

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2014.05.011

## 空气中抗性基因 (ARGs) 的研究方法及研究进展\*

贺小萌 曹 罡\*\* 邵明非 李 继

(哈尔滨工业大学深圳研究生院, 深圳市水资源利用与环境污染控制重点实验室, 深圳, 518055)

**摘 要** 抗生素的长期滥用导致大量耐药菌的出现, 并加剧抗生素抗性基因 (ARGs) 在不同环境介质中传播扩散, 对人类和动物健康造成潜在威胁. 作为一种新型污染物, ARGs 已经成为近年来环境研究领域的热点之一. 然而目前多数研究关注的是水、土壤和沉积物中的 ARGs, 国内外对空气中 ARGs 的研究相对较少且零散. 本文综述了空气中 ARGs 的国内外研究现状, 并探讨了空气中 ARGs 样品的采集和检测方法, 旨在为空气中 ARGs 的研究提供科学依据和技术策略.

**关键词** 抗生素抗性基因 (ARGs), 空气, 采样方法, 检测方法.

## Research method and progress on antibiotics resistance genes (ARGs) in air

HE Xiaomeng CAO Gang\*\* SHAO Mingfei LI Ji

(Harbin Institute of Technology Shenzhen Graduate School, Shenzhen Key Laboratory of Water Resources Utilization and Environmental Pollution Control, Shenzhen, 518055, China)

**Abstract:** The long-term overuse of antibiotics lead to the emergence of antibiotic resistant bacteria and accelerate the transport and the spread of antibiotic resistance genes (ARGs) in different environmental matrix, which poses potential health risks to humans and animals. As a new category of environmental contaminants, ARGs have been one of the hot topics in the area of environmental research in recent years. Most research, however, focuses on AGRs in water, soil and sediment. There have been only a few studies on ARGs in air. This paper summarizes the research progress of ARGs in air and discusses the methods that can be used for collecting and detecting ARGs samples in air. The aim of this paper is to provide the scientific basis and technical strategies to support the development of studies on ARGs in air.

**Keywords:** antibiotics resistance genes (ARGs), air, sampling methods, detection methods.

由于抗生素具有预防、治疗疾病和促进生长的作用, 其在医疗业和畜牧养殖业的滥用情况日趋严重, 大量抗生素以原药形态或代谢产物形态进入环境<sup>[1-2]</sup>. 环境中的抗生素除了导致化学药物污染外, 所产生的环境压力能加剧抗生素抗性基因 (ARGs) 的传播和扩散, 造成潜在基因污染<sup>[3]</sup>. 抗生素在人和动物肠道内诱导产生耐药菌, 这些编码 ARGs 的耐药菌经排泄后, 是环境中 ARGs 的重要来源<sup>[4-5]</sup>. 当环境中的 ARGs 位于基因转移单位时, 可整合到一些可移动基因元件上, 如质粒、转座子、整合子等, 然后通过转化、转导、接合等作用, 在微生物种内、种间等进行传递转移. 通过这种基因水平转移 (Horizontal gene transfer, HGT), ARGs 可以在不同微生物物种间传播扩散<sup>[6-7]</sup>. 因此, ARGs 作为一种新型的基因污染物, 具有可复制性, 传播性和环境持久性等特点, 比传统化学污染物更加难以研究和控制. 我国由于抗生素滥用情况严重, 抗生素所带来的环境污染问题可能较其他国家更为严峻, 因此更加迫切需要加强 ARGs 的基础研究<sup>[8]</sup>.

2013 年 8 月 13 日收稿.

\* 环保公益性行业科研专项 (201309031) 资助.

\*\* 通讯联系人, Tel: 13480819670; E-mail: caogang@hitsz.edu.cn

近年来,ARGs的污染问题受到各方面的极大关注,国内外已逐渐开展环境中ARGs的研究,研究方向集中在ARGs的来源、分布、传播扩散及生态风险等<sup>[9-13]</sup>。目前,已有多种ARGs在水、土壤、沉积物、空气等环境介质中被检出<sup>[3-7,9]</sup>,然而有关水和土壤中ARGs的报道较多且较为系统<sup>[14,6-7]</sup>,国内外对于空气中ARGs的研究相对薄弱<sup>[15-16]</sup>。不同于水、土壤环境中ARGs的高浓度特点,空气中ARGs的环境风险主要体现于病原菌等携带ARGs的微生物易被人吸入,可能对人体造成直接的健康危害。我国多数城市细颗粒物污染严重,空气中的细颗粒物尤其是PM<sub>2.5</sub>很可能成为ARGs向人体呼吸系统传播的一个重要暴露途径。近年的文献中已陆续报道了在养殖场、医院、公共场所、城市住宅的空气中检出耐药菌的相关研究<sup>[17-22]</sup>。然而,ARGs与耐药性的传播扩散机制密切相关,因此需在空气中耐药菌的研究基础上加强ARGs的研究。但由于对空气中ARGs的污染现状缺乏足够的信息,且采样方法和检测分析方法尚未标准化,该领域研究的开展面临很大挑战。

本文根据近年来国内外的文献资料,综述了空气中ARGs的研究进展、空气样本的采集方法和检测方法,为进一步研究空气中的ARGs提供研究思路和技术策略。

## 1 空气中ARGs的研究进展

自ARGs作为一种新型环境污染物的Pruden等<sup>[23]</sup>提出后,受到国内外各方面的极大关注,相关研究逐渐展开。目前已有数百种ARGs在各种环境介质中被检出,主要包括:四环素抗性基因、氨基糖苷类抗性基因、大环内酯类-林肯酰胺-链阳霉素(MLS)抗性基因、氯霉素抗性基因、万古霉素抗性基因、磺酰胺类抗性基因、甲氧苄啶类抗性基因、 $\beta$ -内酰胺类抗性基因等<sup>[14]</sup>。迄今为止,空气中已发现5种四环素类抗性基因,1种氨基糖苷类抗性基因,7种大环内酯类抗性基因,1种万古霉素抗性基因,1种 $\beta$ -内酰胺类抗性基因和1种杆菌肽锌抗生素抗性基因,如表1所示。这些基因多数是从养殖场和医院的空气种被检出。

