

石家庄汪洋沟地区抗生素、抗性细菌和抗性基因污染特征

徐 艳^{1,2}, 张 远², 郭昌胜², 王红梅², 王丁明², 王 凯^{1,2}, 李晓晨¹, 徐 建^{2*}

(1. 山东农业大学水利土木工程学院, 山东 泰安 271000; 2. 中国环境科学研究院, 环境基准与风险评估国家重点实验室, 北京 100012)

摘 要:以石家庄汪洋沟地区为研究对象,采用高效液相色谱-质谱法(HPLC-MS)、平板计数、实时荧光定量(qPCR)法分别对地表水、地下水及沉积物样品中的抗生素、抗性细菌和抗性基因进行定量分析。结果表明,汪洋沟地区四环素类抗生素总体含量高于磺胺类抗生素,水体中 $\rho(\Sigma \text{四环素})$ 为 $5.81 \times 10^1 \sim 3.87 \times 10^5 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, $\rho(\Sigma \text{磺胺})$ 为 $1.02 \times 10^1 \sim 5.37 \times 10^3 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$;沉积物中 $w(\Sigma \text{四环素})$ 为 $4.28 \times 10^1 \sim 1.63 \times 10^5 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, $w(\Sigma \text{磺胺})$ 为 $1.18 \times 10^1 \sim 1.68 \times 10^4 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$;水体中四环素的抗性细菌数量为 $4.00 \times 10^1 \sim 2.13 \times 10^4 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$,磺胺抗性细菌数量为 $6.67 \times 10^1 \sim 7.34 \times 10^5 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$;水体中抗性细菌含量比沉积物中低3~4个数量级。样品中检出的5种四环素类抗性基因(*tetA*、*tetB*、*tetE*、*tetW*和*tetZ*)、2种磺胺类抗性基因(*sul1*、*sul2*)及2种整合子基因(*int1*、*int2*)的相对表达量较高,其中*tetA*及*sul1*为汪洋沟地区的优势抗性基因,相对表达量均高于 1.58×10^{-2} 。主成分分析结果表明 ARGs 的含量分布受不同污染源和复杂的水质特征的影响。从*tet(B)*基因的系统发育分析结果可以看出,水质的变化会导致抗性菌种存在差异。与国内外河流相比,汪洋沟抗生素含量处于较高污染水平,抗性基因污染也较为严重。

关键词:汪洋沟;抗生素;抗性细菌;抗性基因;荧光定量 PCR

中图分类号:X825 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2014)06-1174-09 doi:10.11654/jaes.2014.06.018

Pollution Characteristics of Antibiotics and Antibiotic-Resistant Bacteria and Genes in Wangyanggou River, Shijiazhuang, China

XU Yan^{1,2}, ZHANG Yuan², GUO Chang-sheng², WANG Hong-mei², WANG Ding-ming², WANG Kai^{1,2}, LI Xiao-chen¹, XU Jian^{2*}

(1. Water Conservancy and Civil Engineering College, Shandong Agricultural University, Taian 271000, China; 2. State Key Laboratory of Environmental Criteria and Risk Assessment, Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, China)

Abstract: Extensive uses of antibiotics have promoted development of antibiotic-resistant bacteria and genes in the environment. In this study, high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS), plate counting, and real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) were respectively applied to analyze the level of antibiotics, antibiotic-resistant bacteria and genes in surface water, groundwater and sediment samples from Wangyanggou River. The total concentration of tetracyclines was higher than that of sulfonamides. The concentrations of three tetracyclines (tetracycline, oxytetracycline and chlortetracycline) and six sulfonamides (sulfadiazine, sulfamerazine, sulfadimidine, sulfachinoxaline, sulfamethoxazole and trimethoprim) ranged from 5.81×10^1 to $3.87 \times 10^5 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ and 1.02×10^1 to $5.37 \times 10^3 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ in water, and from 4.28×10^1 to $1.63 \times 10^5 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ and 1.18×10^1 to $1.68 \times 10^4 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ in sediments, respectively. The number of tetracycline and sulfonamide resistant bacteria in water was 4.00×10^1 to $2.13 \times 10^4 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ and 6.67×10^1 to $7.34 \times 10^5 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively, 3 to 4 orders of magnitude lower than that in sediments. The abundance of five tetracycline resistant genes (*tetA*, *tetB*, *tetE*, *tetW* and *tetZ*), two sulfonamide (*sul1* and *sul2*) resistant genes and two integron genes (*int1*, *int2*) detected was relatively high in all samples. The genes, *tetA* and *sul1*, were dominant resistant genes with relative abundance greater than 1.58×10^{-2} in Wangyanggou River. Principal component analysis indicated that the abundance of antibiotic-resistant genes might be affected by different pollution sources and water quality characteristics. The phylogenetic analysis of *tet(B)* showed that water quality change resulted in diverse resistant strains. The current results indicate that pollution of antibiotics, antibiotic-resistant genes in Wangyanggou River is more severe than in other rivers.

