

文章编号: 1674 - 7054(2018)02 - 0147 - 09

东寨港红树林典型区域氯霉素抗性基因的分布

阮孙兰^{1 2 3}, 赵洪伟^{1 2 3}, 张禹^{1 2 3}, 张腾云^{1 2 3},
张鸣珊⁴, 靳晓拓^{1 2 3}, 黎平^{1 2 3}, 刁晓平^{1 3}

(1. 海南大学 南海海洋资源利用国家重点实验室, 海口 570228; 2. 海南大学 海口市环境毒理学重点实验室, 海口 570228;
3. 海南大学 热带农林学院, 海口 570228; 4. 海南省环境科学研究院/海南省环境监测中心, 海口 570228)

摘要: 采用实时荧光定量 PCR 方法, 于 2017 年 8 月采集东寨港红树林区域表层沉积物, 探究氯霉素抗性基因在该区域的污染情况, 同时比较红树区域密林内与密林外沉积物样品中氯霉素抗性基因的分布差异及其与环境因子之间的相关性。结果表明: 该区域受氯霉素抗性基因污染严重, 基因绝对丰度可高达 $108 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$ 数量级; 具有不同耐药机制的氯霉素抗性基因在环境样本中具有不同的组成比例, 始终以 *cml* 基因居多, 证明该地区的氯霉素抗性基因的耐药机制以抗生素主动外排为主; 红树林密林内的沉积物样品中氯霉素抗性基因的绝对丰度比其他样点高; 氯霉素抗性基因与环境因子的相关性分析显示亚硝酸盐 ($\text{NO}_2^- - \text{N}$) 和氯霉素抗性基因具有极显著相关性。

关键词: 氯霉素抗性基因; 红树林; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: X 171 文献标志码: A DOI: 10. 15886/j. cnki. rdsxb. 2018. 02. 004

我国是世界上第一大抗生素使用国, 抗生素的滥用已经成为当今重要的环境卫生问题。抗生素被广泛的应用在医疗以及畜牧和水产养殖等领域, 其中氯霉素属于一种广谱类抗生素, 性质相对稳定, 对致病菌(如大肠杆菌、产气杆菌、伤寒杆菌、流感杆菌和沙门氏菌等)有良好的抑制作用, 曾被广泛的应用于畜牧和水产养殖业的病害防治。但因其具有较强的毒副作用, 能诱发再生障碍性贫血或具有致畸和致白血病等危害^[1], 所以引起国际组织和许多国家的重视。目前, 各国对氯霉素残留限量标准均作出相应的规定, 其中, 美国和欧盟均在法规中规定其为“零允许量”^[2], 而我国则于 1999 年开始在养殖业中禁用该类抗生素。随着各国对于此药物的检测方法不断地完善, 检出限也不断降低, 但是, 因为这种药物价格低廉、广谱、药效好, 仍有许多不法商贩和不法养殖户偷用氯霉素。此外, 有研究表明, 氯霉素的滥用与细菌对氯霉素产生的耐药性具有极强的相关性^[3-4]。长期滥用抗生素容易诱发抗生素抗性基因(antibiotic resistance genes, ARGs)和抗生素抗性细菌(antibiotic resistance bacteria, ARB)的产生^[5]。抗生素抗性基因的危害及对环境的影响超过抗生素, 且抗生素抗性基因在环境中的残留时间远比抗生素要持久^[6]。抗生素抗性基因位于可移动遗传元件上, 可以通过水平基因转移, 在非病原体、病原体, 甚至是革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌之间转移^[7]。据相关研究报道, 目前在各种环境介质中均可检测到抗生素抗性基因。如 Fuentesfria 等通过研究医疗废水, 发现医院废水菌株中抗生素的耐药性较高, 且在這些菌株中观察到多重耐药表型^[8]。Luczkiewicz 等在污水处理厂里的活性污泥里检测出抗性基因^[9]。我国许多江河湖泊都有不同程度的抗生素抗性基因污染, 如南方珠江口河流^[10]、黄浦江流域^[11]和长三角流域^[12]等。近年来, 氯霉素抗性基因被检出时有报道, 如 Lang 等利用功能性宏基因组学研究阿拉斯加地区的土壤, 检出氯霉素

收稿日期: 2018 - 01 - 04

修回日期: 2018 - 02 - 23

基金项目: 海南省重大科技计划项目(ZDKJ2017002); 海南省自然科学基金项目(417053, 317302); 海南省重点研发项目(ZDYF2017050)

作者简介: 阮孙兰(1991 -), 女, 海南大学热带农林学院 2015 级硕士研究生. E-mail: ruansunlan1991@163.com

通信作者: 赵洪伟(1983 -), 男, 副教授, 博士. 研究方向: 污染生态学. E-mail: hwzhao@hainu.edu.cn

和氟苯尼考抗性基因^[13]。Stoll等分析德国和澳大利亚地表水样品中的抗生素抗性基因,检出氯霉素抗性基因且其在澳大利亚样品中基因丰度更高^[14]。此外,抗性基因可以通过各种途径从环境传播到人类,造成人类健康风险。氯霉素抗性基因的耐药作用机制包括酶灭活机制和非酶耐药机制^[15]。氯霉素乙酰转移酶基因(acetyltransferase, *cat*) (如 *catal* *cata2* 等)以酶灭活的耐药机制为主, *cat* 基因通过调控使耐药细菌产生氯霉素乙酰转移酶,使其不能与细菌的核糖体结合,从而达到丧失或减弱氯霉素抗菌的作用^[16]。*cml* 基因(如 *cml_e1* *cml_e3* 和 *cmlA* 等)以合成转运蛋白使抗生素主动外排的非酶耐药机制为主,其简要作用机理是耐药细菌产生膜转运蛋白,以分子泵的形式将氯霉素输送到细胞外,使得菌体内的氯霉素无法达到效应浓度,产生相应的耐药性^[17]。

