

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

冀秀玲, 刘芳, 沈群辉, 刘扬

东华大学环境学院环境科学系, 上海 201620

摘要: 抗生素滥用及其诱导产生的抗生素抗性基因 (antibiotic resistance genes, ARGs) 污染已经引起人们的广泛关注。选取上海市某地养殖场作为研究对象, 采用高效液相色谱-质谱法和实时荧光定量 PCR 法, 对养殖场污水及附近农田灌溉渠河水中 5 种四环素及磺胺类抗生素, 8 种对应的 ARGs 的含量、特征及相关性进行了研究。研究结果显示, 在采集的水样中均含有待检测的 5 种抗生素, 养殖污水中抗生素含量高于农田灌溉河水, 各样本中四环素类抗生素含量均略高于磺胺类抗生素, 2 种四环素抗生素总量为 294.0~376.1 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 3 种磺胺类抗生素总量为 197.7~323.0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。养殖场污水样本中 8 种 ARGs 均有检出, 磺胺类抗性基因中 *sul* (A) 含量最高, 绝对拷贝数为 $10^{8.4108} \sim 10^{10.3728}$; 四环素类抗性基因中 *tet* (W) 含量最高, 绝对拷贝数为 $10^{6.18805} \sim 10^{7.8874}$ 。农田灌溉渠河水中除 *tet* B(P) 外, 其它 7 种 ARGs 均有检出。样本中 ARGs 相对表达量总体呈现磺胺类 ARGs 高于四环素类 ARGs 的特点。抗生素浓度与 ARGs 相对表达量的 Pearson 相关性分析显示, 样本中 *sul* (III) 与磺胺类抗生素浓度存在较明显的正相关性, 但其它几种 ARGs 与抗生素则未见或存在一定负相关性。表明除抗生素外, ARGs 在水环境中的丰度可能与 ARGs 种类及其它环境因子有关。该研究将有助于认识上海地区养殖场废水中抗生素和 ARGs 污染状况, 为进一步开展黄浦江水域抗生素尤其是 ARGs 的污染研究提供数据基础。

关键词: 抗生素; 抗性基因; 高效液相色谱-质谱法; 实时荧光定量 PCR; 污水; 养殖场

中图分类号: X132

文献标志码: A

文章编号: 1674-5906 (2011) 05-0927-07

近年来, 抗生素在环境中的归趋及其对环境的潜在危害逐步受到人们的关注, 已成为环境领域的研究热点之一。研究表明, 抗生素摄入后除少部分残留在体内, 85% 以上以原药和代谢产物的形式经由病人与动物的粪尿排出体外, 进入生态环境^[1], 对农田土壤、地表和地下水及生态系统中各类生物产生危害, 并诱发和传播各类抗生素耐药致细菌^[2-4]。抗生素抗性基因 (antibiotic resistance genes, ARGs) 的存在是细菌耐药性产生的根源, 自 Pruden 等^[5]将 ARGs 作为一种新型环境污染物质提出之后, 有关 ARGs 在环境中传播和污染等的报道日益增多。ARGs 在环境中的持久性残留菌群间的迁移、转化和传播, 比抗生素残留本身对环境生态的危害更大^[6-8]。目前, 对于抗生素的研究资料较为丰富, 周启星等^[9]总结国内外对抗生素的来源、环境残留及生态毒性的相关研究, 为抗生素研究提供了较多的参考依据; 王冉等^[4]对于抗生素在环境中的转归过程进行了综述。近年来, 国内外对于 ARGs 在环境中的来源、传播扩散、生态风险及研究方法也开展了许多工作^[10-12]。Pruden 等^[5]对美国科罗拉多州北部的河流、农田灌溉渠、湖泊等中的 ARGs 浓度进行检测, 发现 ARGs 浓度在受城市和农业影响的区域显著高于那些未受影响或

影响较小的区域; 邹世春等^[13]对北江河水中抗生素抗性基因污染进行初步研究, 发现北江河相对于罗拉多州北部的河流污染更为严重; 罗义, 周启星等^[14]对天津海河流域 ARGs 的污染状况、趋势做了详尽的研究。朱永官、吴楠等^[15]已经从养殖场土壤着手研究, 对四环素抗性基因进行定量检测。但目前上海地区有关抗生素及 ARGs 污染的研究数据尚有不足, 姜蕾、尹大强等^[16]对黄浦江水域抗生素污染的产生、分布及季节变化做了较为详尽的研究, 但有关 ARGs 的研究仍有不足亟待开展相关工作。

基于以上原因, 本研究选取上海市某养殖场较为集中的地区作为研究对象, 该地区位于上海市黄浦江上游, 养殖所用的抗生素及其引起的抗性基因污染很可能对上海市重要水源之一的黄浦江构成潜在危害。本研究对该地区畜牧场的 3 个水体采样点进行了四环素类及磺胺类抗生素及 ARGs 的定量检测, 对其含量、分布特征及相关性进行初步评估, 并探讨对抗生素含量与抗性基因丰度的相关性, 为进一步开展黄浦江水域的抗生素尤其是 ARGs 的污染研究提供数据基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集

