

广东西枝江-东江流域抗生素抗性基因污染特征研究

张瑞泉¹, 应光国^{1*}, 丁永祯², 苏浩昌¹, 刘有胜¹

(1.中国科学院广州地球化学研究所 有机地球化学国家重点实验室, 广州 510640; 2.农业部环境保护科研监测所, 天津 300191)

摘要: 抗生素抗性基因(Antibiotics Resistance Genes, ARGs)污染已成为全球性环境问题之一。于枯水季对广东西枝江-东江流域的淡水河、西枝江、东江干流上 120 多公里河段范围采样, 共 10 个点, 每个点同步采集水样和沉积物样品, 采用实时荧光定量 PCR 方法, 测定了 3 种代表性磺胺类耐药基因(*sul1*、*sul2*、*sul3*)及 2 种代表性整合酶基因(*int1*、*int2*)的存在及其丰度。结果显示, 水样及沉积物样品中 *sul1*、*sul2*、*sul3* 和 *int1*、*int2* 均具有 100%检出率, 表明西枝江-东江流域水环境受到这 5 种抗生素抗性基因的污染。*sul1* 和 *sul2* 在水样和沉积物中的绝对丰度和相对丰度最高, 为优势抗性基因。抗性基因丰度在水体和沉积物间, 具有较好的相关性($R^2=0.64$)。无论水体和沉积物, 一些抗性基因之间也存在显著的正相关:*sul1* 和 *int1*($R^2>0.95$, $P=0.000<0.01$), *sul1* 和 *sul2*($R^2>0.8$, $P=0.002<0.01$), *sul2* 和 *int1*($R^2>0.8$, $P=0.004<0.01$)。西枝江-东江流域的不同采样点的丰度水平并没有明显峰值, 从支流到干流抗性基因丰度未随着水量的增加而削减, 反而随着微生物繁殖和新的污染源排放而不断富集。

关键词: 水环境; 抗生素抗性基因; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: X52 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2013)12-2471-09 doi:10.11654/jaes.2013.12.021

Pollution Characteristics of Antibiotic Resistance Genes in Xizhijiang -Dongjiang River Basin, Guangdong Province, China

ZHANG Rui-quan¹, YING Guang-guo^{1*}, DING Yong-zhen², SU Hao-chang¹, LIU You-sheng¹

(1.State Key Laboratory of Organic Geochemistry, Guangzhou Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, China; 2.Agro-Environmental Protection Institute, Ministry of Agriculture, Tianjin 300191, China)

Abstract: Contamination from antibiotic resistance genes (ARGs) has become an environmental issue all over the world. In this study, we sampled water and sediments during dry season at ten sites in the Xizhijiang-Dongjiang River Basin, Guangdong province. SYBR Green-based real-time quantitative PCR was used to assay the abundance of three representative sulfonamides resistance genes (*sul1*, *sul2*, and *sul3*) and two integrase genes (*int1* and *int2*). These five genes were all detected in both water and sediment samples, implying ARG contamination of water in the Xizhijiang-Dongjiang River basin. The absolute abundance and relative abundance of *sul1* and *sul2* were highest, suggesting that they both were predominant ARGs. A positive correlation ($R^2=0.64$) was found between the relative abundance of the ARGs in water and that in the sediments. In both water and sediments, there was a positive correlation between relative abundance of *sul1* and *int1* ($R^2>0.95$, $P=0.000<0.01$), *sul1* and *sul2* ($R^2>0.8$, $P=0.002<0.01$), and *sul2* and *int1* ($R^2>0.8$, $P=0.004<0.01$). From tributaries to the main stream, antibiotic resistance gene became enriched. Special attention should be paid to ARGs contamination in this region.

Keywords: water environment; ARGs; real-time PCR

抗生素及抗生素抗性基因(Antibiotics Resistance Genes, ARGs)污染已成为全球性环境问题之一^[1-4], 由此产生的潜在生态风险也日益引起了广泛关注。我国是抗生素生产和使用的大国, 抗生素年生产量接近 21

万 t, 其中 90%用在农业(48%)和医疗(42%)上, 剩下的 10%用于出口^[5], 而且呈持续上升的趋势。抗生素常被用于畜禽养殖及医疗业, 其中只有少部分在生物体内转化、代谢和降解, 大部分(90%左右)以原药或者代谢物形式经由病人和畜禽的粪尿排出体外^[6], 一部分通过肥料的施用、地表径流或渗滤等形式进入水体, 大部分则作为废水进入污水处理厂, 并逃过现有的污水处理系统最终进入水体^[6-7]。残留的抗生素进入环境后, 会给环境中的微生物带来巨大的选择性压

收稿日期: 2013-05-06

基金项目: 国家自然科学基金联合基金(U1133005), 中科院重要方向创新项目 KZCX2-EW-108, 环保公益项目(201309031)

作者简介: 张瑞泉(1979—), 男, 博士研究生, 研究方向为环境化学与环境微生物学。E-mail: ruiquan817@qq.com

* 通信作者: 应光国 E-mail: guang-guo.ying@gig.ac.cn

力,诱发和传播各类抗生素耐药菌(Antibiotics Resistance bacteria, ARBs)及抗生素抗性基因,对生态系统中各类生物产生危害^[8-9]。

抗生素抗性基因的存在是细菌耐药性产生的根源,Pruden 等^[10]将抗生素抗性基因明确定义为一种新型污染物。抗生素抗性基因可在土壤、水体、地下水等各种环境介质中迁移、转化,可整合到质粒、转座子、整合子等可移动基因元件而进入环境微生物,并通过基因横向转移在细菌间传播,使原本没有抗生素抗性的细菌获得耐药性^[8-9,11],最终通过食物链进入动物及人体,导致抗生素治疗效力下降,使许多疾病的救治越来越困难,对畜禽养殖及人类健康构成潜在威胁^[3,11-12]。抗生素抗性基因已在欧洲^[13]、北美^[14]和亚洲^[15]水环境中被广泛检出,在我国的一些自然水体中,如九龙江^[16]在、温榆河^[17]、黄浦江^[18]、北江^[19]、珠江^[20]及海河^[21]等,均检测到不同程度的抗生素抗性基因的污染。

磺胺类耐药基因包括编码二氢叶酸还原酶的 *dfr* 基因家族和二氢叶酸合成酶基因家族,其中 *dfr* 基因家族包括 *dfrA1*、*dfrA5*、*dfrA7*、*dfrA12*、*dfrA15*、*dfrA17* 等,二氢叶酸合成酶基因家族包含 *sul1*、*sul2*、*sul3*、*sulA* 等^[8],其中 *sul1*、*sul2*、*sul3* 在环境中比较常见,文献报道已在北美^[14]和亚洲^[15]水环境中被广泛检出,在我国的一些自然水体中,如温榆河^[17]、珠江广州段^[20]、东江^[21]及海河^[22]等,均检测到二氢叶酸合成酶基因的污染。

