

禽畜养殖场土壤抗生素抗性基因污染的初步研究^{*}

邹世春¹, 李青¹, 贺竹梅²

(1. 中山大学海洋学院水产品安全教育部重点实验室, 广东 广州 510275;
2. 中山大学生命科学学院水产品安全教育部重点实验室, 广东 广州 510275)

摘要: 抗生素作为禽畜疾病预防及治疗药物、生长促进剂、饲料添加剂等被广泛应用于养殖业并进入环境, 造成了环境中抗性耐药菌和抗性基因 (Antibiotic Resistance Genes, ARGs) 的日益增加, 从而影响人体健康和生态环境。因此, ARGs 作为一种新型环境污染物质已经引起了人们的广泛关注。本工作以珠海某些养殖场及周边土壤中的微生物及其 ARGs 为主要研究对象, 采用聚合酶链反应 (PCR) 研究了养殖场土壤细菌 DNA 中 9 种四环素抗性基因存在和污染水平。结果表明, 所研究的 9 种四环素抗性基因中除 *tetD* 之外, 其他 8 种抗性基因 (*tetA*、*tetB*、*tetC*、*tetG*、*tetL*、*tetO*、*tetQ* 和 *tetX*) 均可检出, 其中 *tetG* 的样本检出率达到 94%; 另外, 对其中常见的 4 种 ARGs (*tetA*、*tetC*、*tetG* 和 *tetX*) 的荧光实时定量 PCR 定量结果显示, 在这 4 种基因中, 以 *tetC* 在样品中的丰度最高, *tetG* 次之。在 16 个土壤采样点中发现, *tetC* 和 *tetG* 的 copies/g DNA 达到 10^8 量级均占 50%, 其他基因的 copies/g DNA 最低也能达到 $10^2 \sim 10^5$ 之间, 与北京某一养猪场周边土壤中抗性基因含量相当, 有些甚至更为严重。

关键词: 四环素抗性基因; 养殖场土壤; 基因污染

中图分类号: X17 文献标志码: A 文章编号: 0529-6579 (2012) 06-0087-05

A Preliminary Study on the Tetracycline Resistance Genes in the Livestock Soil, South China

ZOU Shichun¹, LI Qing¹, HE Zhumei²

(1. MOE Key Laboratory of Aquatic Product Safety, School of Life Sciences, School of Marine Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

2. MOE Key Laboratory of Aquatic Product Safety, School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Use of antibiotics at subtherapeutic concentrations for agricultural applications has been believed to be an important factor in the proliferation of bacteria with antibiotic resistance genes (ARGs). In this work, total nine tetracycline ARGs (*tet*-ARGs) including *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetG*, *tetL*, *tetO*, *tetQ* and *tetX* were studied in sixteen soil samples from livestock using qualitative PCR SYBR Green I real-time PCR methods. The results showed that eight of *tet*-ARGs except *tetD* could be detected in most of samples and the detection percentages ranged from 6% (*tetB*) to 94% (*tetC*). The quantitative results for four *tet*- genes (*tetA*, *tetC*, *tetG* and *tetX*) showed that 50% samples had the highest *tetC* abundance (10^8) and the others were in range of 10^2 to 10^5 . As a result, the spread occurrences of high levels of *tet*-genes in livestock soil should not be overlooked.

Key words: *tet*-ARGs; livestock soil; gene contamination

* 收稿日期: 2012-06-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21177162)

