收稿日期: 2016-01-10; 接受日期: 2016-03-29; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-04-08

samples, as well as detection methods for antibiotic resistance—cultivation-based and molecular biology methods (qualitative and quantitative PCR, DNA hybridization and DNA microarray, metagenomics, etc.). The aim is to provide scientific basis and technical support for the research on antibiotic resistance in different environmental matrices.

Keywords: Antibiotic resistance genes, Quantitative PCR, Antibiotic resistome, Metagenomics, High-throughput sequencing

自 20 世纪抗生素被发现以来,其在医疗及养殖等领域发挥了重要作用。然而近年来随着抗生素的大量使用,甚至滥用,已经导致抗生素耐药性的蔓延。在人类和动物致病菌中,人和动物的共生菌中都出现了抗生素耐药性,并由单一耐药性发展到多重耐药性。目前致病菌耐药性的增加和扩散已经成为全球疾病治疗所面临的一个巨大问题,加之新抗生素的研发速度持续下降,使得世界许多地区面对一些致命感染时“无药可用”^[1]。致病菌对抗生素产生耐药性的主要原因是其携带有各种抗生素抗性基因(Antibiotic resistance genes, ARGs),而越来越多的证据显示,致病菌耐药性的扩散与环境中抗生素抗性微生物(Antibiotic resistance bacteria, ARB)和 ARGs 紧密相关^[2]。这些 ARB 和 ARGs 广泛分布在各个环境介质中,如土壤、表层水环境、沉积物、畜禽养殖场的污水池、畜禽粪便、污水处理厂、地下水、饮用水、甚至空气中。不同于传统化学污染物,ARGs 因其固有的生物学特性,表现出独特的环境行为,如可复制性、传播性和环境持久性等特点。ARGs 可通过基因水平转移(Horizontal gene transfer, HGT)等机制在各环境介质中的微生物之间传播,而环境中拥有这种内在机制的微生物成为一个巨大的 ARGs 储存库。一旦这些 ARGs 进入到人类或动物致病菌中,将会对人类的公共健康构成潜在的威胁。

目前对于环境中抗生素耐药性的污染现状缺少足够的信息,对环境介质中的 ARB 和 ARGs 进行高效检测显得尤为重要,但相关采样、检测分析方法尚未标准化,研究方法体系亟待优化和完善。因此本文综述了近年来国内外对不同环境介质中 ARB 和 ARGs 的检测方法,旨在为进一步研究环境

中抗生素耐药性提供研究思路和技术支持。

1 样品的采集与预处理

对于水、污泥、土壤、粪便等样品,可以直接采集。对一些要求较高的样品,为避免外源污染可利用无菌装置来贮存。为保持样品新鲜,减少基因组 DNA 降解,采集的样品应尽快运回实验室,运输过程中可使用干冰等保持低温。样品在实验室以 4 °C 保存,24 h 内进行预处理。如不能及时处理,应在更低温度下(如-80 °C)保存样品。对于水样的预处理,一般采取抽滤方式对微生物进行富集处理。例如抽取一定体积水样通过 0.45 μm 或 0.22 μm 滤膜,待滤膜堵塞后收集滤膜做进一步处理^[3]。而土壤、污泥等固体样品可冻干后,或者直接对新鲜样品提取 DNA(如后期要对 ARGs 进行定量,需测定新鲜样品的含水率,将结果换算成单位重量干物质中的基因拷贝数方便比较分析)^[4]。

由于空气中微生物生物量相对较低,且携带 ARGs 的微生物在空气中以气溶胶形式存在,因此对空气样品中 ARB 和 ARGs 的采集需要配备一些专业的采样器装置,采样方法主要借鉴生物气溶胶的采集方式,按原理可分为撞击式、离心式、气旋式及过滤式采样法等^[5]。目前较常见的是利用固体撞击式采样器(Andersen)^[6]和液体撞击式采样器(AGI-30)^[7]来采集空气中的抗性微生物。

2 检测方法

抗生素耐药性的研究主要包括 ARB、ARGs 以及基因水平转移机制的检测和表征。其研究方法大体可分为两类:传统微生物培养法和分子生物学方法。

2.1 传统微生物培养法

用于检测抗生素耐药性的传统培养法是基于

微生物的纯培养,虽然环境中的大部分微生物不能在人工条件下培养,但这种传统培养法操作简单灵活、成本低、标准化程度高,因此在一些耐药性研究(如识别微生物的耐药性模式,评估耐药性发生率)依然发挥作用。此外通过微生物筛选方法获得纯菌有助于更深入地研究 ARB 的耐药性机制,同时传统培养法也为研究 ARB 细胞的生理学及对 ARGs 进行常规分子生物学检测提供基础。

传统培养法可用于评估微生物对抗生素的敏感性(或耐受程度),常见的药敏实验主要有纸片扩散法(K-B 琼脂法)、稀释法(肉汤稀释法和琼脂稀释法)、抗生素浓度梯度法(E-test)及利用自动化仪器(如 BD Phoenix、Vitek 2 等全自动微生物分析仪)。例如 K-B 琼脂法是测量含抗生素纸片周围抑菌环的直径大小,稀释法可测量抗生素的最小抑菌浓度(MIC)。传统培养法可用于考察环境样品中可培养微生物的耐药率。在选择性培养基中添加适当含量的抗生素,能耐受此浓度的微生物可被视作 ARB,根据 ARB 数量占总菌数(培养基中不加抗生素)的百分比可以估算微生物对一种或多种抗生素的耐药率。对于一些代表性菌属,如水环境中常见指标微生物大肠杆菌、肠球菌等,通过计算其耐药率,可以一定程度上快速了解抗生素耐药性在环境中的传播和归趋。例如 Novo 等^[8]通过检测污水处理厂进出水中的微生物(异养菌、肠杆菌和肠球菌)对阿莫西林、四环素和环丙沙星的耐药性,对污水厂中抗生素耐药性的负荷进行了评估。

