

环境中泰乐菌素残留及其与土壤微生物的 互作效应研究进展

李 谦¹, 邹永德³, 马保华³, 吴银宝^{1,2*}

(1. 华南农业大学动物科学学院, 广州 510642; 2. 华南农业大学农业部华南热带农业环境重点实验室, 广州 510642;
3. 南海出入境检验检疫局, 佛山 528200)

摘 要: 泰乐菌素是中国养殖业广泛使用的抗菌促生长类兽用抗生素之一, 它进入畜禽体后, 其原形和代谢产物会随畜禽粪尿进入环境, 与环境微生物产生互作效应, 由此本文首先介绍了环境介质中泰乐菌素残留现状, 然后综述了泰乐菌素与土壤微生物的互作效应。目前畜禽生产中使用的泰乐菌素是泰乐菌素 A、B、C 和 D 的混合物, 其中泰乐菌素 A 占 80% 以上, 因此泰乐菌素 A 也是泰乐菌素在环境中残留的主要形式, 但在不同环境条件下, 泰乐菌素 A 可转化为泰乐菌素 B、C 和 D, 而且已有研究表明在畜禽粪便、污水、土壤及水体等环境介质中均检测到泰乐菌素 A 及其代谢产物的残留。土壤中残留的泰乐菌素可与微生物产生互作效应, 即一方面泰乐菌素可影响土壤中微生物的数量、群落结构和功能; 另一方面土壤微生物在受到泰乐菌素胁迫时会产生和传播耐药基因以及可降解泰乐菌素微生物等。笔者还对今后该领域的研究进行了展望。

关键词: 泰乐菌素; 土壤微生物; 互作效应; 耐药基因; 生物降解

中图分类号: X17; S811.5

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2014)02-0165-10

Research Progress of the Interaction Effect between Tylosin Residues in Environment and Soil Microorganism

LI Qian¹, ZOU Yong-de³, MA Bao-hua³, WU Yin-bao^{1,2*}

(1. College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. Key Laboratory of Tropical Agriculture Environment of Ministry of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 3. Nanhai Entry-Exit Inspection and Quarantine, Foshan 528200, China)

Abstract: Tylosin (TYL) is one of the veterinary antibiotics which were widely used in animal husbandry in China. After absorbed by animal, the prototype and metabolites of TYL were excreted with urine and manure, which resulted in negative effect on the environmental microorganism. Firstly this article introduced the residue of TYL and its metabolites in the environmental medium as animal waste, soil and water. TYL was a mixture of Tylosin A (TYLA), Tylosin B (TYLB), Tylosin C (TYLC), and Tylosin D (TYLD), with TYLA been the major component accounting up to 80% to 90% of TYL, so TYLA was the main form of tylosin residues in the environment. But TYLA could be converted into TYLB, TYLC and TYLD in the different environmental conditions. Secondly this article summarized the interaction effects of tylosin residues with soil microorganism, including the impact of the TYL residues on the number, structure, and function of soil microorganism, and the adaption of soil microorganism to the TYL residues as the degradation of TYL residues, and the generation and transmission of antibiotic resistance genes. Finally the

收稿日期: 2013-08-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(31072067; 31272481)

作者简介: 李 谦(1989-), 男, 江西南昌人, 硕士研究生, 主要从事家畜生态学研究, E-mail: 731563191@qq.com

* 通信作者: 吴银宝(1973-), 男, 副教授, 主要从事家畜生态学研究, E-mail: wuyinbao@scau.edu.cn

shortage of present research and direction of future research were also prospected.

Key words: tylosin; soil microorganism; interaction effects; resistance gene; biodegradation

兽用抗生素是目前养殖生产中使用最为广泛的抗感染药物,它在控制畜禽疫病传播、促进畜禽生长和增强免疫力等方面发挥了巨大作用,但与此同时,环境中的兽用抗生素残留及其对生态环境的不良影响也日益受到人们关注。泰乐菌素(tylosin)是目前养殖业中应用比较广泛的大环内酯类兽用抗生素之一,它通过作用于细菌核蛋白体,阻碍细菌蛋白合成,起到对革兰阳性菌、某些革兰阴性球菌、支原体、分枝杆菌、螺旋体及原虫等的抑制作用^[1]。然而进入畜禽体内的泰乐菌素并不能被机体完全吸收利用,其中高达 67% 以药物原形和代谢产物形式随畜禽粪尿排出体外,经不同途径对土壤和水体造成污染^[2]。由于泰乐菌素具有广谱抗菌性,因此进入环境中的泰乐菌素可能影响环境微生物的数量、结构和功能,进而影响生态系统的稳定性。但环境微生物并非仅受泰乐菌素残留的影响,它们对泰乐菌素残留还存在适应和反作用,即一方面它们可以通过适应产生和传播耐药基因,另一方面它们还会产生可降解微生物反作用于泰乐菌素,从而减弱或消除泰乐菌素对自身的影响,维持生态系统的正常功能。目前兽用抗生素与环境微生物之间的互作效应已逐渐引起研究者的关注。本文首先介绍了环境介质中泰乐菌素残留的主要形式及现状,然后综述了土壤中泰乐菌素残留与微生物间的互作效应。本文可为合理评价泰乐菌素对环境微生物的生态毒理学效应提供参考。

1 环境中泰乐菌素残留的主要形式及其残留现状

1.1 泰乐菌素残留的主要形式

养殖生产中使用的泰乐菌素实际上是泰乐菌素 A、B、C 和 D 四种成分的混合物,其中泰乐菌素 A (Tylosin A) 占 80%~90%^[3-4]。泰乐菌素的上述成分均有抗菌活性,其中以 Tylosin A 的抗菌活性最高,因此在研究和生产中所使用的泰乐菌素一般就是指 Tylosin A。在体内代谢及不同的外部环境下, Tylosin A 的形式会发生变化。根据文献报道,泰乐菌素 A、B、C 和 D 的转化关系如图 1 所示^[5-9]。

Tylosin B 由 Tylosin A 在酸性条件下分裂糖苷键形成,在水中时光照有助于该反应的进行^[5-6];