采样地区有较多养殖场分布。从中选取具有代

基金项目: 中央高校基本科研业务经费 (9D11306); 上海市重点学科开放基金项目 (B604)

作者简介: 冀秀玲 (1975 年生), 女, 副教授, 博士, 主要研究方向为环境毒理学和环境化学。E-mail: ling-jx@dhu.edu.cn

收稿日期: 2011-04-19

表性的2个较大规模的养殖场——养猪场(存栏量约10000头)、养牛场(存栏量约1000头),对养殖场内污水贮流池中的水体采样;并对猪养殖场附近的一条与污水贮流池连通的农田灌溉渠采样(距污水排放口10m处)。样品于常温下采集,保存于4℃环境中。

1.2 HPLC-MS分析

1.2.1 样品预处理

水样以0.45 μm滤膜除去悬浮物,按1L水样中加入0.5 mg Na₂EDTA,并加入盐酸调节pH至3.0左右。取经过预处理的样品提取液各10 mL以1滴/s的速度预先经5 mL甲醇和5 mL水活化的PEP固相萃取柱,待上清液完全流出后,依次用5 mL水和5 mL *V*(甲醇):*V*(水)=5:95溶液淋洗,弃去全部流出液。减压抽干5 min,最后10 mL *V*(甲醇):*V*(乙酸乙酯)=10:90溶液洗脱。将洗脱液在40℃吹氮、浓缩至干,用1 mL标准溶解液溶解残渣,过0.45 μm滤膜,供液相色谱仪测定^[17-18]。

1.2.2 绘制标准曲线

分别称取四环素(TC),土霉素(OTC),磺胺嘧啶(SDZ),磺胺二甲嘧啶(SDMe),磺胺甲噁唑(SMZ)标准品(购自中国药品生物制品检定所),配制成单标储备液和混标储备液^[19],将配制好的抗生素标准储备液经过同水样相同的预处理程序后经HPLC-MS(Agilent 1100)测定。以浓度为横坐标,出峰面积为纵坐标绘制标准曲线。

1.2.3 样品测定

取经过预处理的样品提取液经HPLC-MS(Agilent 1100)测定。色谱条件^[18]:色谱柱:Inertsil ODS-3;流速:0.4 mL·min⁻¹;检测波长:265 nm;进样量:10 μL;流动相:乙腈+水和0.2%(*V*:*V*)甲酸。质谱条件:离子化方式:电喷雾电离源正源模式(ESI⁺),离子源温度:320℃,喷雾电压:3000 V,氮气流量10 mL·min⁻¹。

1.3 抗性基因的RT-PCR定量分析

本研究参照HPLC-MS法检测抗生素的结果,选取常见的几种典型抗生素抗性基因作为目的基因:4种磺胺类抗生素抗性基因*sul*(I)、*sul*(II)、*sul*(III)、*sul*(A)和4种四环素类抗生素抗性基因*tet*(M)、*tet*(O)、*tet*(W)、*tet*B(P),对采集水样中所提取的DNA进行定量检测,引物设计主要来源于已发表的文献^[20-22]。

1.3.1 DNA提取

采用细菌基因组DNA提取试剂盒(购于TIANGEN)提取样品中的DNA,依照试剂盒内说明书的方法提取。提取的DNA用琼脂糖凝胶电泳及紫外分光光度计(UV-8000PC)检测含量以及纯

度(A260/A280值在1.8~2.0之间),表明用试剂盒提取的DNA纯度较高生物基因组DNA。

1.3.2 绘制标准曲线

PCR反应体系(体积为25 μL),包括5×buffer 5 μL, Mg²⁺(25 mM) 1.5 μL,引物各1 μL, dNTPs mixture(各10 mM) 1 μL, Taq DNA聚合酶(5 U·μL⁻¹) 0.25 μL, ddH₂O 15.25 μL。PCR反应程序为:94℃ 4 min;94℃ 30 sec;60℃ 30 sec;72℃ 90 sec。循环35次,72℃ 5 min。进行电泳检测,并将正确的片断用割胶回收试剂盒做胶回收(上海闪晶生物公司),纯化PCR产物。使用PUC57-T Vector,将靶基因片断连入PUC57-T载体,然后采用商品化的感受态细胞DH-5α(上海闪晶生物公司)进行转化。挑选菌落,少量培养。裂解细菌,使用小量质粒抽提试剂盒(上海闪晶公司)提取质粒。将质粒进行DNA测序确定目的产物。提取的质粒通过紫外分光光度计检测其浓度,按10倍浓度梯度稀释,以拷贝数为横坐标,Ct值为纵坐标绘制标准曲线。

1.3.3 RT-PCR

用上海闪晶生物有限公司的RT-PCR试剂盒进行8个目的基因和内参基因16S-*r* RNA的SYBR Green I实时定量PCR反应(Rotor-Gene 3000)。PCR反应体系(体积为25 μL),包括目的基因上、下游引物各1.25 μL, PCR mix 12.5 μL,待测DNA模板1 μL, ddH₂O 9 μL。PCR反应程序为:95℃ 15 min;95℃ 15 sec;65℃ 30 sec;*sul*(I)65℃ 30 sec、*sul*(II)57℃ 30 sec、*sul*(III)61℃ 30 sec、*sul*(A)60℃ 30 sec、*tet*(M)55℃ 30 sec、*tet*(O)50℃ 30 sec、*tet*(W)60℃ 30 sec、*tet*B(P)46℃ 30 sec,72℃ 30 sec,40个循环。16S-*r* RNA反应条件同目的基因。