常见的选择性培养基有 LB 培养基、M-H 培养基、R2A/R3A 培养基等。例如 Gao 等^[9]在对水产养殖系统的耐药性研究过程中,在营养肉汤培养基中加入不同浓度的四环素和磺胺甲恶唑,来统计不同抗生素浓度下 ARB 的存活数目,并利用 LB 培养基对 ARB 进行分离和富集培养,采用分子生物学技术检测其所携带的 ARGs。Huang 等^[10]采用添加有不同浓度四环素的 M-H 培养基对污水厂中的 ARB 进行药敏试验。Munir 等^[11]利用添加一定浓度抗生素(四环素 16 mg/L 和磺酰胺 50.4 mg/L)的 R2A 培养

基对污水处理厂的进出水、生物固体样品中的四环素类和磺胺类 ARB 进行了筛选,利用异养菌平板计数法(HPC)对 ARB 的浓度(CFU/mL)和在总可培养菌中所占比例进行了考察。R2A 培养基由于可以修复被氯离子损伤的细菌,使其能在培养基上正常生长,从而可纠正损伤细菌带来的结果偏差,因此对来自污水厂、医院等常用氯消毒的地方的样品,可考虑用 R2A 培养基。此外,由于环境样品中微生物组成复杂,可以在培养基中添加抗真菌剂(如放线菌酮)来防止真菌生长^[9]。

此外,传统培养法为鉴定 ARB 的种属类型,了解 ARGs 的宿主特征提供了基础,这有助于追踪抗生素耐药性的来源和传播途径。ARB 的种属鉴定可以通过传统的生理生化法完成,如观察菌落形态结构和生长特性,进行生化实验鉴定等,也可借助自动化分析仪器(如 Biolog)进行鉴定。目前常用的 ARB 种属鉴定方法是 16S rRNA 基因鉴定法,其将传统培养法与分子生物学技术相结合,即对微生物富集培养后,利用 PCR 对 16S rRNA 基因片段进行扩增后再测序,与 NCBI 库中已知序列进行 BLAST 比对,从而得到鉴定结果。

2.2 分子生物学方法

近年来发展迅速的分子生物学技术因其快速灵敏、特异性高的特点,已经成为检测环境样品中 ARGs 及 ARB 的主要方法。由于该技术不依赖于微生物的筛选培养过程,因此不只局限于可培养微生物耐药性的检测,还能直接对环境微生物中的主体——不可培养微生物的耐药性进行检测,使得到的结果更为全面可信^[12]。

2.2.1 简单及复合 PCR 方法:在多种分子生物学手段中,聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)方法是最为经典的用于环境样品及纯菌株中 ARGs 的检测方法。常见步骤为:(1)样品 DNA 的抽提。可以利用直接溶解法手动提取 DNA,即通过物理、化学或酶的作用来裂解细胞,获取样本 DNA,如 SDS 法。此外还可利用各类试剂盒提取 DNA,即先使核酸吸附于固相介质上,洗涤去除杂质后,

再使 DNA 溶解到纯水或缓冲液中, 常见的试剂盒如 FastDNA、UltraClean 等。(2) 目标基因的引物设计。(3) PCR 扩增反应。(4) 凝胶电泳验证扩增产物。需要注意的是, 由于 PCR 检测中可能会有假阳性结果出现, 因此常常还需配合 DNA 测序的方法来识别特定的 ARGs。

为节省更多时间和精力, 一些研究采用复合 PCR (Multiplex PCR) 方法, 即在同一个 PCR 反应体系内应用多对引物, 扩增多个不同的 ARGs 片段。Hu 等^[13]利用复合 PCR 方法检测了 7 种氨基糖苷类抗生素耐药基因。Koczura 等^[14]利用该方法从来自污水处理厂、河流及临床样本中的大肠杆菌中分离出携带有整合子的抗性菌株。复合 PCR 被认为是一种快速简捷的检测各种 ARGs 的方法, 但这种方法也存在一些缺点, 如可能出现假阴性结果, 引物间配对而对反应造成干扰, 导致特异性差等^[15]。

普通 PCR 技术不仅可以单独用于 ARGs 的定性分析, 还可以与其他多种方法相结合用于 ARGs 及 ARB 的检测。例如与传统微生物培养法相结合, 可检测纯菌株所携带的 ARGs; 与变性梯度凝胶电泳技术结合(PCR-DGGE), 可以对携带 ARGs 的微生物进行种属鉴定, 追溯 ARGs 的来源, 还可以考察抗生素胁迫下的微生物群落结构变化。此外 PCR 方法还为其他技术(如 DNA 杂交和 DNA 微阵列技术, 见 2.2.3)成功用于环境样品中 ARGs 的检测提供了基础。