土壤中 Tylosin A 可能通过非生物因素转化为 Tylosin C; Tylosin D 被发现于含粪便的测试系统中,细菌代谢可能是产生这种转变的重要原因,已有研究发现,在猪和老鼠的代谢试验中 Tylosin D 是 Tylosin A 的主要代谢产物^[5,7]。

除了上述 3 种主要代谢产物外,光照条件下至少还可检测到 2 种 Tylosin A 的光解产物,即异构泰乐菌素 1 (Iso tylosin 1) 和异构泰乐菌素 2 (Iso tylosin 2); 中性和碱性条件下还可形成泰乐菌素-羟基丁醛 (Tyosin aldol) 和一些不明的极性降解产物^[6]。此外,在含有 Tylosin A 的水体和土壤中能同时检测到铵离子,但铵离子来自于由水体和土壤中 Tylosin A 的降解还是来自于样品分析时所使用的流动相并不明确^[8]。最终上述所有降解产物都将进一步降解或矿化^[7,9]。

1.2 畜禽废弃物中的泰乐菌素残留

目前已有研究报道了畜禽废弃物中泰乐菌素的残留浓度,也有研究者在进行泰乐菌素的环境行为试验时,为选择试验浓度而进行了相关测定。如 K. Kumar 等^[10]从美国明尼苏达州 4 个集约化养猪场采集排泄物样品并检出 $4.03 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的泰乐菌素残留; M. G. Mellon 等^[11]在大型养殖场粪便及其周围的土壤、水体中检测到了多种抗生素,其中猪粪含泰乐菌素和磺胺甲噁唑混合物 $89 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; H. Dolliver 等^[12]测得猪粪中泰乐菌素的浓度范围为 $0.4 \sim 4.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; A. C. Kolz 等^[7]测得猪粪池中 Tylosin B 和 Tylosin D 的浓度范围分别为 $0.05 \sim 1.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.015 \sim 0.27 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; A. C. Kolz 等^[13]在开放式厌氧塘中检测到泰乐菌素的浓度为 $1 \sim 30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; A. Hoese 等^[14]在评估土壤中泰乐菌素的迁移特性时,测得猪粪浆中泰乐菌素的浓度是 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,并且得出土壤径流液中泰乐菌素的收集率为 $8.4\% \sim 12\%$,由此认为施用含抗生素的粪便可能会造成异地污染; A. J. Watkinson 等^[15]在评估废水处理设施对 28 种人和动物抗生素的去除效果时,在废水入口处测得泰乐菌素的平均浓度为 $1 \times 10^{-3} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,检出率为 100%。李艳霞等^[16]检测了辽宁省部分规模化养殖场的猪粪、牛粪和鸡粪中的抗生素残留,发现泰乐菌素的残留浓度范围为 $0.23 \sim 0.35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。L. Zhou 等^[17]调查

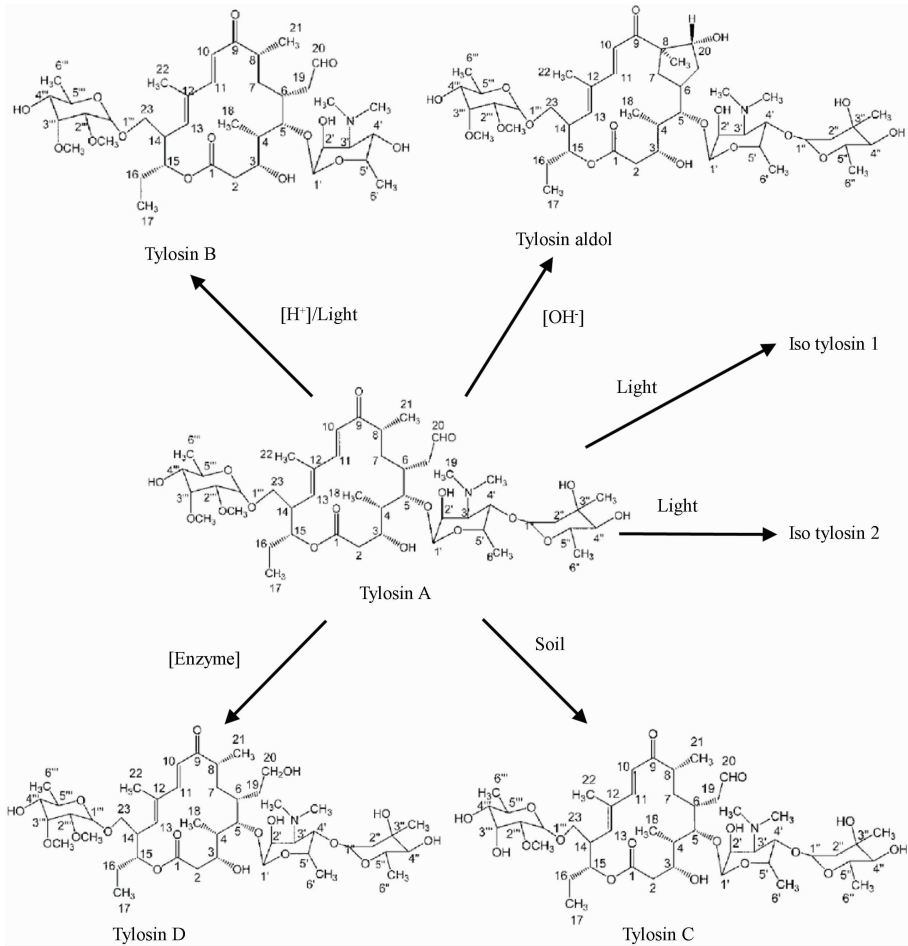


图 1 Tylosin A 的主要转化形式及途径

Fig. 1 The major environmental fates and degradation pathways of tylosin A

了广西博白县 3 个猪场的污水、淤泥及附近河流的抗生素残留情况,发现采自第 2 个猪场淤泥中泰乐菌素的残留浓度为 $(18.00 \pm 0.11) \times 10^{-3} \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,附近河流中泰乐菌素的残留浓度为 $(5.55 \pm 0.08) \times 10^{-6} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;第 3 个猪场污水中泰乐菌素的残留浓度为 $(144.00 \pm 4.71) \times 10^{-6} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Y. Li 等^[18]检测了来自东北三省 9 个城市的猪场、鸡场和牛场粪便中的抗生素残留,发现泰乐菌素残留浓度分别为 $0.23 \sim 1.88 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $0.23 \sim 0.34 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $0.22 \sim 0.28 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,该浓度与养殖场泰乐菌素的使用情况以及泰乐菌素在环境中的降解性有关。