作为陆地向海洋的过渡带,红树林生态系统具有特殊的生态功能,但人类的行为活动使得红树林的污染越来越严重,红树的种类组成、红树面积以及空间分布等都受到了不同程度破坏。东寨港红树林是经国务院批准的第1个红树林保护区,该区域的红树种类为35种,约占全国的95%^[18]。港内有多条河流流经红树林保护区进而入海,具有丰富的生物多样性^[19]。但经实地考察,发现该地区周边分布着许多养殖场,而抗生素的使用是该地区养殖业控制水产品致病菌感染的重要手段。未经处理的养殖废水中含有多种污染物,其排放流经红树林并对其造成一定的污染。此外,有研究表明,环境中的抗性基因会改变其微生物的群落结构进而影响生态系统的平衡运转,对生态系统造成较大影响^[20]。辛欣等的研究报道,在过去60多年里,海南省失去了约50%的红树林,许多红树林物种已面临濒危^[21]。目前,关于红树林中抗性基因的研究还未见报道。笔者调查了养殖池塘周边环境氯霉素抗性基因的残留情况,同时研究氯霉素抗性基因在红树区域的密林内与密林外的差异,探究环境因子与氯霉素抗性基因之间的相关性,旨在为红树林保护及深入研究提供基础数据。

1 材料与amp;方法

1.1 采样点分布及样品采集 东寨港位于海南省的东北部,属于热带季风海洋性气候,该地区拥有大面积的红树林,且周边分布着大量的养殖池塘。笔者于2017年8月在该区域的红树林湿地林内、林缘和滩涂地采集沉积物表层样品,样点分布如图1所示。样点用GPS进行定位且将其划分为5个断面,D1表示林内样点,D2表示林缘样点,D3表示滩涂临海样点,1D1表示1号断面林内样点,2D1表示2号断面林内样点,其余样点编号以此类推。每个断面均采集表层沉积物(0~10 cm),每个样点的沉积物在“1 m × 1 m”样方范围内采集5个生物学重复,剔除枝条及石子等,于密封袋中混合均匀后放入冰盒中带回实验室。一部分沉积物样品置于-80℃用于分子生物学实验,一部分沉积物样品于4℃下冷藏保存,用于理化性质分析。

1.2 仪器及试剂 实验中用到的主要仪器:NanoDrop 2000 微量分光光度计(Thermo Fisher Scientific,美国)、琼脂糖凝胶电泳仪(Bio-Rad,美国)、PCR仪(Bio-Rad T100 Thermal Cycler,美国)、荧光定量PCR仪(Roche LightCycler 96,美国)、凝胶成像仪(Bio-Rad,美国)等。

实验中用到的主要试剂:PowerSoil™ DNA Isolation Kit 试剂盒(MiBio,美国)、SanPrep 柱式DNA胶回收试剂盒(生工,上海)、引物(生工,上海)、pGEM-T Easy 载体(Promega,美国)、Trans5α 化学感受态细胞(全式金,北京)、SanPrep 柱式质粒提取试剂盒(生工,上海)、SYBR Green Master Mix (Promega,美国)。

1.3 沉积物微生物总DNA的提取 每个样点设置3个生物学重复,每个重复称取0.25~0.35 g新鲜样品,利用PowerSoil™ DNA Isolation Kit 试剂盒提取沉积物样品中微生物总DNA。所提取的DNA样品用NanoDrop 2000 微量分光光度计测量DNA的纯度(OD: 1.7~1.9)和浓度并存储于-80℃冰箱备用。

1.4 荧光定量PCR 取出DNA样品于冰上冻融,利用荧光定量PCR的方法对样品中4种氯霉素抗性基因(*catal* *cata2* *cmle_1* 和 *cmle_3*)进行扩增。反应体系为25 μL,其中包括14.5 μL Green Master Mix,各1.5 μL 10 μmol · L⁻¹的上下游引物(引物详细信息见表1)^[22] 2 μL的DNA模板(质量浓度范围在10~50 mg · L⁻¹) 5.5 μL的无酶水。扩增条件如下:94℃预变性4 min;94℃变性30 s,58℃退火30 s,72℃延伸1 min,共35个循环。用琼脂糖凝胶电泳检测其扩增结果(胶浓度为2%,电压为120 V,时间为20~30 min)。利用SanPrep 柱式DNA胶回收试剂盒对PCR产物纯化回收。将扩增产物连接到pGEM-T

Easy 载体中,然后转化到 Trans5 α 化学感受态细胞中进行摇菌培养。经蓝白斑筛选,并挑取阳性克隆过夜培养后提取质粒于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。具体操作及实验步骤参考《分子克隆实验指南(第3版)》。