2.2.2 定量 PCR 方法: 由于普通 PCR 只能对环境中的 ARGs 进行定性检测, 近年来, 越来越多的研究采用实时荧光定量 PCR (Real-time quantitative PCR) 技术作为检测手段, 从数量上更为直观地表征环境中 ARGs 的水平, 有助于探寻其在环境介质中的迁移和传播等行为的规律。该技术将传统 PCR 与荧光能量传递技术相结合, 借助荧光信号来检测 PCR 产物。荧光标记探针与扩增产物结合后, 被激发的荧光强度与扩增产物的量成正比, 从而实现精确定量。目前使用较多的是基于 SYBR Green I 荧光染料的定量 PCR 方法, 其灵敏度高、使用简便且成本

较低, 已被用于多种环境介质中的 ARGs 的定量, 如土壤、畜禽粪粪便、地表水、沉积物、污水处理厂等^[16-19]。但 SYBR Green I 特异性较差, 可与任何 DNA 双链结合, 因此也可能与引物二聚体或非特异性产物结合, 产生假阳性信号, 必要时可配合凝胶电泳法来检验是否有此类干扰的产生。此外, 基于 TaqMan 荧光探针的定量 PCR 方法也是一种常见手段, 如用于污水处理系统、自然水体、农业生态系统中的 ARGs 定量^[20-21]。

然而, 传统的荧光定量 PCR 方法一般每次只能对几种或几十种 ARGs 进行定量分析, 这在一定程度上限制了人们对环境中 ARGs 分布的更深入的认识。新近发展的高通量荧光定量 PCR 技术 (High-throughput quantitative PCR) 突破了这种局限性, 可同时多达上百种 ARGs 或多个样品进行定量分析, 大大提高了效率。如 Zhu 等^[22]利用高通量荧光定量 PCR 技术对我国大型养猪场及周边地区的猪粪、猪粪堆肥和施用堆肥的土壤样品中可能存在的 244 种 ARGs 进行了检测和定量, 共检测到 149 种 ARGs, 基本涵盖了目前已知的主要 ARGs 类型, 如表 1 所示。Wang 等^[23]也利用同样的技术, 选取长期进行再生水浇灌的公园土壤为研究对象, 同时对 285 种 ARGs 和 9 种转座子酶基因进行研究, 共检测到 147 种 ARGs。再生水浇灌土壤中的 ARGs 丰度明显高于空白对照样品(99.3–8 655.3 倍), 其中氨基糖苷类和 β -内酰胺类抗性基因在所有土样中所占的比例最多。

利用定量 PCR 方法对 ARGs 定量时, 结果主要有以下几种表达方式: (1) 绝对丰度, 即单位体积或重量的环境样品中所含 ARGs 的绝对拷贝数 (ARGs copies/mg 或 ARGs copies/mL)。(2) 相对丰度, 即样本中 ARGs 的绝对拷贝数与内参基因 16S rRNA 基因绝对拷贝数的比值 (ARGs/16S rRNA)。由于 16S rRNA 基因在微生物中的表达量相对稳定, 可用来指示环境样本中微生物数量, 因此 ARGs 的相对丰度可以代表 ARGs 在样品微生物种群中的相对含量, 也可表征抗生素对 ARGs 的诱导能力。相

表 1 常见的主要 ARGs 类型
Table 1 Common types of antibiotic resistance genes

抗生素类型 Types of antibiotics	主要抗性基因类型 Main types of antibiotic resistance genes
FCA	<i>catB3, cfr, floR, yidY/mdtL, cmlA1, cmx(A), catA1, mexE, mexF, emrB/qacA, pmrA, qnrA, acrB, acrF, adeA, cmeA, acrA, mexA, mexD, oprJ</i>
MLSb	<i>msrC, mata/mel, msrA, vgaA, vgaB, lmrA, vgbB, oleC, carB, ermK, ermJ/ermD, erm(35), ermF, erm(36), ermB, ermT, ermX, ermY, ermA, ermC, ermA/ermTR, pikR1, pikR2, ereA, vgb, mdtA, erm(34), mefA, mphA, mphB, mphC, lnuB, vatD, vatE, vatB, vatC, lnuA, lnuC</i>
氨基糖苷类 Aminoglycoside	<i>aac, aacC1, aacC2, aacC4, aac(6')II, aacA/aphD, aac(6')-Iy, aac(6')-II, aacC, aac(6')-Ib, aadA5, aadA1, aadA2, aadA, aadD, aadA9, aadE, speN, aphA3, aph6ia, aph(2')-Id, aph, aphA1, str, strA, strB</i>
β -内酰胺类 Beta Lactam	<i>blaSHV, blaVEB, bla1, blaOKP, blaROB, blaOXY, blaPSE, cfxA, cepA, blaCTX-M, blaGES, blaSFO, blaTLA, blaZ, Pbp5, pbp, blaTEM, penA, pbp2x, blaPER, cfiA, cphA, bla-L1, blaVIM, blaIMP, bla-ACC-1, ampC, blaCMY, blaMOX/blaCMY, blaOCH, blaPAO, blaCMY2, ampC/blaDHA, fox5, blaOXA10, blaOXA1/blaOXA30, mecA</i>
磺胺类 Sulfa	<i>sul2, sul1, sulA/foIP</i>
四环素类 Tetracycline	<i>tet(32), tet(34), tet(35), tet(36), tet(37), tet(38), tetA, tetB, tetC, tetD, tetE, tetG, tetH, tetJ, tetK, tetL, tetM, tetO, tetQ, tetR, tetS, tetT, tetU, tetV, tetW, tetX, tetPA, tetPB</i>
万古霉素类 Vancomycin	<i>vanA, vanRA, vanSA, vanXA, vanB, vanHB, vanWB, vanXB, vanRB, vanSB, vanYB, vanC, vanTC, vanC1, vanC2/vanC3, vanRC, vanRC4, vanSC, vanD, vanHD, vanXD, vanRD, vanYD, vanSE, vanTE, vanWG, vanG, vanTG</i>
其他 Other	<i>marR, catB8, dfrA1, dfrA12, folA, bexA, cmr, sdeB, ereB, fosX, mepA, emrD, mdt11, yceE/mdtG, yceL/mdtH, rarD, qacA/qacB, yyaR, fosB, bacA, nimE, imiR, nisB, ttgB, pica, fabK, ceoA, mdtE/yhiU, acrR, mtrD, mtrE, oprD, ttgA, mtrC, tolC, qacH, qacEΔ1, qac, qacA, sat4, speA</i>

