

嘉兴市抗生素抗性基因的污染现状调查

刘 锐

(嘉兴职业技术学院, 浙江 嘉兴 314036)

摘要:采用PCR技术对嘉兴市地表水和农田土壤中 *sul1*、*sul2*、*tetA*、*tetB* 和 *tetC* 等5种基因分布现状进行了调查。结果表明20个地表水水样中 *sul1*、*sul2*、*tetA*、*tetB* 和 *tetC* 基因的检出率分别为65.0%、95.0%、80.0%、40.0%、90.0%，9个农田土壤样品中 *sul1*、*sul2*、*tetA*、*tetB* 和 *tetC* 基因的检出率分别为55.6%、100.0%、55.6%、44.4%、88.9%。检测结果说明嘉兴市已经广泛受到抗生素抗性基因污染，为嘉兴市水污染治理提出了更高的要求。

关键词:嘉兴市; 抗生素抗性基因; PCR; 调查

中图分类号: X171.5

文献标识码:

文章编号: 1003-8701(2016)02-0109-04

Research on Contamination of Antibiotic Resistance Genes in Jiaxing

LIU Rui

(Jiaxing Vocational Technical College, Jiaxing 314036, China)

Abstract: PCR was used to investigate the distribution of 5 ARGs, including *sul1*, *sul2*, *tetA*, *tetB* and *tetC* in groundwater and farmland soil of Jiaxing City. The results showed that all these five genes were all detected in both water and soil samples. The detection rate of *sul1*, *sul2*, *tetA*, *tetB*, *tetC* was 65.0%, 95.0%, 80.0%, 40.0% and 90.0%, based on 20 groundwater samples and 55.6%, 100.0%, 55.6%, 44.4% and 88.9% based on 9 farmland soil samples, respectively. The results revealed that Jiaxing City was widely contaminated with ARGs, drawing higher demand in water pollution control of Jiaxing City.

Key words: Jiaxing city; Antibiotic resistance genes; PCR; Investigation

抗生素抗性基因(antibiotic resistance genes, ARGs)作为一种新型污染物,已成为目前国内外关注的焦点之一,其主要原因为医疗行业和养殖行业对于抗生素的大量使用。为了提高畜牧业生产,兽用抗生素被大量使用在各种养殖业,而长期大量兽用抗生素的使用除了直接污染生态环境外,还可能导致大量 ARGs 的产生。近年来国内学者对 ARGs 的研究发现,我国广东^[1-3]、河北^[4]、新疆^[5]、上海^[6]等许多地区均存在不同程度的 ARGs 污染。

嘉兴市是浙江省东北部地级市,位于地处长江三角洲杭嘉湖平原腹地,东北与上海接壤,是长三角最大的生猪养殖基地。随着嘉兴市生猪养殖业转型发展计划的实施,嘉兴市养殖业正逐步向规模化、集约化的健康养殖转型,2015年4月嘉

兴市正式成为全国首批试点海绵城市之一,标志着嘉兴市已进入环保建设的快车道。目前嘉兴市有关 ARGs 的研究数据较为匮乏,因此有必要加强对嘉兴市 ARGs 分布现状进行研究,为此笔者针对嘉兴市20个主要地表水和9个农田土壤中2种磺胺类抗性基因(*sul1*、*sul2*)和3种四环素类抗性基因(*tetA*、*tetB* 和 *tetC*)污染情况进行了调查,以期对嘉兴市全面评估其生态环境质量提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 样品来源

检测样品来源于嘉兴市20个主要地表水和9个农田土壤中,采样点分布如图1所示。地表水样品采集于距水面0.5~1.0 m深处水样,并同步采集底泥样品混合,农田土壤样品采集于土壤深度20~40 cm处。每个采样点均采集样品5份,并现场均匀混合。样品采集后装在棕色采样瓶中带回,在4℃避光条件下保存待检测。采样时间为2015年8月。

收稿日期: 2015-10-12

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目(2013BAD21B00、2013BAD21B04)