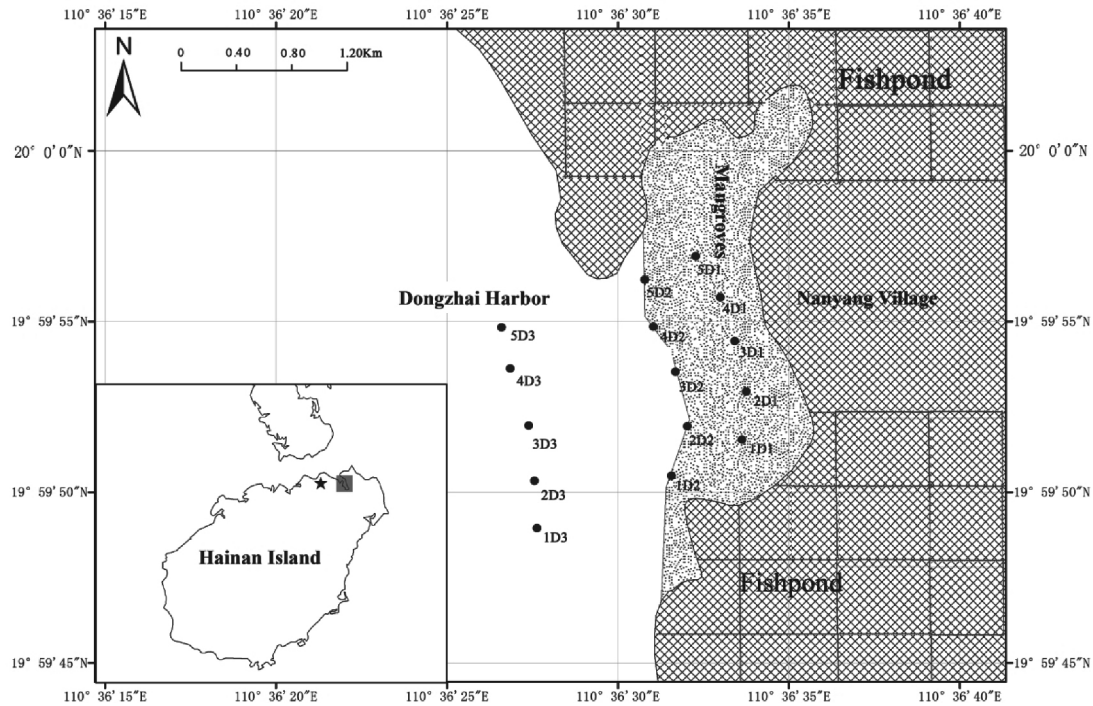


图1 东寨港红树林区表层沉积物采样点分布

字母 D 代表东寨港红树林区域的沉积物样点,分为 5 个断面,每个断面 3 个样点,其中 D1 为林内样点,D2 为林缘样点,D3 为滩涂临海样点,1D1 表示 1 号断面林内样点,2D1 表示 2 号断面林内样点,其余样点编号以此类推

Fig. 1 The sampling sites of surface sediment in Mangroves, Dongzhai Harbor

D represents the sediment sampling site of mangroves in Dongzhai Harbor, and was divided into five transects. Each transect was composed of three sampling sites, D1, D2, and D3. D1 was located in the middle of a mangrove swamp; D2 was near the mangroves; and D3 was located at mud flats. The 1D1 represents the mangrove samples in the first transect. The 2D1 represents the mangrove samples in the second transect. The remaining sampling sites were coded as such

1.5 标准曲线的绘制及样品的测定 利用 NanoDrop 2000 微量分光光度计测定 4 种氯霉素抗性基因的初始质粒质量浓度(所用质粒及质粒质量浓度见表 1)并以 10 倍梯度进行稀释,通过 real-time quantitative PCR (RT-qPCR) 后记录 cycle threshold (C_t) 值绘制标准曲线,利用 RT-qPCR 测定所有样品中氯霉素类抗性基因(*catal*, *cata2*, *cmle_1* 和 *cmle_3*)和 16S rRNA 的 C_t ,代入标准曲线,计算获得各基因的绝对丰度。反应体系为 $10\text{ }\mu\text{L}$,其中包括 $5\text{ }\mu\text{L}$ SYBR Green Master Mix,各 $0.5\text{ }\mu\text{L}$ $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的上下游引物(表 1)^[22] $2\text{ }\mu\text{L}$ 的 DNA 模板(质量浓度范围在 $10\sim 50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) $2\text{ }\mu\text{L}$ 的无酶水。扩增条件如下: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预孵育 10 min ; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s ; $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 60 s ; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s ,总共 45 个循环;熔解条件为 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s , $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 60 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s 。将得到的 C_t 值通过标准曲线换算为单位样品中该基因的拷贝数^[22]。拷贝数换算公式:

$$C = 6.02 \times 10^{23} \times (C_0 \times 10^{-9} / M),$$

式中, $M = (\text{载体碱基数} + \text{目的片段碱基数}) \times 660$, C_0 为质粒初始质量浓度, C 为质粒拷贝数 ($\text{copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)。每个样品进行 3 次重复实验,基因有效检出标准为 3 次均是阳性扩增。

1.6 理化性质分析 硝酸盐(NO_3^--N)、亚硝酸盐(NO_2^--N)和铵氮(NH_4^+-N)3 项营养盐的质量浓度采用氯化钾溶液提取-分光光度法测定,具体方法和前处理过程参考《环境标准 HJ 634—2012 土壤氨氮、亚硝酸盐氮、硝酸盐氮的测定氯化钾溶液提取-分光光度法》^[23]。总磷的测定方法为钼酸铵分光光度法,具体方法和前处理过程参考《GB17378.5—2007 海洋监测规范 第 5 部分:沉积物分析》^[24],含水率的测定采用比重法,pH 及盐度分别采用 pH 计和盐度计测定。

表 1 氯霉素抗性基因引物序列、质粒及标准曲线

Tab.1 Sequences of the primers, plasmid and standard curve of chloramphenicol resistance genes

基因 Gene	引物序列 Primer sequence	质粒初始质量浓度 Initial concentration of plasmids/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	片段长度 Fragment length/bp	标准曲线 Standard curve	扩增效率 Amplification efficiency/%
<i>catal</i>	CACCAGCTCACCGTCTTTCA ACCTATAACCAGACCGTTCAGC	33.8	156	$y = -3.5004x + 37.309$ ($R^2 = 0.9951$)	91
<i>cata2</i>	CCTGGGTGAGTTTTCACGGA CGCGGTTATCTTCCTGCTGA	363.9	102	$y = -3.0544x + 33.499$ ($R^2 = 0.9977$)	105
<i>cmle_1</i>	TGCGTTTCTAGGTTTGGGCA GTTTCAGGCACTTAACGGGGA	36.3	126	$y = -3.3999x + 38.579$ ($R^2 = 0.9977$)	97
<i>cmle_3</i>	ACGTTTATGCCAACCGTCCT TGAATATCGCCTGCCATCCC	22.7	131	$y = -3.4331x + 39.33$ ($R^2 = 0.9969$)	97
16S rRNA	ATGGCTGTCGTCAAGCT ACGGGCGGTGTGTAC	332	345	$y = -3.3324x + 41.614$ ($R^2 = 0.9969$)	99.5

