

基于 SmartChip HT-qPCR 分析不同食品中 抗生素抗性基因的多样性及丰度

陈亚波¹, 谭贵良^{2*}, 胡燕玲¹, 金倩仪¹, 朱爽³, 孟嫚⁴, 邱雨薇², 李雪雁²

(1. 中山市食品药品检验所, 广东中山 528437) (2. 电子科技大学中山学院, 广东中山 528402) (3. 广东药科大学
学生命科学与生物制药学院, 广东广州 510006) (4. 广东利诚检测技术有限公司, 广东中山 528436)

摘要: 抗生素抗性基因 (Antibiotics Resistance Genes, ARGs) 广泛存在于各种环境中, 被认为是一种新型环境污染物, 对环境及人类健康具有潜在威胁。但是目前对于不同食品中多种 ARGs 赋存状况的研究仍然有限。该研究采用 SmartChip 高通量实时定量 PCR 方法 (High-Throughput Quantitative Real-Time PCR, HT-qPCR) 对水产品、发酵食品、肉类、蔬菜四大类样品中的 ARGs 及可移动遗传元件 (Mobile Genetic Elements, MGEs) 进行了定量分析。结果显示, 被分析的 15 个样品中共检出 9 个 ARGs 大类, 涉及 234 个 ARGs 亚类。所有样品中共有的 ARGs 亚类为 79 个, 特有的为 51 个; 水产品 and 肉类样品富集多种 ARGs, 这些基因表现出较高的丰度 (最高可达 3.6 copies/16S rRNA gene)。MGEs 的检出数量达 10 个, 其中所有样均检出整合子基因 *int1-1(clinic)* 和转座酶基因 *tnpA-01*。ARGs 抵抗机制分析结果表明, 抗生素灭活机制、外排泵机制和细胞保护机制为主要的 ARGs 抵抗机制, 抵抗机制贡献大小依次为: 抗生素灭活机制>外排泵机制>细胞保护机制。该研究进一步丰富了对不同食品中 ARGs 赋存情况的认识, 可为食品中 ARGs 的风险分析提供依据。

关键词: 食品; 高通量实时定量 PCR; 抗生素抗性基因; 可移动遗传元件; 多样性和丰度

文章编号: 1673-9078(2023)08-304-310

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.8.1208

Diversity and Abundance of Antibiotic Resistance Genes in Various Types of Food Using SmartChip HT-qPCR

CHEN Yabo¹, TAN Guiliang^{2*}, HU Yanling¹, JIN Qianyi¹, ZHU Shuang³, MENG Man⁴, QIU Yuwei², LI Xueyan²

(1. Zhongshan Institute for Food and Drug Control, Zhongshan 528437, China)

(2. Zhongshan Institute, University of Electronic Science and Technology of China, Zhongshan 528402, China)

(3. School of Biosciences and Biopharmaceutics, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

(4. Guangdong Licheng Detection Technology Co. Ltd., Zhongshan 528436, China)

Abstract: Antibiotic resistance genes (ARGs), recognized as emerging environmental contaminants that potentially threaten environments and human health, have been widely identified in various environments. However, the prevalence of ARGs in various types of food is not well understood. In this study, the diversity and abundance of ARGs and mobile genetic elements (MGEs) from four types of food, including aquatic products, fermented food, meat, and vegetables, were quantitatively detected using SmartChip high-throughput quantitative real-time PCR (HT-qPCR). A total of 234 ARG subtypes belonging to 9 ARG types were detected in all 15 samples. Among them, 79 ARG subtypes were

引文格式:

陈亚波, 谭贵良, 胡燕玲, 等. 基于 SmartChip HT-qPCR 分析不同食品中抗生素抗性基因的多样性及丰度[J]. 现代食品科技, 2023, 39(8): 304-310

CHEN Yabo, TAN Guiliang, HU Yanling, et al. Diversity and abundance of antibiotic resistance genes in various types of food using SmartChip HT-qPCR [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(8): 304-310

收稿日期: 2022-09-22

基金项目: 中山市社会公益重大专项 (2019B2012; 2020B2010); 广东省自然科学基金面上项目 (2020A1515011308; 2022A1515012158); 广东省教学质量与教学改革工程建设项目 (SJD202001)

作者简介: 陈亚波 (1979-), 女, 硕士, 高级工程师, 研究方向: 食品微生物, E-mail: bobozju@163.com

通讯作者: 谭贵良 (1977-), 男, 博士, 教授级高级工程师, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: joe88tan@126.com

common in all samples, and 51 ARG subtypes were detected in specific samples. More ARG types were found in aquatic products and meat (the highest abundance being up to 3.6 copies/16S rRNA gene). Additionally, ten MGEs were detected; among these, integrase gene *intI-1* (*clinic*) and transposase gene *tnpA-01* were both detected in all samples. The analysis of resistance mechanisms of ARGs suggests that antibiotic deactivation, efflux pump, and cellular protection formed the main resistance mechanisms. The contribution of ARGs to resistance was as follows: antibiotic deactivation > efflux pump > cellular protection. The findings of this study will enhance our understanding of the occurrence of ARGs and MGEs in different types of food and provide important information for an integrative risk assessment of food.