整合子基因作为一种和耐药基因密切相关的可移动遗传元件,自从 1989 年 H. Stokes 和 R. Hall 首先报道^[23],到目前已经发现三种整合子,由于整合酶(*intI*)的不同,整合子可分为一型、二型和三型整合子^[8]。其中一型和二型整合子在自然水环境中比较常见,文献报道已在澳洲^[24]、欧洲^[25-26]和亚洲^[27-28]水环境中被广泛检出,在我国福建闽江也检测到整合酶基因的污染^[28]。

西枝江-东江流域位于广东省深圳市、惠州市范围内,该地区经济发达,其流域水环境问题,对东江水质的影响举足轻重^[29]。因此,本研究针对西枝江-东江流域的淡水河、西枝江、东江开展布点采样,共 10 个采样点,每个采样点同步采集水体和沉积物样品,采用实时荧光定量 PCR 法分析了 3 种代表性磺胺类耐药基因及 2 种代表性整合酶基因的存在及其丰度,以期评价该流域水环境状况,并为我国水环境中 ARGs 的丰度及相关风险评价和环境管理提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

由于枯水季节水体、沉积物污染物受自然界降水影响小,更能反映河流环境真实污染状况。因此,本研究于 2012 年 12 月枯水季对西枝江-东江流域的淡水河、西枝江和东江干流进行布点采样(图 1),共设 10

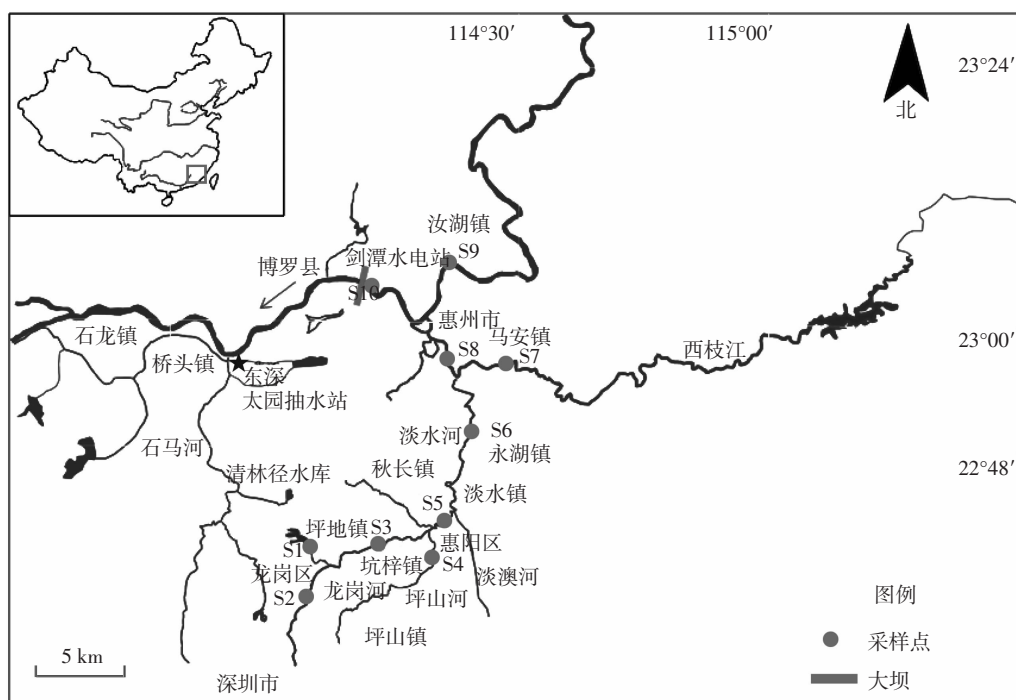


图 1 西枝江-东江流域采样点分布图

Figure 1 Sampling sites in the Xizhijiang-Dongjiang River Basin

个采样点,S1-S6 位于西枝江最大支流淡水河,S7 和 S8 分布于淡水河汇入西枝江入口的上下游,S9 和 S10 分布在西枝江汇入东江入口的上下游。采样点地理位置如表 1。每个点采集距河面 0.5~1.0 m 深处的水样、并用抓斗同步采集河流底泥,水样和沉积物样品均采集 3 份。样品装在干净的棕色玻璃瓶中带回,水样和沉积物分别保存于 4℃、-18℃冰箱中待测。

1.2 DNA 提取

1.2.1 沉积物样品总 DNA 提取

沉积物样品冷冻干燥后,放入干净研钵中,用力研磨样品,然后过 60 目筛。称取 0.5 g 过筛后充分混匀的样品,按照强力土壤 DNA 提取试剂盒(PowerSoil® DNA Isolation Kit, Mobio, 美国)的实验操作步骤,提取和纯化沉积物样品总 DNA。

1.2.2 水样中总 DNA 提取

取 0.5 L 水样过 0.22 微米的水相膜,膜剪碎。将剪碎后的膜,放入厚壁研磨管中,按照强力土壤 DNA

提取试剂盒(PowerSoil® DNA Isolation Kit, Mobio, 美国)的实验操作步骤,提取和纯化水样中总 DNA。

1.2.3 DNA 样品检测

提取的 DNA 用琼脂糖凝胶电泳及 SmartSpec Plus 核酸蛋白测定仪 100~300 nm scan 后,测定 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 值,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值应在 1.6~1.8 之间,表明用试剂盒提取的 DNA 纯度较高。

1.3 普通 PCR 扩增

选取 3 种磺胺类抗性基因 *sul1*、*sul2*、*sul3* 和 2 种整合酶基因 *int1*、*int2* 作为目的基因。对采集沉积物及水样中所提取的 DNA 进行检测,目标抗生素抗性基因(ARGs)引物见表 2。PCR 反应体系(25 μL):2.5 μL 10×PCR buffer,1.5 μL MgCl₂(25 mmol·L⁻¹),3 μL dNTPs(2.5 mmol·L⁻¹ each),1 μLFW、RW 引物(10 μmol·L⁻¹ each),2 μL 模板 DNA,0.125 μL Taq DNA 聚合酶(5 U·μL⁻¹),14.875 μL ddH₂O。PCR 反应程序:94℃预变性 4 min;94℃变性 30 s,退火 30 s,72℃延伸 30~60

表 1 采样点地理位置信息
Table 1 Basic information of sampling sites

编号	采样点位置	经度	纬度	所属河段	所属干支流
S1	深圳龙岗区清林径水库	114°14'12"	22°45'50"	淡水河	西枝江支流
S2	深圳龙岗区龙园公园	114°15'27"	22°43'53"	淡水河	西枝江支流
S3	深圳坪地镇年丰村	114°19'53"	22°45'51"	淡水河	西枝江支流
S4	深圳坑梓镇石化大道桥	114°26'24"	22°44'42"	淡水河	西枝江支流
S5	惠州市惠阳区人民四路	114°27'13"	22°47'59"	淡水河	西枝江支流
S6	惠州市惠阳区永湖镇	114°29'28"	22°56'38"	淡水河	西枝江支流
S7	惠州市惠东县白花镇	114°64'68"	22°97'73"	西枝江	东江支流
S8	惠州市惠东县马安镇	114°28'22"	23°1'35"	西枝江	东江支流
S9	惠州市惠城区汝湖镇	114°27'19"	23°10'51"	东江	东江干流
S10	惠州市惠城区剑潭坝上	114°21'42"	23°08'53"	东江	东江干流