1.4 数据统计

所有数据用Excel软件进行统计学处理,采用t检验进行显著性分析。

2 测试结果

2.1 HPLC-MS结果

2.1.1 标准曲线

通过实验获得5种抗生素的标准曲线,结果如表1所示(以浓度为横坐标,出峰面积为纵坐标)。

表1显示5种抗生素的标准曲线相关系数 R^2

表1 各种抗生素的标准曲线
Table 1 Standard curve of various antibiotics

抗生素	标准曲线方程	相关系数 R^2
四环素(TC)	$y = -2.266 \times 10^3 + 1.028 \times 10^6 x$	0.998 7
土霉素(OTC)	$y = -2.444 \times 10^3 + 4.958 \times 10^5 x$	0.996 2
磺胺嘧啶(SDZ)	$y = -1.370 \times 10^4 + 1.720 \times 10^6 x$	0.999 9
磺胺二甲嘧啶(SDMe)	$y = -2.085 \times 10^4 + 3.638 \times 10^6 x$	0.999 8
磺胺甲噁唑(SMZ)	$y = -1.942 \times 10^4 + 1.996 \times 10^6 x$	0.999 9

在 0.9962~0.9999 之间，线性相关很好，可用于抗生素浓度定量。

2.1.2 抗生素测定结果

根据标准曲线可以计算得出各抗生素含量，5 种抗生素在各样本中的分布情况如图 1 所示。

图 1a、b、c 显示 5 种抗生素在 3 个样本中的分布规律基本一致：四环素类抗生素浓度水平总体高于磺胺类抗生素，四环素类中 OTC 含量最高；磺胺类中 SDZ 和 SMZ 含量高，SDMe 含量最低。图 d 显示养殖场废水中抗生素含量总体高于河流灌溉

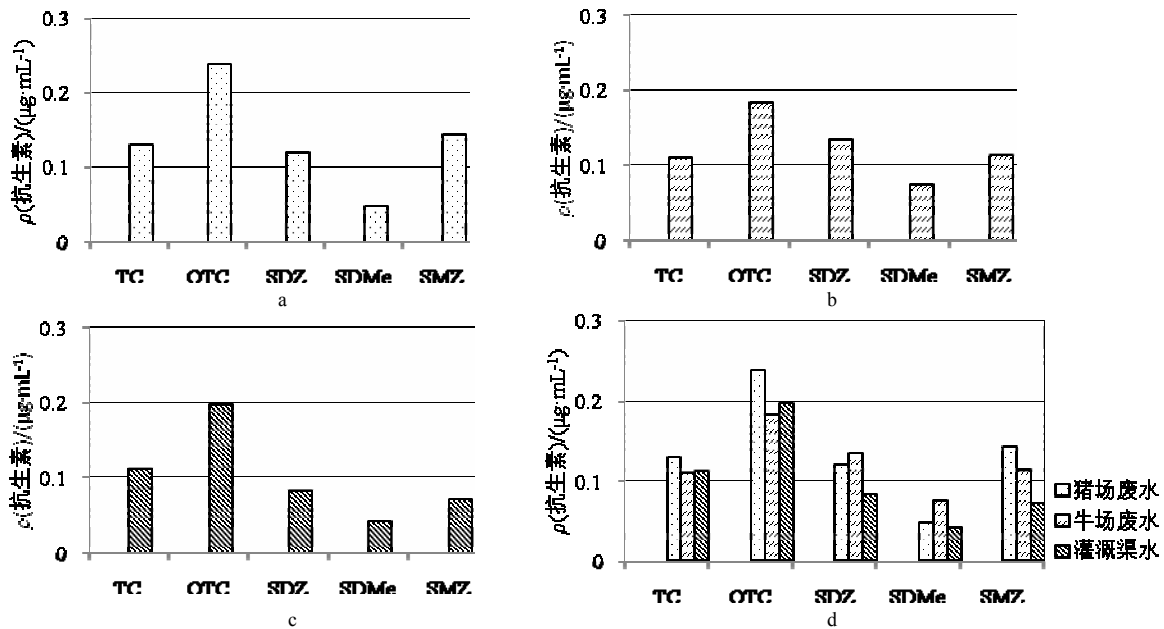


图 a 猪场废水中各抗生素含量 Figurer a Antibiotics concentration in swine wastewater; 图 b 牛场废水中各抗生素含量 Figurer b Antibiotics concentration in cattle farm water; 图 c 灌溉渠水中各抗生素含量 Figurer c Antibiotics concentration in irrigation channels; 图 d 各样本中抗生素含量对比 Figurer d Comparison of antibiotics concentration in there samples