国外自2006年开始关注空气中ARGs的研究,在养殖场空气、医院空气、住宅区及街道空气中检测出ARGs。Chapin等<sup>[24]</sup>发现,养猪场室内的空气中大约98%的革兰氏阳性菌对至少两种养猪场常用抗生素(包括大环内酯类、林肯酰胺、四环素)产生抗性。Sapkota等<sup>[25]</sup>在Chapin等<sup>[24]</sup>研究基础上,采用DNA分子杂交和PCR法对肠球菌和链球菌进行检测,首次提供了养殖场空气中的细菌携带ARGs的数据。结果表明,所有受试菌均含有多重大环内酯类-林肯酰胺-链阳霉素(含称MLS)抗性基因 $ermA$ 、 $ermB$ 、 $ermC$ 、 $ermF$ 、 $mefA$ ,50%的肠球菌和44%的链状球菌含有多重四环素抗性基因 $tetM$ 、 $tetK$ 、 $tetL$ 。Chapin等<sup>[24]</sup>和Sapkota等<sup>[25]</sup>的研究表明养殖场空气中的革兰氏阳性菌可能是一个潜在的ARGs储存库。Just等<sup>[26]</sup>对在笼舍圈养(cage-housed)家禽养殖场(用于生产鸡蛋)和自由放养(floor-housed)家禽养殖场(用于生产肉类)采集的耐药菌和ARGs进行了比较。研究表明,自由放养的家禽养殖场气溶胶中的肠球菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌浓度明显比笼舍圈养的家禽养殖场气溶胶中含量高,且杆菌肽锌抗性基因 $bcrR$ 、红霉素抗性基因 $ermA$ 、四环素抗性基因 $tetA$ 、 $tetC$ 在自由放养的养殖场中检出率比笼舍圈养养殖场中高,一定程度上说明ARGs和抗生素用量的相关性。Gilbert等<sup>[27]</sup>检测医院空气中的微生物气溶胶,发现所有的空气样品中的DNA提取物都含有 $ermX$ ,60%和90%的空气样品中分别含有 $tetG$ 和 $ermF$ 。Lis等<sup>[28]</sup>在长期与医院环境接触的人的家中分离出耐甲氧西林金黄色葡萄球菌,且检测含有 $mecA$ 抗性基因。Drudge等<sup>[29]</sup>从医院预过滤器上分离出的灰尘中检测到与耐甲氧西林金黄色葡萄球菌和凝固酶阴性葡萄球菌相关的3种ARGs( $aac(6')-aph(2'')$ 、 $ermA$ 、 $mecA$ )。除此之外,Gandolfi等<sup>[30]</sup>在米兰Torre Sarca的一个高流量的街道旁采集的PM<sub>10</sub>中分离出耐甲氧西林金黄色葡萄球菌,通过对其检测发现,几乎在所有的菌株中都存在 $tetK$ ,在少数菌株中存在 $ermC$ 和 $vanA$ 。Ling等<sup>[31]</sup>的研究表明,密集型动物养殖场(CAFOs)和诊所可能成为空气中 $tetX$ 和 $tetW$ 的源头,并可通过空气的运动进行传播。

国内近两年来才开始关注空气中ARGs的研究,且目前文献中相关的研究报道仅局限于养殖场空气。Liu等<sup>[18]</sup>从6个养鸡场中采集的室外空气和室内空气样品中分离出149株金黄色葡萄球菌菌株,并在其中检测出 $tetM$ 、 $mecA$ 、 $ermC$ 、 $aac(6')-aph(2'')$ 基因。结合REP-PCR(基因外重复一致回文序列聚合酶链式反应)溯源鉴定结果确认,鸡体产生的具有耐药基因的金黄色葡萄球菌能够形成气溶胶上悬浮,借助舍内、外的气体交换传播到舍外环境中,视气象条件扩散到一定的距离,对该区域的公共卫生形成

威胁.李楠等<sup>[19]</sup>以从养殖场分离的耐药性严重的凝固酶阴性葡萄球菌为研究对象,针对 $\beta$ -内酰胺类、大环内酯类和四环素这3类耐药率较高的抗生素,采用PCR法对其相关耐药基因进行检测.结果显示,*mecA*的检出率为58.0%,部分菌株表现为抗苯唑西林;*ermC*(69.6%)是阳性率最高的大环内酯类耐药基因,其次是*msrA*(15.7%)和*ermB*(14.8%);四环素类耐药基因*tetK*(62.7%)检出率明显高于*tetM*(25.4%).

上述研究表明,ARGs在空气中广泛存在,并与抗生素的使用具有一定相关性,空气环境可能成为一个潜在的ARGs的存储库.该研究领域目前存在的主要问题表现在数据匮乏,采样和分析方法尚未标准化使得相关数据不具可比性等方面.另外,空气中ARGs的来源、浓度、影响因素、传播扩散机制、生态风险等方面仍缺乏足够的信息,空气中ARGs的研究任重而道远.