1.7 数据统计分析 通过使用 Excel 2010 来处理 C_i 值, 获得氯霉素抗性基因的标准曲线和拷贝数。使用 SPSS 22 软件进行 Pearson 双变量相关分析。Origin 2015 软件进行数据的可视化。

2 结果与分析

2.1 东寨港红树林区域氯霉素抗性基因的分布特征 通过对东寨港红树林湿地各样品表层沉积物中抗性基因的定量分析, 从图 2 可知, 氯霉素抗性基因(*catal*, *cata2*, *cmle_1* 和 *cmle_3*) 在各样点均有检出, 且基因拷贝数最高可达 10^8 数量级。其中, 氯霉素 4 种抗性基因丰度分布规律一致, 均表现为 1 号断面抗性基因丰度较 2、3 号断面高。其中 5D1 的基因丰度最高, 分别为 $5.68 \times 10^6 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$ (*catal*)、 $6.35 \times 10^5 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$ (*cata2*)、 $7.67 \times 10^6 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$ (*cmle_1*) 和 $1.19 \times 10^8 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$ (*cmle_3*)。 *catal* 基因的最小绝对丰度为 $1.19 \times 10^5 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$ (2D3), *cata2* 基因的最小绝对丰度为 $1.43 \times 10^4 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$ (3D2), *cmle_1* 基因的最小绝对丰度为 $1.21 \times 10^5 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$ (2D1), *cmle_3* 基因的最小绝对丰度为 $1.63 \times 10^6 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$ (2D3)。为了减小由于沉积物样品中细菌数量的不同以及 DNA 提取过程所带来的偏差, 笔者将沉积物样品中抗性基因的绝对拷贝数比上对应环境样品中的 16S rRNA 基因拷贝数, 通过相对丰度来进一步研究抗性基因在环境中的分布规律。由图 2 可以看出, 氯霉素抗性基因的绝对丰度和相对丰度分布趋势一致。

东寨港红树林区域中氯霉素总抗性基因在林内、林缘和滩涂地的分布如图 3 所示。从图 3 可知, 3 个不同环境中氯霉素抗性基因的丰度也不一样, 红树林林内(即 D1)所采集的沉积物样品中抗性基因丰度最高($2.34 \times 10^8 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$), 林缘抗性基因丰度次之($1.02 \times 10^8 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$), 滩涂地抗性基因丰度最低($8.44 \times 10^7 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$)。由采样点的分布情况可以获知 D1、D2、D3 样点离养殖池塘的距离依次增大, 且 4 种氯霉素抗性基因总绝对丰度随着远离红树林密林的距离的不断增大而降低, 这表明抗生素抗性基因的丰度与抗生素的暴露具有相关性。研究发现抗生素残留的分布与红树林湿地中的生境变化有明显的相关性^[25]。Zhao 等研究发现, 通过将抗生素作为饲料添加剂喂食猪, 其肠道中的抗性基因丰度与抗生素的添加情况具有相关性^[26]。且 Hoelzer 等研究发现, 对食源性动物使用大量的抗生素, 其产生的抗性基因会传播给人类, 影响人类健康^[27]。

2.2 东寨港红树林区域氯霉素抗性基因组成比例 从图 4 可知, 氯霉素 4 种抗性基因在不同样点的组成比例较一致, 均以 *cmle_3* 所占比例最大, 约 83% ~ 94%; *catal* 基因和 *cmle_1* 基因所占比例相当; *cata2* 基因的比例最小, 所占比例小于 4%。因此, 该区域氯霉素抗性基因的分布主要以 *cmle* 基因为主。抗生素抗性基因的耐药机制主要是微生物通过抗生素抗性基因来表达蛋白质, 该蛋白具有降解或消除对抗生素敏感性的作用。具体包括 4 种机制^[28]: 对细菌表面进行改变, 阻止抗生素的进入; 对抗生素进行化学修饰使其失活; 通过改变或转移原始抗生素的目标靶位, 使抗生素失效; 迅速排出抗生素, 使其无法达到有效浓度。