表 2 构建目标基因标准质粒和实时荧光定量 PCR 所用引物

Table 2 Primers used for real-time PCR in the study

目的基因	引物	引物序列(5'→3')	退火温度/℃	扩增长度/bp	文献
<i>sul1</i>	<i>Qsul1</i> /F	CGCACCGGAAACATCGCTGCAC	62	163	[30]
	<i>Qsul1</i> /R	TGAAGTTCCGCCGCAAGGCTCG			
<i>sul2</i>	<i>Qsul2</i> /F	TCCGGTGGAGGCCGCTATCTGG	62	191	[30]
	<i>Qsul2</i> /R	CGGGAATGCCATCTGCCTTGAG			
<i>sul3</i>	<i>Qsul3</i> /F	TCCGTTACGCGAATTGGTGCAG	62	128	[30]
	<i>Qsul3</i> /R	TTCGTTACGCGCTTACACCAGC			
<i>int1</i>	<i>Qint1</i> /F	CAGTGGACATAAGCCTGTTTC	55	160	[31]
	<i>Qint1</i> /R	CCCGAGGCATAGACTGTA			
<i>int2</i>	<i>Qint2</i> /F	GTTATTTTATTGCTGGGATTAGGC	55	166	[22]
	<i>Qint2</i> /R	TTTACGCTGCTGTATGGTGC			
16S rDNA	690F	TGTGTAGCGGTGAAATGCCG	62	140	[22]
	829R	CATCGTTTACGGCGTGGAC			

s, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min; 12 °C forever。

1.4 标准曲线的建立

利用 PCR 技术扩增得到的目的耐药基因的 PCR 产物进行电泳检测, 并将正确的片断用切胶回收试剂盒 (MinElute Gel Extraction Kit, Qiagen, 德国) 做胶回收纯化 PCR 产物。使用 pMD[®] 18-T 载体试剂盒 (Takara, 大连), 将纯化的 PCR 产物目的基因片断连接到 pMD[®] 18-T 载体, 然后采用商品化的感受态细胞 *E. coli* DH5a (Takara, 大连) 进行转化。蓝白筛选后, 挑选菌落, 小量培养。裂解细菌, 使用质粒小提试剂盒 (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen, 德国) 提取质粒后进行 PCR 检测。

将提取的耐药基因阳性载体质粒的质粒用

SmartSpec Plus 核酸蛋白测定仪检测 OD_{260 nm} 值, 并计算出各目的标准质粒的拷贝数 ($1 \text{ OD}_{260} = 50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 双链 DNA)。根据计算结果, 用 TE Buffer 把所提质粒稀释成 0.5×10^9 、 0.5×10^8 、 0.5×10^7 、 0.5×10^6 、 0.5×10^5 、 0.5×10^4 、 $0.5 \times 10^3 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的标准 DNA 溶液, 以此建立实时荧光定量 PCR 的标准曲线。5 种目的抗性基因及 16S-rRNA 的标准曲线相关系数 $R^2 \geq 0.99$, 扩增效率在 95%~105% 之间, 溶解曲线应为单峰, 如图 2 所示。

1.5 实时荧光定量 PCR

以 16S-rRNA 作为内参基因, 对提取纯化的环境基因组 DNA 用 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Tli RNaseH Plus) (Takara, 大连), 在 ViiA 7 荧光定量 PCR 仪 (ABI, 美国) 上进行实时荧光 PCR 反应, 可得到 CT 值