1.3 土壤及水体中的泰乐菌素残留

E. Zuccato 等^[19]采用高效液相色谱法 (HPLC) 检测到意大利河水含有泰乐菌素,其浓度为 $2.5 \times 10^{-5} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,而且在饮用水源和河水沉积物中也检测到泰乐菌素,浓度分别为 $0.6 \times 10^{-6} \sim 1.7 \times$

$10^{-6} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $2.64 \times 10^{-3} \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。L. Proia 等^[20]检测到西班牙略夫雷加特河的泰乐菌素残留浓度范围为 $(2.95 \sim 18.77) \times 10^{-6} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在丹麦, M. Y. Haller 等^[21]检测到施用养殖场粪浆的农用土壤中泰乐菌素的含量为 $0.0574 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; B. Halling Sorensen 等^[22]将含泰乐菌素的猪粪施加到土壤中,测得土壤中 Tylosin A 的浓度范围为 $0.025 \sim 0.05 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。D. W. Kolpin 等^[6]对美国河流进行污染物普查时,在地表水中测得泰乐菌素的浓度高达 $0.28 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;但是 D. Calamari 等^[23]在类似环境中测得泰乐菌素浓度仅为 $2.8 \times 10^{-3} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。段夏珍^[24]研究了惠州市不同蔬菜基地灌溉水、土壤和蔬菜中 20 种抗生素的残留水平,发现土壤中泰乐菌素的平均含量为 $2.07 \times 10^{-3} \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。杨林^[25]分析了河北省大清河底泥中抗生素污染状况,检测到泰乐菌素的残留浓度为 $3.276 \times 10^{-2} \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。H. Dolliver 等^[12]选用耕

地和免耕地土壤研究了抗生素在土壤中的淋失情况,发现泰乐菌素的淋失量小于5%;在土壤浸出液和地表径流中均可以检测到泰乐菌素,其中在浸出液中的最高浓度是 $1.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,在径流中为 $6.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。由于翻耕使土壤孔隙度增加和持水量增多,因此泰乐菌素在耕地土壤中的流失比非耕地土壤大。

2 泰乐菌素残留对土壤微生物的影响

兽用抗生素随畜禽粪尿进入土壤环境后能杀死或抑制土壤环境中的敏感微生物^[26-28],影响土壤微生物的数量、群落结构和群落功能^[29],造成微生物对土壤中有机质、氮、磷等物质的分解能力下降,而且还会降低土壤微生物对农药、重金属等其他污染物的降解能力^[30],因此已有越来越多的研究者关注兽用抗生素对土壤微生物的影响。

2.1 对微生物数量的影响

K. Westergaard 等^[31]研究了 $2\ 000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的泰乐菌素对土壤微生物数量的影响,结果发现加入泰乐菌素的处理组在第1天土壤细菌群落总数下降,但之后细菌总数开始恢复,第54天时处理组细菌群落总数与对照组差异不显著;不过整个试验期内处理组泰乐菌素抗性细菌数量显著高于对照组,而且试验10 d后泰乐菌素处理组土壤原生动物和真菌数量也均显著高于对照组。上述结果的原因可能为泰乐菌素主要对革兰阳性菌和部分革兰阴性菌有抑制作用,当它杀灭或抑制相关细菌后,促进了其它生物对土壤营养物质的竞争,从而使原生动物和真菌大量繁殖。李孟阳^[32]的研究结果表明,采用平板培养法时,试验前期加入泰乐菌素可明显抑制土壤细菌生长,如第7天时 500 、 $1\ 000$ 和 $2\ 000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的泰乐菌素处理组土壤细菌数比空白组分别减少了67.4%、55.1%和75.8%,而且对放线菌也有轻微抑制作用,但能促进真菌生长;进入试验中期(42 d)泰乐菌素反而明显促进细菌生长,其中 $1\ 000$ 和 $2\ 000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的处理组细菌数显著高于对照组;试验后期,随着泰乐菌素的不断降解,各试验组微生物数量均逐步恢复到试验初期水平。Y. Chander 等^[33]和 L. J. Onan 等^[34]均采用平板培养法测定了不同介质中的细菌和抗泰乐菌素细菌的数量。Y. Chander 等^[33]的结果显示,与不使用抗生素的农场相比,使用抗生素的农场火鸡粪、狗粪和土壤中抗泰乐菌素细菌占有所有细菌的百分率差异不显

著;但 L. J. Onan 等^[34]的结果显示,3个使用抗生素的农场土壤中抗泰乐菌素细菌的百分率(7.2%~16.5%)显著高于另外3个不使用泰乐菌素的农场(0.7%~2.5%)。B. Halling Sorensen 等^[22]研究了泰乐菌素平均干重浓度为 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的猪粪对土壤中抗泰乐菌素细菌数量的影响,结果表明,尽管整个样品测试期间,抗泰乐菌素细菌在总菌落形成单位中占有比例都很低,但试验初期土壤中抗泰乐菌素细菌数量显著增加,而且试验结束时抗泰乐菌素细菌数量会下降至接近试验初期的水平,作者推测该结果可能与肠道细菌在土壤中的生存潜力有限有关。