表1 空气中检出的ARGs<sup>[18-19,24-31]</sup>

Table 1 ARGs detected in air

基因	生物源	环境源
<i>tetA/C</i>	微生物菌落	养殖场
<i>tetM</i>	肠球菌、链球菌、金黄色葡萄球菌	大型养猪场、养鸡场
<i>tetK</i>	肠球菌、链球菌、葡萄球菌	大型养猪场、米兰的街道上PM <sub>10</sub>
<i>tetL</i>	肠球菌、链球菌	大型养猪场
<i>tetG</i>	微生物菌落	医院病房、养殖场
<i>tetX</i>	微生物菌落	密集型动物养殖场、诊所
<i>tetW</i>	微生物菌落	密集型动物养殖场、诊所
<i>aac(6')-aph(2'')</i>	耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、凝固酶阴性葡萄球菌	医院空气过滤器上的灰尘、养鸡场
<i>ermA</i>	耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、凝固酶阴性葡萄球菌、肠球菌、链球菌、微生物菌落	医院空气过滤器上的灰尘、大型养猪场、养殖场
<i>ermB</i>	肠球菌、链球菌、凝固酶阴性葡萄球菌、微生物菌落	大型养猪场、养殖场
<i>ermC</i>	葡萄球菌属、凝固酶阴性葡萄球菌	米兰的街道上PM <sub>10</sub> 、养鸡场
<i>ermF</i>	肠球菌、链球菌、微生物菌落	大型养猪场、医院病房
<i>ermX</i>	微生物菌落	医院病房
<i>mefA</i>	肠球菌、链球菌	大型养猪场
<i>msrA</i>	凝固酶阴性葡萄球菌	养殖场
<i>vanA</i>	葡萄球菌	米兰的街道上PM <sub>10</sub>
<i>mecA</i>	耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、凝固酶阴性葡萄球菌	医院空气过滤器上的灰尘、与医院环境接触过的人的家中、养鸡场
<i>bcrR</i>	微生物菌落	养殖场

## 2 空气中 ARGs 的采集方法

携带ARGs的耐药性病菌在空气中以气溶胶的形式存在,单个生物气溶胶的直径一般为0.2—20 $\mu\text{m}$ <sup>[32-33]</sup>.空气中ARGs样品的采集可借鉴生物气溶胶的采集方法,一般按原理可分为:撞击式采样法、离心式采样法、气旋式采样法及过滤式采样法等,各方法的特点如表2所示.其中撞击式采样法使用的Andersen 6级生物采样器和全玻璃液体冲击式采样器AGI-30为国际空气生物学学会推荐使用的两种空气微生物标准(参照)采样器,是公认的准确性较高的采样器.采集空气中ARGs的样品时,可优先考虑采用这两种采样器.除此之外,离心式采样器法、气旋式采样法及过滤式采样器法等也可用于采集空气ARGs样品.

撞击式采样器的原理是利用抽气装置,使每分钟恒定气流量的空气通过狭小喷嘴,形成高速气流射向采集面,气体沿采集面拐弯而去,而颗粒则按惯性继续直线前进,撞击并黏附于采集面上被捕获<sup>[34]</sup>.根据阻挡面上介质的不同,可分为固体撞击式和液体撞击式采样器.固体撞击式采样器中以Andersen采样器最为常用.Andersen采样器是采用分粒径撞击原理,模拟人的呼吸道解剖结构和动力学特征设计制造,由几个带微细孔眼的金属圆盘组成,圆盘的孔径逐级递减,以便分离并收集空气中不同粒径的气溶

胶<sup>[35]</sup>. Andersen 采样器对细菌气溶胶有较高的采集效率,如杨文慧等<sup>[36]</sup>的实验结果表明,在单级或多级撞击式采样器、离心式采样器、气旋式采样器、液体冲击式采样器、过滤式采样器中,以 Andersen 采样器采样效率最高,所采粒子数较多.目前,对于空气中 ARGs 样本的采集,大都采用的是 Andersen 采样器,如 Gandolfi 等<sup>[30]</sup>采用 Andersen 八级采样器,在街道上采集的 PM<sub>10</sub> 中检测出四环素抗性基因 *tetK*、大环内酯类抗性基因 *ermC* 和万古霉素抗性基因 *vanA*. Liu 等<sup>[18]</sup>使用 Andersen 六级采样器,从养鸡场采集到的微生物气溶胶中检测到四环素抗性基因 *tetM*、 $\beta$ -内酰胺类抗性基因 *mecA*、大环内酯类抗性基因 *ermC* 和氨基糖苷类抗性基因 *aac(6')-aph(2'')*. Andersen 采样器的独有的特性是可以采集空气中不同粒径的气溶胶携带的耐药菌和 ARGs,从而反映出携带耐药菌和 ARGs 气溶胶的粒径分布特性. Andersen 采样器采集空气中 ARGs 的不足之处在于采样过程中的壁损失、生物失活、粒子重叠、粒子反弹等引起的对实际空气中 ARGs 测量结果的偏差.基于当前采样器的研究现状,可以从采样器的结构和采样方式等方面提高 Andersen 采样的准确性;对采样器内部进行精细设计,使内部无不流动死角或在内壁贴上不粘菌的材料,以降低壁损失;采样器加入增湿功能,从而减少生物失活率;研制平皿可转动的采样器,以减少粒子重叠等<sup>[37]</sup>.如 Xu 等<sup>[38]</sup>采用在培养基上涂上一层矿物油的方式,有效地解决了 Andersen 采样时粒子反弹的问题,提高了采样器的收集效率.