作者简介: 刘 锐(1977-),男,副教授,硕士,主要从事生态养殖及动物性食品安全技术研究。

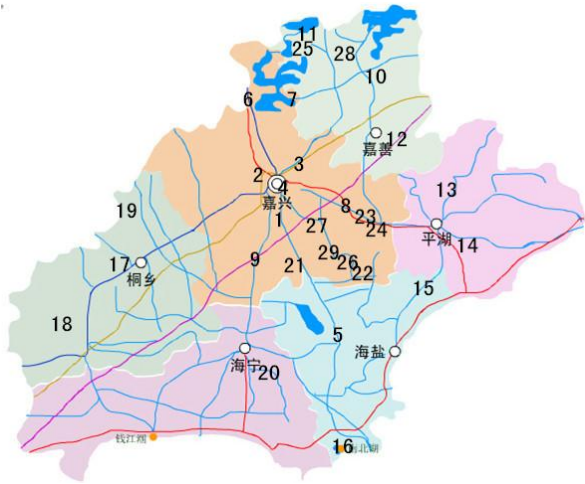


图1 嘉兴市抗生素抗性基因样品采样点分布图

注:1.贯泾港;2.石臼漾;3.湘江荡;4.南湖景区;5.于北村徐家桥港;6.运河干流王江泾;7.红旗塘油车港出口;8.平湖塘焦山门桥;9.长水塘王店百乐桥;10.西塘景区;11.陶庄汾湖;12.柳洲公园;13.上海塘东园大桥;14.乍浦塘乍浦塘桥;15.海盐塘西塘桥;16.南北湖景区;17.京杭运河万年高桥;18.白荡漾;19.乌镇景区;20.长山河五星桥;21.余新镇明星村;22.凤桥镇庄史村;23.新丰镇永丰村;24.新丰镇竹林村;25.陶庄镇汾玉村;26.凤桥镇庄史村;27.余新镇永利村;28.西塘镇星建村;29.凤桥镇三星村(其中1~20为地表水水样,21~29为农田土壤)

1.2 实验试剂

TaqDNA 聚合酶;10×PCR Buffer;MgCl₂;dNTP;Marker;6×DNA Loading Dye;10×TAE;土壤基因组DNA快速抽提试剂盒(SK8233);溴化乙锭;柱式DNA胶回收试剂盒(SK8131),以上均购于生工生物工程(上海)股份有限公司。引物序列^[1]见表1,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表1 抗生素抗性基因PCR引物

基因	引物序列	扩增产物
<i>sul1</i>	<i>sul1-F</i> CACCGAAACATCGCTGCA	158bp
	<i>sul1-R</i> AAGTTCGCCGCAAGGCT	
<i>sul2</i>	<i>sul2-F</i> CTCCGATGGAGCCGGTAT	190bp
	<i>sul2-R</i> GGAATGCCATCTGCCTTGA	
<i>tetA</i>	<i>tetA-F</i> GCTACATCTGCTTGCCTTC	204bp
	<i>tetA-R</i> CATAGATCGCCGTGA AGAGG	
<i>tetB</i>	<i>tetB-F</i> CGAAGTAGGGTTGAGACGC	192bp
	<i>tetB-R</i> AGACCAAGACCCGCTAATGAA	
<i>tetC</i>	<i>tetC-F</i> TCCGTTGATGCAATTTCTATGC	335bp
	<i>tetC-R</i> GGAATGGTGCATGCAAGGAG	

1.3 实验仪器

SW-CJ-1D 洁净工作台;HC-2518R 高速冷冻离心机;DYY-6C 型稳压稳流电泳仪;H6-1 微型电泳槽;凝胶成像系统;TU-1901 紫外分光光度计;PCR反应扩增仪;移液器;3730XL 测序仪。

1.4 方法

DNA 抽提依照土壤基因组DNA快速抽提试剂盒(上海生工)说明。PCR反应体系见表2、表3。PCR产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序和相似性检索分析。

表2 PCR25μL体系的配制

模板DNA	0.5μL
引物F(10μM)	0.5μL
引物R(10μM)	0.5μL
dNTP(10 mM)	0.5μL
Taq Buffer(10×)	2.5μL
MgCl ₂ (25 mM)	2μL
Taq 酶(5U/μL)	0.2μL
H ₂ O	18.3μL

表3 PCR反应条件

程序	温度(°C)	时间
预变性	95	3 min
变性	94	30 s
退火	56	30 s
延伸	72	30 s
修复延伸	72	8 min
循环数	35	

2 结果与分析

2.1 嘉兴市地表水的抗生素抗性基因检测结果与分析

本次调查的5种ARGs全部检出,PCR电泳图见图2,调查说明嘉兴市整体生态环境已经广泛受到ARGs污染。Pei等^[1]研究发现,人类活动可以加重ARGs污染,由于嘉兴市是浙江省养殖业主产区之一,养殖业相对集中,加之地区人口密度大,工商业发达,这都为嘉兴市ARGs污染的形成和扩散提供了有利的条件,与有机污染物污染相比,ARGs污染一旦形成将更加难以控制和消除,这无疑为嘉兴市水污染治理提出了更高的要求。