Keywords: Wangyanggou River; antibiotics; antibiotic-resistant bacteria; antibiotic-resistant genes; real time quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

收稿日期:2014-02-07

基金项目:环境保护公益性行业科研专项(201209053, 201309031);国家自然科学基金项目(51178438)

作者简介:徐 艳(1988—),女,山东潍坊人。E-mail: xuyan_wa@163.com

* 通信作者:徐 建 E-mail: xujian@craes.org.cn

抗生素的大量使用诱导环境微生物产生抗性基因^[1-3],抗性基因的存在是细菌产生抗性的根源。早在20世纪70年代,Cohen等^[1,4]在未受污染和受污染的大西洋水样中发现了抗性细菌之后,江河海口等多种水环境中相继检出了抗性细菌^[5-6]。2006年Pruden等^[7]将抗性基因作为一种新型污染物提出,环境中抗性基因的研究报道逐渐增多。近年来,我国学者也逐渐关注环境中抗生素和抗性基因的污染问题。Luo等^[8-9]研究了海河流域磺胺类抗生素与抗性基因的分布情况,发现磺胺类抗生素和磺胺类抗性基因的表达有一定的相关性。Wu等^[10]对养殖场附近的四环素类抗性基因的丰度及多样性进行分析,发现养殖场附近的土壤是抗性基因污染的主要环境介质。Zhang等^[11-12]研究了江苏省不同水体以及污水和饮用水处理设施中 $int(1)$ 、 $tet(A)$ 和 $tet(C)$ 基因的分布趋势,发现抗性基因分布在各个环境介质中,并通过基因的横向转移机制在环境微生物间广泛传播。当前我国还未建立抗生素抗性基因的环境生态风险性评估体系,同时缺乏对细菌抗药性的来源及分子机理和相关抗性基因的相互作用的研究。

汪洋沟是海河水系子牙河流域的一条支流,全长85 km。河水主要来源于石家庄市高新技术开发区和经济技术开发区各工业企业达到纳管标准后的综合废水,日排放量10万t左右。该区域分布多家大型制药企业,如华北制药、石药集团等,其产品包含多种抗生素、抗生素中间体、制剂及输液制剂等。本研究选择石家庄汪洋沟地区作为研究对象,采用高效液相色谱-质谱法、平板计数和实时荧光定量法对地表水、沉积物及地下水中9种常见的抗生素、两类抗性细菌及9种典型的抗性基因进行定量检测,分析汪洋沟地区不同环境介质中抗生素、抗性细菌及抗性基因的污染特征。本研究结果可为评价汪洋沟地区抗生素污染造成的环境风险提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 标样与试剂

四环素(Tetracycline)、土霉素(Oxytetracycline)和金霉素(Chlortetracycline)购自中国药品生物制品检定所。磺胺嘧啶(Sulfadiazine)、磺胺甲基嘧啶(Sulfamerazine)、磺胺二甲嘧啶(Sulfadimidine)、磺胺喹恶啉(Sulfachinoxaline)、磺胺甲基异恶唑(Sulfamethoxazole)购自德国Dr.Ehrenstorfer公司。甲氧苄氨(Trimethoprim)购于Sigma公司。内标物Sulfamethoxazole-D4

(SMX-D4),Trimethoprim-D3(TMP-D3)购自加拿大Toronto研究所。

1.2 样品采集

2012年10月,自汪洋沟上游至下游共设11个采样点,编号为S1~S11,采集地表水及沉积物样品。且受采样地区条件限制,从S2、S3、S4、S9、S10及S11点位附近的水井(20~30 m)中采集6个地下水样(图1),编号为DS2、DS3、DS4、DS9、DS10及DS11。采集距河面0.3 m深处的地表水样2 L,保存在棕色试剂瓶中。取沉积物1 kg。样品保存于4℃环境中运输,并在24 h内处理完毕。

1.3 抗生素分析

水体和沉积物中抗生素的提取净化及仪器分析详见文献[13-14]。

1.4 抗性细菌分析

将样品分别稀释 10^1 、 10^2 、 10^3 倍,取100 μ L稀释后的样品涂布到麦康凯琼脂培养板上。平板分为三种,一种为无抗生素的平板,其余两种分别加入两种不同的抗生素,即16.0 μ g $\cdot$ mL⁻¹的盐酸四环素与50.4 μ g $\cdot$ mL⁻¹的磺胺嘧啶^[15-16]。同时,取100 μ L对抗生素无抗性的大肠杆菌(*Escherichia coli* DH5 α)涂布在抗生素抗性平板上,作为对照。将平板在35℃条件下倒置培养24~48 h,每样品设置3个平行,分析样品中细菌对两种抗生素的抗性情况。

1.5 抗性基因分析

1.5.1 DNA提取

取0.3 L水样过0.45 μ m滤膜,将滤膜剪碎放到含有裂解液的离心管中,用E.Z.N.A.Plasmid Mini kit(OMEGA)试剂盒提取水样中的DNA,依照试剂盒内说明方法操作。同样取0.5 g沉积物用POWERDNA SPIN kit for soil(MoBioLaboratories, Inc.)试剂盒提取DNA。用微量核酸蛋白质分析仪(Nanodrop)检测DNA含量及纯度。

1.5.2 定性PCR分析

PCR反应体系体积为50 μ L,包括:1.25 U^{Ex} Taq DNA聚合酶(TaKaRa Biotechnology);5 μ L缓冲液10 $\times$ ExTaq buffer;4 μ L dNTPs(1 mmol $\cdot$ L⁻¹ each);0.2 μ mol $\cdot$ L⁻¹引物;5 ng DNA模板。

PCR反应程序:94℃ 4 min;94℃ 45 s;退火45 s;72℃ 1 min;循环30次;72℃ 4 min。PCR产物经纯化后,进行琼脂糖凝胶电泳检测确定目的基因的存在,其中目的基因的片段大小为100~600 bp,选择浓度为1%的琼脂糖凝胶,在80~120 V电压下电泳20 min。