2.2 对微生物群落结构的影响

K. Westergaard 等^[31]发现,添加 $2\ 000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的泰乐菌素可影响土壤微生物群落结构多样性,表现为处理组土壤 DGGE 条带数少于对照组,而且这种影响会一直持续至试验结束。因此作者认为可以通过测定微生物群落结构多样性来研究兽用抗生素对土壤微生物的影响,不过值得注意的是,作者指出泰乐菌素对土壤微生物群落结构多样性的影响程度可能还与土壤微生物 DNA 的提取过程有关。李孟阳^[32]研究表明,泰乐菌素对土壤微生物群落多样性的影响会随着作用时间的延长而渐趋明显,表现为加入泰乐菌素的试验组土壤微生物的 Shannon 丰富度指数和 Evenness 均一性指数均呈下降的趋势,说明泰乐菌素可降低土壤微生物群落结构多样性。L. J. Onan 等^[34]研究发现,在使用泰乐菌素的农场可在其土壤变形菌门中检测到抗泰乐菌素细菌,而在不使用抗生素的农场检测到链霉菌属类抗泰乐菌素细菌。A. K. Muller 等^[35]研究了加入浓度为 $2\ 000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的泰乐菌素对土壤微生物的影响, DGGE 图谱显示在 16S rDNA 多样性方面处理组和对照组有微小差别,但在菌落形态结构和 Biolog 基板利用率方面无显著差异。J. J. Stone 等^[36]研究了含泰乐菌素的猪粪对土壤微生物群落结构的影响,结果表明处理组和对照组土壤微生物群落结构差异显著。

2.3 对微生物活性的影响

土壤呼吸作用和土壤酶活性是反映土壤微生物活性的指标,因此在监测抗生素对土壤微生物影响时,也可用这2种指标反映抗生素对土壤微生物活性的影响。目前国内外关于农药对土壤呼吸作用的影响的研究报道较多,但关于兽用抗生素对土壤呼

吸作用的影响的研究报道较少。张敏等^[29]研究指出,抗生素污染土壤后,除了会影响土壤微生物数量和群落结构外,也会影响土壤呼吸作用和土壤酶活性等反映微生物活性的生理生化指标。刘锋等^[37]研究表明,0~4 d 时添加 $70 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以上的泰乐菌素会显著抑制土壤呼吸作用,但低于 $70 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时处理组与对照组土壤呼吸作用无显著差异;4~12 d 时添加 $70 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以上的泰乐菌素不仅未抑制土壤呼吸作用,反而有显著的促进作用;16~21 d 时添加 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以上的泰乐菌素处理组均显著抑制了土壤呼吸作用。作者由此得出,泰乐菌素可在一定程度上影响土壤呼吸作用,它对土壤呼吸作用的最大抑制率为 38.08%。参考农药的安全性评价标准,可认为泰乐菌素属于低毒或无实际危害的药物。不过作者发现,加入 $1 \sim 300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的泰乐菌素可显著影响土壤磷酸酶的活性。A. K. Muller 等^[35]的研究表明,泰乐菌素对土壤呼吸作用无显著影响。

3 土壤微生物对泰乐菌素残留的适应

土壤中残留的泰乐菌素会影响环境微生物的数量、群落结构和功能,但与此同时,土壤微生物并非仅仅被动受泰乐菌素残留的影响,土壤微生物还会对泰乐菌素残留产生适应,如产生和传播耐药基因,并可产生可降解泰乐菌素的微生物增强对泰乐菌素残留的降解。

3.1 产生和传播耐药性

有研究者认为,诱导环境微生物产生并传播耐药性是环境中兽药污染的一个重要的潜在危害^[28]。当耐药微生物或其耐药基因沿食物链传播进入人体时,就有可能降低人用治疗药物的效果。水体和土壤是耐药微生物产生和传播的重要场所,如水产养殖中,以原药方式直接进入水环境的抗生素会在鱼塘中富集、转化和迁移,并使鱼塘成为耐药菌扩展、演化和繁殖的重要媒介,特别是当不同种属的细菌在相互接触时还可能导致耐药基因的传播^[38]。此外,抗生素还可通过在农田施用动物排泄物和城市废水而进入土壤,使土壤也成为耐药微生物产生和传播的重要媒介,而且多种抗生素残留还会导致多种抗生素的超级耐药微生物的产生^[39]。

3.1.1 泰乐菌素耐药性的产生机制 细菌对泰乐菌素产生耐药性通常来源于细菌核糖体靶位的改变。泰乐菌素主要通过结合细菌核糖体靶位点 50S

亚基,促使肽酰 tRNA 在移位的过程中从核糖体上脱落下来,阻碍细菌蛋白质合成,从而起到杀菌或抑菌作用。据报道,在 23S rRNA 上发生甲基化是细菌对泰乐菌素产生耐药性的主要机制^[40-42]。23S rRNA 是 MLSB (Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B,大环内酯类、林可酰胺类和 B 类链阳霉素类抗生素的总称)类抗生素作用的靶目标^[42],细菌对泰乐菌素产生耐药性时,23S rRNA 中 2 058 位的腺嘌呤会发生腺嘌呤-N6-甲基转移修饰^[43-45]。M. Liu 等^[46]认为 TlrB 是在操纵子上编码抗泰乐菌素的一个基因,由其合成的甲基转移酶可作用于 23S rRNA 核苷酸序列的 G748 使其甲基化,从而改变了泰乐菌素结合细菌核糖体的靶位点。不过 M. Liu 等^[47]指出 TlrB 和 TlrD 可分别在 23S rRNA 核苷酸序列的 G748 和 A2058 添加甲基基团,但 TlrB 或 TlrD 的单独甲基化作用并不足以使细菌产生对泰乐菌素的耐药性,只有在 G748 和 A2058 协同甲基化的作用下才会产生耐药性。进一步的研究结果显示,产生对泰乐菌素的耐药性时,细菌 23S rRNA 核苷酸中 G748 甲基化的位置是 N-1, A2058 甲基化的位置是 N-6^[48]。

3.1.2 泰乐菌素耐药性的传播 J. C. Chee-Sanford 等^[49]认为,环境中耐药基因的主要来源是畜禽养殖业所排放的畜禽粪便。耐药基因可以随畜禽粪便进入土壤及水体,在迁移和传播的同时将抗性质粒(plasmid)带入食物链,通过在各种环境介质中的迁移、转化,最终使耐药基因的污染具有全球性^[50]。环境中抗生素耐药基因的预期暴露途径如图 2 所示。