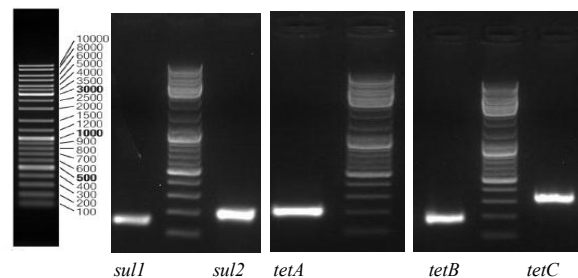


图2 PCR电泳图

本次调查的20个嘉兴市主要地表水水样ARGs检测结果见表4,从ARGs分布范围来看,在嘉兴市 *sul2* 和 *tetC* 基因分布最广,在绝大多数水样中均有检出,检出率分别达到95%和90%,而 *tetA* 和 *sul1* 基因检出率分别为80%和65%,*tetB* 基因

检出率最低仅为40%。这说明在嘉兴地区,含有 *sul2* 和 *tetC* 基因的宿主菌对各种环境耐受力较强,以致这两种基因较 *tetA*、*sul1* 和 *tetB* 基因在环境中分布更广,其结果与国内其他地区ARGs污染报道^[1,8-9]相近,但不完全一致。

表4 嘉兴市地表水的抗生素抗性基因检测结果

序号	采样点	磺胺类			四环素类		
		<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>tetA</i>	<i>tetB</i>	<i>tetC</i>	
1	贯泾港	+	+	+	-	+	
2	石白漾	-	+	+	+	+	
3	湘江荡	+	+	-	-	+	
4	南湖景区	-	+	+	-	+	
5	于北村徐家桥港	-	+	+	+	+	
6	运河干流王江泾	+	+	+	-	+	
7	红旗塘油车港出口	+	+	-	+	-	
8	平湖塘焦山门桥	+	-	+	-	+	
9	长水塘王店百乐桥	+	+	+	+	-	
10	西塘景区	+	+	+	-	+	
11	陶庄汾湖	-	+	+	-	+	
12	柳洲公园	+	+	+	+	+	
13	上海塘东园大桥	-	+	+	+	+	
14	乍浦塘乍浦塘桥	+	+	+	-	+	
15	海盐塘西塘桥	+	+	+	+	+	
16	南北湖景区	+	+	+	-	+	
17	京杭运河万年高桥	-	+	-	-	+	
18	白荡漾	+	+	-	-	+	
19	乌镇景区	-	+	+	+	+	
20	长山河五星桥	+	+	+	-	+	
	检出率(%)	65.0	95.0	80.0	40.0	90.0	

注:“+”代表检出,“-”代表未检出,下同

2.2 嘉兴市农田土壤的抗生素抗性基因检测结果与分析

本次调查的9个嘉兴市农田土壤ARGs检测

结果见表5,在长期施用猪粪的农田土壤和未施用猪粪的农田土壤中5种ARGs均有检出,说明嘉兴市农田土壤ARGs污染范围较广泛。黄福义

表5 嘉兴市农田土壤的抗生素抗性基因检测结果

序号	采样点			磺胺类		四环素类		
	土壤性质	采样点位置	农产品类型	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>tetA</i>	<i>tetB</i>	<i>tetC</i>
21	长期施用猪粪的农田土壤	余新镇明星村	芦笋	-	+	-	-	+
22		凤桥镇庄史村	翠冠梨	+	+	+	+	+
23		新丰镇永丰村	果树	+	+	+	-	+
24		新丰镇竹林村	水稻	+	+	+	+	+
25	未施用猪粪的农田土壤	陶庄镇汾玉村	水稻	-	+	-	-	+
26		凤桥镇庄史村	葡萄	+	+	-	-	+
27		余新镇永利村	水稻	-	+	+	+	+
28		西塘镇星建村	水稻	-	+	+	-	-
29		凤桥镇三星村	水蜜桃	+	+	-	+	+
	检出率(%)			55.6	100.0	55.6	44.4	88.9

