

禽畜粪肥对农田蔬菜中抗生素抗性内生菌的影响

王瑞飞^{1a,b}, 郭玉晖^{1a}, 俞宁², 杨清香^{1a,b}

(1. 河南师范大学 a. 生命科学学院; b. 资源微生物与功能分子河南省高校重点实验室
培育基地, 河南 新乡 453007; 2. 新乡市环境保护监测站, 河南 新乡 453000)

摘要:选取常食农田茎叶类蔬菜——上海青和芹菜为研究对象, 探讨禽畜粪肥对蔬菜抗生素抗性内生菌的影响。结果表明: 施加粪肥的农田上海青及芹菜样品的根、茎、叶中抗阿莫西林、头孢氨苄、四环素的单抗性内生细菌的数量均比未施加粪肥组高, 它们的相对百分比含量比未施加组高出9~19倍。其中, 从施加禽畜粪肥上海青中分离获得的多重抗生素抗性细菌—嗜麦芽寡养单胞菌, 可能引起多种人类疾病, 尤其值得关注。

关键词: 抗生素; 蔬菜; 抗生素性内生细菌; 禽畜粪便

中图分类号: Q939

文献标志码: A

几十年来, 兽药抗生素被畜牧养殖业广泛用于防病、治病、促进动物生长和提高产量^[1]。它们的使用给人们带来了巨大经济效益, 但是, 近年来的研究表明, 兽药抗生素的过度使用可能对人类生存环境造成极大威胁^[2]。一方面, 兽用抗生素对禽畜肠道内的抗性菌群进行选择, 使禽畜粪便成为抗生素抗性菌及抗性基因的巨大储存库。这些抗生素抗性菌群及抗性基因随粪肥进入农田, 将抗性基因传递给土壤中的其他微生物, 导致土壤中抗生素性微生物增加^[3-5]。另一方面, 兽药抗生素在动物体内只有大约10%~20%被吸收, 其余均以原药或代谢物的形式随畜禽排泄物排出^[6]。这些残留抗生素进入农田土壤环境, 也将对土壤中的抗性微生物进行选择。而且, 抗生素的这种选择压力经常与抗性基因水平转移进程相偶联, 克服基因水平转移的环境障碍, 促进土壤中多重抗生素抗性细菌的出现。这些多重抗生素抗性细菌对人类可能造成的直接或间接威胁已引起各国政府和研究人员的高度关注。

植物内生菌是指一些生存于健康植物组织或者器官内的内生菌, 它们能够与植物之间形成互利互惠的中性关系^[6]。通常认为, 这些植物内生菌主要来自于植物根际土壤^[7]。因此, 禽畜粪肥中的抗生素抗性菌或抗性基因极有可能通过土壤进入蔬菜, 并最终影响人类健康。在我们前期的研究中发现施加畜禽粪肥的芹菜、小白菜等蔬菜中有一定量抗生素抗性内生细菌的存在^[8]。然而, 施加粪肥如何影响蔬菜中的抗生素抗性内生细菌群落? 土壤中的多重抗生素抗性内生细菌能否直接进入蔬菜内生菌系统等问题目前还没有深入的报道。在本研究中, 我们选取常食农田茎叶类蔬菜—上海青和芹菜为研究对象, 通过平板菌落计数的方法检测了施加畜禽粪肥和不施加畜禽粪肥的蔬菜中抗阿莫西林(Amoxicillin trihydrate)、头孢氨苄(Cephalexin monohydrate)、四环素(Tetracyclin hydrachloride)或庆大霉素(Gentamicin sulphate)的抗性内生细菌的数量和比例。进一步, 通过16S rDNA测序及系统进化树构建, 我们对分离所得的多重抗性内生细菌的类群进行了深入分析。

1 材料与方法

1.1 蔬菜样品的采集

本研究所选取的蔬菜样品—上海青(pakchoi, *Brassicachinensis*L.)和芹菜(celery, *Apiumgraveolens*

收稿日期: 2016-01-14; 修回日期: 2016-05-20.

基金项目: 国家自然科学基金(21477035; 21277041); 教育部博士点基金项目(20134104110006).

第1作者简介: 王瑞飞(1983—), 男, 河南汝州人, 河南师范大学讲师, 博士, 研究方向为农业微生物学.

通信作者: 杨清香, 教授, 博导, E-mail: yangqx66@163.com.