注：FCA：氟喹诺酮、喹诺酮、氟苯尼考、氯霉素和酰胺醇；MLSb：大环内酯类-林可胺类-链酶杀阳菌素 B。

Note: FCA: Fluoroquinolone, quinolone, florfenicol, chloramphenicol and amphenicol; MLSb: Macrolide-lincosamide-streptogramin B.

对丰度为不同采样点中 ARGs 数量的比较提供了方便，减少样品微生物数量不同所带来的偏差^[18]。(3) 富集倍数(Fold change)，即根据高通量荧光定量 PCR 法所检测的循环阈值 C_t ，计算出待测样品中目的基因相对于对照样品中目的基因的富集倍数^[23]。具体可依据研究目的及实验手段不同，选择合适的定量表达方法。

2.2.3 DNA 杂交及 DNA 微阵列技术：DNA 杂交技术通过所使用的探针对已知序列进行特异性的靶序列检测，其用于检测特定 ARGs 已有 30 多年历史，并且在探针设计和合成方面还在不断改善中。DNA 杂交技术被用于区分同一家族不同种类的 ARGs，来进行系统命名，或被用于识别特定环境中存在的 ARB 和 ARGs^[15]。Agersø 等^[24]利用该技术证实四环素类抗性基因和 Class 1 整合子可从土壤分离菌株中共转移到大肠杆菌和/或恶臭假单胞菌中。Shah 等^[25]利用 DNA 杂交技术，配合 PCR 扩增与产物测序等方法从养鱼场的菌株中检测到

四环素类、甲氧苄氨嘧啶类、 β -内酰胺类、氨基糖苷类、氯霉素类、红霉素类等多种类型的 ARGs 和 *int1* 整合子。

DNA 微阵列(DNA microarray)也叫基因芯片，是新一代基因诊断技术，具有快速高效、高并行性、自动化等特点，它将大量已知序列探针固定在微小的芯片上，通过与样本中若干靶核苷酸序列进行杂交，从而可以同时快速检测出样本中大量基因的表达情况。目前 DNA 微阵列被广泛应用于临床医学上检测致病菌中的 ARGs，但其用于检测环境样品中 ARGs 的报道较少，这主要是由于环境样品基质复杂，一些污染物的存在可能会干扰目标基因的检测，因此样品在检测前还需复杂的前处理过程^[26]。另外由于该技术的检测限较低，用于检测环境样品时往往还要配合 PCR 方法^[15]。Patterson 等^[27]利用基因芯片从土壤和动物粪便样品提取的 DNA 中检测出 23 种四环素类抗性基因和 10 种红霉素抗性基因。

2.2.4 宏基因组学方法：宏基因组学方法 (Metagenomics) 是将环境样品中的 DNA 直接克隆到合适的载体并导入宿主细菌中，进而筛选目的基因及进行测序分析等。利用该方法可以检测环境微生物的抗生素抗性组学 (Antibiotic resistome)，即微生物中所有 ARGs 的集合，如致病菌和抗生素产生菌所携带的 ARGs，存在于细菌染色体上通常不表达或低表达的抗性基因 (Cryptic embedded genes)，以及具有较低抗性或者与抗生素密切相关，有可能进化为 ARGs 的抗性基因前体 (Precursor genes)^[28]。配合新一代测序技术，宏基因组方法可以发掘环境中新型的 ARGs，而不局限于已知序列的 ARGs。此外通过检测转移基因组 (Mobilome)，宏基因组方法还能为研究微生物之间的 ARGs 水平转移提供技术支持^[29]。

图 1 描述了宏基因组方法用于检测土壤环境中 ARGs 的大体流程^[30]：(1) 宏基因组 DNA 提取与纯

化：直接法，对土样中微生物进行原位裂解，提取宏基因组 DNA 并纯化；间接法，先将微生物细胞从土样中分离出来再提取基因组 DNA，可进一步通过标记和分类细菌细胞 (如 FISH 或流式细胞仪方法) 获取目标种群的基因组 DNA，实现单细胞全基因组测序等目的。(2) 宏基因组文库的构建：将基因组 DNA 克隆到合适的载体中，将载体转化到宿主细菌，构建文库。(3) 宏基因组文库的筛选和分析：文库的筛选方案主要有功能驱动 (生物活性) 筛选、序列驱动筛选、化合物结构水平筛选以及底物诱导基因表达筛选；宏基因组 DNA 的测序，为完善 ARGs 公共数据库提供支持。此外，宏基因组方法还可与传统培养法或 PCR 方法相结合，直接对目标 ARB 或 ARGs 进行检测。