作者简介: 邹世春 (1965 年生), 男, 教授; 通讯作者: 贺竹梅; E-mail: lsshez@ mail. sysu. edu. cn

在医疗和养殖等过程中大剂量持续排放的抗生素选择压力下^[1-2], 生物体不断地接触到低于致死浓度的抗生素^[3], 这将引起细菌特定的转录响应^[4-7], 固有抗性菌株和选择性抗性突变株中的抗性基因 (Antibiotic Resistance Genes, ARGs) 便被选择出来。当这些抗性基因整合到基因移动元件能够转移并能在抗生素选择压力下能富集的时候, 便被视为一种新型污染物而存在^[8], 这将极大地危害人类健康及生态系统的稳定。四环素作为一种广谱抗生素, 凭借其杀菌作用显著及较小副作用的特点, 被广泛应用于人类及养殖业并进入周边环境, 使得存在于环境微生物染色体上的四环素抗性基因 *tet* 被选择出来, 成为一种新型持久性的环境污染物。此外, 大部分 *tet* 基因都能与基因移动单元 (如能转移的质粒、转座子、整合子等) 相连, 使 *tet* 基因可在种间甚至属间进行转移, 造成携带有 *tet* 基因的细菌容易在人体、动物、环境中广泛存在, 并通过基因水平转移 (Horizontal Gene Transfer, HGT) 等方式, 侵染到其他共生菌甚至病原菌中。而共生菌将作为 *tet* 基因以及其他 ARGs 的大型储库, 造成对环境、人体健康的危害。对珠三角一些主要水体 (河流、养殖基塘、污水处理厂及海湾等) 中抗生素及北江河水中磺胺、四环素抗性基因污染的研究均表明, 环境抗生素及其抗性基因污染已十分严重^[9-11]。

本文以珠海某养殖场土壤及周边基塘沉积物中的微生物及其 ARGs 为主要研究对象, 使用聚合酶链反应 (PCR) 及荧光实时定量 PCR 等技术, 着重研究了多种四环素抗性基因的存在和污染水平, 以期为我国养殖环境中抗性基因的污染状况提供信息。

1 材料与方法

1.1 样品采集与处理

所研究的养猪场为珠海高新区那州村四大猪场之一, 年出栏数 3000 头多左右, 已使用 20 余年。养猪场周边有人工种植林木和两个养殖基塘, 粪便经化粪池简单处理后通过沟渠排出, 固体物用于林木施肥和鱼塘。但由于管理问题, 猪场对周边河流、土壤及空气造成一定污染, 经常受到周边居民投诉。本研究选择该养殖场土壤及周边基塘沉积物, 共设置了 16 个采样点。采集养殖场 0~5 cm 表层土壤样品各约 100~150 g, 用无菌密实袋装好, 并记录采样时间、天气、温度等。

1.2 土壤样品细菌耐药性分析

取 1 g 土壤溶于 10 mL 无菌水中, 移取 100 μ L 均匀涂布在四环素终浓度为 20 g/L 的抗性 LB 固体培养基上, 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h, 观察是否有菌落生长。同时, 将样品涂布在不含有四环素的 LB 固体培养基上做阴性对照, 初步分析样品中四环素抗性菌群的大致状况。

1.3 四环素类抗生素抗性基因 (*tet*) 分析

1.3.1 四环素类抗生素抗性基因的定性分析 采用聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 技术对环境中拷贝数相对较低的 ARGs 进行指数倍扩增放大。首先采用 OMEGA 微量土壤 DNA 提取试剂盒法抽提土壤中总 DNA, 并采用 NanoVue 超微量分光光度计测定其 A_{260}/A_{280} 及 A_{260}/A_{230} 比值。通常纯 DNA 的 A_{260}/A_{280} 值介于 1.7~1.9 之间。当样品中含有大量腐殖酸、蛋白、酚类等物质时, 会造成 A_{260}/A_{280} 值小于 1.6; 当有 RNA 污染时, A_{260}/A_{280} 值会大于 1.9。不纯净的 DNA 样品对后续的 PCR 反应中的 Taq 酶等造成抑制作用, 从而影响后续反应进行。

根据设计的引物^[12-13] (序列如表 1 所示), 对样品中的 9 种 *tet* 基因及 16S rDNA 进行 PCR 扩增, 相关反应体系和程序如下。

表 1 引物序列

| 四环素 抗性基因 | PCR 引物 | 片断 大小/bp | 基因 序列号 |
|-------------|---|-------------|-----------|
| <i>tet</i> | AGCT ACA TCC TGC TTG CCT TC | 210 | X61367 |
| | CAT AGA TCG CCG TGA AGA GG BTGG GTT ACG GGC AAG TTT TG | | |
| <i>tet</i> | GTA ATG GGC CAA TAA CAC CG CCTT GAG ACG CTT CAA CCC AG | 659 | J01830 |
| | ATG GTC GTC ATC TAC CTG CC DAAA CCA TTA CGG CAT TCT GC | | |
| <i>tet</i> | GAC CGG ATA CAC CAT CCA TC GCAG CTT TCG GAT TCT TAC GG | 844 | S52437 |
| | GAT TGG TGA GGC TCG TTA GC LTGG TTA GCG TGC TGT CAT TC | | |
| <i>tet</i> | GTA TCC CAC CAA TGT AGC CG OAAAC TTA GGC ATT CTG GCT CAC | 515 | Y07780 |
| | TCC CAC TGT TCC ATA TCG TCA XCAA TAA TTG GTG GTG GAC CC | | |
| <i>tet</i> | TTC TTA CCT TGG ACA TCC CG 27F: AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG | 468 | |
| | 1492R: TAC CTT GTT ACG ACTT | | |
| 16S rDNA | | | |