图 1 样本中抗生素分布情况

Fig.1 Distribution of antibiotics in samples

渠水。

2.2 抗性基因测定结果

2.2.1 抗性基因标准曲线

通过实验获得 8 个目的基因及其内参基因的标准曲线，结果如表 2 所示（以拷贝数为横坐标，Ct 值为纵坐标绘制标准曲线）。

表 2 显示，Ct 值与目的基因拷贝数之间的相关系数 R^2 在 0.991~0.999 之间；扩增效率 E 在 97.3%~122.0%之间；斜率在-2.89~-3.39 之间。内参基因 16S-rRNA 的 R^2 在 0.993~0.999 之间；扩增效率 E 在 94.8%~132.5%之间；斜率在-2.73~-3.45 之间。线性相关良好，可用于计算各基因的拷贝数。

2.2.2 定量 PCR 结果

根据标准曲线可以计算得出各抗性基因的拷贝数，8 个基因的绝对拷贝数及其与内参基因的相对拷贝数结果如图 2 所示。

图 2 中，图 a、b 分别是磺胺类 ARGs 和四环素类 ARGs 在样本中的绝对拷贝数。养殖场污水均含有所检测的 8 个抗性基因，而河流灌溉渠水中未检测到 *tetB(P)*。图 c、d 分别是 8 个抗性基因在样

表 2 目的基因和 16S-rRNA 标准曲线

Table 2 Standard Application Curve of ARGs and 16S-rRNA

基因	线性方程	相关系数 R^2	均方差	扩增效率 $E(\%)$
<i>sul(I)</i>	$y = -3.031 1x + 45.6116$	0.999 5	0.012 3	113.75
16S-r RNA	$y = -3.452 9x + 55.4849$	0.999 3	0.020 1	94.81
<i>sul(II)</i>	$y = -2.971 2x + 45.3927$	0.998 1	0.042 2	117.05
16S-r RNA	$y = -2.942 3x + 44.6994$	0.999 2	0.010 5	118.71
<i>sul(III)</i>	$y = -3.355 5x + 47.5496$	0.997 4	0.074 8	98.62
16S-r RNA	$y = -3.397 8x + 53.9288$	0.993 3	0.195 5	96.93
<i>sul(A)</i>	$y = -3.056 3x + 45.7513$	0.991 4	0.204 3	112.42
16S-r RNA	$y = -2.729 7x + 45.0408$	0.997 4	0.048 6	132.46
<i>tet(M)</i>	$y = -2.902 8x + 45.0907$	0.998 5	0.042 2	121.05
16S-r RNA	$y = -2.942 3x + 44.6994$	0.999 2	0.010 5	118.71
<i>tet(O)</i>	$y = -3.388 5x + 48.8580$	0.994 8	0.012 3	97.29
16S-r RNA	$y = -2.935 7x + 45.6481$	0.994 8	0.113 8	119.10
<i>tet(W)</i>	$y = -3.109 0x + 46.2015$	0.999 3	0.017 5	109.72
16S-r RNA	$y = -2.729 7x + 45.0408$	0.997 4	0.048 6	132.46
<i>tetB(P)</i>	$y = -2.886 8x + 44.7802$	0.998 6	0.029 9	122.03
16S-r RNA	$y = -3.199 3x + 49.9495$	0.994 4	0.145 6	105.38