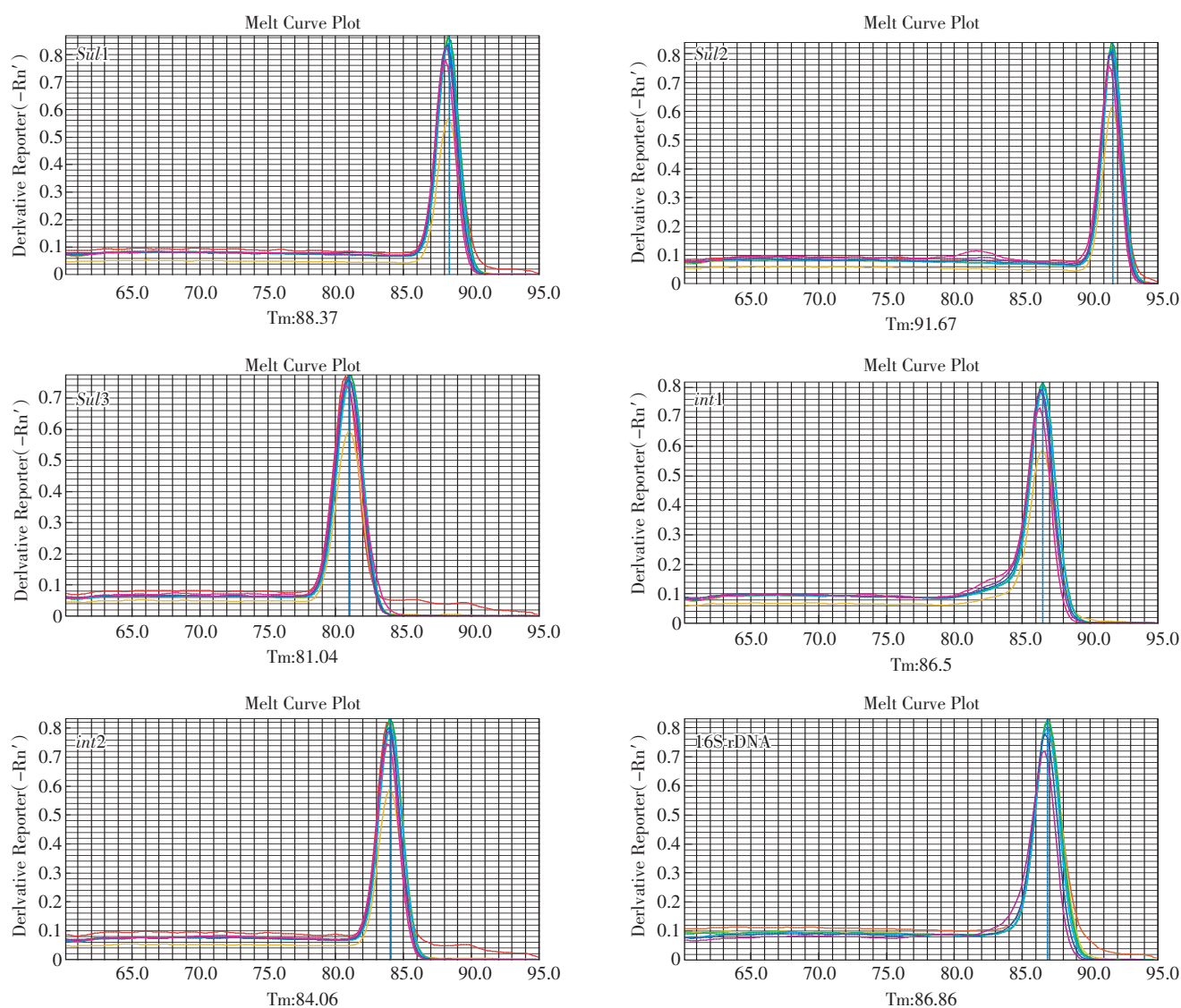


图2 目标基因荧光定量 PCR 溶解曲线图

Figure 2 Melting curves of Real-time PCR for target genes

及溶解曲线。测定样品中 5 种 ARGs 的含量水平每次反应都要设定标准曲线、阴性对照及阳性对照。荧光定量 PCR 反应体系 (20 μL): 10 μL SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Tli RNaseH Plus), 0.8 μL FW、RW 引物 (10 μM each), 0.4 μL ROX Dye II, 2 μL 模板 DNA, 0.125 μL Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μL), 6 μL ddH₂O。荧光定量 PCR 反应程序: (1) 预变性: 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min; (2) PCR 扩增: 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 退火 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s (荧光信号采集), 40 个循环; (3) 融解曲线检测: 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 秒, 后 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min。模板数计算: 根据样品 RT-PCR 扩增得到的 CT 值, 对应标准曲线得到样品中耐药基因的含量 (copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ DNA), 通过数学计算出样品中耐药基因的含量 (copies $\cdot \text{g}^{-1}$ 或 copies $\cdot \text{L}^{-1}$)。

1.6 数据统计分析

用 SPSS 16.0 软件进行统计学处理, 采用 one-way ANOVA 进行差异性分析。回归分析用 Sigmaplot 11 完成。

2 结果与分析

2.1 抗生素抗性基因绝对丰度

结果显示, 10 个采样点的水样及沉积物样品中 *sul1*、*sul2*、*sul3* 和 *int1*、*int2* 均具有 100% 检出率, 说明

所检测的 ARGs 在西枝江-东江流域水环境中是广泛存在的。表 3 给出了 3 种抗生素抗性基因和 2 种整合酶基因的检出率及丰度。

图 3 显示, 水样和沉积物样品中, *sul1* 和 *int1* 绝对丰度值接近 ($P > 0.05$), *sul1*、*sul2* 和 *int2* 三种基因之间绝对丰度均差异显著 ($P < 0.05$)。水样和沉积物样品中 *sul1*、*sul2* 和 *int2* 中较高绝对丰度, *sul3* 和 *int2* 基因具有较低的绝对丰度。其中 *sul1* 含量最高, 在水样中达 $(3.05 \pm 3.01) \times 10^8$ copies $\cdot \text{L}^{-1}$, 在沉积物中达 $(1.63 \pm 1.74) \times 10^8$ copies $\cdot \text{g}^{-1}$ 。 *sul3* 的含量最低, 在水样中达 $(7.79 \pm 5.49) \times 10^5$ copies $\cdot \text{L}^{-1}$, 在沉积物中为 $(4.88 \pm 5.32) \times 10^5$ copies $\cdot \text{g}^{-1}$, 两者含量水平相差三个数量级。 *int1* 基因远远大于 *int2* 基因, 水样中相差两个数量级, 沉积物样品中相差一个数量级。

不同采样点的沉积物样品中的抗性基因 (ARGs) 绝对丰度 ($F = 2.104$, $P = 0.052$) 并没有出现明显的峰值。除 S9 点外, 抗性基因绝对丰度 ($F = 1.966$, $P = 0.08$) 在不同采样点的水样亦并没有出现明显的峰值。

2.2 抗生素抗性基因相对丰度

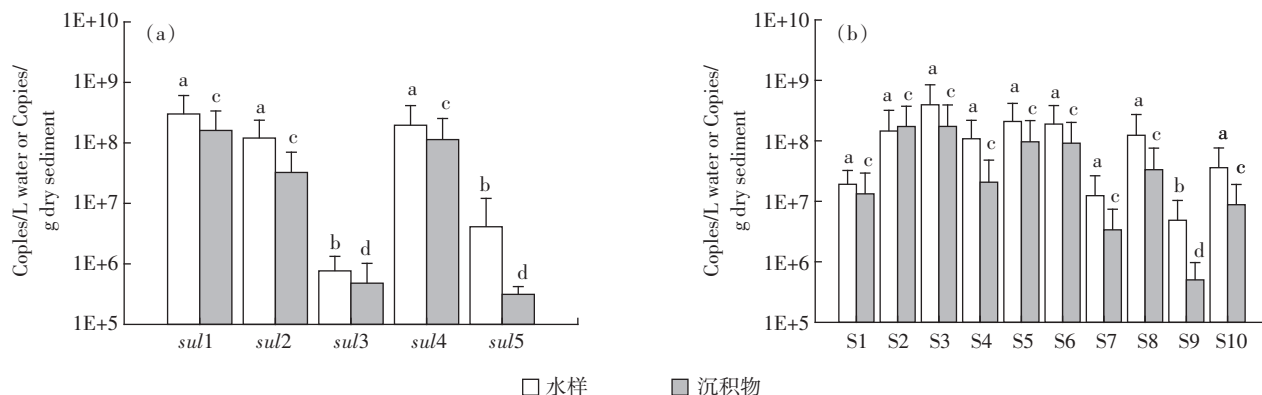
抗生素抗性基因相对丰度 (目的抗性基因与 16S-rRNA 基因的比值) 除 *sul1* 和 *int1* 含量接近外 ($P =$