Linn),均取自于河南省新乡市周边蔬菜大棚.其中,未施加畜禽粪肥,只施加复合肥的蔬菜每次灌溉时施用冲施肥(大约10 d施一次或者15 d一次);施用畜禽粪肥的蔬菜平均每年每亩施用的底肥(鸡粪或猪粪)在10 t左右.禽畜粪肥来源于定期或不定期使用抗生素的养殖场.

样品采集时间为蔬菜的成熟期.采样方法为五点取样法,在每个采样点采集3到4棵完整植株(包括根),置于4℃低温保温箱中,立即带回实验室,3 h内做消毒处理.

1.2 蔬菜样品的表面消毒处理

蔬菜表面的消毒处理参考文献中的方法进行^[8],但依据实际情况有所修改.简单来说,将蔬菜样品的完整植株置于流水下冲洗干净,风干或用吸水纸吸干其表面水分,置于超净台中进行后续无菌操作.用无菌的刀片和镊子分离出根、茎、叶各部位后,依次在70%乙醇和0.1%升汞溶液中浸泡1~3 min.接下来,在无菌水中冲洗6次,用吸水纸吸干其表面水分,各称取5 g,研磨至泥状.为了确定消毒的彻底性,我们将蔬菜各部分的最后一次冲洗水涂布于牛肉膏蛋白胨培养基上,30℃培养24~48 h,如无细菌生长则证明消毒彻底.

1.3 蔬菜中抗生素抗性内生细菌的培养计数

蔬菜中抗生素抗性内生细菌的计数采用平板菌落计数法进行.本次实验所用的培养基是加入1 mL制霉菌素母液(5 mg/mL)制成的牛肉膏蛋白胨固体培养基;用于抗性研究的抗生素选用畜禽养殖过程中最常用的4种抗生素:阿莫西林、头孢氨苄、四环素、庆大霉素.根据CLSL(抗菌药物敏感性实验执行标准),单抗性平板各类抗生素的终浓度分别为阿莫西林50 μg/mL,头孢氨苄100 μg/mL,四环素16 μg/mL,庆大霉素32 μg/mL;多抗性平板是将上述抗生素的3种或4种抗生素母液混合均匀后加入到灭过菌的培养基中,使每种抗生素终浓度为相应单抗平板上的终浓度^[9].

向1.2中蔬菜根、茎、叶各部分的研磨液中,加入等量的无菌水,混匀成菌悬液.然后,取1 mL菌悬液进行梯度稀释,取不同稀释度下的研磨液各0.2 mL分别滴加于配好的牛肉膏蛋白胨固体培养基上,涂布均匀,每一个梯度设置3个重复.30℃恒温倒置培养48~72 h.根据平板上菌落数目和稀释度计算每克样品中的内生细菌数目.

1.4 统计分析

各种抗生素抗性内生细菌数目的统计:

抗生素抗性内生细菌的百分比(%)=抗生素抗性内生细菌数量/总内生细菌数量×100%.

所得数据运用IBM SPSS Statistics V21.0软件进行方差分析(one-way ANOVA)和显著性分析, $\alpha < 0.05$ 为显著水平, $\alpha < 0.01$ 为极显著水平.

1.5 蔬菜中多重抗生素抗性内生细菌的分子生物学鉴定

根据多重抗生素抗性平板上长出的菌落形态、颜色和大小特征挑取单菌落,反复划线纯化后编号保藏.采用细菌的通用引物27F(5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3')和1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')对多重抗生素抗性内生细菌的16S rDNA片段进行扩增,产物送上海生工生物公司测序.所得序列进行BLAST比对后,用MEGA4.1软件构建系统发育树.