液体撞击式采样器是通过一个狭隙高速冲击的方式将空气中的微生物粒子收集在少量的液体中<sup>[39]</sup>.有研究表明,液体撞击式采样器联合基于分子技术的 PCR 分析方法,对采集和检测微生物气溶胶具有较好的效果.冯文如等<sup>[40]</sup>采用液体微生物采样器和固体撞击式微生物采样器对模拟现场空气微生物进行采样并检测.结果表明,在不同污染状态和不同采样时间下,液体采样器法的采样效率及稳定度均较固体撞击式空气微生物采样器法好,且所获采样液可以用于进一步的微生物培养或分子生物学检测.全玻璃液体撞击式采样器 (AGI) 已被用于空气中 ARGs 的采集<sup>[24-25]</sup>.然而,AGI 采样器采集空气中的 ARGs 可能存在以下缺点:采样液会冻结或蒸发,不适合低温或长时间采样;采样流量小,不适于低浓度空气微生物的采样.针对这些问题,可考虑在采样液中加入对微生物无害的抗冻物质(如甘油)或对采样器附加加热装置,采样时及时补充采样液等方式来避免采样液冻结或蒸发<sup>[34]</sup>.

离心式采样器是在克服其他采样器体积较大,操作不方便,噪声大,价格高,需要外接电源等缺点的基础上发展起来的一种便携式空气微生物采样器<sup>[41]</sup>.该采样器基于离心撞击原理,借助蜗壳内叶轮的高速旋转使气流进入蜗壳并形成锥形运动,气流中的带菌粒子则由于离心力而偏离气体流线,撞击沉着在采集面上.实验证明,离心式采样器对于  $\geq 4 \mu\text{m}$  的粒子采集率高,适用于采集自然微生物粒子<sup>[37]</sup>.高晖等<sup>[42]</sup>研究了离心式采样器捕获空气中细菌和真菌的效果,结果表明,离心式空气微生物采样器对微生物气溶胶的回收率比 Andersen 采样器略低,但差异不显著.

气旋式采样器的主要工作原理是基于两相流体力学在旋风除尘器中的应用,利用了气流高速旋转过程中的惯性作用,对气流中的微生物粒子进行分离<sup>[43]</sup>.梁磊<sup>[44]</sup>设计了一种新型的便携式旋风采样器,并将其与 Andersen 采样器进行对比,结果表明,该便携式旋风采样器采样效率较高,且可进行连续采样,有较为广泛的浓度适用范围.气旋式采样器适用于采集较小的带菌粒子,如病毒等.实验表明,气旋式采样器对于采集病毒粒子(T-3 噬菌体)的收集效率比 Andersen 采样器高 30 倍左右<sup>[34]</sup>.

过滤采样器的原理是将空气中的微生物粒子抽入采样头内,通过碰撞、截留、沉降等机制,使微生物粒子被阻留在滤膜上<sup>[37]</sup>.Thorne 等<sup>[45]</sup>对固体撞击式采样器 (Andersen),液体撞击式采样器 (AGI) 和核微孔滤膜过滤式采样器对家畜养殖区生物气溶胶的采集效率进行评价,结果表明,AGI 采样器和核微孔滤膜过滤式采样器的采集效率较高,适用于采集养殖区域空气中的细菌. Myatt 等<sup>[46]</sup>的研究表明过滤采集方法结合基于 PCR 的检测方法,较撞击式采样器结合基于培养的检测方法有明显优势,且过滤采集方法适用于长时间采样.陈延京等<sup>[47]</sup>针对现有滤膜的孔径较大,难以截留粒径较小颗粒,滤膜材料本身可能有抑菌或杀菌作用等缺陷,研制成了一种以无机膜为支撑膜,以壳聚糖醋酸溶液为涂层溶液制成壳聚糖复合膜,更好地将过滤式采样器应用于空气中微生物的采集.

为了富集空气中较为微量的 ARGs,除了需要将采样器自身结构不断优化外,还可将两种乃至多种不同原理的采样技术联合应用以发挥其各自优势<sup>[48]</sup>.如 Klaus 等发明的三孔旋涡式的生物样品液体冲击采样器,联合了离心和冲击两种方法,有效地解决液体冲击式采样器的粒子气化问题,提高采样效率

并降低采样过程中生物活性的损伤<sup>[49]</sup>.华利忠等<sup>[50]</sup>设计了一个集液体冲击式采样器和过滤式采样器于一体的双重富集装置,有效地提高了微生物采样器的采集效率.

环境介质中耐药菌和 ARGs 的有效采集和保存,是准确测定其浓度、了解其性质和影响效应、评估其风险的基本前提和保障.现有的生物气溶胶采样技术在采样过程中都会不同程度地导致部分微生物丢失或失活,从而不能准确还原空气中微生物的粒子数.空气中耐药菌和 ARGs 的采样技术的选取需要根据采集环境、后续分析方法和实验需求而定,这就要求研究者们充分了解各种采样器的特点,根据不同的采样条件选择相应的采样器或是在原有采样器的基础上研发新型采样器,并通过模拟实验对采样器进行评价<sup>[51]</sup>.目前空气中 ARGs 的相关研究多数采用的是 Andersen 采样器<sup>[18-19,26,30]</sup>,也有个别研究采用 AGI-30 采样器<sup>[23-24]</sup>.这些研究尚没有对所使用的采样器进行运行参数优化实验,也没有对采样器性能进行评价,因此对其采样分析结果是否能真实地反映空气中 ARGs 的实际情况存在很大的不确定性.目前空气中 ARGs 的研究仍处于起步阶段,对空气中 ARGs 的种类、浓度以及采样过程中可能会受到的影响因素还不清楚,这给制定合适的空气 ARGs 样品的采集方法增加了难度.