表 3 抗生素抗性基因绝对丰度

Table 3 Absolute abundance of Antibiotics resistance genes in samples

采样点		<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>sul3</i>	<i>int1</i>	<i>int2</i>	16S-rRNA
S1	水样 ^a	$3.45 \pm 0.12 \times 10^7$	$1.12 \pm 0.09 \times 10^7$	$1.25 \pm 0.19 \times 10^6$	$2.34 \pm 0.22 \times 10^7$	$2.59 \pm 0.55 \times 10^7$	$8.01 \pm 0.06 \times 10^8$
	沉积物 ^b	$3.54 \pm 0.2 \times 10^7$	$7.17 \pm 0.17 \times 10^6$	$7.52 \pm 0.37 \times 10^4$	$2.47 \pm 0.25 \times 10^7$	$3.08 \pm 0.18 \times 10^5$	$2.01 \pm 0.38 \times 10^9$
S2	水样	$4.09 \pm 0.13 \times 10^8$	$1.10 \pm 0.10 \times 10^8$	$2.34 \pm 0.22 \times 10^5$	$2.18 \pm 0.13 \times 10^8$	$9.79 \pm 0.11 \times 10^5$	$2.04 \pm 0.48 \times 10^9$
	沉积物	$4.28 \pm 0.15 \times 10^8$	$1.12 \pm 0.06 \times 10^8$	$1.19 \pm 0.07 \times 10^6$	$3.37 \pm 0.15 \times 10^8$	$1.34 \pm 0.35 \times 10^5$	$6.18 \pm 0.17 \times 10^9$
S3	水样	$9.94 \pm 0.48 \times 10^8$	$2.75 \pm 0.21 \times 10^8$	$1.62 \pm 0.11 \times 10^6$	$7.24 \pm 1.51 \times 10^8$	$7.29 \pm 0.07 \times 10^6$	$4.67 \pm 1.13 \times 10^9$
	沉积物	$4.53 \pm 0.05 \times 10^8$	$6.40 \pm 0.20 \times 10^7$	$1.66 \pm 0.10 \times 10^6$	$3.62 \pm 0.50 \times 10^8$	$2.83 \pm 1.58 \times 10^5$	$8.35 \pm 0.86 \times 10^9$
S4	水样	$2.33 \pm 0.25 \times 10^8$	$1.17 \pm 0.15 \times 10^8$	$5.58 \pm 0.23 \times 10^5$	$1.99 \pm 0.19 \times 10^8$	$1.49 \pm 0.27 \times 10^6$	$1.32 \pm 0.28 \times 10^{10}$
	沉积物	$6.37 \pm 0.23 \times 10^7$	$1.08 \pm 0.07 \times 10^7$	$1.48 \pm 0.20 \times 10^5$	$3.04 \pm 0.21 \times 10^7$	$3.80 \pm 0.11 \times 10^5$	$3.88 \pm 0.79 \times 10^9$
S5	水样	$4.54 \pm 0.86 \times 10^8$	$2.70 \pm 0.27 \times 10^8$	$1.27 \pm 0.03 \times 10^6$	$3.34 \pm 0.68 \times 10^8$	$1.56 \pm 0.35 \times 10^6$	$3.74 \pm 0.35 \times 10^9$
	沉积物	$2.61 \pm 0.17 \times 10^8$	$4.48 \pm 0.19 \times 10^7$	$6.33 \pm 0.29 \times 10^5$	$1.84 \pm 0.15 \times 10^8$	$2.71 \pm 0.12 \times 10^5$	$6.11 \pm 0.29 \times 10^9$
S6	水样	$4.4 \pm 0.27 \times 10^8$	$2.77 \pm 0.27 \times 10^8$	$4.80 \pm 0.29 \times 10^5$	$2.44 \pm 0.84 \times 10^8$	$1.51 \pm 0.13 \times 10^6$	$4.57 \pm 1.53 \times 10^9$
	沉积物	$2.57 \pm 0.35 \times 10^8$	$6.33 \pm 0.32 \times 10^7$	$4.34 \pm 0.14 \times 10^5$	$1.43 \pm 0.14 \times 10^8$	$2.70 \pm 0.28 \times 10^5$	$2.40 \pm 0.29 \times 10^9$
S7	水样	$9.78 \pm 0.21 \times 10^6$	$2.51 \pm 0.28 \times 10^6$	$2.35 \pm 0.22 \times 10^5$	$1.17 \pm 0.09 \times 10^7$	$4.63 \pm 0.35 \times 10^5$	$1.14 \pm 0.14 \times 10^9$
	沉积物	$1.25 \pm 0.09 \times 10^6$	$1.49 \pm 0.31 \times 10^5$	$1.60 \pm 0.08 \times 10^5$	$6.44 \pm 2.20 \times 10^5$	$3.56 \pm 0.32 \times 10^5$	$5.10 \pm 1.38 \times 10^8$
S8	水样	$3.21 \pm 0.1 \times 10^7$	$8.69 \pm 0.25 \times 10^6$	$2.71 \pm 0.21 \times 10^5$	$2.14 \pm 0.25 \times 10^7$	$6.13 \pm 0.27 \times 10^5$	$1.23 \pm 0.16 \times 10^9$
	沉积物	$9.24 \pm 0.58 \times 10^6$	$1.37 \pm 0.29 \times 10^6$	$1.74 \pm 0.17 \times 10^5$	$5.89 \pm 1.39 \times 10^6$	$5.34 \pm 0.13 \times 10^5$	$7.05 \pm 1.17 \times 10^8$
S9	水样	$3.6 \pm 0.32 \times 10^8$	$1.25 \pm 0.19 \times 10^8$	$1.44 \pm 0.32 \times 10^6$	$1.42 \pm 0.05 \times 10^8$	$5.81 \pm 0.12 \times 10^5$	$3.09 \pm 0.14 \times 10^9$
	沉积物	$1.00 \pm 0.02 \times 10^8$	$2.08 \pm 0.02 \times 10^7$	$2.65 \pm 0.28 \times 10^5$	$4.81 \pm 0.30 \times 10^7$	$3.64 \pm 0.28 \times 10^5$	$3.43 \pm 0.47 \times 10^9$
S10	水样	$8.65 \pm 0.42 \times 10^7$	$2.54 \pm 0.12 \times 10^7$	$4.33 \pm 0.35 \times 10^5$	$6.49 \pm 0.24 \times 10^7$	$1.44 \pm 0.11 \times 10^5$	$5.77 \pm 0.25 \times 10^9$
	沉积物	$2.25 \pm 0.22 \times 10^7$	$5.31 \pm 0.27 \times 10^6$	$1.42 \pm 0.17 \times 10^5$	$1.65 \pm 0.34 \times 10^7$	$2.85 \pm 0.07 \times 10^5$	$1.43 \pm 0.43 \times 10^9$

注: a: copies $\cdot \text{L}^{-1}$ b: copies $\cdot \text{g}^{-1}$ dry sediment.