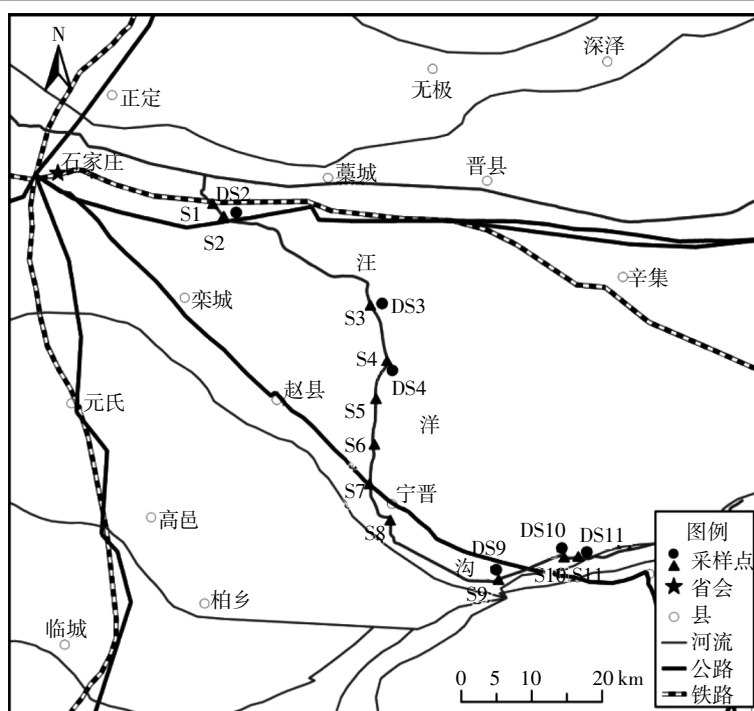


图1 汪洋沟采样点分布

Figure 1 The location of sampling sites in Wangyanggou River

1.5.3 实时荧光定量 PCR

实时荧光定量采用 SYBR Green Premix TaqII 反应体系,利用 iQ5(Bio-rad, USA)测定分析(大连宝生物有限公司)。反应体系的体积为 20 μL ,包括:10 μL 荧光染料 SYBR PremixExTaq(TaKaRaBiotechnology); 0.4 μL 引物($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$);模板浓度 20 ng 左右; ddH₂O 7.2 μL 。反应程序^[10]为 94 $^{\circ}\text{C}$ 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s; 退火 45 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min; 循环 35 次; 72 $^{\circ}\text{C}$ 6 min。

采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法来计算目的基因与管家基因表达的比值。其中 C_t 值(Threshold Cycle)表示反应体系的荧光信号达到设定的阈值所经历的循环数。

1.6 数据分析

所有数据用 Excel 和 SPSS 16.0 进行统计分析,组间差异性分析采用 one-way ANOVA,用 t 检验进行显著性分析。系统分析采用 DNASTar 与 MEGA 5.1。

2 结果与讨论

2.1 抗生素污染状况

四环素和磺胺类抗生素含量分布情况如图 2 所示。9 种抗生素在绝大部分样品中均有不同程度的检出,其中四环素类抗生素浓度总体高于磺胺类抗生素。水样中 ρ (四环素)为 $5.81 \times 10^1 \sim 3.87 \times 10^5 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$,其中 S8、S9、S10、S11 采样点较高,与冀秀玲等^[18]研究的

养殖场废水中 ρ (四环素)均值为 $1.74 \times 10^5 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, Campagnob 等^[19]检测的美国某养猪场废水中 ρ (四环素)均值 $5.33 \times 10^5 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 相当;与自然水体相比,远高于黄浦江水域中 ρ (四环素)均值 $9.1 \times 10^2 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[20],以及美国 30 个州 139 条河流中抗生素的残留水平^[21]。这几个采样点处于宁晋县附近,医院、制药厂和饲料厂分布密集,含量分布受到周边环境的影响较大。水样中 ρ (Σ 磺胺)分布为 $1.02 \times 10^1 \sim 5.37 \times 10^3 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$,此含量高于北江河^[15]、邕江南宁市区段^[22]磺胺类抗生素,与黄浦江水域中 ρ (磺胺)分布($9.7 \times 10^2 \sim 1.47 \times 10^3 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$)相当。其中 S10 点磺胺浓度最高, ρ 均值达 $45.25 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$,与该点位于某卫生院附近,受医疗废水的影响有关。

沉积物中 w (Σ 四环素、 Σ 磺胺)分别在 $4.28 \times 10^1 \sim 1.63 \times 10^5 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $1.18 \times 10^1 \sim 1.68 \times 10^4 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 范围内。两类抗生素浓度分布趋势大致相同,在 S8、S9、S10 点处含量都呈现高峰,它们的含量远高于苕溪流域沉积物中 w (四环素)均值 $1.04 \times 10^2 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 w (磺胺)均值 $0.3 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ^[23]及美国科罗拉多州北部 Cache La Poudre 河^[7]。S1~S5 点处地表水、沉积物及地下水中两类抗生素检出含量均较低,可能与区域用药特征、物质的迁移性及水环境中稳定性有关^[24-26]。水样与沉积物中不同抗生素的含量水平在一定程度上反映了汪洋沟地区抗生素的使用与排放特征。