PCR 反应体系: 10 \times buffer, 2.5 μ L; 引物, 每反应需要引物 0.2 μ mol/L; Taq 酶, 2.5 U/反应; dNTPs, 每种脱氧核苷酸为 200 μ mol/L; DNA 模板, 1.5 μ L; ddH₂O, 19.3 μ L; 总体积为 25 μ L。

PCR 反应程序：95℃ 预变性 5 min；然后 95℃，30 s；55℃，30 s；72℃，1 min，共 40 个循环；接着 72℃，10 min；4℃ 保存。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后，割胶回收、纯化。将目的 DNA (*tetA*、*tetC*、*tetG* 和 *tetX*) 片段与 pGM-T 载体连接后，转化进入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中并提取白斑菌落的重组质粒。经过 PCR 验证后将质粒上含有目的 *tet* 基因进行测序。利用 NCBI 数据库中 BLAST 功能对测序结果进行分析，以进一步验证所获得 ARGs (*tetA*、*tetC*、*tetG* 和 *tetX*) 的核苷酸序列与基因库中目的基因序列匹配的一致性，并为后续 ARGs 的定量分析做准备。

1.3.2 四环素类抗生素抗性基因的定量分析 采用 SYBR Green I 荧光定量 PCR 法对样品中 *tetA*、*tetC*、*tetG* 和 *tetX* 等 4 种四环素抗性基因进行定量分析。*qPCR* 体系为 10 μ L：2 \times SYBR supermix，1.5 μ L；模板 DNA，0.5 μ L；引物，0.6 μ L；ddH₂O，8.8 μ L。反应程序为：95℃，预变性 5 min；然后 95℃，30 s；55℃，30 s；72℃，1 min，共 40 个循环；最后 72℃，10 min。将所提取的质粒原液稀释 10 倍成 10 个梯度（拷贝数从 $n \times 10^{10}$ 系列稀释到 $n \times 10^1$ ），制作标准曲线。根据标准曲线所计算出的目的基因浓度及样品 DNA 的浓度，从而得出该目的基因在样品 DNA 中的丰度。

2 结果与讨论

2.1 土壤样品耐药性分析

根据细菌在抗性 LB 固体培养基生长状况看来，16 个采样点土壤及沉积物样品在四环素抗性培养基上都有细菌菌落生长，表明该地区四环素抗性细菌的存在十分普遍。并且，环境中只有 5% 左右的细菌能在抗性培养基上培养，这意味着可能在环境中存在更多未能被培养的抗性细菌。因此，我们需要通过基因克隆、PCR 和 *qPCR* 等分子生物学手段在基因水平上对抗性细菌及其抗性基因有更深入的研究。

2.2 四环素抗性基因 (*tet*) 存在水平分析

养殖土壤环境中 *tet* 基因 PCR 产物扩增结果如图 1 所示，其样品检出率统计结果列于表 2 中。

根据图 1 中 9 种四环素抗性基因 (*tetA*、*tetB*、*tetC*、*tetD*、*tetG*、*tetL*、*tetO*、*tetQ* 和 *tetX*) 的定性 PCR 电泳结果可知，除 *tetD* 未被检出之外，其余 8 种均有检出。从表 2 可以看出，在检出的 8 种抗性基因中，除 *tetB* 检出率相对较低（6%）之外，以 *tetG* 的检出率为最高（94%），其次为 *tetC* 和 *tetO*