(a) 5种抗性基因绝对丰度, (b) 10个采样点抗性基因绝对丰度

(a) Absolute abundance of five antibiotic resistance genes, (b) Absolute abundance of antibiotic resistance genes at ten sampling sites

图3 抗生素抗性基因绝对丰度水平

Figure 3 Absolute abundance of antibiotic resistance gene

0.116>0.05), *sul1*, *sul2* 和 *int2* 三种基因之间相对丰度均差异显著 ($P<0.05$), 如图4所示。三种磺胺类抗生素抗性基因(ARGs)中 *sul1* 在样品中的相对丰度最高, 在水样和沉积物样品中的相对丰度分别为 $(8.81 \pm 7.94) \times 10^{-2}$ 和 $(3.71 \pm 3.226) \times 10^{-2}$; *sul2* 的相对丰度在水样和沉积物样品中分别为 $(3.32 \pm 2.83) \times 10^{-2}$ 和 $(7.90 \pm 8.28) \times 10^{-3}$; *sul3* 的含量在样品中相对丰度最低, 在水样和沉积物样品中分别为 $(4.00 \pm 4.60) \times 10^{-4}$ 和 $(2.0 \pm 1.0) \times 10^{-4}$ 。水样和沉积物样品中两种整合酶基因的相对丰度存在显著性差异 ($P<0.05$, $int1>int2$), *int1* 在水样和沉积物样品中相对丰度分别可达 $(5.38 \pm 4.94) \times 10^{-2}$ 和 $(2.44 \pm 2.11) \times 10^{-2}$ 。

除 S9 点外, 不同采样点的沉积物样品中的抗性基因相对丰度 ($F=1.433$, $P=0.136$) 并没有出现明显的峰值, 抗性基因相对丰度 ($F=1.433$, $P=0.217$) 在不同采样点的水样亦并没有出现明显的峰值。目的基因在

水样中的相对丰度均大于对应采样点的沉积物的相对丰度 ($P<0.05$)。

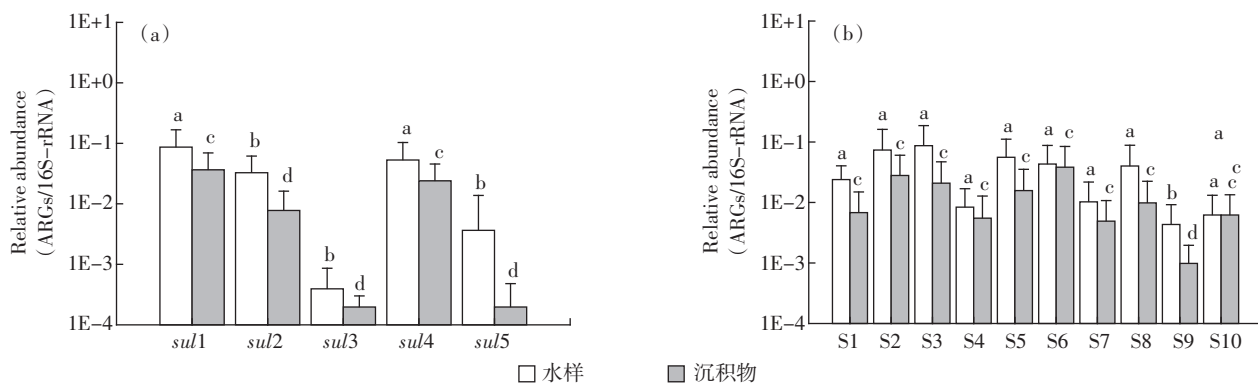
2.3 抗生素抗性基因相关性分析

水样和沉积物样品中抗生素抗性基因的相关性分析如表4所示。结果显示: 水样和沉积物样品中, *sul1* 和 *sul2* 为极显著正相关 ($R^2>0.8$, $P=0.002<0.01$), *sul2* 和 *int1* 也为极显著正相关 ($R^2>0.8$, $P=0.004<0.01$), 同时 *sul1* 和 *int1* 具有更高的显著正相关性 ($R^2>0.95$, $P=0.000<0.01$)。

对所有水样及对应采样点中的抗生素抗性基因相对丰度做回归分析, 结果如图5所示, 水样和对应采样点沉积物样品中的抗生素抗性基因的相对丰度水平具有显著的相关性。

3 讨论

检测结果表明 *sul1* 和 *sul2* 磺胺类抗生素抗性基



(a) 5种抗性基因相对丰度, (b) 10个采样点抗性基因相对丰度

(a) Relative abundance of five antibiotic resistance genes, (b) Relative abundance of antibiotic resistance genes at ten sampling sites

图4 抗生素抗性基因相对丰度水平

Figure 4 Relative abundance of antibiotic resistance genes

表 4-1 抗性基因相关性分析结果(R^2)
Table 4-1 Correlation analysis of antibiotics resistance genes(R^2)

项目		水样					沉积物				
		<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>sul3</i>	<i>int1</i>	<i>int2</i>	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>sul3</i>	<i>int1</i>	<i>int2</i>
水样	<i>sul1</i>	1	0.847	-0.059	0.962	-0.173	0.658	—	—	—	—
	<i>sul2</i>	0.847	1	-0.103	0.822	-0.206	—	0.697	—	—	—
	<i>sul3</i>	-0.059	-0.103	1	-0.041	0.953	—	—	0.335	—	—
	<i>int1</i>	0.962	0.822	-0.041	1	-0.143	—	—	—	0.737	—
	<i>int2</i>	-0.173	-0.206	0.953	-0.143	1	—	—	—	—	-0.042
沉积物	<i>sul1</i>	0.658	—	—	—	—	1	0.972	0.099	0.964	-0.554
	<i>sul2</i>	—	0.697	—	—	—	0.972	1	0.107	0.917	-0.487
	<i>sul3</i>	—	—	0.335	—	—	0.099	0.107	1	0.129	0.670
	<i>int1</i>	—	—	—	0.737	—	0.964	0.917	0.129	1	-0.586
	<i>int2</i>	—	—	—	—	-0.042	-0.554	-0.487	0.670	-0.586	1

表 4-2 抗性基因相关性分析结果(P)
Table 4-2 Correlated analysis of antibiotics resistance genes(P values)

项目		水样					沉积物				
		<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>sul3</i>	<i>int1</i>	<i>int2</i>	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>sul3</i>	<i>int1</i>	<i>int2</i>
水样	<i>sul1</i>	0.000	0.002	0.872	0.000	0.634	0.039	—	—	—	—
	<i>sul2</i>	0.002	0.000	0.777	0.004	0.567	—	0.025	—	—	—
	<i>sul3</i>	0.872	0.777	0.000	0.911	0.000	—	—	0.232	—	—
	<i>int1</i>	0.000	0.004	0.911	0.000	0.693	—	—	—	0.015	—
	<i>int2</i>	0.634	0.567	0.000	0.693	0.000	—	—	—	—	-0.907
沉积物	<i>sul1</i>	0.039	—	—	—	—	0.000	0.000	0.785	0.000	0.097
	<i>sul2</i>	—	0.025	—	—	—	0.000	0.000	0.770	0.000	0.153
	<i>sul3</i>	—	—	0.232	—	—	0.785	0.770	0.000	0.723	0.034
	<i>int1</i>	—	—	—	0.015	—	0.000	0.000	0.723	0.000	0.075
	<i>int2</i>	—	—	—	—	-0.907	0.097	0.153	0.034	0.075	0.000

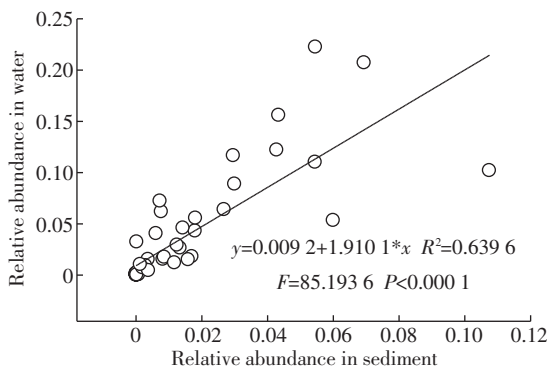


图 5 水样和沉积物中抗生素抗性基因相对丰度的回归分析
Figure 5 Regression analysis of antibiotics resistance genes between water and sediment