本中的含量水平和相对表达量。基因相对表达量是样本中目的基因的绝对拷贝数相对于内参基因

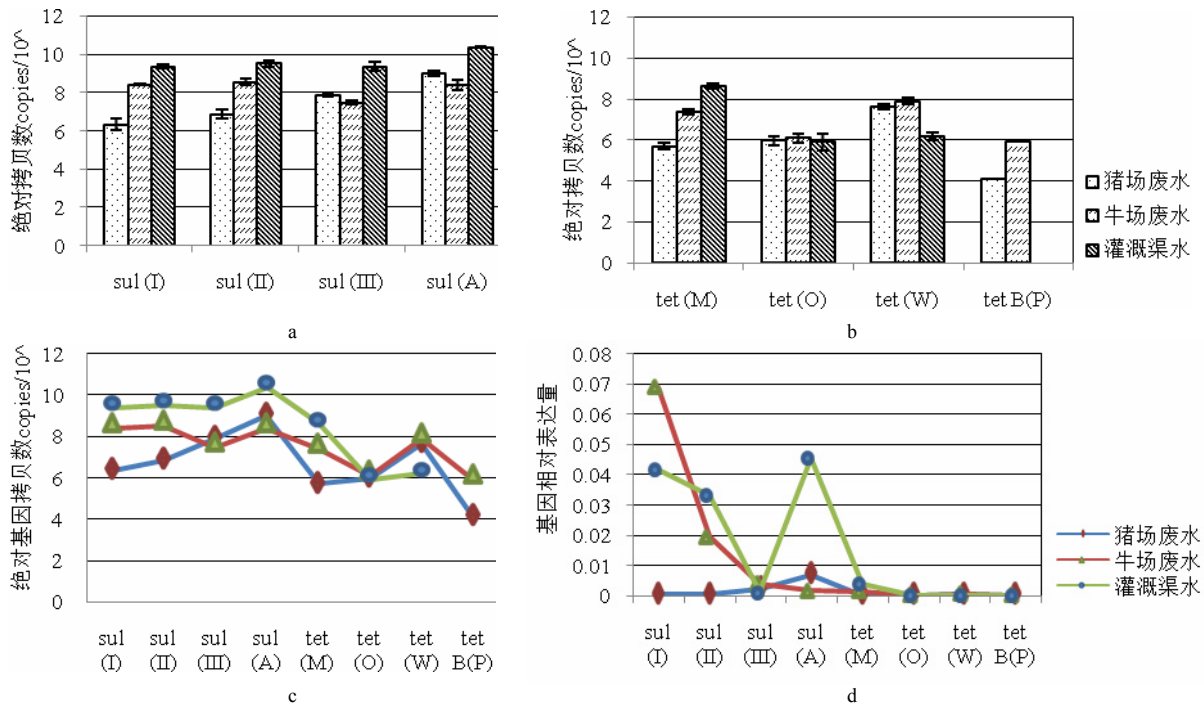


图 a 各样本磺胺类抗性基因绝对拷贝数 Figure a Absolute ARGs Copies of *sul* in three samples. 图 b 各样本四环素抗性基因绝对拷贝数 Figure c Absolute ARGs Copies of *tet* in three samples. 图 c 样本中各基因绝对拷贝数 Figure c Comparison of the Absolute ARGs Copies. 图 d 样本中抗性基因相对表达量 Figure d Copies of ARGs/Copies of 16S-rRNA in three samples

图 2 样本中抗性基因分布情况

Fig.2 Distribution of antibiotics resistance genes in samples

16SrRNA 绝对拷贝数的变化, 代表的是微生物群落中所含的抗性基因数量, 可定量表示抗生素对抗性基因的诱导率^[11], 所以基因的相对表达量更能反映基因在样本中的分布情况。ARGs 绝对及相对表达结果显示, 与抗生素含量分布特征不同, 各样本中磺胺类 ARGs 的含量水平高于四环素类 ARGs; 灌溉渠水中 ARGs 的相对表达量变化很大, 虽然河流灌溉渠水中抗生素含量低于养猪场排放污水, 但灌溉渠水中所有检出 ARGs 的相对表达量却均高于猪场养殖污水。

3.3 抗生素与抗性基因相关性分析结果

通过对抗生素含量与抗性基因相对表达量的相关性进行分析, 得到结果如表 3、表 4 所示:

表 3、表 4 分别是四环素类和磺胺类浓度与抗性基因相对表达量的相关性结果。在表 3 中, 除 *tet*

(M)外, 其他基因与总四环素类抗生素呈一定负相关性, $R < -0.5$; 在表 4 中, *sul* (III)与磺胺类抗生素有较好的相关性, $R > 0.5$; 但其他 3 个基因则与总磺胺类抗生素呈现负相关, $R < -0.5$ 。

3 结果分析 (Analysis)

3.1 抗生素定量结果分析

由图 1 结果可知, 所采样本中均含有所检测的 5 种抗生素, 这是由于动物的排泄物进入养殖场废水中造成抗生素在水体中扩散。由图 d 可知, 5 种抗生素在水样中的存在规律有较好的一致性: 四环素类中 OTC 含量最高, 为 $0.1832 \sim 0.2378 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 磺胺类中 SDZ 和 SMZ 含量较高, SDMe 含量最低, 为 $0.04199 \sim 0.07464 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。同时, 四环素类抗生素的含量总体上高于磺胺类抗生素, 有文献显示^[4]磺胺类抗生素在水中容易生物降解, 而四环素类抗

表 3 四环素类抗生素及抗性基因相关度分析结果

Table 3 Related analysis results of Tetracycline antibiotics and resistance genes

样本	TC($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	OTC($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	总四环素含量($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	<i>tet</i> (M)	<i>tet</i> (O)	<i>tet</i> (W)	<i>tet</i> (P)
猪场污水	0.129 3	0.237 8	0.367 1	1.63E-05	1.19E-05	0.000 30	3.69E-08
牛场污水	0.110 8	0.183 2	0.294	0.001 38	5.80E-05	0.000 48	2.54E-05
灌溉渠水	0.112 8	0.197 3	0.310 1	0.004 00	3.12E-06	2.98E-06	0
相关系数 R	与 TC 相关系数			-0.609 91	-0.552 43	-0.070 39	-0.669 46
	与 OTC 相关系数			-0.695 01	-0.455 36	0.042 03	-0.581 84
	与总四环素相关系数			-0.577 55	-0.585 50	-0.110 45	-0.698 79

表 4 磺胺类抗生素及抗性基因相关度分析结果
Table 4 Related analysis results of Sulfonamide antibiotics and resistance genes