表 2 空气中常用微生物采样器的特点<sup>[52]</sup>

Table 2 The features of the commonly used microorganism samplers in air

类型	优点	缺点	采样器	分析方法
固体撞击式采样器	采集粒谱范围宽;效率高;对呼吸道易沉着粒子捕获率高;应用范围广	壁损失、粒子从采集面滑落、打碎等造成微生物细胞受损;不适用于压力敏感型微生物采样;所需营养琼脂平板较多,操作复杂	Andersen 采样器 (6 级、2 级、单级和 8 级),JWL 型, MAS-100	培养、显微镜分析
液体撞击式采样器	适合于高浓度空气微生物采样,能将采集样品分别分析;采样液对微生物有保护作用;捕获率高,使用方便	不适于低温或长时间采样;采样时微生物粒子冲击液体导致微生物细胞受损;易污染,携带不便	Porton 采样器, AGI-30 采样器,Shipe 采样器,多级液体喷射式采样器, Bio-sampler 采样器	培养、显微镜分析、生物化学分析、免疫化验
离心式采样器	结构简单;体积小;重量轻;噪音小;使用方便灵活;对空气微生物粒子捕获率较高	采气量不恒定;对小粒径微生物粒子采样效率低;部分细菌粒子会损耗于抽气叶轮的叶片上;采样片及其外套的灭菌存在问题	RCS 型及国产的 LWC 型	培养、显微镜分析、生物化学分析、免疫化验
气旋式采样器	结构简单;操作简便;耗能低;可连续采样;成本低	易出现再携带现象;微生物气溶胶粒子的活性损失较大	Bio-Guardia 采样器, Spin-Con 型全玻璃旋风采样器,大流量旋风采样器等	培养、显微镜分析、生物化学分析、免疫化验
过滤阻留类	捕获率较高,可在低温环境下进行采样	不适用于不耐干的微生物;滤膜孔径易堵塞;采气量不稳定;干燥效应和后续分析中的洗脱过程会影响微生物的活性	玻璃纤维,纤维素酯,聚碳酸酯,聚四氟乙烯过滤式采样器	培养、显微镜分析、生物化学分析、免疫化验

### 3 ARGs 的检测方法

迄今为止,已有多种检测手段被用于检测、分型、表征 ARGs.这些方法主要有传统的培养法和分子生物学法,如 PCR(简单和复合 PCR)、实时定量 PCR、DNA 测序、微阵列比较基因组杂交技术等<sup>[14]</sup>.

微生物培养技术的原理是将通过撞击法收集到培养皿表面的微生物直接进行培养,或把收集到采集液和滤膜上的微生物转移到培养基上进行培养的方法<sup>[53]</sup>.通常是通过细菌的抗性表型来评价其耐药性,并鉴定细菌种属类型,确定抗性基因的宿主特征.细菌种属鉴定的方法主要有传统的生理生化鉴定、16S rRNA/rDNA、基因序列分析法和 Biolog 细菌鉴定系统等<sup>[54]</sup>.不同于水和土壤,空气中 ARGs 环境风险主要体现于病原菌等携带 ARGs 的微生物易被吸入,对人体造成直接的健康危害.因此,目前空气中 ARGs 的检测大多是基于传统的培养方法,主要关注与人体健康紧密相关的致病菌.在我国,临床多重耐

药性直接相关的携超广谱 $\beta$ -内酰胺酶(ESBL)革兰氏阴性菌及耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)、耐万古霉素肠球菌(VRE)等在各场所的检出率都在逐年上升<sup>[55]</sup>。但由于空气环境中存在大量不可培养的微生物,采用基于细菌培养的方法会低估空气环境中生物群落耐药菌的种类、数量和 ARGs 的存在量。

普通 PCR 法是基因检测最常用的方法,其基本原理是对特定核苷酸片段进行指数级的扩增,在扩增反应结束后,再通过凝胶电泳对扩增产物进行定性分析。该方法可与微生物培养相结合用于检测 ARGs。首先利用培养基筛选出抗性细菌,再从这些菌体中提取 DNA,利用 PCR 进行 ARGs 的检测分析。另外,也可直接在空气样品中提取总 DNA,再利用 PCR 方法分析样品中的 ARGs。该方法不需要对微生物进行培养,可将环境中低浓度的目标 DNA 或 RNA 进行扩增和检测,结果更加准确,快速灵敏,是 ARGs 检测方法未来发展的趋向<sup>[56-57]</sup>。目前 PCR 的方法已被广泛用于各种环境样品中 ARGs 的检测。Chee-Sanford 等<sup>[58]</sup>采用 PCR-DGGE 和序列分析技术在养猪场附近的粪池中检测到了 8 种四环素抗性基因。邹世春等<sup>[59]</sup>采用 PCR 研究了养殖场土壤细菌 DNA 中 9 种四环素抗性基因的存在和污染水平。在空气 ARGs 的研究中,也大多采用的是普通 PCR 法,在一定程度上说明该方法适用于空气样品中 ARGs 的检测。普通 PCR 法只能对空气中的 ARGs 进行定性研究,要对其展开全面的研究还需要借鉴已成功运用于其他环境介质的检测手段。