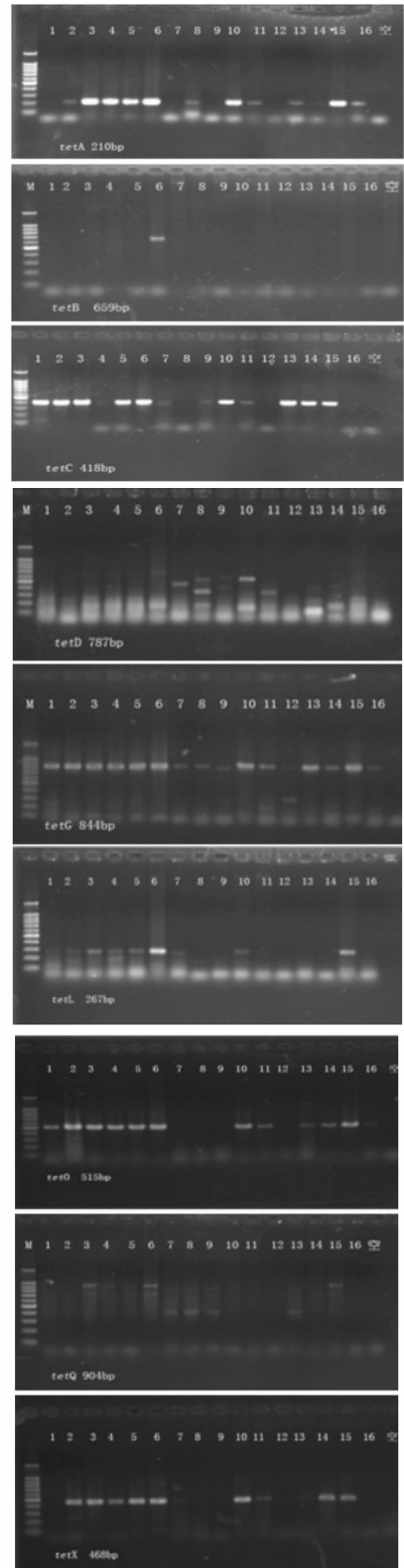


图 1 9 种四环素抗性基因 (*tetA*、*tetB*、*tetC*、*tetD*、*tetG*、*tetL*、*tetO*、*tetQ* 和 *tetX*) 的 PCR 扩增电泳图

Fig. 1 Electrophoretograms of PCR products for 9 tetracycline resistance genes *tetA*、*tetB*、*tetC*、*tetD*、*tetG*、*tetL*、*tetO*、*tetQ* and *tetX* in soil of sewage farms

(75%)，其他抗性基因的检出率也较高 (44% ~ 69%)。

表 2 抗生素抗性基因 PCR 结果统计

Table 2 Positive Percentages of ARGs in 16 samples

| 抗性基因 (ARGs) | 检出样品数/个 | 检出率/% |
|--------------|---------|-------|
| <i>tetA</i> | 11 | 69 |
| <i>tetB1</i> | 6 | |
| <i>tetC</i> | 12 | 75 |
| <i>tetD</i> | 0 | 0 |
| <i>tetG</i> | 15 | 94 |
| <i>tetL</i> | 8 | 50 |
| <i>tetO</i> | 12 | 75 |
| <i>tetQ</i> | 7 | 44 |
| <i>tetX</i> | 9 | 56 |

值得注意的是，在所检出的 8 种四环素抗性基因中，*tetA*、*tetB*、*tetC*、*tetD*、*tetG* 和 *tetL* 为用于编码外排泵蛋白的基因。当纳摩尔浓度的四环素进入细胞，与阻遏蛋白结合，使阻遏物不能与 DNA 操纵作基因结合，调节基因与结构基因开始转录，编码相应的外排蛋白，将细菌体内的药物泵出，达到对抗生素的抗性。这些外排泵基因常与携带不同抗性基因甚至不同来源的质粒相连，这无疑加剧了抗性基因在细菌群体中的转移并使细菌易于产生多重耐药。另外，*tetO* 和 *tetQ* 主要为编码核糖体保护蛋白，它们与核糖体结合后使核糖体构象发生改变，从而使四环素不能与核糖体发生结合，从而起到对四环素的抗性。*tetX* 是唯一编码四环素灭活酶的基因，在有氧条件及 NADPH 作用下，该基因编码的蛋白可以对四环素进行修饰，使四环素失效。