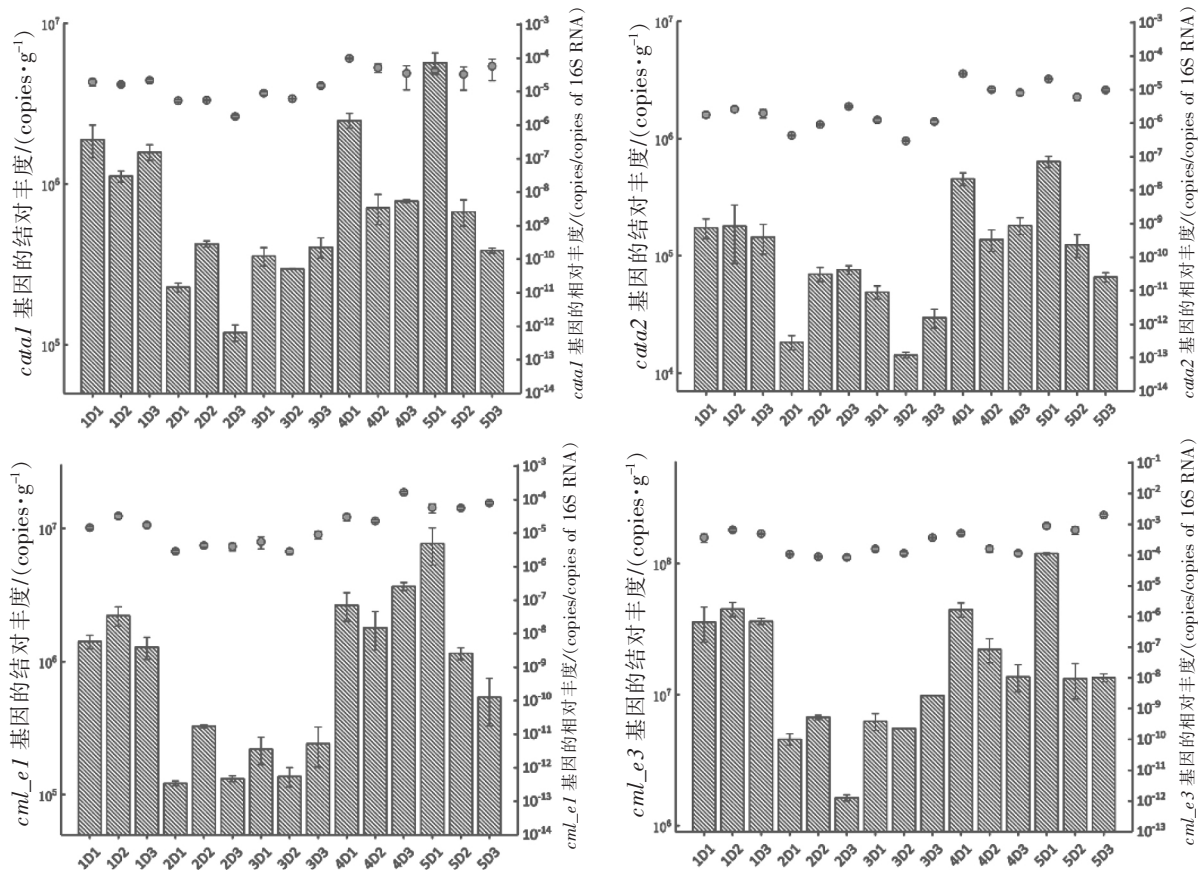


图 2 氯霉素抗性基因在东寨港红树林区域表层沉积物中的丰度分布

横坐标表示的是不同的采样点,柱状图代表的是 4 种抗性基因在不同样点的绝对丰度,散点代表 4 种抗性基因在不同样点的相对丰度;误差棒是通过 3 次有效重复求得的误差值

Fig. 2 Levels of CRGs among the surface sediment samples in Dongzhai Harbor

Horizontal axis indicates different sampling sites. Bar charts represent the absolute abundance of four ARGs at different sampling sites. Scatter plots represent the relative abundance of four ARGs at different sampling sites. The error bars are obtained by the errors of three effective replicates

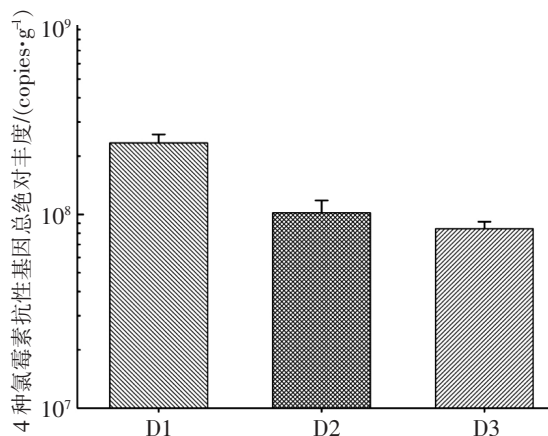


图 3 4 种氯霉素抗性基因林内、林缘和滩涂地的分布
Fig.3 Distribution of four CRGs in mangrove, mangrove margin and mud flats

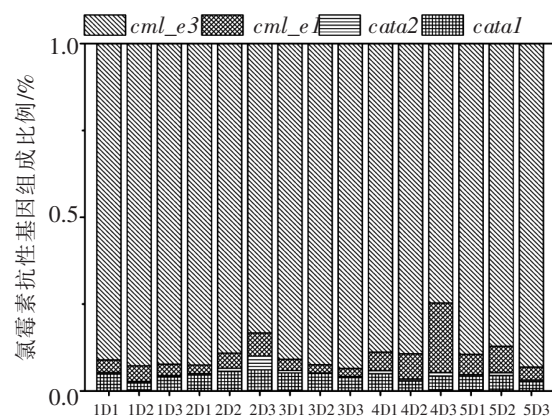


图 4 东寨港红树林区域氯霉素 4 种抗性基因在不同样点的百分比

Fig.4 The percentage composition of the four CRGs at different sampling sites in mangrove, Dongzhai Harbor

2.3 氯霉素抗性基因与环境因子的相关性

2.3.1 不同试验样点氯霉素抗性基因的内在联系 通过 SPSS 22 对氯霉素抗性基因进行相关性分析,由

表2可见,氯霉素4种抗性基因呈极显著相关。抗生素抗性基因的传播扩散可以通过基因水平转移实现,主要是可移动遗传因子(如转座子、质粒等)通过不同方式(包括转化、转导和接合)将抗性基因从一个菌株转移到另一个菌株^[29]。这些不同的抗性基因可能位于同一个可移动遗传因子上,因此在传播过程会一起进行转移,该菌株即具有多重耐药性。Sams发现 *cat* 基因和 *cmlA* 基因都位于质粒上^[30]。Shaw等发现非酶抗性基因 *cml* 由质粒介导,可以在大肠杆菌中表达,既可单独存在,也可与 *cat* 共同存在^[31]。这就证实了氯霉素的两大类抗性基因之间具有相关性。