近年发展起来的定量 PCR(QPCR)技术,通过荧光标记探针,巧妙地把核酸扩增、杂交、光谱分析和实时检测计算技术结合起来,然后借助荧光信号检测 PCR 产物。荧光标记物与扩增产物结合后,被激发的荧光强度就与扩增产物量成正比,从而可实现精确定量,准确表征环境的抗性基因水平,是未来研究的重点<sup>[60]</sup>。QPCR 技术已被大量运用于水和土壤中四环素类、磺胺类、万古霉素等 ARGs 的研究中<sup>[61-62]</sup>。王青等<sup>[63]</sup>对九龙江下游水源水,进行 DNA 提取和 QPCR 检测,结果表明 *tetA*、*tetG*、*ermB* 和 *vanA* 的检出水平分别最高可达  $10^7$  copies·mL<sup>-1</sup>水样、 $5 \times 10^2$  copies·mL<sup>-1</sup>水样、 $10^5$  copies·mL<sup>-1</sup>水样、 $10^6$  copies·mL<sup>-1</sup>水样。吴楠等<sup>[64]</sup>设计了一种 QPCR 程序对养殖场土壤中 5 种四环素抗性基因进行检测,其中 *tetW* 的含量最高为  $2.16 \pm 0.20 \times 10^8$  copies·g<sup>-1</sup>(干土),*tetB/P* 的含量最低为  $2.89 \pm 0.54 \times 10^6$  copies·g<sup>-1</sup>(干土)。QPCR 技术也被少数研究用来检测空气中的 ARGs。Ling 等<sup>[31]</sup>采用 QPCR 对空气样品中选取细菌特定的 16S rRNA、*tetX*、*tetW* 进行检测。结果表明,诊所和养殖场样品中细菌 16S rRNA 的浓度为  $1.5 \times 10^1$ — $1.9 \times 10^5$  16S rRNA gene number·m<sup>-3</sup>,养殖场空气中 *tetX* 和 *tetW* 含量较高,分别约为  $10^2$  *tetX* number·m<sup>-3</sup> 和  $10^3$  *tetW* number·m<sup>-3</sup>。Just 等<sup>[26]</sup>采用 QPCR 技术对养殖场空气中的 *tetG* 进行了定量检测。结果表明 *tetG* 在笼舍圈养(cage-housed)的家禽养殖场(用于生产鸡蛋)的个人采样样品中和区域采样样品中的浓度分别为  $6.9 \times 10^3$  copies·m<sup>-3</sup> 和  $7.8 \times 10^3$  copies·m<sup>-3</sup>,在自由放养(floor-housed)家禽养殖场(用于生产肉类)的个人采样样品中和区域采样样品中的浓度分别为  $2.6 \times 10^4$  copies·m<sup>-3</sup> 和  $1.8 \times 10^4$  copies·m<sup>-3</sup> 空气。ARGs 的 QPCR 定量数据表明,相较于水和土壤样品,空气中 ARGs 的含量较低,因此对空气中 ARGs 的检测技术要求更高。目前 QPCR 用于空气样品中 ARGs 的检测还不成熟,需要进一步改善优化采样方法和样品处理方案,减少环境背景对 QPCR 分析结果的影响等。因此,把生物气溶胶采样、处理和鉴定各个步骤综合在一起,形成一套综合的检测系统,是未来空气中 ARGs 检测技术发展的方向。

除以上常用方法外,DNA 杂交技术及微阵列技术,也被少数研究运用在 ARGs 的定性和定量分析中。如 Malik 等<sup>[65]</sup>采用 DNA 杂交技术和 PCR 技术,发现 $\beta$ -内酰胺类抗性基因 *ampC* 存在于使用废水灌溉的废水中。Call 等<sup>[66]</sup>和 Patterson 等<sup>[67]</sup>采用 DNA 微阵列技术分别检测了细菌体内的多种四环素抗性基因和土壤及动物粪便样品中的四环素和红霉素抗性基因,表明微阵列技术可以用于筛选环境样品 DNA,从而鉴别 ARGs。目前文献鲜有报道运用这些方法检测空气样品中的 ARGs,其适用性需要进一步研究。

#### 4 研究展望

随着抗生素的长期滥用,ARGs 在环境介质被大量检出。作为一种新型的环境污染物,ARGs 已经成为近年来环境研究领域的热点之一。ARGs 主要存在于水体、土壤、空气等环境介质中。然而目前多数研究关注的是水、土壤和沉积物中的 ARGs,国内外对空气中 ARGs 的研究相对较少且零散。我国对于环境中 ARGs 的研究尚处于起步阶段,ARGs 在空气中污染状况的研究更是为数不多。近年来我国空气细颗

颗粒物污染严重,空气中的细颗粒物尤其是 PM<sub>2.5</sub>很可能成为 ARGs 向人体呼吸系统传播的一个重要暴露途径.因此,在我国开展空气中 ARGs 的相关研究非常必要.本文综述了空气中 ARGs 的国内外研究现状,并探讨了空气中 ARGs 样品的采集和检测方法.今后相关研究的重点发展方向应该集中在以下几个方面:

(1)对所选采样器进行运行参数优化实验和性能评价实验,使采集的样本能够真实地反映空气中 ARGs 的实际情况.建立和完善一套可靠、高效、快速的空气中 ARGs 的采样方法体系,是保证监测数据准确性的重要前提,应成为未来该领域的一个重要研究方向.

(2)不同于水和土壤环境,空气样品的微生物生物量通常较低,因此对检测技术的检测限和灵敏度要求更高.空气样品的采集和处理对检测结果影响很大,把空气微生物采样、处理和鉴定各个步骤集成在一起,形成一套综合的检测系统,是未来空气中 ARGs 检测技术发展的方向.

(3)重点在抗生素使用较多的养殖场和医院开展空气中 ARGs 的污染来源、污染种类和水平、扩散传播机制、环境影响因子等方面的研究.并应特别关注空气中对人类公共健康具有更大威胁的致病菌以及条件致病菌所携带的 ARGs,这将对指导养殖场改善饲养环境,医院改善通风消毒设备,合理使用抗生素,职业暴露环境的安全防护等方面具有重要意义.

(4)目前还没有直接的证据表明空气中 ARGs 的健康毒性.应展开空气中 ARGs 生态行为的研究,评估空气中 ARGs 对人类健康的潜在危害,建立空气中 ARGs 生态环境安全评价和预警体系,以引起社会各方面的重视,为国家制定相关政策提供科学依据,从而对这种新型污染物进行有效控制.