上述结果表明，生长在禽畜养殖场土壤中抗四环素的细菌具有多种不同的抗性基因及其抗性机制，其中以编码外排泵蛋白的基因占优势。这使得细菌可将进入体内的四环素重新泵至外环境，从而造成更大面积的四环素污染；另外，在四环素的低致死剂量的持续排放下，又会进一步加剧 *tet* 基因的富集。

2.3 四环素抗性基因(*tet*)实时荧光定量结果分析

为了对样品中常见的 *tetA*、*tetC*、*tetG* 和 *tetX* 等 4 种四环素抗性基因作进一步的研究，我们对其进行了实时荧光定量分析。本研究在前述 PCR 定性结果的基础上，将样品中所获得的 *tetA*、*tetC*、*tetG* 和 *tetX* 等 4 种四环素抗性基因的测序结果与 GeneBank 中的目的序列比对发现，其吻合率在 99% 以上，进一步确认了样品中存在 *tetA*、*tetC*、

tetG 和 *tetX* 等 4 种抗性基因。

以成功获得含有目的基因的质粒制作 qPCR 的标准曲线，并通过 LightCycler® 480 荧光定量 PCR 系统所携带的样品溶解曲线的设定程序来排除非特异性扩增的干扰。

表 3 *tet*-ARGs 拷贝数与样品 DNA

浓度的比值 (copies/g DNA)

Table 3 Ratios of ARGs to DNA (copies/g DNA)

| 采样点 | <i>tetA</i> | <i>tetC</i> | <i>tetG</i> | <i>tetX</i> |
|-----|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 1 | 2.54×10^3 | 8.32×10^8 | 1.64×10^8 | 2.39×10^3 |
| 2 | 5.71×10^5 | 7.81×10^8 | 1.54×10^8 | 4.30×10^3 |
| 3 | 4.01×10^5 | 7.91×10^8 | 1.56×10^8 | 1.27×10^4 |
| 4 | 2.60×10^5 | 5.78×10^7 | 1.14×10^7 | 9.80×10^3 |
| 5 | 2.32×10^5 | 7.30×10^8 | 1.44×10^8 | 5.33×10^3 |
| 6 | 5.75×10^5 | 8.89×10^8 | 1.75×10^8 | 6.78×10^3 |
| 7 | 5.64×10^2 | 4.02×10^5 | 7.92×10^4 | 7.71×10^2 |
| 8 | 1.75×10^4 | 6.53×10^5 | 1.29×10^5 | 8.54×10^2 |
| 9 | 7.75×10^2 | 3.65×10^5 | 7.20×10^4 | 2.08×10^3 |
| 10 | 4.75×10^5 | 6.53×10^8 | 1.29×10^8 | 2.96×10^3 |
| 11 | 7.57×10^2 | 3.65×10^5 | 7.18×10^4 | 6.49×10^2 |
| 12 | 1.57×10^2 | 1.32×10^5 | 2.60×10^4 | 1.00×10^3 |
| 13 | 1.27×10^5 | 6.72×10^8 | 1.32×10^8 | 2.17×10^3 |
| 14 | 6.41×10^4 | 7.30×10^7 | 1.44×10^7 | 8.21×10^3 |
| 15 | 3.31×10^5 | 6.53×10^8 | 1.29×10^8 | 1.95×10^3 |
| 16 | 5.25×10^2 | 2.26×10^6 | 4.45×10^5 | 1.58×10^3 |

首先，采用含有目的基因的质粒为样品，获得所对应目的基因 *tetA*、*tetC*、*tetG* 和 *tetX* 的溶解温度分别取 84 °C、84 °C、84 °C 和 78 °C。选择某一样品对所设定的 PCR 反应条件及溶解温度进行预实验，通过观察溶解曲线的单峰状态，以确保该反应条件不会出现基因的非特异性扩增。*tetA*、*tetC*、*tetG* 和 *tetX* 标准质粒的起始浓度分别为 336.5、26.5、587.0 和 111.0 ng/μL。将质粒通过 10 倍系列稀释后进行实时荧光定量 PCR 反应，可得到以 C_T 为纵坐标，以拷贝数及初始浓度相应关系所得基因浓度为横坐标的标准曲线。实验结果表明，所有标准曲线的 R^2 在 1 ~ 0.997 之间，满足定量分析要求。通过测定 ARGs 的拷贝数与不同样品所得 DNA 浓度的比值，可以代表 ARGs 在样品细菌种群中总基因的含量比，亦即 ARGs 在环境中细菌总基因中的丰度，其结果列于表 3 中。从表 3 可知，4 种 *tet*-ARGs 的丰度范围在 $6.49 \times 10^2 \sim 8.89 \times 10^8$ 之间，其中 *tetC* 在样品中总体丰度最高 ($1.32 \times 10^5 \sim 8.89 \times 10^8$)，其次分别为 *tetG* ($2.60 \times 10^4 \sim 1.75 \times 10^8$)，*tetA* ($1.57 \times 10^2 \sim 5.75 \times 10^5$) 和