等^[10]研究认为长期施用猪粪的农田土壤比未施用猪粪的农田土壤 ARGs 种类显著增加,而本次研究由于样本较少并未出现明显增加趋势。大量研究表明^[11],ARGs 可以通过食物链由环境转移到人体,因此如何通过严控抗生素使用,防止耐药细菌引发的安全隐患将是下一步研究重点。

从 ARGs 分布范围来看,在嘉兴市农田土壤中 *sul2* 和 *tetC* 基因分布最广,检出率分别达到 100% 和 88.9%,其后依次是 *tetA*、*sul1* 和 *tetB*,检出率分别是 55.6%、55.6% 和 44.4%,其结果与嘉兴市地表水的 ARGs 检测结果类似。

3 结论与讨论

本次研究可以得出结论,在嘉兴市地表水和农田土壤中 ARGs 污染范围较大,其中污染以 *sul2* 和 *tetC* 基因分布相对较广。闫幸等^[12]于 2013 年针对嘉兴市地表水中四环素类、磺胺类、大环内酯类、喹诺酮类等多种兽用抗生素的含量进行了调查,结果表明各种兽用抗生素均有不同程度污染,其污染程度与生猪养殖量相关,养殖业是嘉兴市抗生素主要污染源,与本次研究结果相印证。兽用抗生素的污染已成为引发嘉兴市 ARGs 污染主要原因之一,因此为了防止 ARGs 污染的进一步加剧而引起的安全隐患,改善嘉兴市生态环境水平,笔者建议:(1)地方政府应合理规划嘉兴市养殖业,实现生猪养殖控量限量发展,引导养殖业向生态化、规模化和集约化方向发展。(2)学习借鉴国外发达国家和地区经验,从国家层面尽早出台相关法律法规严格控制抗生素在养殖业中的使用。(3)通过对现有养殖业从业人员技术培训、加大农业专业应用型人才培养力度、出台高学历农业人才就业政策等一系列措施提高养殖业从业人员素质,从而提高现有养殖企业生产技术水平。(4)建立健全动物性食品全程安全监控体系,探索动物性食品有害物质残留市场准入和检测机制,落实原产地可追溯制度,对于滥用抗生素的生产企业依法进行严惩。(5)加强抗生素替代物相关技术的应用性研究^[13],通过推广抗生

素替代物在养殖业中的应用,探索出一条适合现有嘉兴市养殖管理水平的生态养殖技术。(6)加强对嘉兴市水环境中 ARGs 扩散规律、生态风险和控制技术的研究,为实现嘉兴市水污染治理提供技术支撑。

参考文献:

- [1] 梁惜梅,聂湘平,施 震.珠江口典型水产养殖区抗生素抗性基因污染的初步研究[J].环境科学,2013,34(10):4073-4080.
- [2] 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,2010:36-60.
- [3] 张瑞泉,应光国,丁永祯,等.广东西枝江-东江流域抗生素抗性基因污染特征研究[J].农业环境科学学报,2013,32(12):2471-2479.
- [4] 徐 艳,张 远,郭昌胜,等.石家庄汪洋沟地区抗生素、抗性细菌和抗性基因污染特征研究[J].农业环境科学学报,2014,33(6):1174-1182.
- [5] 周 婷.新疆典型水环境中抗生素抗性基因的分布[D].石河子:石河子大学,2014:22-43.
- [6] 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.
- [7] Pei R, Sung-chul K, Carlson K H. Effect of River Landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes(ARG) [J].Water Research, 2006(40): 2427-2435.
- [8] Luo Y, Mao D Q, Rysz M, et al. Trends in antibiotic resistance genes occurrence in the Haihe River, China[J].Environmental Science & Technology, 2010, 44(19): 7220-7225.
- [9] Gao P 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(7): 2355-2364.
- [10] 黄福义,李 虎,韦 蓓,等.长期施用猪粪水稻土抗生素抗性基因污染研究[J].环境科学,2014,35(10):3869-3873.
- [11] 刘珍珍,李 亮,孙 坚,等.华南地区猪场环境中蔬菜细菌携带耐药基因情况调查[J].华南农业大学学报,2015,36(3):1-7.
- [12] 闫 幸,余卫娟,兰亚琼,等.嘉兴市地表水中兽用抗生素的污染现状调查[J].环境科学,2013,34(9):3368-3373.
- [13] 万伶俐,于振斌,张尔刚,等.抗生素添加剂替代产品的研究进展[J].吉林农业科学,2003,28(3):39-42.

(责任编辑:王 昱)