#### 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 ] Cabello F C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: A growing problem for human and animal health and for the environment [J]. *Environmental Microbiology*, 2006, 8(7): 1137-1144
- [ 3 ] Kemper N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment[J]. *Ecological Indicators*, 2008, 8(1): 1-13
- [ 4 ] Kümmerer K. Antibiotics in the aquatic environment-A review-part II [J]. *Chemosphere*, 2009, 75(4): 435-441
- [ 5 ] Fan C, He J. Proliferation of antibiotic resistance genes in microbial consortia of sequencing batch reactors (SBRs) upon exposure to trace erythromycin or erythromycin-H<sub>2</sub>O[J]. *Water Research*, 2011, 45(10): 3098
- [ 6 ] Schmitt H, Stoob K, Hamscher G, et al. Tetracyclines and tetracycline resistance in agricultural soils: Microcosm and field studies[J]. *Microbial Ecology*, 2006, 51(3): 267-276
- [ 7 ] Ansari M I, Grohmann E, Malik A. Conjugative plasmids in multi-Resistant bacterial isolates from Indian soil[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2008, 104(6): 1774-1781
- [ 8 ] 高立红, 史亚利, 厉文辉, 等. 抗生素环境行为及其环境效应研究进展[J]. *环境化学*, 2013, 32(9): 1619-1633
- [ 9 ] Hu J, Shi J, Chang H, et al. Phenotyping and genotyping of antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolated from a natural river basin[J]. *Environmental Science & Technology*, 2008, 42(9): 3415-3420
- [ 10 ] Ram S, Vajpayee P, Singh R L, et al. Surface water of a perennial river exhibits multi-antimicrobial resistant shiga toxin and enterotoxin producing *Escherichia coli*[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2009, 72(2): 490-495
- [ 11 ] 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
- [ 12 ] 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(3): 243-251
- [ 13 ] 徐冰洁, 罗义, 周启星, 等. 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*, 2010, 29(2): 169-178
- [ 14 ] Zhang X X, Zhang T, Fang H H P. Antibiotic resistance genes in water environment[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 82(3): 397-414
- [ 15 ] Rao G G. Risk factors for the spread of antibiotic-resistant bacteria[J]. *Drugs*, 1998, 55(3): 323-330
- [ 16 ] Beggs C B. The airborne transmission of infection in hospital buildings: Fact or fiction? [J]. *Indoor and Built Environment*, 2003, 12(1/2): 9-18
- [ 17 ] Brooks J P, McLaughlin M R, Scheffler B, et al. Microbial and antibiotic resistant constituents associated with biological aerosols and poultry litter within a commercial poultry house[J]. *Science of the Total Environment*, 2010, 408(20): 4770-4777
- [ 18 ] Liu D J, Chai T J, Xia X Z, et al. Formation and transmission of *Staphylococcus aureus* (including MRSA) aerosols carrying antibiotic-resistant genes in a poultry farming environment[J]. *Science of the Total Environment*. 2012, 6: 139-145
- [ 19 ] 李楠. 养殖场空气中细菌分布及耐药性研究[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院博士论文, 2011
- [ 20 ] 陈艳华, 李晖, 陆一平, 等. 医院空气中细菌分类及耐药性分析[J]. *中国抗生素杂志*, 2006(8): 505-506, 514