表2 氯霉素抗性基因间的相关性

Tab.2 Correlations between chloramphenicol resistance genes

基因 gene	<i>catal</i>	<i>cata2</i>	<i>cml_e1</i>	<i>cml_e3</i>
<i>catal</i>	1	0.945**	0.900**	0.975**
<i>cata2</i>	0.945**	1	0.910**	0.915**
<i>cml_e1</i>	0.900**	0.910**	1	0.901**
<i>cml_e3</i>	0.975**	0.915**	0.901**	1

注: ** . 在0.01水平(双尾)极显著相关

Note: ** . Correlation is highly significant at the 0.01 level (2-tailed)

2.3.2 不同试验样点氯霉素抗性基因与环境因子的相关关系 东寨港红树林区域不同样点的环境因子质量浓度见表3。本研究涉及的环境因子主要有含水率、氨氮($\text{NH}_4^+\text{-N}$)、亚硝酸盐($\text{NO}_2^-\text{-N}$)、硝酸盐($\text{NO}_3^-\text{-N}$)、TP-P、pH和盐度。通过Pearson双变量相关分析,可以得到各环境因子与抗性基因之间的相关性(表4)。结果表明, $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 与氯霉素4种抗性基因均具有极显著相关性;含水率和 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 与氯霉素各抗性基因具有正相关关系,但不显著; $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 、pH和盐度与氯霉素各抗性基因呈负相关关系;除了*cml_e3*基因外,其余3个基因与TP-P具有正相关关系。Rochelle的研究发现,pH能影响接合质粒的转移^[32],这4种抗性基因位于质粒上,因此受pH的影响。郭业彬的研究也证实了pH能影响大肠杆菌抗性基因水平转移^[33]。反硝化过程主要是由反硝化细菌完成的,亚硝态氮还原步骤是由*nirS*基因控制,尹国宇等通过研究*nirS*基因,发现抗生素抗性基因对于反硝化细菌的活性提高有促进的作用^[34]。

表3 红树林区域环境因子组成

Tab.3 Composition of environmental factors in the Mangrove area

样点 Sampling site	w(水分) Water content/%	$\text{NH}_4^+\text{-N}/$ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	$\text{NO}_2^-\text{-N}/$ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	$\text{NO}_3^-\text{-N}/$ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	TP-P/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	盐度 Salinity	pH
1D1	27.79	3.98	21.93	524.09	3.51	30.40	6.79
1D2	26.72	2.64	80.26	143.81	2.54	31.10	7.21
1D3	32.39	2.40	48.74	164.61	7.80	32.30	7.67
2D1	25.67	2.67	42.43	273.31	3.47	29.00	6.45
2D2	30.83	4.26	5.75	120.62	2.78	29.40	6.91
2D3	32.39	4.20	27.56	17.87	5.22	30.10	7.29
3D1	31.92	2.37	24.74	599.50	3.09	29.40	6.43
3D2	26.47	1.86	28.64	400.98	2.43	30.30	7.10
3D3	21.66	1.21	25.52	637.58	5.26	31.00	7.38
4D1	28.97	3.01	50.31	277.50	4.19	28.70	6.64
4D2	29.63	3.71	25.25	137.27	2.89	29.90	7.05
4D3	26.69	1.81	26.30	546.02	7.70	30.5	7.54
5D1	32.35	4.48	95.66	249.43	3.99	29.10	6.45
5D2	30.23	3.97	39.10	222.79	2.80	31.00	7.15
5D3	28.99	1.85	18.15	82.41	7.21	31.30	7.59

表 4 环境因子与氯霉素抗性基因间的相关性

Tab. 4 Correlations between the environmental factors and the CRGs

	<i>catal</i>	<i>cata2</i>	<i>cml_e1</i>	<i>cml_e3</i>
水分含量 Water content/%	0.315	0.325	0.234	0.285
$\text{NH}_4^+ \text{-N}/(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$	0.409	0.414	0.314	0.373
$\text{NO}_2^- \text{-N}/(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$	0.740**	0.718**	0.723**	0.824**
$\text{NO}_3^- \text{-N}/(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$	-0.023	-0.094	-0.004	-0.103
TP-P/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	0.001	0.015	0.098	-0.024
盐度 Salinity	-0.270	-0.363	-0.233	-0.170
pH	-0.383	-0.361	-0.228	-0.313

注: ** . 在 0.01 水平(双尾)极显著相关

Note: ** . Correlation is highly significant at the 0.01 level (2-tailed)