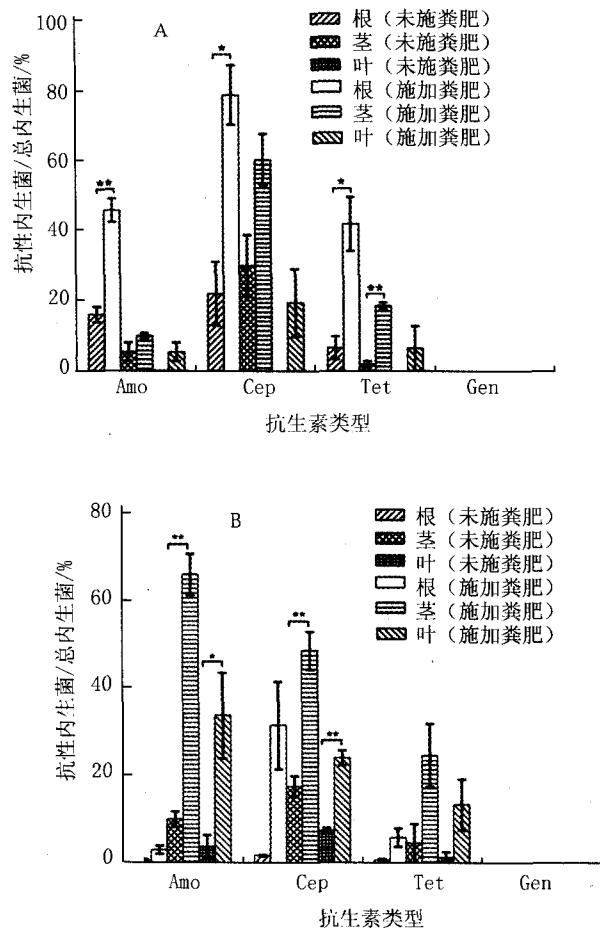
2 结果

2.1 抗生素抗性内生细菌在农田蔬菜不同组织中的分布

为了调查抗生素抗性内生细菌在农田蔬菜不同组织的分布情况,我们对上海青和芹菜各部分的总内生细菌和抗生素抗性内生细菌进行计数.与未施用粪肥相比,施加粪肥使上海青根、茎和叶的总内生细菌数量增加了一个数量级,抗阿莫西林、头孢氨苄或四环素的单一抗生素抗性内生细菌的数量也相应增加了一个数量级.在未施加粪肥组上海青的叶中,我们并未检测到任何抗生素抗性内生细菌的存在;但在施加过粪肥的上海青叶中,抗阿莫西林、头孢氨苄或四环素的抗性内生细菌数量分别达到了 2.98×10^4 cfu·g⁻¹、 1.20×10^2 cfu·g⁻¹和 6.60×10^4 cfu·g⁻¹.为了进一步明确施加粪肥对上海青中抗生素抗性内生菌含量的影响,我们计算了不同组织部位抗生素抗性内生细菌占总内生细菌的百分比.由图1可以看出,在上海青中,4种单一抗生素抗性内生细菌的比例在0%~78.82%之间,其中施加粪肥组上海青根和茎中抗阿莫西林、头孢氨

苜蓿或四环素的单一抗生素抗性内生细菌比例分别是未施加粪肥组的 2.89 倍和 1.87 倍、3.61 倍和 2.02 倍、6.49 倍和 10.61 倍。其中,根中各类抗生素抗性内生细菌百分比均显著增加($\alpha < 0.05$ 或 $\alpha < 0.01$),而在茎中,只有抗四环素抗性内生细菌的百分比显著增加($\alpha < 0.01$)。在未施加粪肥的上海青叶中没有检测到各类抗生素抗性内生细菌,但是,在施加粪肥的上海青叶中,抗阿莫西林、头孢氨苄或四环素的单一抗生素抗性内生细菌比例分别为 5.27%、19.24% 和 6.34%(图 1A)。

芹菜中的结果也与上海青中类似。尽管施加粪肥和未施加粪肥芹菜的同一部分在总内生细菌含量上处于同一数量级,但是,与未施加粪肥相比,施加粪肥组芹菜的根、茎和叶中抗阿莫西林、头孢氨苄或四环素的单一抗生素抗性内生细菌数量均高出一个数量级。在芹菜中,各类单一抗生素抗性内生细菌的比例范围是 0%~65.80%。施加粪肥组芹菜茎和叶中抗阿莫西林或头孢氨苄的单一抗生素抗性内生细菌占总内生细菌的百分比分别是未施加粪肥组的 7.2 倍和 6.65 倍,19.13 倍和 2.76 倍,10.27 倍和 5.54 倍,且其增加达到了显著($\alpha < 0.05$)或极显著水平($\alpha < 0.01$)(图 1B)。



Amo, Cep, Tet, Gen分别代表阿莫西林、头孢氨苄、四环素和庆大霉素; *, $\alpha < 0.05$; **, $\alpha < 0.01$ 。