tetX ($6.49 \times 10^2 \sim 1.27 \times 10^4$)。在 16 个采样点中, *tetC* 和 *tetG* copies/g DNA 达到 10^8 数量级以上的均达到 50%。表 3 中 7、8 和 9 号采样点离养殖场污染源比较远 (约 300 m), 但该 3 个采样点含量达到 10^5 数量级。除 *tetC* 之外, *tetA* 和 *tetA* 在样品中含量相对较低, 但所有采样点的 copies/gDNA 也处于 $10^2 \sim 10^5$ 之间。

3 结 论

以珠海某养殖场土壤中细菌四环素抗性基因为主要研究对象, 采用 DNA 提取、基因克隆、定性 PCR 和荧光定量 PCR 等分子生物学方法研究了 9 种四环素抗性基因的存在及其污染水平。结果发现, 在所采集的 16 个土壤样品中共检出 8 种四环素抗性基因, 样品检出率大多数在 40% ~ 94% 之间; 对其中常用的 4 种抗性基因的 PCR 定量分析结果表明, 所有采样点中 *tetC* 和 *tetG* 的 copies/g DNA 达到 10^8 数量级的占 50%, 其余采样点 *tetC* copies/g DNA 含量也在 $10^2 \sim 10^5$ 之间。与国内外其他同类研究^[14], 这种相对高的检出率和高抗性基因水平表明目标养殖场的抗性基因污染已十分严重, 有必要进行更加广泛和深入的研究。

参考文献:

- [1] MARTINEZ J L, BAQUERO F. Mutation frequencies and antibiotic resistance [J]. *Antimicrob Agents Chemothe*, 2000, 44: 1771 - 1777.
- [2] MARTINEZ J L, BAQUERO F, ANDERSSON D I. Predicting antibiotic resistance [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2007, 5: 958 - 965.
- [3] LINDBERG R H, BJORKLUND K, RENDAHL P, et al. Environmental risk assessment of antibiotics in the Swedish environment with emphasis on sewage treatment plants [J]. *Water Res*, 2007, 41: 613 - 619.
- [4] TSUI W H, YIM G, WANG H H, et al. Dual effects of MLS antibiotics: transcriptional modulation and interactions on the ribosome [J]. *Chem Biol*, 2004, 11: 1307 - 1316.
- [5] DAVIES J. Are antibiotics naturally antibiotics? [J] *Ind Microbiol Biotechnol*, 2006, 33: 496 - 499.
- [6] LINARES J F, GUSTAFSSON I, BAQUERO F, et al. Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 19484 - 19489.
- [7] YIM G, WANG H H, DAVIES J. Antibiotics as signaling molecules [J]. *PhilosTrans Royal Soc B Biol Sci*, 2007, 362: 1195 - 1200.
- [8] 罗义, 周启星. 抗生素抗性基因(ARGs): 一种新型环境污染物[J]. *环境科学学报*, 2008, 28 (8): 1499 - 1505.
- [9] 杨颖. 北江水环境中抗生素抗性基因污染分析[D]. 广州: 中山大学分析化学系. 2008.
- [10] 朱春敬. 环境中抗生素抗性基因污染的初步研究[D]. 广州: 中山大学分析化学系. 2008.
- [11] 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.
- [12] NG L K, MARTIN I, ALFA M, et al. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes [J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2001, 15: 209 - 215.
- [13] ZHANG T, ZHANG M, ZHANG X, et al. Tetracycline resistance genes and tetracycline resistant lactose-fermenting Enterobacteriaceae in activated sludge of sewage treatment plants [J]. *Environ Sci Technol*, 2009, 43: 3455 - 3460.
- [14] 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.