3 讨 论

研究结果表明:(1)4种氯霉素抗性基因在东寨港红树林生态系统中具有较高的丰度,对该区域环境造成了较大的生态风险,且具有比较明显的空间异质性,应引起重视。该区域红树林呈长条状,且两端分布着许多养殖池塘,养殖户通过喷洒对池塘施用抗生素,未经处理的污水直接排放,流经红树林区域,造成不同程度的抗生素残留及其抗性基因污染,也不排除生活污水带来的影响。抗生素滥用致使各环境介质中抗性基因丰度增加,这与前人研究外源性抗生素是诱导抗性基因污染的重要因素结论一致。如 Luo 等研究了我国海河中抗生素抗性基因发生的趋势,其结构显示磺胺抗性基因丰度与磺胺类抗生素残留呈显著正相关^[35]。Zhu 等通过对施用抗生素和未施用抗生素的土壤样品进行抗生素抗性基因检测,结果发现施用抗生素的样品中抗性基因的丰度比对照样品高^[36]。Li 和 Wu 的研究也证实了抗生素的不断暴露会导致对抗性基因的选择性压力^[37-38]。抗生素抗性基因可以在不同的环境介质中进行传播扩散且难降解。环境中的细菌存在内在抗性,低浓度抗生素可被视为微生物种群间或种群内的信号分子,但在环境抗生素污染的严重的情况下加速了细菌抗性基因突变和抗性基因水平转移^[39]。氯霉素抗性基因在红树林密林内的沉积物样品中相对丰度较其余样点高,可能是因为红树林生态系统具有微生物多样性,是发现微生物新物种的重要资源,再遭受大量抗生素污染,抗性基因极易在微生物之间进行表达和传播。(2)不同环境样本中氯霉素 4 种抗性基因所占比例各不相同。由于基因信息在传递过程中受相关质粒或宿主菌等局限,不同抗性基因在环境介质中的组成比例存在差异。各基因在各样点中代谢速率也存在差异。东寨港红树林区域始终是 *cml* 基因丰度为最高比例,说明该区域氯霉素抗性基因主要是以抗生素主动外排机制为主,而抗生素活性结构破坏机制占少数,关于氯霉素耐药基因的治理应提高对 *cml* 基因的重视程度。(3)通过 Pearson 双变量相关分析,氯霉素抗性基因虽然具有不同的耐药作用机制,但氯霉素抗性基因之间存在内在的相关性。不仅氯霉素抗性基因之间具有相关性,不同抗生素的抗性基因之间也具有一定的相关性。氯霉素抗性基因与亚硝酸盐有极显著的相关性,后续检测应重点观察这两个指标。综上所述,该红树林区域受氯霉素抗性基因污染较严重,抗性基因应作为该区域环境监测的重要指标,为红树林的合理开发利用提供科学的数据及理论支持。此外,红树林作为极为重要的生态系统,过度的养殖行业已经对该区域造成了一定的生态风险,为了维持红树林湿地生态系统的平衡运转,应加强相关行业及领域的管理。

参考文献:

- [1] Turton J A , Havard A C , Robinson S , et al. An assessment of chloramphenicol and thiamphenicol in the induction of aplastic anaemia in the BALB/c mouse [J]. Food & Chemical Toxicology , 2000 , 38 (10) : 925 - 938.

- [2] 李诚. 抗菌药物残留检测方法研究动态 [J]. 肉品卫生, 1993(10): 23-25.
- [3] Varga C, Rajic A, Mcfall M E, et al. Associations between reported on-farm antimicrobial use practices and observed antimicrobial resistance in generic fecal *Escherichia coli* isolated from Alberta finishing swine farms [J]. Preventive Veterinary Medicine, 2009, 88(3): 185-192.
- [4] Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, et al. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2004, 28(5): 519-542.
- [5] 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.
- [6] 王双玲, 王礼, 周贺, 等. 饮用水系统中抗生素抗性基因的研究进展 [J]. 环境化学, 2017, 36(2): 229-240.
- [7] Roberts M C. Update on acquired tetracycline resistance genes [J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 245(2): 195-203.
- [8] Fuentesfria D B, Ferreira A E, Corção G. Antibiotic resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospital waste water and superficial water: Are they genetically related [J]. Journal of Environmental Management, 2011, 92(1): 250-255.
- [9] Łuczkiwicz A, Jankowska K, FudalaksiażEk S, et al. Antimicrobial resistance of fecal indicators in municipal wastewater treatment plant [J]. Water Research, 2010, 44(17): 5089-5097.
- [10] Chen B, Liang X, Huang X, et al. Differentiating anthropogenic impacts on ARGs in the Pearl River Estuary by using suitable gene indicators [J]. Water Research, 2013, 47(8): 2811-2820.
- [11] 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.
- [12] Guo X, Li J, Yang F, et al. Prevalence of sulfonamide and tetracycline resistance genes in drinking water treatment plants in the Yangtze River Delta, China [J]. Science of the Total Environment, 2014, 493: 626-631.
- [13] Lang K S, Anderson J M, Schwarz S, et al. Novel florfenicol and chloramphenicol resistance gene discovered in Alaskan soil by using functional metagenomics [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2010, 76(15): 5321-5326.
- [14] Stoll C, Sidhu J P, Tiehm A, et al. Prevalence of clinically relevant antibiotic resistance genes in surface water samples collected from Germany and Australia [J]. Environmental Science & Technology, 2012, 46(17): 9716-9726.
- [15] 杜向党, 阎若潜, 沈建忠. 氯霉素类药物耐药机制的研究进展 [J]. 动物医学进展, 2004, 25(2): 27-29.
- [16] Miyamura S. Inactivation of chloramphenicol by chloramphenicol resistant bacteria [J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2010, 53(6): 604-607.
- [17] George A M, Hall R M. Efflux of chloramphenicol by the *cmlA1* protein [J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 209(2): 209-213.
- [18] 胡杰龙, 辛琨, 李真, 等. 海南东寨港红树林保护区碳储量及固碳功能价值评估 [J]. 湿地科学, 2015, 13(3): 338-343.
- [19] 胡亚强, 丁敬敬, 黄勃, 等. 东寨港红树林夏季浮游动物的多样性 [J]. 热带生物学报, 2016, 7(1): 23-29.
- [20] Dantas G, Sommer M O, Oluwasegun R D, et al. Bacteria subsisting on antibiotics [J]. Science, 2008, 320(5872): 100-103.
- [21] 辛欣, 宋希强, 雷金睿, 等. 海南红树林植物资源现状及其保护策略 [J]. 热带生物学报, 2016, 7(4): 477-483.
- [22] 李壹, 曲凌云, 朱鹏飞, 等. 山东地区海水养殖区常见抗生素耐药菌及耐药基因分布特征 [J]. 海洋环境科学, 2016, 35(1): 55-62.
- [23] 环境保护部. 土壤氨氮、亚硝酸盐氮、硝酸盐氮的测定氯化钾溶液提取——分光光度法: HJ 634-2012 [S]. 北京: 国家质量监督检验检疫总局, 2012.
- [24] 国家海洋环境监测中心. 海洋监测规范 第5部分: 沉积物分析: GB 17378.5-2007 [S]. 北京: 国家质量监督检验检疫总局, 2007.
- [25] 张宇. 红树林湿地沉积物对河口水体中典型磺胺类抗生素锁定能力的比较研究 [D]. 厦门: 厦门大学, 2015.
- [26] Zhao Y, Su J Q, An X L, et al. Feed additives shift gut microbiota and enrich antibiotic resistance in swine gut [J]. Science of the Total Environment, 2017, 106(10): 1-9.
- [27] Hoelzer K, Wong N, Thomas J, et al. Antimicrobial drug use in food producing animals and associated human health risks: what, and how strong, is the evidence [J]. BMC Veterinary Research, 2017, 1(13): 211-249.
- [28] Krulwich T A, Lewinson O, Padan E, et al. Do physiological roles foster persistence of drug/multidrug efflux transporters A case study [J]. Nature Reviews Microbiology, 2005, 3(7): 566-572.
- [29] 杨凤霞, 毛大庆, 罗义, 等. 环境中抗生素抗性基因的水平传播扩散 [J]. 应用生态学报, 2013, 24(10): 2993-3002.
- [30] Sams R A. Chemistry and metabolism of a novel-broad-spectrum antibiotic [J]. Tierärz. Umschau, 1995, 50(10): 703-707.
- [31] Shaw W V. Bacterial resistance to chloramphenicol [J]. British Medical Bulletin, 1984, 40(1): 36-41.