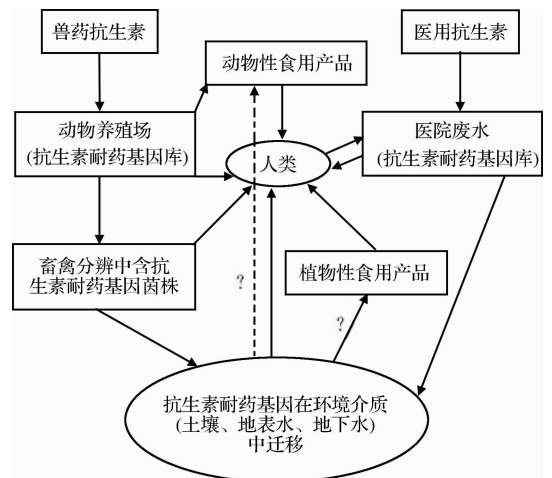


图 2 环境中抗生素耐药基因的预期暴露途径^[49]

Fig. 2 Potential exposure pathway of antibiotics resistance genes

细菌耐药基因的传播可以通过染色体介导,但更重要的是可以通过质粒和转座子(transposons)介导^[51]。耐药质粒可以通过转化、转导、接合、易位或转座等方式在菌群中相互传递而发生扩散,它不但可以在相同种属细菌间传播,而且可以在不同种属细菌(包括致病和非致病菌)间传播。在环境中,细菌耐药基因的表达受相应抗生素的诱导,抗生素的选择压力可导致耐药基因的持续存留。

K. G. Byrne-Bailey 等^[52]在土壤中施用含泰乐菌素的猪粪后,检测到整合子的丰富度和多样性明显增加。整合子是一种运动性的 DNA 分子,具有独特结构可捕获和整合外源性基因,使之转变为功能性基因的表达单位。它通过转座子或接合性质粒,使多重耐药基因在细菌中进行水平传播^[53]。J. Garder^[54]在农田中施用含泰乐菌素的猪粪,结果表明短期内土壤中泰乐菌素的浓度、抗泰乐菌素细菌和 *erm*(erythromycin ribosome methylation, 红霉素核糖体甲基化酶)耐药基因均有所增加。P. M. D. Costa 等^[55]分别给肉鸡饲料喂林可霉素+大观霉素、三甲氧苄二氨嘧啶+磺胺甲基异噁唑以及泰乐菌素,然而从试验组和对照组分离的肠球菌中均检测出对四环素、红霉素和呋喃妥英很高的耐药性。在对照组检测出耐药性说明耐药基因可能在试验动物间存在水平传播,如通过接触试验组鸡粪或其它途径等。S. Koike 等^[56]研究表明,使用泰乐菌素会导致 *erm* 基因对多种抗生素的耐药性,因此研究环境中影响耐药基因传播和持续的因素非常重要。

环境中耐药基因的水平传播可导致耐药菌在环境中的扩散,而且还会增加耐药基因进入生物体的可能性。J. Chen 等^[57]指出,测定微生物群落耐药性时需要了解耐药菌生态学,例如耐药菌或耐药性的产生、持续和传播等。S. Pakpour 等^[58]的研究表明,已经两年半没有使用抗生素的加拿大某猪场中 *erm* 耐药基因数量依然很多。J. Chen 等^[57]研究发现,牛粪中含有的编码 6 类 MLSB 耐药性的耐药基因 *erm*(A、B、C、F、T 和 X)比猪粪少,而且在粪池和污水中均可检测到类似基因,但采自猪粪堆肥过程中的样品耐药基因比猪粪大幅减少,这表明粪尿等废弃物的储存和处理方法对 MLSB 耐药性的持续和减少有重要作用。该研究还发现在猪粪中,超过 70% 的耐药基因是 *ermB*, 25% 是 *ermT*, 2% 是 *ermF*, 因此认为耐药基因 *erm* 是泰乐菌素的主要耐药基因,而且也是大多数 MLS 类抗生素的耐药基

因。A. Portillo 等^[59]的研究也表明, *ermB* 在 MLS 类抗生素耐药基因中含量最多。

目前在土壤微生物耐药性方面研究较多的是群落诱导抗性(pollution-induced community tolerance, PICT),而且 PICT 也是当前抗生素生态毒理研究的热点之一。PICT 指土壤微生物群落为了在抗生素污染的环境中继续生存,通过生理生化与遗传特征的改变或以抗性类群代替敏感性类群,从而使整个群落产生抗性并不断提高。兽药作用时间、种类和浓度等是土壤微生物群落诱导抗性产生与传播的主要影响因素^[29]。

3.2 泰乐菌素的微生物降解

土壤中残留的泰乐菌素可发生光解和生物降解等一系列降解反应。由于土壤中存在大量的微生物,因此微生物降解是土壤中泰乐菌素降解的重要方式。然而,抗生素的微生物降解受到多种因素影响,如畜禽废弃物中含有大量微生物,而且这些微生物已经在畜禽体内接触过抗生素从而有了一定的降解能力,它们随粪便进入土壤后,会直接影响土壤中的微生物,进而影响土壤微生物对抗生素的降解能力。F. Ingerslev 等^[9]认为兽用抗生素的生物降解过程可能受土壤性质和土壤生物的影响,在地表(< 0.25 m)有氧生物降解是含粪土壤中兽用抗生素降解的主要方式。P. B. Hatzinger 等^[60]认为土壤颗粒对抗生素的吸附可能会减少抗生素的生物利用率和生物降解能力。此外土壤中有机的种类与含量也会增加^[61]或者降低抗生素的微生物降解^[62]。J. C. Carlson 等^[63]研究了土壤中泰乐菌素的降解情况,发现在加入粪便的情况下土壤中泰乐菌素的半衰期是 4.5 d,没有加入粪便时半衰期是 6.1 d,因此作者认为有粪便加入时土壤中泰乐菌素降解显著加快与粪便中微生物有关。D. Hu 等^[8]认为吸附和非生物降解是影响泰乐菌素在环境中降解的主要因素;不过 S. A. Sassman 等^[64]研究表明,非生物因素和微生物因素均有利于 Tylosin A 的降解;非生物因素对泰乐菌素的降解作用较小,并且在试验前 2 周占主导,试验最后 3 d 微生物降解占主导,能促使降解过程较快完成。