样本	SDZ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	SDMe($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	SMZ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	总磺胺类含量($\mu\text{g}/\text{mL}$)	<i>sul</i> (I)	<i>sul</i> (II)	<i>sul</i> (III)	<i>sul</i> (A)
猪场污水	0.119 9	0.047 86	0.142 9	0.310 7	0.000 34	0.000 24	0.002 36	0.006 98
牛场污水	0.134 2	0.074 64	0.114 2	0.323 0	0.068 98	0.019 469	0.003 94	0.001 61
灌溉渠水	0.0835 3	0.041 99	0.072 15	0.197 7	0.041 69	0.033 147	0.001 15	0.045 63
相关系数 R	与 SDZ 相关系数				-0.027 99	-0.758 1	0.872 60	-0.999 75
	与 SDMe 相关系数				0.158 84	-0.623 24	0.948 36	-0.986 39
	与 SMZ 相关系数				0.688 95	-0.072 29	0.961 68	-0.720 88
	与总磺胺相关系数				-0.507 95	-0.978 94	0.527 53	-0.864 26

生素则较为稳定。所以，抗生素在环境中的转归很大程度上决定了水体中抗生素含量的差异。

美国 USGS(1999-2000)调查了 30 个州 139 条河流，结果检测到 21 种抗生素残留。这些抗生素在水环境中的残留浓度一般小于 $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ [23]。姜蕾等[16]在长江三角洲地区的养猪场废水中检测到四环素类抗生素浓度范围为 $31.05\sim 100.75 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ，而本研究中采集水样中四环素的含量达 $110.8\sim 237.8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ，说明养殖过程中抗生素的使用是造成此地区抗生素污染的决定因素，且抗生素污染水平较高。

3.2 抗性基因定量结果分析

由图 2 结果可知，养殖场废水中 8 个抗性基因均有检出，说明所检测的 ARGs 在养殖场废水中是广泛存在的。图 c 显示，磺胺类抗性基因的含量水平总体上高于四环素类抗性基因，其中 *sul* (A) 含量最高，绝对 Ct 值高达 $10^{8.4108}\sim 10^{9.0117}$ ；*tet* B(P) 含量最低，绝对 Ct 值为 $10^{4.0982}\sim 10^{5.91157}$ ，两者之间最大相差约 4 个数量级；而在灌溉渠水中未检测到 *tet* B(P)。样本中检测到的几个优势基因在其他一些相关研究中也常被检测到[22, 24-25]，而 *tet* B(P) 只在少数报道中有被检测出，表明 *tet* B(P) 在环境中存在水平可能较低。

图 d 是样本中各基因的相对表达量，结果中各目的基因与 16S-rRNA 表达量的比值在 $10^{-5.5255}\sim 10^{-1.1613}$ 范围内 (*tet* B(P) 除外)，其中，牛场废水中的基因相对表达量与相关文献报道有关环境中抗性基因存在规律基本相符[10, 15]：*sul* (I) > *sul* (II) > *sul* (III)，*tet* (W) > *tet* (M) > *tet* (O)；而猪场废水总体水平较低，河流灌溉渠水则变化较大。由于猪场污水贮流池的排污口与河流灌溉渠是连通的，猪场废水由贮流池直接排入河流中用于农田灌溉，使得抗生素被迁移到农田土壤中，从而增加了土壤中的耐药致细菌，土壤中的抗性基因水平迁移到开放的灌溉渠河流中，致使河流灌溉渠水中抗性基因含量增加，所以河流灌溉渠水中的基因含量普遍高于猪场废水，同时猪场废水与河流灌溉渠水在基因相对表达量上具有一致性。

3.3 抗生素含量与抗性基因丰度的相关性

养殖场中抗生素的大量使用是导致细菌耐药性增加的重要原因之一，所以抗生素是 ARGs 在环境中的重要来源。表 3 数据显示，*tet* (M) 含量与四环素类抗生素浓度相关性较弱；*sul* (III) 含量与磺胺类抗生素及总磺胺抗生素浓度的相关性均较好，相关系数 $R>0.5$ ；其他抗性基因含量与抗生素浓度多呈现负相关性。林殷等[26]将北江各采样点所获得的磺胺抗性基因污染水平与种磺胺类抗生素总浓度的定量分析结果进行比较后发现，二者具有一定的相关性；Smith 等[23]研究发现饲养场泻湖的四环素抗性基因量与抗生素水平相关性较弱。现已有的研究证实了抗性基因的存在与抗生素的使用之间有很好的相关性[24-27]，但是对于抗性基因含量与抗生素浓度之间的关系还没有较为一致的结论，说明抗生素浓度不是影响抗性基因表达量的唯一因素，还可能受到环境中其他因素的影响，如光照、高温、厌氧等条件可以加速抗性基因的降解[10]，而重金属的存在则可能与 ARGs 形成协同抗性，从而导致微生物群落多重抗性的产生，使 ARGs 丰度升高[29]，因此对 ARGs 在环境中的迁移转化问题仍有待实验的进一步的研究与探讨。

4 结论 (Conclusions)