图1 上海青(A)和芹菜(B)中抗生素抗性内生细菌占总内生细菌的百分比

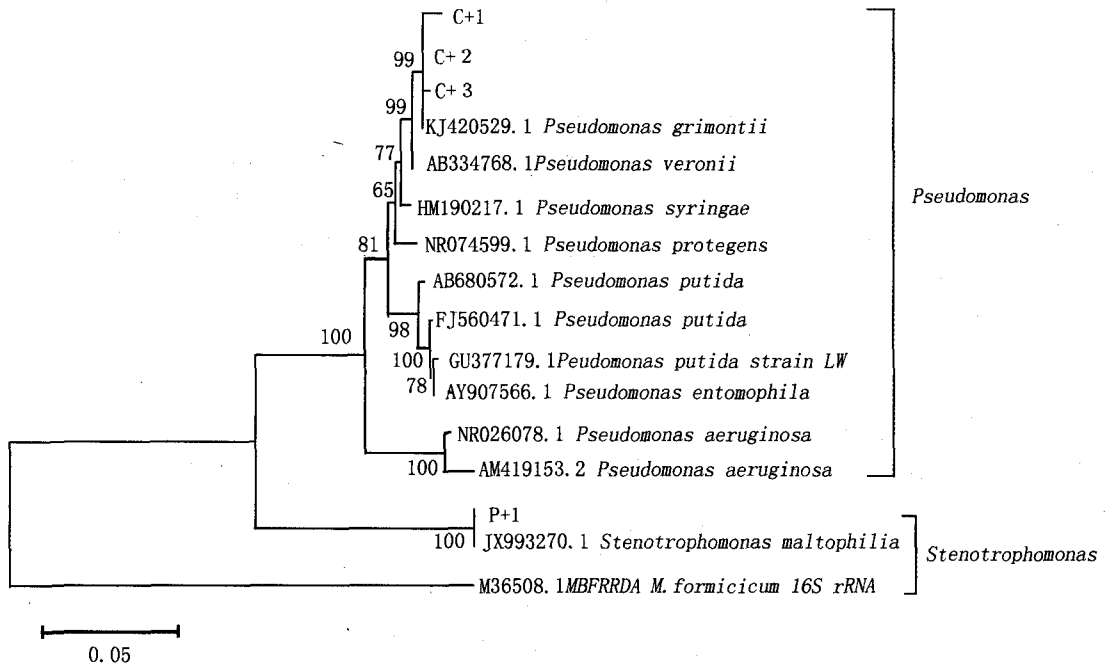
2.2 农田蔬菜中多重抗生素抗性内生细菌的分离鉴定

除了检测单一抗生素抗性内生细菌外,我们也检测了多重抗生素抗性内生细菌在蔬菜中的存在情况。值得注意的是,在施加禽畜粪肥组上海青的茎中,抗阿莫西林、头孢氨苄和四环素的多重抗生素抗性内生细菌数量达到了 2.03×10^2 cfu \cdot g⁻¹。在施加粪肥组芹菜的根中,抗阿莫西林、头孢氨苄和四环素的多重抗生素

抗性内生细菌数量达到了 $7.26 \times 10 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

从施加禽畜粪肥组上海青的茎和芹菜的根中分别分离多重抗生素抗性内生细菌各 20 株,并对这些菌株进行 16S rDNA 序列的扩增和测序. 利用软件 Chromas Lite (version 2.01) 对测序结果进行分析,按照 97% 的相似性分成不同的操作单元(OTU). 每个 OTU 选择一个代表性的序列,利用 BLAST 和 GENE BANK 数据库中的序列进行比对,选择其同源性最高的序列,利用 MEGA4.1 中的 Neighbor-Joining 法构建系统进化树,如图 2 所示。

由图 2 中的系统进化树可知,农田蔬菜中所分离的多重抗生素抗性内生细菌集中分布在两个属中:假单胞菌属(*Pseudomonas*)和寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)。其中,施加禽畜粪肥芹菜中的多重抗生素抗性内生细菌分属 3 个操作单元(C+1, C+2 和 C+3),且均分布于假单胞菌属(*Pseudomonas*),与格氏假单胞菌(*Pseudomonas grimontii*)具有极高的相似性. 施加粪肥上海青中的多重抗生素抗性内生菌主要归属于一个操作单元(P+1),且分布于寡养单胞菌属,与嗜麦芽寡养单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)具有极高的相似性。



C+1, C+2和C+3: 芹菜中多重抗生素抗性内生细菌所属的 3 个不同操作单元;

P+1: 芹菜中多重抗生素抗性内生细菌所属的操作单元

图2 农田蔬菜中多重抗生素抗性内生细菌的系统发育树

3 讨论

前期的相关研究显示,禽畜粪便施肥的农田蔬菜中含有抗生素抗性内生细菌. 在本研究中,进一步探讨了禽畜粪肥对蔬菜中抗生素抗性内生细菌产生的影响. 结果显示,施加禽畜粪肥明显增加农田蔬菜(上海青和芹菜)中单一抗生素抗性内生细菌的比例(图 1)。