3.3 可降解泰乐菌素的微生物

目前利用微生物降低和消除环境中的有机物残留已被证明是一种行之有效的方法,并已显示出良好的应用前景。可降解兽药微生物的获得途径主要有两种,一是从受兽药污染的土壤、污水处理厂等环

境中富集、驯化、筛选、分离高效降解微生物,这是目前用的最多的一种方法;二是定向培育微生物,其方法是在土壤中通过人为多次施药,培育可降解该兽药微生物,并从中分离出高效降解菌株。确认可降解兽药的微生物是环境中兽药残留生物修复的一项重要工作,它对于开发降解兽药的微生物资源、了解降解微生物的起源与分布具有重要意义。然而目前的研究主要集中在可降解兽药微生物的培育及其效果分析方面,环境中可降解兽药的微生物是天然存在还是来自于环境中兽药残留诱导或来自于畜禽粪便,以及可降解兽药的微生物对进入环境的兽药残留有何影响等,均值得进一步研究探讨。

马玉龙等^[65]从长期堆放泰乐菌素药渣的土壤中筛选到对泰乐菌素具有良好降解效果的复合菌株,将该菌株以 10% 的接种量接入药渣培养基,在 30~35 °C、pH 7 和 120 r·min⁻¹ 下振荡培养 120 h 后培养基中未检出泰乐菌素残留。作者还从降解泰乐菌素的复合菌中分离纯化得到 4 株菌,其中 FY 菌株对泰乐菌素具有较好的降解效果,该菌株经 16S rRNA 鉴定为无丙二酸柠檬酸杆菌(*Citrobacter amalonaticus*),而且还发现 4 株单一菌对泰乐菌素的降解效果没有复合菌的降解效果明显。刘力嘉等^[66]也从长期堆放泰乐菌素药渣的土壤中分离纯化出 1 株高效降解泰乐菌素的菌株,经鉴定也为无丙二酸柠檬酸杆菌,该降解菌在 30 °C、pH 6.5、摇床转速 125 r·min⁻¹、接种量 10% 的条件下培养 48 h,对泰乐菌素(50 mg·L⁻¹)的降解率达 95.2%。张新沙等^[67]研究表明无丙二酸柠檬酸杆菌产生的胞内酶对泰乐菌素具有较强的降解作用,在 35 °C、转速 130 r·min⁻¹ 的摇床中好氧培养 3 d 后,对 20 mg·L⁻¹ 泰乐菌素的降解率为 41.34%;同时经鉴定,无丙二酸柠檬酸杆菌产生的胞内酶为组成酶,其降解泰乐菌素的适宜条件为温度 35 °C、pH 5.5、加酶量 12%。孙瑞珠等^[68]也筛选分离出 1 株泰乐菌素高效降解菌株 TS1,该菌株对不同初始浓度(50、100、200、300、400、500 mg·L⁻¹)泰乐菌素的降解符合一级动力学特征。当泰乐菌素浓度在 100~400 mg·L⁻¹ 时,降解速率常数 k 均大于 0.4,半衰期小于 2 d;不过当浓度达到一定限度时,泰乐菌素会抑制菌株对其降解;在降解体系中,蛋白胨或氮氮的加入可促进菌株对泰乐菌素的降解作用,而加入葡萄糖则有抑制作用。

4 研究展望

目前,在畜禽废弃物、土壤等环境介质中都检测到泰乐菌素残留,而且已有研究表明环境中泰乐菌素残留对土壤微生物的数量、群落结构和功能等方面都会产生影响,同时土壤微生物受到泰乐菌素胁迫时会产生适应性。但是目前的研究并未明确进入土壤后的泰乐菌素会对土壤中何种微生物产生影响,这种影响会不会改变所进入土壤系统的基本功能;同时也未明确土壤微生物对泰乐菌素产生耐药性的原因,即这种耐药性是天然存在还是诱导产生或经由畜禽废弃物水平传播;同时,对土壤中泰乐菌素耐药基因的研究还应涉及其传播途径及消除措施等。此外,已有一些研究关注到可降解泰乐菌素微生物,但是这种微生物的产生机制及其对泰乐菌素的降解机制等也需进一步研究。有学者认为,培养可降解兽药的微生物用以降低或消除环境介质中的兽药残留可能会造成兽药耐药基因的扩散,这也值得进一步研究与关注。

参考文献:

- [1] 亢继俊,曾振灵.大环内酯类药物在猪病防治中的应用[C]//中国畜牧兽医学学会养猪学分会 2009 年学术年会“回盛生物”杯全国养猪技术论文大赛论文集,2009:332-337.
- [2] CHEE-SANFORD J C, MACKIE R I, KOIKE S, et al. Fate and transport of antibiotic residues and antibiotic resistance genes following land application of manure waste[J]. *J Environ Qual*, 2009, 38(3): 1086-1108.
- [3] HORIE M, SAITO K, ISHII R, et al. Simultaneous determination of five macrolide antibiotics in meat by high-performance liquid chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 1998, 812(1-2): 295-302.
- [4] LOKE M L, TJØORNELUND J, HALLING-SØRENSEN B. Determination of the distribution coefficient (log K_d) of oxytetracycline, tylosin A, olaquinox and metronidazole in manure [J]. *Chemosphere*, 2002, 48(3): 351-361.
- [5] LOKE M L, INGERSLEV F, HALLING-SØRENSEN B, et al. Stability of tylosin A in manure containing test systems determined by high performance liquid chromatography[J]. *Chemosphere*, 2000, 40(7): 759-765.
- [6] KOLPIN D W, FURLONG E T, MEYER M T, et al.

- Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: A national reconnaissance[J]. *Environ Sci Technol*, 2002, 36(6):1202-1211.
- [7] KOLZ A C, MOORMAN T B, ONG S K, et al. Degradation and metabolite production of tylosin in anaerobic and aerobic swine-manure lagoons[J]. *Water Environ Res*, 2005, 77(1):49-56.
- [8] HU D, COATS J R. Aerobic degradation and photolysis of tylosin in water and soil[J]. *Environ Toxicol Chem*, 2007, 26(5):884-889.
- [9] INGERSLEV F, HALLING-SØRENSEN B. Biodegradability of metronidazole, olaquinox, and tylosin and formation of tylosin degradation products in aerobic soil-manure slurries[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2001, 48(3):311-320.
- [10] KUMAR K, THOMPSON A, SINGH A K, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for ultratrace determination of antibiotics in aqueous samples[J]. *J Environ Qual*, 2004, 33(1):250-256.
- [11] MELLON M G, BENBROOK C, BENBROOK K L. Hogging it: estimates of antimicrobial abuse in livestock[M]. Union of Concerned Scientists, 2001.
- [12] DOLLIVER H, GUPTA S. Antibiotic losses in leaching and surface runoff from manure-amended agricultural land[J]. *J Environ Qual*, 2008, 37(3):1227-1237.
- [13] KOLZ A C, ONG S K, MOORMAN T B. Sorption of tylosin onto swine manure[J]. *Chemosphere*, 2005, 60(2):284-289.
- [14] HOESE A, CLAY S A, CLAY D E, et al. Chlortetracycline and tylosin runoff from soils treated with antimicrobial containing manure [J]. *J Environ Sci Health*, 2009, 44(4):371-378.
- [15] WATKINSON A J, MURBY E J, COSTANZO S D. Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: Implications for environmental discharge and wastewater recycling[J]. *Water Res*, 2007, 41(18):4164-4176.
- [16] 李艳霞, 李 帷, 张雪莲, 等. 固相萃取-高效液相色谱法同时检测畜禽粪便中 14 种兽药抗生素[J]. *分析化学*, 2012, 40(2):213-217.
- [17] ZHOU L, YING G, LIU S, et al. Excretion masses and environmental occurrence of antibiotics in typical swine and dairy cattle farms in China[J]. *Sci Total Environ*, 2013, 444:183-195.
- [18] LI Y, ZHANG X, LI W, et al. The residues and environmental risks of multiple veterinary antibiotics in animal faeces [J]. *Environ Monit Assess*, 2013, 185(3):2211-2220.
- [19] ZUCCATO E, CALAMARI D, NATANGELO M, et al. Presence of therapeutic drugs in the environment [J]. *The Lancet*, 2000, 355(9217):1789-1790.
- [20] PROIA L, LUPINI G, OSORIO V, et al. Response of biofilm bacterial communities to antibiotic pollutants in a Mediterranean river[J]. *Chemosphere*, 2013, 92:1126-1135.
- [21] HALLER M Y, MULLER S R, MCARDELL C S, et al. Quantification of veterinary antibiotics (sulfonamides and trimethoprim) in animal manure by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2002, 952(1):111-120.
- [22] HALLING-SØRENSEN B, JACOBSEN A M, JENSEN J, et al. Dissipation and effects of chlortetracycline and tylosin in two agricultural soils: A field-scale study in southern Denmark [J]. *Environ Toxicol Chem*, 2005, 24(4):802-810.
- [23] CALAMARI D, ZUCCATO E, CASTIGLIONI S, et al. Strategic survey of therapeutic drugs in the rivers Po and Lambro in northern Italy [J]. *Environ Sci Technol*, 2003, 37(7):1241-1248.
- [24] 段夏珍. 惠州市蔬菜基地抗生素污染特征的初步研究[D]. 暨南大学, 2011.
- [25] 杨林. 海河流域底泥中残留药物与个人护理品的检测及生态风险分析[D]. 中南林业科技大学, 2011.
- [26] 张劲强, 董元华, 安 琼, 等. 兽药抗生素在土壤环境中的行为[J]. *土壤*, 2005, 37(4):353-361.
- [27] 刘吉强, 诸葛玉平, 杨 鹤, 等. 兽药抗生素的残留状况与环境行为 [J]. *土壤通报*, 2008, 39(5):1198-1203.
- [28] 王 敏, 唐景春. 土壤中的抗生素污染及其生态毒性研究[C]//第三届全国农业环境科学学术研讨会论文集. 2009:450-456.
- [29] 张 敏, 付海滨, 刘庆玉, 等. 土壤中兽药残留对微生物影响的研究进展[J]. *土壤通报*, 2009, 40(5):1221-1225.
- [30] 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):265-270.
- [31] WESTERGAARD K, MULLER A K, CHRISTENSEN S, et al. Effects of tylosin as a disturbance on the soil microbial community[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33(15):2061-2071.
- [32] 李孟阳. 泰乐菌素对土壤微生物活性及群落多样性的影响[D]. 武汉:华中农业大学, 2011.