- [32] Rochelle P A , Fry J C , Day M J. Factors affecting conjugal transfer of plasmids encoding mercury resistance from pure cultures and mixed natural suspensions of epilithic bacteria [J]. J. Gen Microbiol , 1989 , 135 (2) : 409 – 424.
- [33] 郭业彬, 舒为群, 常晓松, 等. 温度与 pH 值对长江水系产超广谱 β -内酰胺酶大肠埃希菌耐药基因转移影响分析 [J]. 微生物学杂志, 2010 , 30 (5) : 29 – 35.
- [34] 尹国宇. 河口近岸氮素的削减途径及抗生素的影响机理研究 [D]. 上海: 华东师范大学, 2015.
- [35] Luo Y , Mao D , Rysz M , et al. , Trends in antibiotic resistance genes occurrence in the Haihe River , China [J]. Environmental Science & Technology , 2010 , 44 (19) : 7220 – 7225.
- [36] Zhu Y G , Johnson T A , Su J Q , et al. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America , 2013 , 110 (9) : 3435 – 3440.
- [37] Li J , Wang T , Shao B , et al. Plasmid mediated quinolone resistance genes and antibiotic residues in wastewater and soil adjacent to swine feedlots: potential transfer to agricultural lands [J]. Environmental Health Perspectives , 2012 , 120 (8) : 1144 – 1149.
- [38] Nan W , Min Q , Bing Z , et al. Abundance and diversity of tetracycline resistance genes in soils adjacent to representative swine feedlots in China [J]. Environmental Science & Technology , 2010 , 44 (18) : 6933 – 6939.
- [39] Aminov R I. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature [J]. Environmental Microbiology , 2009 , 11 (12) : 2970 – 2988.

Distribution of Chloramphenicol Resistance Genes in the Typical Area of Mangroves in Dongzhai Harbor , Hainan , China

RUAN Sunlan^{1,2,3} , ZHAO Hongwei^{1,2,3} , ZHANG Yu^{1,2,3} , ZHANG Tengyun^{1,2,3} ,
ZHANG Mingshan⁴ , JIN Xiaotuo^{1,2,3} , LI Ping^{1,2,3} , DIAO Xiaoping^{1,3}

(1. State Key Laboratory of Marine Resource Utilization of South China Sea , Hainan University , Haikou , Hainan 570228 , China;

2. Haikou Key Laboratory of Environmental Toxicology , Hainan University , Haikou , Hainan 570228 , China;

3. Institute of Tropical Agriculture and Forestry , Hainan University , Haikou , Hainan 570228 , China;

4. Hainan Research Academy of Environmental Science & Hainan Environmental Monitoring Center , Haikou , Hainan 570228 , China)

Abstract: The long-term abuse of antibiotics has led to the rapid growth of drug-resistant bacteria in the environment. The distribution and mechanism of antibiotics resistance genes (ARGs) have attracted public attention. ARGs , as an emerging contaminant , not only have a serious impact on the environment , but also pose a potential threat to the health of organisms and human beings. The surface sediment of the mangrove area in Dongzhai Harbor , Haikou , Hainan , China was collected in the mangroves , near the mangroves and the mud flats in August , 2017 to determine the abundance of ARGs by using real-time quantitative PCR in a view to investigate the pollution of chloramphenicol resistance genes (CRGs) in this area. The distribution of CRGs in the sediment samples in the mangroves , near the mangroves and in the mud flats was analyzed and compared , and the correlation between the CRGs and the environmental factors were analyzed. The results showed that this area was seriously polluted by CRGs , with an absolute abundance of CRGs being $108 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$. CRGs with different resistance mechanisms had different compositional ratios in the environmental samples , of which the *cml* gene was always the highest in the compositional ratios of all the samples , indicating that the resistant mechanism of CRGs is based on active efflux of antibiotics. The sediment samples in the mangroves showed higher absolute abundance of CRGs than those near the mangroves or in the mud flats. Correlation analysis between the CRGs and the environmental factors showed that $\text{NO}_2^- - \text{N}$ was highly significantly correlated with the CRGs.

Keywords: chloramphenicol resistance genes; mangroves; real-time quantitative PCR

(责任编辑: 潘学锋)