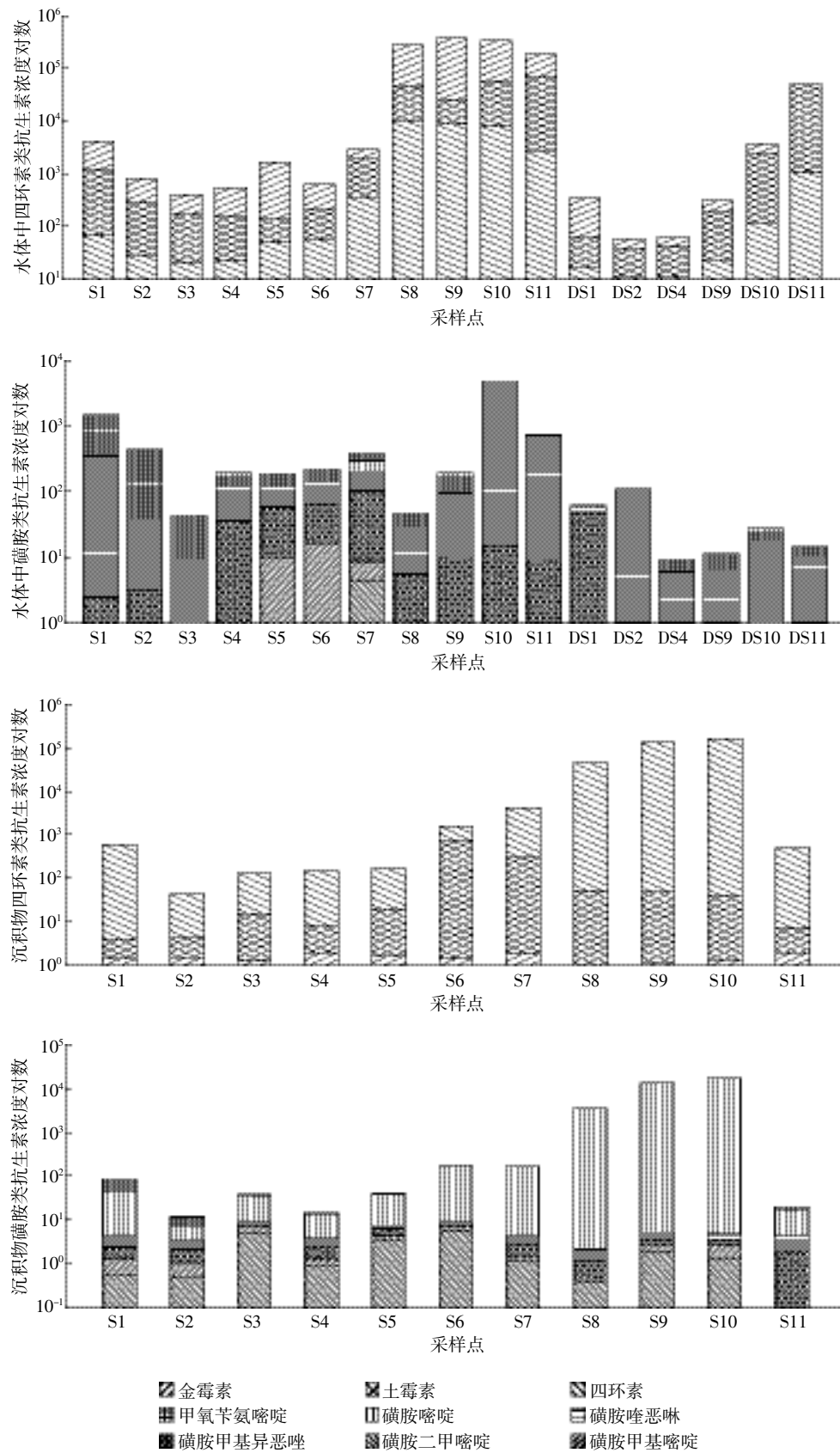


图 2 各采样点四环素和磺胺类抗生素浓度分布

Figure 2 Concentrations of tetracyclines and sulfonamides in water and sediment samples

2.2 活菌计数和抗性细菌比例

汪洋沟地区水体中总细菌数在 $8.40 \times 10^3 \sim 2.71 \times 10^5$ CFU·mL⁻¹ 范围内,而沉积物中活菌总数比水体中高出 2~3 lg 单位(表 1)。地下水中总细菌量为 $7.33 \times 10^1 \sim 1.62 \times 10^4$ CFU·mL⁻¹。从抗性细菌检测结果来看,磺胺类抗性细菌数比四环素的高 1 个数量级,并且磺胺类细菌抗性率较高,表明汪洋沟地区受磺胺类抗生素影响较大。由于河流中四环素及磺胺在水样及沉积物中的浓度普遍较高,抗生素水样及沉积物中的浓度与相应的抗性细菌的含量呈现一定负相关^[16-17],在一定范围内,抗生素浓度大对抗性细菌表达有相应的抑制作用。四环素及磺胺的化学特性不同,对细菌的影响程度也会不同,进而导致抗性细菌含量的差异。通过地表水与地下水的抗性细菌比较分析可知,地下水磺胺类抗性细菌比例普遍较高(均值 50.8%),而不同点位四环素抗性细菌比例差别较大。本研究结果与越南北部水产环境中磺胺和四环素的抗性细菌比例相似^[27],而与澳大利亚的水产养殖场中这两类抗性细菌结果相反^[28-29]。日本的某些河流中 *E.coli* 对四环素及磺胺类抗生素的抗性率最高分别达到 69.6% 和 55.6%^[30-31],说明复杂的水质环境导致抗生素对抗性细菌的效应也不同。通过抗性细菌的含量分布情况表明细菌抗性与区域周边生活污水、工业废水的排放,

以及人类活动等因素密切相关。

2.3 抗性基因污染状况

定量 PCR 的结果表达了抗性基因的含量水平和相对表达量,其中相对表达量(即相对丰度)是根据样品中目的基因的绝对拷贝数相对于管家基因 16S rRNA 绝对拷贝数得出的,可表达微生物群落中所含抗性基因的量,定量说明抗生素对抗性基因的诱导率^[18],因此相对定量更能反映样品中抗性基因的分布情况。汪洋沟地区 5 种四环素类抗性基因(*tetA*、*tetB*、*tetE*、*tetW* 和 *tetZ*),2 种磺胺类抗性基因(*sul1* 和 *sul2*)和 2 种整合子基因(*int1* 和 *int2*)含量分布情况见图 3。

5 种四环素类抗性基因中,*tetA* 与管家基因 16S rRNA 相对表达量最高,且在整个区域的地表水、地下水和沉积物样品中含量也较高($4.68 \times 10^{-3} \sim 9.8 \times 10^{-1}$)。*tetB* 含量分布在 S6~S11 点较低(均值为 3.76×10^{-10}),与该地区较高的四环素浓度不存在一致性。本研究其他的 *tet* 基因含量均较低且未出现显著的分峰峰值,故在汪洋沟地区不作为优势基因。