- [33] CHANDER Y, GUPTA S C, KUMAR K, et al. Antibiotic use and the prevalence of antibiotic resistant bacteria on turkey farms[J]. *J Sci Food Agric*, 2008, 88(4): 714-719.
- [34] ONAN L J, LAPARA T M. Tylosin-resistant bacteria cultivated from agricultural soil[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2006, 220(1): 15-20.
- [35] MULLER A K, WESTERGAARD K, CHRISTENSEN S, et al. The diversity and function of soil microbial communities exposed to different disturbances [J]. *Microb Ecol*, 2002, 44(1): 49-58.
- [36] STONE J J, DREIS E K, LUPO C D, et al. Land application of tylosin and chlortetracycline swine manure: Impacts to soil nutrients and soil microbial community structure[J]. *J Environ Sci Health*, 2011, 46(8): 752-762.
- [37] 刘 锋, 应光国, 周启星, 等. 抗生素类药物对土壤微生物呼吸的影响[J]. *环境科学*, 2009, 30(5): 1280-1285.
- [38] DAVISON J. Genetic exchange between bacteria in the environment[J]. *Plasmid*, 1999, 42(2): 73-91.
- [39] WOLLENBERGER L, HALLING-SORENSEN B, KUSK K O. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna* [J]. *Chemosphere*, 2000, 40(7): 723-730.
- [40] GATTETT R A, DOUTHWAITE S R, LILJAS A, et al. The ribosome: structure, function, antibiotics, and cellular interactions [M]. Washington DC: ASM Press, 2000.
- [41] NASH K A. Intrinsic macrolide resistance in *Mycobacterium smegmatis* is conferred by a novel erm gene, erm (38) [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47(10): 3053-3060.
- [42] WEISBLUM B. Erythromycin resistance by ribosome modification. [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995, 39(3): 577.
- [43] ANDERSSON S, KURLAND C G. Elongating ribosomes in vivo are refractory to erythromycin Les ribosomes en train de s'allonger in vivo sont réfractaires à l'érythromycine [J]. *Biochimie*, 1987, 69(8): 901-904.
- [44] FLUIT A C, VISSER M R, SCHMITZ F. Molecular detection of antimicrobial resistance[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2001, 14(4): 836-871.
- [45] VESTER B, DOUTHWAITE S. Domain V of 23S rRNA contains all the structural elements necessary for recognition by the ErmE methyltransferase. [J]. *J Bacteriol*, 1994, 176(22): 6999-7004.
- [46] LIU M, KIRPEKAR F, VAN WEZEL G P, et al. The tylosin resistance gene tlrB of streptomyces fradiae encodes a methyltransferase that targets G748 in 23S rRNA[J]. *Mol Microbiol*, 2000, 37(4): 811-820.
- [47] LIU M, DOUTHWAITE S. Resistance to the macrolide antibiotic tylosin is conferred by single methylations at 23S rRNA nucleotides G748 and A2058 acting in synergy[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(23): 14658-14663.
- [48] DOUTHWAITE S, CRAIN P F, LIU M, et al. The tylosin-resistance methyltransferase RlmA^{II} (TlrB) modifies the N-1 position of 23 S rRNA nucleotide G748 [J]. *J Mol Biol*, 2004, 337(5): 1073-1077.
- [49] 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(4): 1494-1502.
- [50] 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): 243-250.
- [51] 王 兰. 抗生素污染现状及对环境微生态的影响[J]. *药物生物技术*, 2006, 13(2): 144-148.
- [52] BYRNE-BAILEY K G, GAZE W H, ZHANG L, et al. Integron prevalence and diversity in manured soil [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(2): 684-687.
- [53] FLUIT A C, SCHMITZ F J. Resistance integrons and super-integrons[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2004, 10(4): 272-288.
- [54] GARDER J. Occurrence and movement of total and tylosin-resistant enterococci, erm genes and tylosin in tile-drained agricultural fields receiving swine manure application[D]. Iowa State University, 2012.
- [55] COSTA P M D, BICA A, VAZ-PIRES P, et al. Changes in antimicrobial resistance among faecal enterococci isolated from growing broilers prophylactically medicated with three commercial antimicrobials[J]. *Prev Vet Med*, 2010, 93(1): 71-76.
- [56] KOIKE S, AMINOV R I, YANNARELL A C, et al. Molecular ecology of macrolide-lincosamide-streptogramin B methylases in waste lagoons and subsurface waters associated with swine production[J]. *Microb Ecol*, 2010, 59(3): 487-498.
- [57] CHEN J, YU Z, MICHEL F C, et al. Development and application of real-time PCR assays for quantification of erm genes conferring resistance to macrolides-

- lincosamides-streptogramin B in livestock manure and manure management systems[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(14):4407-4416.
- [58] PAKPOUR S, JABAJI S, CHENIER M R. Frequency of antibiotic resistance in a swine facility 2.5 years after a ban on antibiotics[J]. *Microb Ecol*, 2012, 63(1):41-50.
- [59] PORTILLO A, RUIZ-LARREA F, ZARAZAGA M, et al. Macrolide resistance genes in *Enterococcus* spp. [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44(4):967-971.
- [60] HATZINGER P B, ALEXANDER M. Biodegradation of organic compounds sequestered in organic solids or in nanopores within silica particles[J]. *Environ Toxicol Chem*, 1997, 16(11):2215-2221.
- [61] SHIMP R J, PFAENDER F K. Influence of easily degradable naturally occurring carbon substrates on biodegradation of monosubstituted phenols by aquatic bacteria[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1985, 49(2):394-401.
- [62] ZAIDI B R, MEHTA N K. Effects of organic compounds on the degradation of p-nitrophenol in lake and industrial wastewater by inoculated bacteria[J]. *Bio-degradation*, 1995, 6(4):275-281.
- [63] CARLSON J C, MABURY S A. Dissipation kinetics and mobility of chlortetracycline, tylosin, and monensin in an agricultural soil in Northumberland County, Ontario, Canada[J]. *Environ Toxicol Chem*, 2009, 25(1):1-10.
- [64] SASSMAN S A, SATMAH A K, LEE L S. Sorption of tylosin A, D, and A-aldol and degradation of tylosin a in soils[J]. *Environ Toxicol Chem*, 2007, 26(8):1629-1635.
- [65] 马玉龙, 张作义, 刘宁普, 等. 废弃药渣中残留泰乐菌素降解菌的筛选[J]. 环境科学研究, 2010, 23(8):1076-1080.
- [66] 刘力嘉, 谢 丽, 张作义, 等. 泰乐菌素高效降解菌的筛选及降解特性研究[J]. 农业环境科学学报, 2011, 30(5):1027-1030.
- [67] 张新沙, 马玉龙, 刘力嘉, 等. 药渣残留泰乐菌素的酶促降解特性[J]. 环境工程学报, 2012, 6(11):4179-4184.
- [68] 孙瑞珠, 马玉龙, 张 娟, 等. 泰乐菌素降解菌的筛选及其降解动力学研究[J]. 中国环境科学, 2013, 33(4):722-727.

(编辑 白永平)