在单一抗生素抗性内生细菌的分析中,我们发现,施加禽畜粪肥导致上海青或芹菜不同组织部位单一抗生素抗性内生细菌的比例均有不同程度的增加. 分析其原因可能有两个方面. 一方面,畜禽粪肥中携带的大量抗生素残留可能被蔬菜吸收并在不同生理部位富集,从而诱导产生新的抗生素抗性内生细菌. 相关的报道间接支持这种可能性. 例如,李学文等^[10]对中国北方集约化蔬菜种植地中多种蔬菜进行抗生素残留的检测,结果发现黄瓜、西红柿、辣椒、菠菜以及茄子等蔬菜样品均检测到喹诺酮类抗生素的累积,而且不同蔬

菜中同种抗生素的残留量并不相同. Migliore 等^[11]的研究表明,植物可吸收抗生素并在其根系和地上部位显著积累,含量高达 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 级. 另一方面,禽畜粪便是抗生素抗性细菌及抗性基因的储存库,随着施肥进程,这些抗性细菌及抗性基因将进入农田土壤系统,并通过基因水平转移使土壤中出现大量的抗性细菌^[3-4],而植物根际土壤中的微生物已被证明是植物内生菌的主要来源^[7]. 因此,这些抗性细菌很有可能进入植物体内,定殖于蔬菜的不同组织部位,并将其所携带的抗性基因传递给其他内生细菌,导致新的抗生素抗性内生细菌的出现.

在多抗性菌的分析中,我们发现,施加粪肥上海青中多重抗生素抗性细菌与嗜麦芽寡养单胞菌具有极高的相似性. 嗜麦芽寡养单胞菌是一种需氧、非发酵性的革兰氏阴性菌,广泛存在于各种自然环境中^[12]. 文献报道显示,嗜麦芽寡养单胞菌是重要的人类条件致病菌,在塑料、玻璃和聚四氟乙烯上能够形成有效克隆,从而感染人类,造成多种疾病(如败血症、尿路和皮肤感染、心肌炎和脑膜炎等)的发生,甚至导致病人的死亡^[13]. 在本实验室以前的工作中,我们对禽畜粪便及粪便施肥土壤中的抗生素抗性菌进行了研究. 结果表明,寡养单胞菌属的细菌既存在于禽畜粪便又存在于粪便施肥的农田土壤中,而且,无论在禽畜粪便中还是在禽畜粪便施肥的土壤中,这一属中的嗜麦芽寡养单胞菌均具有多种抗生素抗性^[8,14]. Berg 等在 2005 年发表的综述中指出,植物根际的人类机会致病菌(包括 *Stenotrophomonas* 等)可以进入植物和人类寄主之间的相互作用系统中,其在植物根际和在人类器官或组织中的定植机制相似^[15]. 最新的研究也显示,动物体内的抗生素抗性菌或其抗性基因极有可能随着食物链传递给人类,严重威胁人类健康^[16]. 所有这些资料提示我们,禽畜粪便中具多重抗生素抗性的嗜麦芽寡养单胞菌应引起人们的关注,因为这类菌很有可能会通过动物粪便-土壤-蔬菜的链条直接进行传递,成为蔬菜内多重抗生素抗性细菌类群改变的重要驱动者,并最终传递给人类,造成多种人类疾病. 因此,如何控制嗜麦芽寡养单胞菌等具有多重抗生素抗性的人类条件致病菌在粪便-土壤-蔬菜-人类链条中的传播将是我们必须面对的一大挑战.

4 结 论

1) 畜禽粪肥显著提高农田蔬菜中抗生素抗性内生细菌的含量. 施加畜禽粪肥的农田上海青及芹菜样品的根、茎、叶中抗阿莫西林、头孢氨苄、四环素的单一抗生素抗性内生细菌的绝对数量均比未施加组高出 1~2 个数量级,它们的相对百分比含量比未施加组高出 9~19 倍.

2) 施加畜禽粪肥的上海青和芹菜中均分离得到了多重抗生素抗性细菌. 其中,尤其值得关注的是从上海青茎中分离得到的嗜麦芽寡养单胞菌,因为它是重要的人类致病菌,能够引起多种人类疾病.