磺胺类抗性基因中 *sul1* 为优势基因,表达量均值在 4.79×10^{-6} 。在采样点分布中,S6~S11 及 DS4 点表达量比其他各点高出 7 个数量级,表达量达到 $3.09 \times 10^{-4} \sim 1.26 \times 10^{-2}$ 。这与海河流域^[8]检测到的 *sul1* 和 *sul2*

表 1 抗性细菌数目及所占比例

Table 1 Number and proportion of antibiotic-resistant bacteria

采样点	总活菌数/CFU·mL ⁻¹		四环素抗性细菌/CFU·mL ⁻¹ (%)		磺胺抗性细菌/CFU·mL ⁻¹ (%)	
	水样	沉积物	水样	沉积物	水样	沉积物
S1	1.23×10^4	8.40×10^7	3.33×10^3 (27.03)	1.71×10^7 (20.32)	7.00×10^3 (56.76)	2.52×10^7 (30.00)
S2	8.40×10^3	2.47×10^7	4.67×10^3 (55.56)	2.13×10^7 (86.49)	6.60×10^3 (78.57)	1.58×10^7 (64.05)
S3	6.67×10^3	8.00×10^7	6.67×10^1 (1.00)	8.67×10^5 (1.08)	1.80×10^3 (27.00)	6.23×10^7 (77.92)
S4	6.81×10^4	1.67×10^7	1.80×10^3 (0.10)	2.80×10^6 (16.8)	2.12×10^4 (31.12)	6.93×10^6 (41.60)
S5	2.71×10^5	1.07×10^7	8.20×10^3 (0.83)	5.33×10^5 (5.00)	1.34×10^5 (61.66)	1.02×10^7 (95.67)
S6	1.02×10^4	3.87×10^7	1.33×10^3 (8.03)	5.40×10^6 (13.97)	2.20×10^3 (21.57)	4.07×10^6 (10.52)
S7	6.89×10^4	2.53×10^8	1.07×10^3 (1.93)	4.76×10^7 (18.79)	4.67×10^4 (67.70)	1.13×10^8 (44.61)
S8	1.11×10^5	3.20×10^7	6.67×10^3 (9.64)	5.93×10^6 (18.54)	8.32×10^4 (75.18)	3.15×10^7 (98.54)
S9	1.80×10^5	1.29×10^8	2.13×10^4 (3.70)	6.60×10^7 (51.03)	7.90×10^4 (43.91)	5.33×10^7 (41.24)
S10	4.50×10^4	5.22×10^8	1.33×10^4 (47.40)	8.13×10^6 (1.56)	4.40×10^4 (97.78)	1.00×10^7 (1.92)
S11	6.67×10^4	8.00×10^6	2.07×10^4 (20.00)	2.67×10^6 (33.33)	2.00×10^4 (30.00)	7.33×10^6 (91.67)
DS2	7.33×10^1	—	6.00×10^1 (81.82)	—	5.33×10^1 (72.73)	—
DS3	1.62×10^4	—	2.00×10^2 (1.23)	—	2.67×10^3 (16.46)	—
DS4	2.67×10^2	—	6.67×10^1 (25.00)	—	1.00×10^2 (37.50)	—
DS9	7.47×10^2	—	8.87×10^2 (9.24)	—	6.00×10^3 (62.50)	—
DS10	1.00×10^2	—	4.00×10^1 (40.00)	—	6.67×10^1 (66.67)	—
DS11	6.67×10^2	—	2.00×10^2 (0.74)	—	1.33×10^4 (49.14)	—