因丰度水平要高于 *sul3* 抗性基因,这可能与环境中 *sul3* 在环境中的检出率比较低有关^[15,30]。同美国科罗拉多州与美国科罗拉多州北部河流^[14]及我国珠江水系北江水体^[19]中抗性基因研究结果相比,西枝江-东

江流域环境中 *sul1* 和 *sul2* 丰度较高,说明西枝江-东江流域水环境受 *sul1* 和 *sul2* 污染较严重。同时西枝江-东江流域环境中 *sul1* 和 *sul2* 相对丰度要小于海河流域及黄浦江流域^[18,22],黄浦江流域中的 *sul3* 远大于西枝江-东江流域及海河流域,这可能与不同地区受地域环境影响的抗生素不同使用方式有关^[14,32]。

整合子系统作为微生物多重耐药性的一个机制,其存在对于抗生素抗性基因(ARGs)的扩散及横向转移具有重要的意义,在以往的研究中 *int1* 和 *int2* 两种整合酶基因在不同的环境介质中被广泛地检出且有较高的丰度^[22,33-34]。西枝江-东江流域中 *int1* 整合酶基因的相对丰度在水样中可达 $1.2\times10^{-2}\sim1.56\times10^{-1}$,在沉积物中可达 $8.20\times10^{-3}\sim5.45\times10^{-2}$ 。*int2* 含量较低可能与 *int2* 在环境中的检出率比较低有关^[32,34]。说明西枝江-东江流域水环境受整合子系统基因污染,整合子系统基因的污染,严重于单纯的耐药基因污染^[35]。

西枝江-东江流域聚集了惠州及深圳的主要农工商,是人口最为密集的地区,无论养殖业还是城市污水排放都是环境中抗生素抗性基因污染源和传播扩散的驱动力,而抗生素抗性基因污染一旦形成,则很难控制和消除^[14,18]。上游的淡水河聚集了深圳的工业和生活污水^[29],理论上在注入西枝江后随着水量的增加会稀释,但结果显示并未出现这样的情况,说明西枝江干流在淡水河注入前,由于惠东县范围内的工农业及生活污水的分散注入,西枝江中上游已经受到了抗生素抗性基因污染。结果显示在西枝江和东江交汇口上游,亦受到一定丰度的抗生素抗性基因的污染,说明东江流域中上游区域其他支流也受到抗生素抗性基因的污染^[32]。上游及支流形成的污染可能随水流迁移到下游,且抗性基因浓度不会因为水量的增加而削减,反而会因为微生物繁殖和新的污染源排放而不断富集^[14,18,32]。

相关性分析显示,*sul1* 和 *int1* 具有很高的相关性,此结果和 *sul1* 作为 I 类整合子的一部分相吻合^[35]。同时 *sul2* 和 *int1* 也有很强的相关,研究发现 *sul2* 在大的质粒上^[35-36],但少部分也可以由染色体介导,*sul2* 与 ISCR 插入元件共同区(insertion element common region, ISCR)连锁,研究数据表明 I 类整合子及 ISCR 元件与 *sul2* 基因的连锁遗传能够介导嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)对复方磺胺甲恶唑的耐药性,并且整合子-ISCR 结构可以更容易地把几个耐药基因一起从一个质粒整合到另一个质粒或染色体上,增加耐药性传播^[35-38]。由此可以推断出环境中 *sul1*、*sul2* 和 *int1* 是相关性比较强的三个基因,对于研究磺胺类抗生素抗性基因和整合子系统介导的基因横向转移(HGT)具有重要的意义。

水体和沉积物是水环境中密切相关的两部分,水体中的污染物可以沉积到水底沉积物中,同时水体的流动可以带走水底沉积物中的污染,本研究结果显示,水样和沉积物样品中的目的耐药基因的丰度有很强的相关性,对于研究抗生素抗性基因在水体和沉积物之间的环境行为具有重要的意义。

4 结论

(1)本文所建立的 Real-time PCR 耐药基因检测方法为进一步系统研究抗生素抗性基因在水环境中的环境行为及其生态风险提供了基础。

(2)西枝江-东江流域中 *sul1*、*sul2*、*sul3* 和 *int1*、*int2* 具有 100%的检出率,及抗生素抗性基因的绝对

丰度与相对丰度,表明西枝江-东江流域水环境受到了 3 种磺胺类抗性基因及 2 种整合酶基因的污染。

(3)西枝江-东江流域水环境的抗生素抗性基因 *sul1*、*sul2* 和 *int1* 之间的丰度水平具有很高的相关性。水样中抗性基因的污染特征和对应采样点沉积物中抗性基因的污染特征亦具有很好的相关性。

参考文献:

- [1] Kümmerer K. Antibiotics in the aquatic environment: A review-part I[J]. *Chemosphere*, 2009a, 75(4):417-434.
- [2] Kümmerer K. Antibiotics in the aquatic environment: A review-part II [J]. *Chemosphere*, 2009b, 75(4):435-441.
- [3] 罗义,周启星. 抗生素抗性基因(ARs):一种新型环境污染物[J]. 环境科学学报, 2008, 28(8):1499-1505.
LUO Yi, ZHOU Qi-xing. Antibiotic resistance genes(ARs) as emerging pollutants[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2008, 28(8):1499-1505.
- [4] 徐海花,牛钟相,秦爱建,等. 细菌耐药性研究进展[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2010, 41(1):156-160.
XU Hai-hua, NIU Zhong-xiang, QIN Ai-jian, et al. New research progress of bacterial drug-resistance[J]. *Journal of Shandong Agricultural University(Natural Science)*, 2010, 41(1):156-160.
- [5] Zhou Li-jun, Ying Guang-guo, Zhao Jian-liang, et al. Trends in the occurrence of human and veterinary antibiotics in the sediments of the Yellow River, Hai River and Liao River in Northern China[J]. *Environmental Pollution*, 2011, 159(7):1877-1885.
- [6] 冀秀玲,刘芳,沈群辉,等. 养殖场废水中磺胺类和四环素抗生素及其抗性基因的定量检测[J]. 生态环境学报, 2011, 20(5):927-933.
JI Xiu-ling, LIU Fang, SHEN Qun-hui, et al. Quantitative detection of sulfonamides and tetracycline antibiotics and resistance genes in sewage farms[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2011, 20(5):927-933.
- [7] Gulkowska A, Leung HW, So M K, et al. Removal of antibiotics from wastewater by sewage treatment facilities in Hongkong and Shenzhen, China[J]. *Water Research*, 2008, 42(1-2):395-403.
- [8] Zhang X X, Zhang T, Fang H H. Antibiotic resistance genes in water environment[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 82(3):397-414.
- [9] Aminov R I, Mackie R I. Evolution and ecology of antibiotic resistance genes[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, 271(2):147-161.
- [10] 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.
- [11] Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2010, 74(3):417-433.
- [12] 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.
WU Nan, QIAO Min. Tetracycline Residues and Tetracycline Resistance Gene Pollution in Soil: A Review[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2010, 5(5):618-627.
- [13] Stoll C, Sidhu J P, Tiehm A, et al. Prevalence of clinically relevant an-