近年一些研究开始利用宏基因组方法探索受人类活动干扰环境中及远离人类干扰的自然环境中 ARGs 的分布、多样性及迁移转化过程^[31-33]。

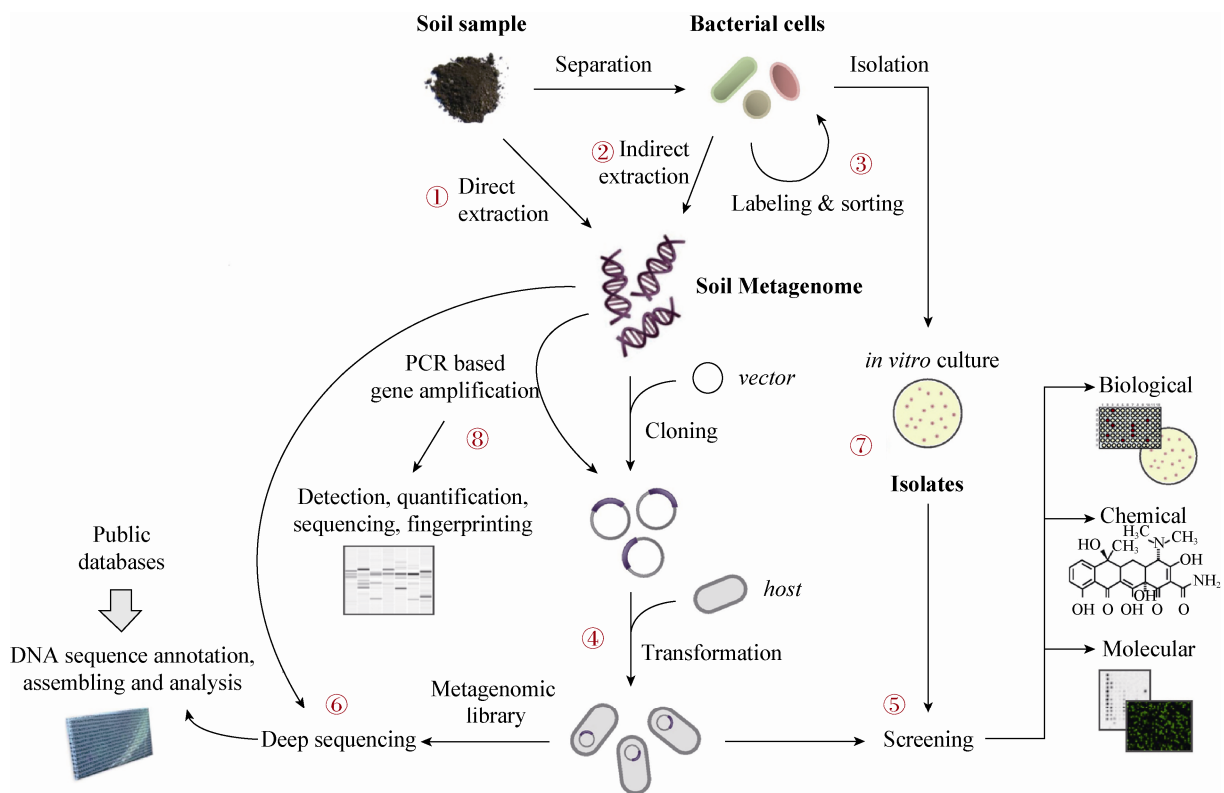


图 1 宏基因组方法用于检测土壤中 ARGs (基于^[30])
 Figure 1 Metagenomic approaches to detect ARGs in soil samples (adapted from^[30])

Fang 等^[34]利用该方法在鸡粪和长期施用鸡粪的土壤中检测到 22 类 ARGs 和 32 种人类致病菌及 46 种由致病菌所携带的抗性基因。样品中四环素抗性基因和多重耐药基因的相对丰度较高,主要致病菌为炭疽芽孢杆菌、百日咳杆菌、结核分枝杆菌和溃疡分枝杆菌等,致病菌所携带的抗性基因主要为 *sul1* 和大环内酯类-林可酰胺类-链阳性菌素耐药基因。Su 等^[29]利用功能基因组学的方法筛选了土壤样品中多种 ARGs,同已知的 ARGs 相比,发现氨基酸水平上只有 2% 的 ARGs 的相似性在 90% 以上,而 67% 以上 ARGs 的相似性低于 60%,这表明环境中还有很多尚未被认识的 ARGs。

对宏基因组的测序分析,目前主要有 Sanger/鸟枪法和高通量测序技术(High-throughput sequencing)。高通量测序技术又称第二代测序技术,可并行对几十万到几百万条 DNA 分子进行序列测定,具有高输出量、高解析度的特点,使测序时间与费用大大减少,该技术已逐渐取代传统 Sanger 法在大规模测序上的应用。目前主要代表平台有 Roche 454 焦磷酸测序(Pyrosequencing)、Illumina Solexa 合成测序、ABI SOLiD 连接法测序等。人们利用高通量测序技术可直接对环境样品的 DNA 进