注:—表示无样品;括号中数据为抗性细菌占总活菌数百分比。

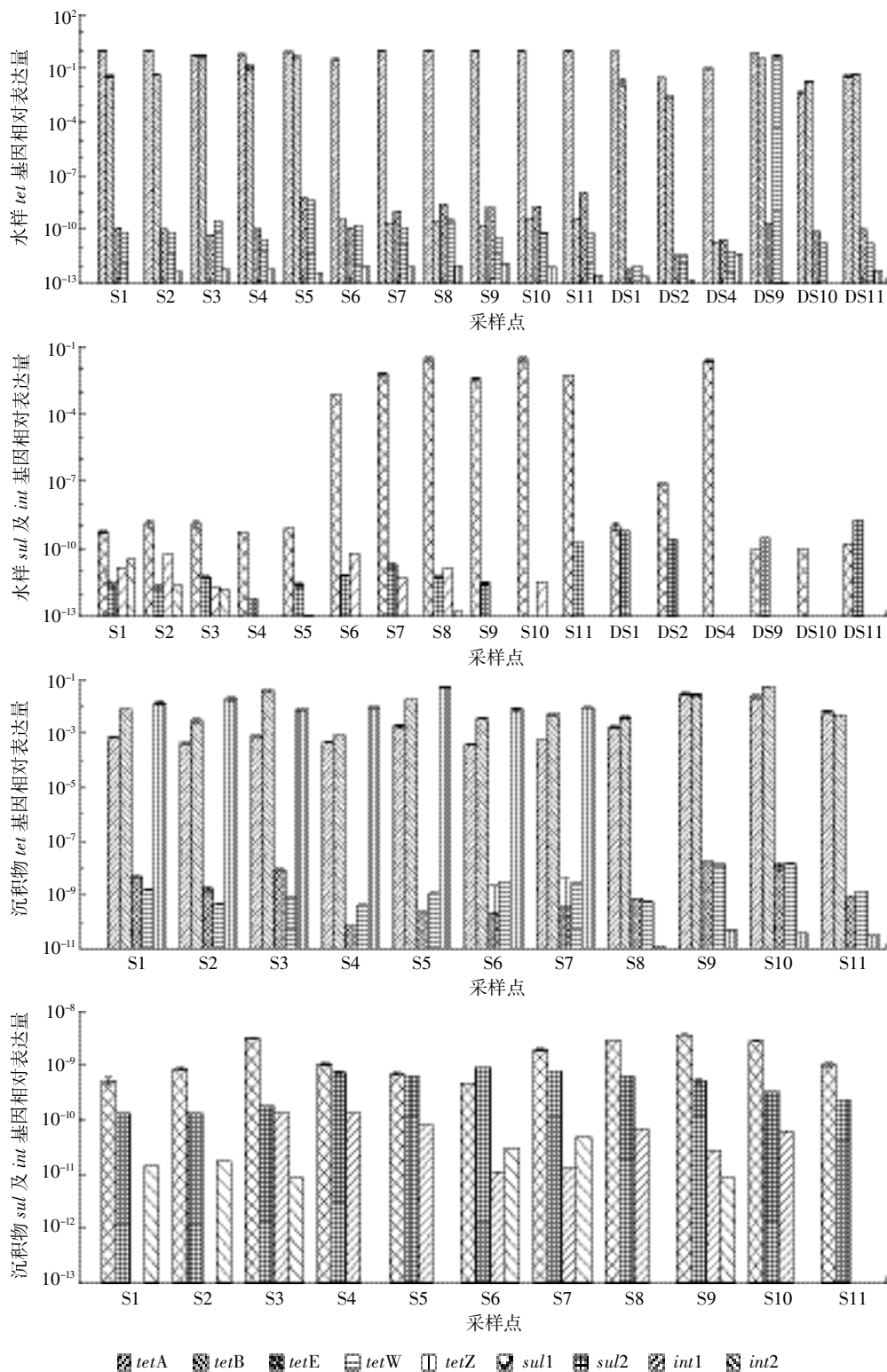


图3 汪洋沟地区抗生素抗性基因分布情况

Figure 3 Abundance of tetracyclines and sulfonamides resistant genes in Wangyanggou River

相对表达量($3.2 \times 10^{-4} \sim 2.7 \times 10^{-1}$),北江水域^[15]受 *sul* 基因的含量水平($3.02 \times 10^{-4} \sim 3.1 \times 10^{-1}$)相近,但高于美国科罗拉多州北部河流^[21]。在采集的所有样品中,两种

整合子基因 *int1* 和 *int2* 的检出较高,表明该地区的抗性基因在菌群之间有较大的传播风险。而 *int1* 和 *int2* 的相对表达比值较低,表明两者不是主要的抗性

基因传播向量^[32-33]。从表达结果来看,区域中四环素类抗性基因总体表达较高,与四环素的浓度分布关系不大,而磺胺类抗生素的浓度分布对相应抗性基因具有一定的影响。这与抗生素使用和残留的环境选择压力密切相关^[20]。

对抗性基因的结果进行主成分分析如图4。水样及沉积物主成分PC1和PC2的累计贡献率分别达到92.38%和94.89%。用PC1,PC2与所有样品的分值作图,通过荷载图分析得到水样可被聚为4类,沉积物被聚为3类。对于水样,A类(包括S1、S2、S3、S4、S6、S7、S8、S9、S10、S11、DS2、DS4)中样品PC1的得分为正的较大值,说明A类的12个样品抗性基因表达量受外界的影响因素比较相似。同样B类(S3,DS11)和C类(S5,DS9)跟PC2有较正的载荷,显示受到的外界污染源相近。人类的活动及水环境中不同的污染源都会影响抗性基因的分布情况,与Chen等^[34]研究的珠江口附近四环素抗性基因污染状况相似。沉积物样品中,A类(包括S1、S2、S3、S4、S5、S6、S7)与PC1有较高的正得分,此类为河流进入宁晋县之前的上游部分;B类(S8、S9、S10、S11)与PC2存在正得分,此类位

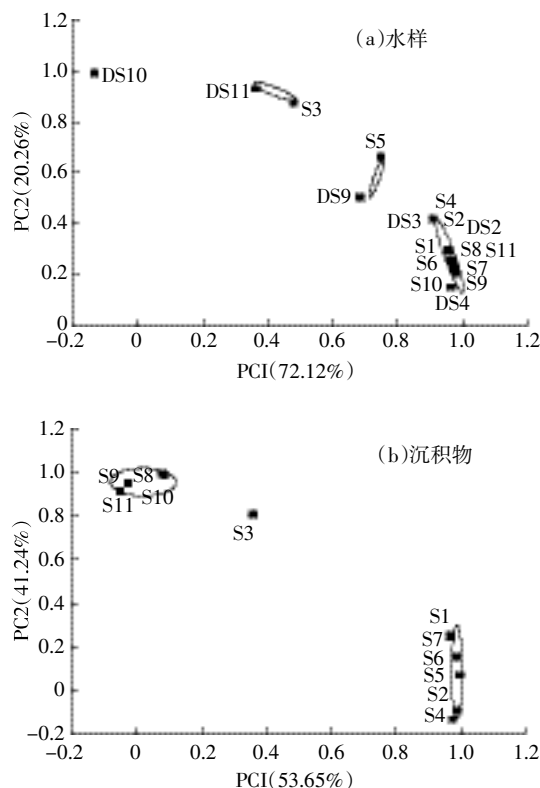


图4 ARGs的相对表达量的主成分分析

Figure 4 Principal component analysis of relative abundance of antibiotic-resistant genes in Wangyanggou River

于河流下游。这两类区别在于人类活动、河流物化及生物指标不同的影响。SUH等^[35]对*sul*基因和*int*基因在东江河流域主成分分析发现,人类活动和河流分布都是影响基因分布的因素。