- [21] Gandara A, Mota L C, Flores C, et al. Isolation of *Staphylococcus aureus* and antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* from residential indoor bioaerosols[J]. *Environmental Health Perspectives*, 2006, 114(12): 1859
- [22] 周继平,李恒. 空气中耐药菌株分布情况调查[J]. *新乡医学院学报*, 2007(2): 147-149
- [23] Pruden A, Pei R, Storteboom H, et al. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: Studies in northern Colorado [J]. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40(23): 7445-7450
- [24] Chapin A, Rule A, Gibson K et al. Airborne multi-drug resistant bacteria isolated from a concentrated swine feeding operation [J]. *Environ · Health Perspect*, 2005, 113(2):137-142
- [25] Sapkota A R, Ojo K K, Roberts M C et al. Antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Enterococcus* spp. and *Streptococcus* spp. recovered from the indoor air of a large-scale swine-feeding operation [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2006, 43(5):5534-5540
- [26] Just N A, Létourneau V, Kiryuchuk S P, et al. Potentially pathogenic bacteria and antimicrobial resistance in bioaerosols from cage-housed and floor-housed poultry operations[J]. *Annals of Occupational Hygiene*, 2012, 56(4): 440-449
- [27] Gilbert Y, Veillette M, Duchaine C. Airborne bacteria and antibiotic resistance genes in hospital rooms[J]. *Aerobiologia*, 2010, 26(3): 185-194
- [28] Lis D O, Pacha J Z, Idzik D. Methicillin resistance of airborne coagulase-negative staphylococci in homes of persons having contact with a hospital environment[J]. *American Journal of Infection Control*, 2009, 37(3): 177-182
- [29] Drudge C N, Krajden S, Summerbell R C, et al. Detection of antibiotic resistance genes associated with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and coagulase-negative staphylococci in hospital air filter dust by PCR[J]. *Aerobiologia*, 2012, 28(2): 285-289
- [30] Gandolfi I, Franzetti A, Bertolini V, et al. Antibiotic resistance in bacteria associated with coarse atmospheric particulate matter in an urban area[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2011, 110(6): 1612-1620
- [31] Ling A L, Pace N R, Hernandez M T, et al. Tetracycline resistance and Class 1 integron genes associated with indoor and outdoor aerosols [J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(9): 4046-4052
- [32] Agranovski V, Ristovski Z D. Real-time monitoring of viable bioaerosols: Capability of the UVAPS to predict the amount of individual microorganisms in aerosol particles[J]. *Journal of Aerosol Science*, 2005, 36(5): 665-676
- [33] 杜睿. 大气生物气溶胶的研究进展[J]. *气候与环境研究*, 2006(4): 546-552
- [34] 郁庆福. 现代卫生微生物学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1995
- [35] 李涛. 空气微生物采样及发展趋势[J]. *中国卫生检验杂志*, 2003(5): 538-539
- [36] 杨文慧,温占波,于龙,等. 应用气溶胶发生法评价空气微生物采样器采样效率[J]. *中国消毒学杂志*, 2009(3): 245-248
- [37] 于玺华,车凤翔. 现代空气微生物学及采检技术[M]. 北京:军事医学科学出版社, 1998: 87-174
- [38] Xu Z, Wei K, Wu Y, et al. Enhancing bioaerosol sampling by andersen impactors using mineral-Oil-spread agar plate [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56896
- [39] 王秀茹. 预防医学微生物学及检验技术[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:713-718
- [40] 冯文如,徐巧兰,刘世强,等. 液体空气微生物采样法与固体采样法效果初步分析[J]. *热带医学杂志*, 2007, 7(9): 932-936
- [41] 吴植娉,施能树,朱培康,等. LWC-1型离心式空气微生物采样器流量的确定[J]. *消毒与灭菌*,1988(3): 154-156
- [42] 高晖,蒋黎娜,张冬莹,等. LWC- I 型, CA6 和 CA2 三种空气微生物采样器在公共场所中应用的对比试验[J]. *卫生研究*, 2000, 29(3): 145-145
- [43] McFarland A R, Haglund J S, King M D, et al. Wetted wall cyclones for bioaerosol sampling[J]. *Aerosol Science and Technology*, 2010, 44(4): 241-252
- [44] 梁磊. 便携式旋风微生物气溶胶采样器研究[J]. *建筑科学*, 2012(S2): 44-48
- [45] Thorne P S, Kiekhaefer M S, Whitten P, et al. Comparison of bioaerosol sampling methods in barns housing swine [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58(8): 2543-2551
- [46] Myatt T A, Johnston S L, Rudnick S, et al. Airborne rhinovirus detection and effect of ultraviolet irradiation on detection by a semi-nested RT-PCR assay[J]. *BMC Pub Heal*,2003,3(5):1-7
- [47] 陈延京,张林,黄金星,等. 复合膜过滤法采样检测空气中的微生物[J]. *中国环境监测*, 2005, 21(4): 14-17
- [48] 梁晓军,刘凡. 低浓度空气微生物采样与效果评价技术研究进展[J]. *环境与健康杂志*, 2011, 28(3): 278-278
- [49] Willeke K, Lin X, Grinshpun S. Swirling aerosol collector: U.S. Patent 5, 902, 385[P]. 1999-5-11
- [50] 华利忠,武昱孜,白方方,等. 猪肺炎支原体气溶胶富集检测技术的初步研究[J]. *中国农学通报*, 2013, 29(5): 42-47
- [51] Cooper C W. High Volume Air Sampling for Viral Aerosols: A Comparative Approach[R]. Air Force Inst of Tech Wright-Patterson AFB OH Graduate School of Engineering and Management, 2010
- [52] Pasanen A L. A review: Fungal exposure assessment in indoor environments[J]. *Indoor Air*, 2001, 11(2): 87-98
- [53] 谈书勤,胡贵方,顾大勇. 空气微生物气溶胶富集,检测与空气消毒技术研究进展[J]. *中国消毒学杂志*, 2012, 29(012): 1115-1120
- [54] 窦春玲,郭雪萍,尹大强. 污水处理厂抗生素抗性基因分布和去除研究进展[J]. *环境化学*, 2013, 32(10): 1885-1893
- [55] 胡必杰.当前医院感染领域中的热点问题[J]. *上海护理*, 2003, 3(2): 64-65
- [56] 高盼盼,罗义,周启星,等. 水产养殖环境中抗生素抗性基因(ARGs)的研究及进展[J]. *生态毒理学报*,2009(6):770-779

- [57] 孙平勇, 刘雄伦, 刘金灵, 等. 空气微生物的研究进展 [J]. 中国农学通报, 2010, 26(11): 336-340
- [58] 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]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(4): 1494-1502
- [59] 邹世春, 李青, 贺竹梅. 禽畜养殖场土壤抗生素抗性基因污染的初步研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2012(6): 87-91
- [60] 王丽梅, 罗义, 毛大庆, 等. 抗生素抗性基因在环境中的传播扩散及抗性研究方法[J]. 应用生态报, 2010(4): 1063-1069
- [61] Smith M S, Yang R K, Knapp C W, et al. Quantification of tetracycline resistance genes in feedlot lagoons by real-time PCR[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(12): 7372-7377
- [62] Volkman H, Schwartz T, Bischoff P, et al. Detection of clinically relevant antibiotic-resistance genes in municipal wastewater using real-time PCR (TaqMan)[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, 56(2): 277-286
- [63] 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(8): 2685-2690
- [64] 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(5): 705-710
- [65] Malik A, Çelik E K, Bohn C, et al. Detection of conjugative plasmids and antibiotic resistance genes in anthropogenic soils from Germany and India[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, 279(2): 207-216
- [66] Call D R, Bakko M K, Krug M J, et al. Identifying antimicrobial resistance genes with DNA microarrays[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2003, 47(10): 3290-3295
- [67] Patterson A J, Colangeli R, Spigaglia P, et al. Distribution of specific tetracycline and erythromycin resistance genes in environmental samples assessed by macroarray detection[J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(3): 703-715