水样中检测出高浓度的抗生素和抗性基因污染物，污染物种类涵盖待测范围内全部 5 种抗生素和 8 个抗性基因，显示养殖用抗生素的滥用现象十分严重。抗生素与抗性基因相关性分析表明，抗性基因在环境中的归转迁移可能受到除抗生素之外其它环境因素的影响。抗生素及其诱导的抗性基因都可通过动物排泄、地表径流等途径进入湖泊、河流，由于养殖场位于黄浦江上游饮用水水源地并与上海市黄浦江上游来水相接，今后迫切需要开展黄浦江水体中抗生素、抗性基因污染水平的调查研究工作，对抗生素、抗性基因污染的生态风险进行评估。同时，国家应制定一系列关于抗生素使用的标准并制定抗生素污染治理与控制的相关政策和法规，改善我国抗生素污染严重的状况。

参考文献:

- [1] HARTMANN A, ALDER A C, KOLLER T, et al. Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source of human genotoxicity in native hospital wastewater[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1998, 17: 377-382.
- [2] DAUGHTON C G, TERNES T A. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change? [J]. *Environmental Health Perspectives*. 1999, 107, 907-938.
- [3] DAVIDSON J. Genetic exchange between bacteria in the environment [J]. *Plasmid*, 1999, (42): 73-91.
- [4] 王冉, 刘铁铮, 王恬. 抗生素在环境中的转归及其生态毒性[J]. *生态学报*, 2006, 26 (1): 265-271
WANG Ran, LIU Tiezheng, WANG Tian. The fate of antibiotics in environment and its ecotoxicology: A review [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26 (1): 265-270.
- [5] PRUDEN A, PEI R, STORTEBOOM H, et al. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: Studies in Northern Colorado [J]. *Environmental Science and Technology*, 2006, 40: 7445-7450.
- [6] BERTOLLA F, KAY E, SIMONET P. Potential dissemination of antibiotic resistance genes from transgenic plants to microorganisms [J]. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 2000, 21(6): 390-393.
- [7] DANTAS G, SOMMER M O, OLUWASEGUN R D, et al. Bacteria subsisting on antibiotic [J]. *Science*, 2008, 320 (5872): 100-103.
- [8] 蒋培余, 潘劲草. 细菌遗传元件水平转移与抗生素抗性研究进展 [J]. *微生物学通报*, 2006, 33 (4): 167-171.
JIANG Peiyu, PAN Jincuo. Progress in the studies of horizontal transfer of bacteria genetic elements related to antibiotic resistance [J]. *Microbiology*, 2006, 33 (4): 167-171. (in Chinese)
- [9] 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 Qixing, LUO Yi, WANG Meie. Environmental residues and ecotoxicity of antibiotics and their resistance gene pollution: a review [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2007, 2 (3): 243-251.
- [10] 徐冰洁, 罗义, 周启星, 毛大庆. 2010. 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*, 29 (2): 169-178
XU Bingjie, LUO Yi, ZHOU Qixing, et al. Sources, dissemination and ecological risks of antibiotic resistances genes (ARGs) in the environment[J]. *Environmental Chemistry*, 2010, 29 (2): 169-178.
- [11] 王丽梅, 罗义, 毛大庆, 周启星. 抗生素抗性基因在环境中的传播扩散及抗性研究方法[J]. *应用生态学报*, 2010, 21 (4): 1063-1069.
WANG Limei, LUO Yi, ZHOU Qixing, et al. Transport of antibiotic resistance genes in environment and detection methods of antibiotic resistance[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2010, 21 (4): 1063-1069.
- [12] 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.
LUO Yi, ZHOU Qixing. 2008. Antibiotic resistance genes (ARGs) as emerging pollutants [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 28(8): 1499-1505.
- [13] 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 Shichun, ZHU Chunjing, HE Zhumei, 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.
- [14] 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.
- [15] 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.
WU Nan, QIAO Min, ZHU Yongguan. Quantification of five tetracycline resistance genes in soil from a swine feedlot [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2009, 4 (5): 705-710.
- [16] 姜蕾, 陈书怡, 杨蓉, 等. 长江三角洲地区典型废水中抗生素的初步分析[J]. *环境化学*, 2008, 27 (3): 371-373.
JIANG Lei, CHEN Shuyi, YANG Rong, et al. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment of the Changjiang Delta, China [J]. *Environmental Chemistry*, 2008, 27 (3): 371-373.
- [17] 杨红梅, 王浩, 刘艳琴, 等. 高效液相色谱-质谱联用测定乳制品中 6 种四环素类抗生素[J]. *中国乳品工业*, 2007, 35 (11): 50-52.
YANG Hongmei, WANG Hao, LIU Yanqin, et al. Determination of minocycline, Oxytetrocycline, tetracycline, chlortetracycline, methacycline and doxycycline in milk products with LC-MS [J]. *China Dairy Industry*, 2007, 35 (11): 50-52.
- [18] 刘虹, 张国平, 刘丛强. 固相萃取-色谱测定水、沉积物及土壤中氯霉素和 3 种四环素类抗生素[J]. *分析化学*, 2007, 35 (3): 315-319.
LIU Hong, ZHANG Guoping, LIU Congqiang. Determination of chloramphenicol and three tetracyclines by solid phase extraction and high performance liquid chromatography-ultraviolet detection [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2007, 35 (3): 315-319.
- [19] 胡献刚, 罗义, 周启星, 等. 固相萃取-高效液相色谱法测定畜牧粪便中 13 种抗生素药物残留[J]. *分析化学 (FENXI HUAXUE) 研究报告*, 2008, 36 (9): 1162-1166.
HU Xiangang, LUO Yi, ZHOU Qixing, et al. Determination of thirteen antibiotics residues in manure by solid phase extraction and high performance liquid chromatography [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2008, 36 (9): 1162-1166.
- [20] AMINOV R I, GARRIGUES-JEANLEAN N, MACKIE R I. Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 1 (1): 22-32.
- [21] RIVERA I N, LIPP E K, GIL A, et al. Method of DNA extraction and application of multiplex polymerase chain reaction to detect toxigenic vibrio cholerae O and O from aquatic ecosystems [J]. *Environmental Microbiology*, 2003, 5 (7): 599-606.
- [22] PEAK N, KNAPP C W, YANG R K, et al. Abundance of six tetracycline resistance genes in wastewater lagoons at cattle feedlots with different antibiotic use strategies [J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9 (1): 143-151.
- [23] 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.
- [24] SMITH M S, YANG R K, KNAPP C W et al. Quantification of tetracycline resistance Genes in feedlot lagoons by real-time PCR [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, 70 (12): 7372-7377.
- [25] PEI R, CHA J, CARLSON K H et al. Response of antibiotic resistance genes (ARG) to biological treatment in dairy lagoon water [J]. *Environ. Sci. Technol.*, 2007, 41 (14): 5108-5113.
- [26] 林殷. 水中典型抗生素测定及其在黄河和北江河段的污染现状研究[D]. 广州: 中山大学, 2008.
LIN Yin. A typical Study on determination and pollution of antibiotics in the Yellow River and the North River [D]. Guangzhou: Sun Yat-sen University, 2008.
- [27] CHEE-SANFORD J C, AMINOV R I, KRAPAC I J, et al. Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities [J]. *Appl. Environ.*