行测序,通过序列比对来鉴定 ARGs。虽然该方法需依靠后期强大的生物信息学分析,并高度依赖于现有 ARGs 数据库的完善程度,但可帮助研究者跨文库构建这一步骤,也在很大程度上避免了功能宏基因组方法在克隆偏好、异源表达方面的缺陷,同时可对多环境介质中 ARGs 及控制基因水平转移的可移动基因元件(Mobile genetic elements)的分布和多样性进行研究比较。近年来基于高通量测序技术的宏基因组方法逐渐成为环境中耐药性检测的有力工具。例如 Staley 等^[35]通过功能基因组学法和高通量测序对密西西比河上游提取的 DNA 进行检测,发现氨基青霉素、头孢噻吩、卡那霉素及四环素类抗性基因的检出频率较低。Kristiansson 等^[36]使用宏基因组学和焦磷酸测序法在抗生素生产废水接纳河流的沉积物中检测到高丰度的 ARGs 及可移动基因元件,其中包括两类新型的携带 ARGs 的质粒。Zhang 等^[37]利用宏基因组技术与 Illumina 高通量测序对污水处理厂活性污泥的质粒基因组进行分析,发现高丰度、多样性的 ARGs 及大量可移动基因元件(包括整合子、转座子和质粒)的存在。

2.3 两类方法的比较与结合

这两类方法侧重点不同,各有优缺点^[38](表 2),

表 2 抗生素耐药性主要研究方法的优缺点

Table 2 Advantages and disadvantages of main research methods on antibiotic resistance

方法类型 Types of approaches	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
传统微生物培养法 Cultivation-based methods	<ol style="list-style-type: none"> 1. 实验操作标准化程度高,利于不同实验室、不同时间段所得结果进行相互比较 2. 可一定程度上了解耐药性宿主的特征 3. 实验稳定性好,结果可靠 4. 实验操作简单,成本低 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 不能检测不可培养微生物的耐药性 2. 微生物生理因素可能对检测结果产生影响 3. 从复杂环境介质中分离耐药菌株存在一定困难 4. 实验操作比较费时费力
分子生物学方法 Molecular biology methods	<ol style="list-style-type: none"> 1. 特异性强,灵敏度高 2. 不依赖于微生物的筛选培养过程 3. 可对整个微生物群落(包括不可培养微生物)中的 ARGs 进行定性及定量分析 4. 可基于功能基因和/或致病因子直接对 ARB 进行分类归属 5. 可以不经富集过程,直接对环境样品进行检测 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 并行检测样品中的自由 DNA 及死亡微生物中 DNA 2. 环境样品中的抑制剂可能会影响检测结果(需要内标参照及纯化 DNA 模板) 3. 获得微生物后代的信息有限 4. 实验操作目前缺少标准化规程 5. 成本高(如酶制剂、各种精密仪器等)

但可以相互补充,使抗生素耐药性的研究更为全面。目前对耐药性的检测,常见的一种思路是将传统培养法与分子生物技术相结合来研究可培养 ARB 的表型和基因型。首先通过添加有抗生素的培养基从环境中筛选 ARB,利用药敏试验可确定该菌株的抗性谱,通过 DNA 提取、PCR 扩增等分子生物学方法来检测该菌株中的 ARGs 及可移动基因元件^[24]。例如, Mokracka 等^[39]结合筛菌和分子生物学技术,从城市污水厂中筛选了 1 832 株肠杆菌,其中 221 株携带有 I 型或 II 型整合子,并在其中发现了多种抗药基因盒。Silveira 等^[40]在不同来源的肠球菌中发现铜抗性基因与多种 ARGs 具有共转移的特点。虽然该路线在不可培养微生物方面有很大局限性,但可以直接获得特定菌株,特别是致病菌的耐药性信息。此外以筛选出的 ARB 作为供体,以对抗生素敏感的模式细菌如大肠杆菌等为受体,在一定条件下共同培养,利用分子生物学技术可以探究 ARGs 及可移动基因元件从供体向受体的转移概率,解析水平转移机制及影响因素^[41-42]。另一种思路是跳过菌株的分离培养,直接以环境总 DNA 基因组为研究对象,利用分子生物学手段对样本中 ARGs 进行定性定量分析,来获得环境样本的总体数据,并且结合系统发育树分析(克隆)、数据统计分析(如相关性分析)来探讨 ARGs 的来源、多样性、传播过程及影响因素^[18-22]。虽然该路线过去在识别 ARGs 的具体宿主方面有一定局限性,但随着宏基因组测序手段的不断成熟和普及,公共数据库的日益完善,可以基于功能基因或致病因子对 ARB 进行分类归属,帮助追溯 ARGs 的来源。例如 Ju 等^[43]利用宏基因组方法在市政污水处理厂污泥消化池中检测到 323 种 ARGs 及 83 种人类致病菌,并利用相关性统计方法绘制了一张 ARGs 与人类致病菌之间的共生关系网络图。不过单纯依赖分子生物学技术,不能像传统培养法直接对感兴趣的 ARB 进行辨识考察,也不能区分存活和灭活的 ARB。

3 结语与展望

上述检测方法有各自的优点和缺陷,在某些应用方面存在重叠与竞争,因此在研究环境介质中抗生素耐药性时,应根据实验目的、样品性质等因素选择合适的检测方法。必要时可几种检测手段相结合,优势互补,从多个角度对 ARB、ARGs 及可移动基因元件进行检测和表征,使获得的结果更为全面和可靠。未来还应在以下几个方面加强研究:

(1) 提高检测技术的速度,增加灵敏度,降低检测限。例如空气样品,由于微生物生物量较低,对检测技术的灵敏度要求更高。在保证检测结果准确性的前提下,发展快速有效的技术方法,并降低实验成本,这对处理大批量、含有高多样性 ARB 和 ARGs 的样品具有重要意义。此外,面对复杂的环境介质时,如何获取完整、客观的抗生素耐药性的相关信息是未来值得关注的方向之一。

(2) 虽然以宏基因组、高通量荧光定量、高通量测序等为代表的先进分子生物学技术近年来迅速发展,但一些常规方法(如传统微生物培养法、普通 PCR 等)也不能完全摒弃。应该将多种技术相结合,为探究环境中 ARGs 的起源、分布和多样性,解析不同环境条件下 ARGs 的水平 and 垂直转移机制,挖掘环境中新型 ARGs,更新和完善 ARGs 公共数据库等提供新的方法学支持。包括一些未在本文进行介绍的技术,如转录组学、蛋白质组学、代谢组学等,也可以作为宏基因组学等的补充研究方法,对耐药性产生的分子机制、生存环境、代谢产物等进行全面解析,帮助找出控制 ARB 产生和阻断 ARGs 传播的方法。

(3) 进一步建立和完善不同环境介质中 ARB、ARGs 及可移动基因元件的研究方法体系,对采样、样品处理、检测与表征、数据分析与结果表达等各个步骤进行参数优化、标准化,方便在不同方法、不同实验室条件下所获结果之间进行比较。为全球水平上抗生素耐药性的研究,控制抗生素耐药性发展,合理使用抗生素及制定相关政策,研发新型抗

耐药菌药物等提供科学依据。

参 考 文 献

- [1] Zhu YG, Ouyang WY, Wu N, et al. Antibiotic resistance: sources and mitigation[J]. Bulletin of the Chinese Academy of Sciences, 2015, 30(4): 509-516 (in Chinese)
朱永官, 欧阳纬莹, 吴楠, 等. 抗生素耐药性的来源与控制对策[J]. 中国科学院院刊, 2015, 30(4): 509-516
- [2] Martinez JL. The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria[J]. Proceedings of the Royal Society B, 2009, 276(1667): 2521-2530
- [3] Chen H, Zhang M. Effects of advanced treatment systems on the removal of antibiotic resistance genes in wastewater treatment plants from Hangzhou, China[J]. Environmental Science & Technology, 2013, 47(15): 8157-8163
- [4] Wu N, Qiao M, Zhu YG. Quantification of five tetracycline resistance genes in soil from a swine feedlot[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2009, 4(5): 705-710 (in Chinese)
吴楠, 乔敏, 朱永官. 猪场土壤中5种四环素抗性基因的检测和定量[J]. 生态毒理学报, 2009, 4(5): 705-710
- [5] He XM, Cao G, Shao MF, et al. Research method and progress on antibiotics resistance genes (ARGs) in air[J]. Environmental Chemistry, 2014, 33(5): 739-747 (in Chinese)
贺小萌, 曹昱, 邵明非, 等. 空气中抗性基因(ARGs)的研究方法及研究进展[J]. 环境化学, 2014, 33(5): 739-747
- [6] Gandolfi I, Franzetti A, Bertolini V, et al. Antibiotic resistance in bacteria associated with coarse atmospheric particulate matter in an urban area[J]. Journal of Applied Microbiology, 2011, 110(6): 1612-1620
- [7] Chapin A, Rule A, Gibson K, et al. Airborne multidrug-resistant bacteria isolated from a concentrated swine feeding operation[J]. Environmental Health Perspectives, 2005, 113(2): 137-142
- [8] Novo A, Manaia CM. Factors influencing antibiotic resistance burden in municipal wastewater treatment plants[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87(3): 1157-1166
- [9] Gao PP, Mao DQ, Luo Y, et al. Occurrence of sulfonamide and tetracycline-resistant bacteria and resistance genes in aquaculture environment[J]. Water Research, 2012, 46(7): 2355-2364
- [10] Huang JJ, Hu HY, Lu SQ, et al. Monitoring and evaluation of antibiotic-resistant bacteria at a municipal wastewater treatment plant in China[J]. Environment International, 2012, 42: 31-36
- [11] Munir M, Wong K, Xagorarakis I. Release of antibiotic resistant bacteria and genes in the effluent and biosolids of five wastewater utilities in Michigan[J]. Water Research, 2011, 45(2): 681-693
- [12] Wu N, Qiao M. Tetracycline residues and tetracycline resistance gene pollution in soil: a review[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2010, 5(5): 618-627 (in Chinese)
吴楠, 乔敏. 土壤环境中四环素类抗生素残留及抗性基因污染的研究进展[J]. 生态毒理学报, 2010, 5(5): 618-627
- [13] Hu XM, Xu BL, Yang YM, et al. A high throughput multiplex PCR assay for simultaneous detection of seven aminoglycoside-resistance genes in Enterobacteriaceae[J]. BMC Microbiology, 2013, 13: 58
- [14] Koczura R, Mokracka J, Jabłońska L, 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: 680-685
- [15] Zhang XX, Zhang T, Fang HHP. Antibiotic resistance genes in water environment[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 82(3): 397-414
- [16] Ji XL, Shen QH, Liu F, et al. Antibiotic resistance gene abundances associated with antibiotics and heavy metals in animal manures and agricultural soils adjacent to feedlots in Shanghai, China[J]. Journal of Hazardous Materials, 2012, 235-236: 178-185
- [17] LaPara TM, Burch TR, McNamara PJ, et al. Tertiary-treated municipal wastewater is a significant point source of antibiotic resistance genes into Duluth-Superior harbor[J]. Environmental Science & Technology, 2011, 45(22): 9543-9549
- [18] Wu N, Qiao M, Zhang B, et al. Abundance and diversity of tetracycline resistance genes in soils adjacent to representative swine feedlots in China[J]. Environmental Science & Technology, 2010, 44(18): 6933-6939
- [19] Zhang T, Zhang M, Zhang XX, et al. Tetracycline resistance genes and tetracycline resistant lactose-fermenting *Enterobacteriaceae* in activated sludge of sewage treatment plants[J]. Environmental Science & Technology, 2009, 43(10): 3455-3460
- [20] Czekalski N, Berthold T, Caucci S, et al. Increased levels of multiresistant bacteria and resistance genes after wastewater treatment and their dissemination into Lake Geneva, Switzerland[J]. Frontiers in Microbiology, 2012, 3: 106
- [21] Walsh F, Ingenfeld A, Zampiccoli M, et al. Real-time PCR methods for quantitative monitoring of streptomycin and tetracycline resistance genes in agricultural ecosystems[J]. Journal of Microbiological Methods, 2011, 86(2): 150-155
- [22] 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
- [23] Wang FH, Qiao M, Su JQ, et al. High throughput profiling of antibiotic resistance genes in urban park soils with reclaimed water irrigation[J]. Environmental Science & Technology, 2014, 48(16): 9079-9085
- [24] Agersø Y, Sandvang D. Class 1 integrons and tetracycline resistance genes in *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, and *Pseudomonas* spp. isolated from pigsties and manured soil[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(12): 7941-7947
- [25] Shah SQA, Colquhoun DJ, Nikuli HL, et al. Prevalence of antibiotic resistance genes in the bacterial flora of integrated fish farming environments of Pakistan and Tanzania[J]. Environmental Science & Technology, 2012, 46(16): 8672-8679
- [26] Call DR. Challenges and opportunities for pathogen detection using DNA microarrays[J]. Critical Reviews in Microbiology, 2005, 31(2): 91-99
- [27] Patterson AJ, Colangeli R, Spigaglia P, et al. Distribution of specific tetracycline and erythromycin resistance genes in environmental samples assessed by macroarray detection[J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(3): 703-715
- [28] Wright GD. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity[J]. Nature Reviews Microbiology, 2007, 5(3): 175-186
- [29] 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
- [30] 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
- [31] Allen HK, Moe LA, Rodbummer J, et al. Functional metagenomics reveals diverse β -lactamases in a remote Alaskan soil[J]. The ISME Journal, 2009, 3(2): 243-251
- [32] Forsberg KJ, Reyes A, Wang B, et al. The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens[J]. Science, 2012, 337(6098): 1107-1111
- [33] Yang Y, Li B, Zou SC, et al. Fate of antibiotic resistance genes in sewage treatment plant revealed by metagenomic approach[J].