- tibiotic resistance genes in surface water samples collected from Germany and Australia[J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(17):9716-9726.
- [14] Pei R T, 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.
- [15] Hoa P T P, Nonaka L, Viet P H, et al. Detection of the *sul1*, *sul2*, and *sul3* genes in sulfonamide-resistant bacteria from wastewater and shrimp ponds of North Vietnam[J]. *Science of the Total Environment*, 2008, 405(1-3):377-384.
- [16] 王 青, 林惠荣, 张舒婷, 等. 九龙江下游水源水中新发病原微生物和抗生素抗性基因的定量 PCR 检测[J]. 环境科学, 2012, 33(8):2685-2690.
- WANG Qing, LIN Hui-rong, ZHANG Shu-ting, et al. Real-time PCR detection and quantification of emerging waterborne pathogens(EWPs) and antibiotic resistance genes(ARs) in the downstream area of Jiu-long River[J]. *Environmental Science*, 2012, 33(8):2685-2690.
- [17] Hu J Y, Shi J C, Chang H, et al. Phenotyping and genotyping of antihi-otic-resistant *Escherichia coli* isolated from a natural river basin[J]. *Environmental Science & Technology*, 2008, 42(9):3415-20.
- [18] 沈群辉, 冀秀玲, 傅淑珺, 等. 黄浦江水域抗生素及抗性基因污染初步研究[J]. 生态环境学报, 2012, 21(10):1717-1723.
- SHEN Qun-hui, JI Xiu-ling, FU Shu-jun, et al. Preliminary studies on the pollution levels of antibiotic and antibiotic resistance genes in Huangpu River, China[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2012, 21(10):1717-1723.
- [19] 邹世春, 朱春敬, 贺竹梅, 等. 北江河水中抗生素抗性基因污染初步研究[J]. 生态毒理学报, 2009, 4(5):655-660.
- ZOU Shi-chun, ZHU Chun-jing, HE Zhu-mei, et al. Preliminary studies on the pollution levels of antibiotic resistance genes in the water of Beijiang River, South China[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2009, 4(5):655-660.
- [20] Tao R, Ying G G, Su H C, et al. Detection of antibiotic resistance and tetracycline resistance genes in *Enterobacteriaceae* isolated from the Pearl rivers in South China[J]. *Environmental Pollution*, 2010, 158(6):2101-2109.
- [21] Su H C, Ying G G, Tao R, et al. Class 1 and 2 integrons, *sul* resistance genes and antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolated from Dongjiang River, South China[J]. *Environmental Pollution*, 2012, 69:42-49.
- [22] Luo Y, Mao D, Rysz M, et al. Trends in antibiotic resistance genes occurrence in the Haihe River, China[J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 19:7220-7225.
- [23] Stokes H W, Hall R M. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: Integrons[J]. *Molecular Microbiology*, 1989, 3(12):1669-1683.
- [24] Koenig J E, Sharp C, Dlutek M, et al. Integron gene cassettes and degradation of compounds associated with industrial waste: The case of the sydney tar ponds[J]. *Plos One*, 2009, 4(4):e5276.
- [25] Laroche E, Pawlak B, Berthe T, et al. Occurrence of antibiotic resistance and class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli* isolated from a densely populated estuary (Seine, France)[J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2009, 68(1):118-130.
- [26] Hardwick S A, Stokes H W, Findlay S, et al. Quantification of class 1 integron abundance in natural environments using real-time quantitative PCR[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2008, 278(2):207-212.
- [27] Ma L, Zhang X X, Cheng S, et al. Occurrence, abundance and elimination of class 1 integrons in one municipal sewage treatment plant[J]. *Ecotoxicology*, 2011, 20(5):968-973.
- [28] Chen B, Zheng W, Yu Y, et al. Class 1 integrons, selected virulence genes, and antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates from the Minjiang River, Fujian Province, China[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(1):148-155.
- [29] 张 恒, 曾凡棠, 房怀阳, 等. 连续降雨对淡水河流域非点源污染的影响[J]. 环境科学学报, 2011, 31(5):927-934.
- Zhang H, Zeng F T, Fang H Y, et al. Impact of consecutive rainfall on non-point source pollution in the Danshui River catchment[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2011, 31(5):927-934.
- [30] Su H C, Ying G G, Tao R, et al. Occurrence of antibiotic resistance and characterization of resistance genes and integrons in *Enterobacteriaceae* isolated from integrated fish farms in South China[J]. *Journal of Environmental Monitoring*, 2011, 13(11):3229-3236.
- [31] Koeleman J G, Stoof J, Van Der Bijl M W, et al. Identification of epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* by integrase gene PCR[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39(1):8-13.
- [32] McKinney C W, Loftin K A, Meyer M T, et al. *tet* and *sul* antibiotic resistance genes in livestock lagoons of various operation type, configuration, and antibiotic occurrence[J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44(16):6102-6109.
- [33] Hardwick S A, Stokes H W, Findlay S, et al. Quantification of class 1 integron abundance in natural environments using real-time quantitative PCR[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, 278(2):207-212.
- [34] Barraud O, Baclet MC, Denis F, et al. Quantitative multiplex real-time PCR for detecting class 1, 2 and 3 integrons[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2010, 65(8):1642-1645.
- [35] Mazel D. Integrons: Agents of bacterial evolution[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, 4(8):608-620.
- [36] Toleman M A, Bennett P M, Bennett D M, et al. Global emergence of trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* mediated by acquisition of *sul* genes[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2007, 13(4):559-565.
- [37] 吴奎海, 孙静静, 陈 清, 等. 嗜麦芽窄食单胞菌整合子 I 和 ISCR1 研究及 ERIC-PCR 基因分型[J]. 热带医学杂志, 2011, 11(4):382-384.
- WU Kui-hai, SUN Jing-jing, CHEN Qing, et al. Study on class I integron and ISCR1 and molecular epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates [J]. *Journal of Tropical Medicine*, 2011, 11(4):382-384.
- [38] 姚印刚, 门 昆, 武大伟, 等. 细菌多重耐药性的组合遗传进化[J]. 医学综述, 2010, 16(9):1314-1315.
- YAO Yin-gang, MEN Kun, WU Da-wei, et al. Combinatorial genetic evolution of multiresistance in bacteria[J]. *Medical Recapitulate*, 2010, 16(9):1314-1315.