- Microbiol., 2001, 67: 1494-1502.
- [28] SEVENO N A, KALLIFIDAS D, SMALLA K, et al. Occurrence and reservoirs of antibiotic resistance genes in the environment [J]. Reviews in Medical Microbiology, 2002, 13 (1):15-27.
- [29] 季秀玲, 魏云林, 林连兵. 细菌抗生素和重金属协同选择抗性机制研究进展[J]. 生物技术通报, 2010, 5: 65-69.
- JI Xiuling, WEI Yunlin, LIN Lianbing. Research advances on co-selection resistant mechanisms of antibiotic and heavy metals resistance in bacteria [J]. Biotechnology Bulletin, 2010, 5: 65-69.

Quantitative detection of sulfonamides and tetracycline antibiotics and resistance genes in sewage farms

JI Xiuling, LIU Fang, SHEN Qunhui, LIU Yang

Department of Environmental Science, Donghua University, Shanghai 201620, China

Abstract: The emerging pollution of antibiotics and antibiotic resistance genes (ARGs) has gained great attention around the globe in recent years. In this study, high performance liquid chromatography - mass spectrometry (HPLC-MS) and real-time quantitative PCR (RT-PCR) were used for detecting occurrence of two tetracyclines [tetracycline (TC), oxtetracycline (OTC)], three sulfonamides [sulfamerazine (SDZ), sulfamethazine (SDMe), sulfamethoxazole (SMZ)], and 8 ARGs [*sul* (I), *sul* (II), *sul* (III), *sul* (A), *tet* (M), *tet* (O), *tet* (W), *tet* B(P)] in water samples collected from feedlot wastewater lagoons and irrigation ditch in Shanghai. The detection frequencies of the above 5 antibiotics were 100% in all samples. Antibiotics in feedlot wastewater lagoons are much higher than those in irrigation ditch. The total concentrations of sulfonamides and tetracyclines are $197.7\sim 323.0\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $294.0\sim 376.1\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ respectively. In the collected samples, both the absolute copies and the relative abundances of sulfonamide ARGs are higher than those of tetracycline ARGs. The highest relative abundance of sulfonamide ARGs is *sul* (A), and *tet* (W) is the highest among tetracycline ARGs, with the absolute copies $10^{8.4108}\sim 10^{10.3728}$ and $10^{6.18805}\sim 10^{7.8874}$ respectively. All of the ARGs were detected in the two feedlot wastewater samples. 7 ARGs, except for *tet* B(P), were detected in the irrigation ditch. In Pearson correlation analysis, almost no consistent positive correlations were found between ARGs and "their" antibiotics, except *sul* (III) maintained a significant positive correlation with sulfonamide antibiotics. It indicated that the abundance of ARGs might be affected by other kinds of environmental factors besides antibiotics residues in aquatic environments. This study will help to know the pollution status of the antibiotics and resistance genes in feedlot wastewater in Shanghai and provide valuable data for conducting further researches on pollution of antibiotic and ARGs in the Huangpu River.

Key words: antibiotics; antibiotic resistance genes; high performance liquid chromatography-mass spectrometry; real-time quantitative PCR; sewage; farms