- Water Research, 2014, 62: 97-106
- [34] Fang H, Wang HF, 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
- [35] Staley C, Gould TJ, Wang P, et al. High-throughput functional screening reveals low frequency of antibiotic resistance genes in DNA recovered from the upper Mississippi river[J]. Journal of Water and Health, 2015, 13(3): 693-703
- [36] Kristiansson E, Fick J, Janzon A, et al. Pyrosequencing of antibiotic-contaminated river sediments reveals high levels of resistance and gene transfer elements[J]. PLoS One, 2011, 6(2): e17038
- [37] Zhang T, Zhang XX, Ye L. Plasmid metagenome reveals high levels of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in activated sludge[J]. PLoS One, 2011, 6(10): e26041
- [38] 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]. Science of the Total Environment, 2013, 447: 345-360
- [39] Mokracka J, Koczura R, Kaznowski A. Multiresistant *Enterobacteriaceae* with class 1 and class 2 integrons in a municipal wastewater treatment plant[J]. Water Research, 2012, 46(10): 3353-3363
- [40] Silveira E, Freitas AR, Antunes P, et al. Co-transfer of resistance to high concentrations of copper and first-line antibiotics among *Enterococcus* from different origins (humans, animals, the environment and foods) and clonal lineages[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2014, 69(4): 899-906
- [41] Guo MT, Yuan QB, Yang J. Distinguishing effects of ultraviolet exposure and chlorination on the horizontal transfer of antibiotic resistance genes in municipal wastewater[J]. Environmental Science & Technology, 2015, 49(9): 5771-5778
- [42] Luo Y, Wang Q, Lu Q, et al. An ionic liquid facilitates the proliferation of antibiotic resistance genes mediated by class I integrons[J]. Environmental Science & Technology Letters, 2014, 1(5): 266-270
- [43] Ju F, Li B, Ma LP, et al. Antibiotic resistance genes and human bacterial pathogens: Co-occurrence, removal, and enrichment in municipal sewage sludge digesters[J]. Water Research, 2016, 91: 1-10