参 考 文 献

- [1] SUZUKI S, HOA P T. Distribution of quinolones, sulfonamides, tetracyclines in aquatic environment and antibiotic resistance in Indochina[J]. *Front Microbiol*, 2012, 3: 67.
- [2] LOOFT T, JOHNSON T A, ALLEN H K, et al. In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome[J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(5): 1691-1696.
- [3] WANG Fenghua, QIAO Min, CHEN Zheng, et al. Antibiotic resistance genes in manure-amended soil and vegetables at harvest[J]. *J Hazard Mater*, 2015, 299: 215-221.
- [4] FANG Hua, WANG Huifang, CAI Lin, et al. Prevalence of Antibiotic Resistance Genes and Bacterial Pathogens in Long-Term Manured Greenhouse Soils As Revealed by Metagenomic Survey[J]. *Environ Sci Technol*, 2015, 49(2): 1095-1104.
- [5] OK Y S, KIM S C, KIM K R, et al. Monitoring of selected veterinary antibiotics in environmental compartments near a composting facility in Gangwon Province, Korea[J]. *Environ Monit Assess*, 2011, 174(1/2/3/4): 693-701.
- [6] 肖淑贤, 高俊明. 植物内生菌的研究概况及应用进展[J]. *农业技术与装备*, 2011(2): 74-77.
- [7] GRAY E J, SMITH D L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes[J]. *Soil Biol Biochem*, 2005, 37(3): 395-412.
- [8] YANG Qingxiang, REN Siwei, NIU Tianqi, et al. Distribution of antibiotic-resistant bacteria in chicken manure and manure-fertilized vegetables[J]. *Environ Sci Pollut Res*, 2014, 21(2): 1231-1241.
- [9] CLSI document M100-S24. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement [S]. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014.

- [10] LI Xuewen, XIE Yunfeng, LI Canglin, et al. Investigation of residual fluoroquinolones in a soil-vegetable system in an intensive vegetable cultivation area in Northern China[J]. *Sci Total Environ*, 2014, 468: 258-264.
- [11] MIGLIORE L, COZZOLINO S, FIORI M. Phytotoxicity to and uptake of enrofloxacin in crop plants[J]. *Chemosphere*, 2003, 52(7): 1233-1244.
- [12] JI Yinghong, JIANG Chunhui, JI Jian, et al. Post-cataract endophthalmitis caused by multidrug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia*: clinical features and risk factors[J]. *BMC Ophthalmol*, 2015, 15: 14.
- [13] MORI M, TSUNEMINE H, IMADA K, et al. Life-threatening hemorrhagic pneumonia caused by *Stenotrophomonas maltophilia* in the treatment of hematologic diseases[J]. *Ann of Hematol*, 2014, 93(6): 901-911.
- [14] YANG Qingxiang, WANG Ruifei, REN Siwei, et al. Practical survey on antibiotic-resistant bacterial communities in livestock manure and manure-amended soil[J]. *J Environ Sci Heal B*, 2016, 51(1): 14-23.
- [15] BERG G, EBERL L, HARTMANN A. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria[J]. *Environ Microbiol*, 2005, 7(11): 1673-1685.
- [16] VERRAES C, VAN B S, VAN M E, et al. Antimicrobial resistance in the food chain: A Review[J]. *Int J Environ Res Pub Heal*, 2013, 10(7): 2643-2669.

Effect of Livestock Manure on Antibiotic-Resistant Endophytic Bacteria in Vegetables

WANG Ruifei^{1a,b}, GUO Yuhui^{1a}, YU Ning², YANG Qingxiang^{1a,b}

(1. a. College of Life Sciences; b. Key Laboratory for Microorganisms and Functional Molecules, University of Henan Province, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China; 2. Monitoring Station of Environmental Protection in Xinxiang City, Xinxiang 453000, China)

Abstract: In this paper, we investigated the effects of application of livestock manure on antibiotic-resistant endophytic bacteria in pakchoi and celery which are often consumed as popular stems and leafy vegetables. The result indicated that the count and proportion of endophytic bacteria resistant to Amoxicillin trihydrate, Cephalexin monohydrate or Tetracyclin Hydrochloride in root, stem and leaf of manure-fertilized pakchoi and celery was 9-19 folds higher than that in manure-free pakchoi and celery. Notably, *Stenotrophomonas maltophilia* of these bacteria is an opportunistic pathogen to humans and can cause various disease infections.

Keywords: antibiotic; vegetable; antibiotic-resistant endophytic bacteria; livestock manure