2.4 *tet*(B)系统发育分析

为分析整个汪洋沟地区抗性菌种遗传进化中可能受到的影响,对抗性细菌的种属及亲缘关系进行系统发育研究,选择3个代表性的采样点(S5、S10、DS10)为研究对象。选取抗性基因*tet*(B)的阳性克隆子进行测序,其结果用BLAST与Genbank数据库中已有的序列进行比对,选择同源性在99%~100%的菌种及克隆子。*tet*(B)的遗传进化发育树如图5,结果显示遗传过程中基因发生不同类型的变异,S5点处抗性菌种与大部分菌种(例如鲍曼不动杆菌、肠道沙门氏菌等)遗传特征比较相近,S5与S10点的遗传距离比较相近,说明S10处于遗传过渡点,从地下水到地表水的变化过程中,抗性菌种也发生较大的改变。这可能由于地表水与地下水水质的差异,导致抗性菌种遗传性质发生变化,然而Fuentefria等^[30,36]在通过系统发育树分析发现,医院污水与被其污染后的地表水中的绿脓杆菌在遗传学上并无密切关系。因此,抗性细菌遗传进化过程中具体的环境影响因素有待于进一步研究。同时系统发育分析为抗性基因的功能预测提供了帮助。

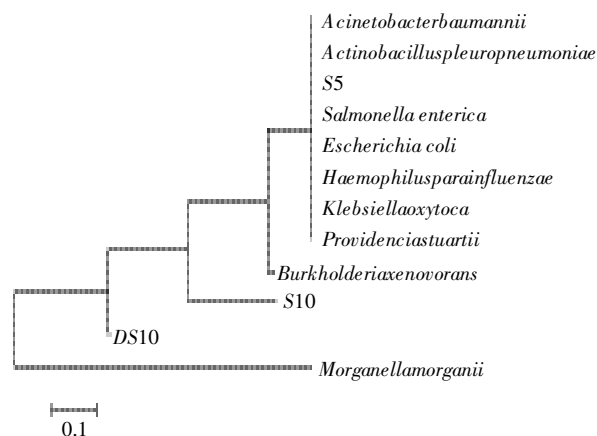


图5 *tet*(B)系统发育树

Figure 5 Phylogenetic tree for *tet*(B)

3 结论

(1)研究了石家庄汪洋沟地区水体和沉积物中四环素类和磺胺类抗生素的浓度水平和分布特征。水体及沉积物中检出的四环素含量总体水平高于磺胺类抗生素,水样中 $\rho(\Sigma \text{四环素})$ 和 $\rho(\Sigma \text{磺胺})$ 分别

为 $5.81 \times 10^1 \sim 3.87 \times 10^5 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1.02 \times 10^1 \sim 5.37 \times 10^3 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$,沉积物中 $w(\Sigma \text{四环素})$ 和 $w(\Sigma \text{磺胺})$ 分别在 $4.28 \times 10^1 \sim 1.63 \times 10^5 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $1.18 \times 10^1 \sim 1.68 \times 10^4 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 范围内。

(2)首次报道了该地区四环素和磺胺类抗性细菌的抗性水平,结果显示该地区水体及沉积物中磺胺抗性细菌均值和抗性比率均值均高于四环素类,表明该地区受磺胺类抗生素影响较大。

(3)汪洋沟地区中检测的抗性基因相对表达量偏高,抗性基因 $tetA$ 和 $sul1$ 表达量最高,尤其 $tetA$ 在整个区域地表水、地下水和沉积物样品中含量为 $4.68 \times 10^{-3} \sim 9.8 \times 10^{-1}$,为汪洋沟地区的优势抗性基因。主成分分析表明 ARGs 在水体和沉积物中种类及分布受多种环境因素的影响。

参考文献:

- [1] 徐冰洁, 罗 义, 周启星, 等. 抗生素抗性基因在环境中的来源、传播扩散及生态风险[J]. 环境化学, 2010, 29(2): 169–178.
XU Bing-jie, LUO Yi, ZHOU Qi-xing, et al. Source, dissemination, and ecological risks of antibiotic resistance genes (ARGs) in the environment[J]. *Environmental Chemistry*, 2010, 29(2): 169–178.
- [2] 周启星, 罗 义, 王美娥. 抗生素的环境残留、生态毒性及抗性基因污染[J]. 生态毒理学报, 2007, 2(3): 243–251.
ZHOU Qi-xing, LUO Yi, WANG Mei-e. Environmental residues and ecotoxicity of antibiotics and their resistance gene pollution: A review[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2007, 2(3): 243–251.
- [3] Kim S C, Carlaon K. Temporal and spatial trends in the occurrence of human and veterinary antibiotics in aqueous and river sediment matrices[J]. *Environmental Science and Technology*, 2007, 41(1): 50–57.
- [4] Cohen E, Colwell R. Coincident plasmids and antimicrobial resistance in marine bacteria isolated from polluted and unpolluted Atlantic Ocean samples[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1986, 51(6): 1285–1292.
- [5] Webster L F, Thompson B C, Fulton M H, et al. Identification of sources of *Escherichia coli* in south Carolina Estuaries using antibiotic resistance analysis[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2004, 298(2): 179–185.
- [6] Smith M S, Yang R K, Knapp C W, et al. Quantification of tetracycline resistance genes in feedlot lagoons by real-time PCR[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(12): 7372–7377.
- [7] Pruden A, Pei R T, Storteboom H, et al. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: Studies in Northern Colorado[J]. *Environmental Science and Technology*, 2006, 40(23): 7445–7450.
- [8] LUO Y, Mao D Q, Michal R, et al. Trends in antibiotic resistance genes occurrence in the Haihe River, China[J]. *Environmental Science and Technology*, 2010, 44(19): 7220–7225.
- [9] 徐维海, 张 干, 邹世春, 等. 模拟水流环境中抗生素的行为特征与归宿[J]. 环境科学研究, 2009, 22(10): 1213–1217.
XU Wei-hai, ZHANG Gan, ZOU Shi-chun, et al. Behavior and fate of antibiotics in a Lid-driven Elongated Annular Flume[J]. *Research of Environmental Science*, 2009, 22(10): 1213–1217.
- [10] 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 and Technology*, 2010, 44(18): 6933–6939.
- [11] Zhang X X, Wu B, Zhang Y, et al. Class I integronase gene and tetracycline resistance genes $tetA$ and $tetC$ in different water environments of Jiangsu Province, China[J]. *Ecotoxicology*, 2009, 18(6): 652–660.
- [12] Zhang X X, Zhang T. Occurrence, abundance, and diversity of tetracycline resistance genes in 15 sewage treatment plants across China and other global locations[J]. *Environmental Science and Technology*, 2011, 45(7): 2598–2604.
- [13] Bai Y W, Meng W, Xu J, et al. Occurrence, distribution and bioaccumulation of antibiotics in Liao River basin in China[J]. *Environmental Science: Processes & Impacts*, DOI: 10. 1039/C3EM00567D.
- [14] 那广水, 周传光, 王 震, 等. HPLC-MS/MS 法同时测定近岸底栖生物中 15 种磺胺类抗生素残留量[J]. 环境科学研究, 2009, 22(4): 434–437.
NA Guang-shui, ZHOU Chuan-guang, WANG Zhen, et al. Simultaneous determination of fifteen sulfonamide residues in Macrobenthos by High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry [J]. *Research of Environmental Science*, 2009, 22(4): 434–437.
- [15] 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.
ZHOU 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.
- [16] 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: 681–693.
- [17] Gao P, Mao D Q, Luo Y, et al. Occurrence of sulfonamide and tetracycline resistant bacteria and resistance genes in aquaculture environment[J]. *Water Research*, 2012, 46: 2355–2364.
- [18] 冀秀玲, 刘 芳, 沈群辉, 等. 养殖场废水中磺胺类和四环素类抗生素及其抗性基因的定量检测[J]. 生态毒理学报, 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.
- [19] Campagnolo E R, Johnson K R, Karpata A, et al. Antimicrobial residues in animal waste and water resources proximal to largescale swine and poultry feeding operations[J]. *Science of the Total Environment*, 2002, 299(1–3): 89–95.
- [20] 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.
- [21] Kolpin D W, Furlong E T, Meyer M T, et al. Pharmaceuticals hormones and other waste water contaminants in US streams 1999-2000 A national reconnaissance[J]. *Environmental Science and Technology*, 2002, 36:1202-1211.
- [22] 伍婷婷, 张瑞杰, 王英辉, 等. 邕江南宁市区段表层沉积物典型抗生素污染特征[J]. 中国环境科学, 2013, 32(3):336-344.
WU Ting-ting, ZHANG Rui-jie, WANG Ying-hui, et al. Investigation of the typical antibiotics in the sediments of the Yongjiang river, Nan-ning city, South China[J]. *China Environmental Science*, 2013, 32(3): 336-344.
- [23] 陈永山, 章海波, 骆永明, 等. 苕溪流域典型断面底泥 14 种抗生素污染特征[J]. 环境科学, 2011, 33(2):667-672.
CHEN Yong-shan, ZHANG Hai-bo, LUO Yong-ming, et al. Investigation of 14 selected antibiotics in sediments of the typical cross sections of Tiaoxi river[J]. *Environmental Science*, 2011, 33(2):667-672.
- [24] Managaki S, Murata A, Takada H, et al. Distribution of macrolides, sulfonamides and trimethoprim in tropical waters: Ubiquitous occurrence of veterinary antibiotics in the Mekong Delta[J]. *Environmental Science and Technology*, 2007, 41(23):8004-8010.
- [25] Wehrhan A, Kasteelr, Simunek J, et al. Transport of sulfadiazine in soil columns experiments and modeling approaches[J]. *Journal of Contaminant Hydrology*, 2007, 89(1-2):107-135.
- [26] Davis J G, Trumanc C, Kim S C, et al. Antibiotic transport via runoff and soil loss[J]. *Journal of Environmental Quality*, 2006, 35:2250-2260.
- [27] Hoa P T P, Managaki S, Nakada N, et al. Antibiotic contamination and occurrence of antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments of Northern Vietnam[J]. *Science of the Total Environment*, 2011, 409(15): 2894-2901.
- [28] Akinbowale O L, Peng H, Barton M D. Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from aquaculture sources in Australia [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 103(5):2016-2025.
- [29] Akinbowale O L, Peng H, Barton M D. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2006, 100(5):1103-1113.
- [30] 佟娟, 魏源送. 污水处理厂削减耐药菌与抗性基因的研究进展[J]. 环境科学学报, 2012, 32(11):2650-2659.
TONG Juan, WEI Yuan-song. State-of-the-art removal of antibiotic resistance bacteria (ARB) and antibiotic resistance gene (ARG) in wastewater treatment plants (WWTP)[J]. *Acta Science Circumstantiae*, 2012, 32(11): 2650-2659.
- [31] Seino A, Hasegawa Y, Masunaga S. Distribution of antibiotic resistant *E. Coli* in Kaname, Tsurumi, and Tama Rivers[J]. *Journal of Japan Society on Water Environment*, 2004, 27(11):693-698.
- [32] Agerso 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.
- [33] 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*, 2003, 45(3):239-252.
- [34] Chenb W, Liang X M, Huang X P, et al. Differentiating anthropogenic impacts on ARGs in the Pearl River estuary by using suitable gene indicators[J]. *Water Research*, 2013, 47:2811-2820.
- [35] Suh 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.
- [36] Fuentefria D B, Ferreira A E, Corcao G. Antibiotic resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospital wastewater and superficial water: Are they genetically related?[J]. *Journal of Environmental Management*, 2011, 92(1):250-255.