Key words: food; high-throughput qPCR; antibiotics resistance genes; mobile genetic elements; diversity and abundance

抗生素是指由微生物（包括细菌、真菌、放线菌属）或高等动植物在生活过程中所产生的具有抗病原体或其他活性的一类次级代谢产物或人工合成的类似物。抗生素对微生物的生长和代谢活动有较强的抑制作用，其在低浓度下就可在一定程度上抑制甚至杀死其他微生物^[1]。据不完全统计，2020 年我国农用抗生素产量达到 23.14 万 t，预计 2022 年我国农用抗生素产量达 23.86 万 t。然而抗生素的过量或长期低剂量的使用会使微生物产生耐药性^[2]，导致抗生素抗性基因（Antibiotics Resistance Genes, ARGs）的产生和传播^[3]。

ARGs 被认定为 21 世纪新型污染物^[4]，它广泛存在于人类、动物体内以及复杂的环境中。ARGs 可通过各种可移动遗传元件(Mobile Genetic Elements, MGEs)如整合子、转座子或质粒等，通过水平基因转移（Horizontal Gene Transfer, HGT）的方式，转移到其它环境细菌和致病菌中^[5]，对人类健康和生态环境造成潜在威胁。目前针对 ARGs 的大多数研究主要集中在土壤、饮用水、医院和生活污水等环境领域^[6-8]，对于食品领域中 ARGs 的研究报道相对较少。在食品领域，已有的研究大都基于普通 PCR 或传统荧光定量 PCR（q-PCR）检测食品中的 ARGs。研究发现，在虾、鱼和贝类等水产品中可检出磺胺类、四环素类、氨基糖苷类 ARGs（如 *tetA*、*tetB*、*tetM*、*sul II*、*floR*、*aphA-I*、*aadA*、*ermB*、*cmlA*）^[9]；在发酵乳制品中可检出 *tetO*、*ermB*、*cat* 等 22 种常见 ARGs^[10]；在肉类、水产品、蔬菜和水果中可检出 11 个 ARGs^[11]；在畜禽养殖场周边蔬菜地生食蔬菜可检出磺胺类、四环素类、大环内酯类、氯霉素类、喹诺酮类 4 类 ARGs^[12]。最近，也有报道采用宏基因组测序方法研究了商品腐乳^[13]、辣椒酱^[14]以及牛奶和牛奶生产环境^[15]中 ARGs 的分布和丰度。与前者不同，后者宏基因组测序方法属于高通量方法，不需要专门针对具体 ARGs 的种类设计引物，可检测出超过 150 种 ARGs^[15]。对更多的食品及环境中多种 ARGs 的检测分析，是当前以及今后一个重要的研究方向。

SmartChip 定量 PCR 系统是美国 WaferGen Biosystems 公司推出的一款高密度、纳升级别的高通量实

时定量 PCR 系统(High-Throughput qPCR, HT-qPCR)^[16]。一张 SmartChip 包含 5 184 个微孔，一次运行可同时完成多达 5 184 个独立的扩增反应。该系统广泛应用于基因表达定量、基因分型等研究领域。特别是近年来 SmartChip 定量 PCR 系统在环境领域中 ARGs 的研究备受关注，研究涉及土壤^[17]、猪粪施肥下的水稻和小麦叶片^[16]，土壤及蔬菜^[18]，最近也开始陆续应用于即食沙拉^[19]、海鲈^[20]等食品安全领域研究。但是对于采用 HT-qPCR 同时分析不同类型食品中 ARGs 的研究至今未见报道。

考虑到 ARGs 对人体健康的潜在风险，更全面的评估不同食品中的 ARGs 多样性及丰度显得尤为必要。因此，本研究针对现有研究不足，采用 SmartChip HT-qPCR 方法，使用 296 对引物对水产品、发酵食品、肉类、蔬菜的 285 个 ARGs 和 10 个 MGEs 标记基因进行定量分析，旨在探究这些食品中 ARGs 和 MGEs 的分布特征，为潜在的食品安全风险提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 实验样品

分为水产品、发酵食品、肉类、蔬菜四大类，共 15 个样品。其中水产品样品 2 个（海鲈，AP-SB-2；草鱼，AP-WA-2）、发酵食品 2 个（黄豆酱，F-HDJ7；发酵火腿，F-HT1）、肉类 3 个（牛肉，M-BE-2；鸽子肉，M-DO-2；猪肉，M-PO-2）、蔬菜 8 个（大白菜，V-CA-3；香菜，V-CI-3；生菜，V-CL-2；生菜，V-CL-3；枸杞叶，V-CWL-3；莴苣，V-LE-2；番茄，V-TO-2；白萝卜，V-TU-2）。上述样品取自中山市的菜市场、海鲜市场和超市，于 2 h 内运送至实验室。

1.2 主要仪器与设备

SmartChip Real-time PCR 系统，美国 WaferGen Biosystems；Milli-Q Integral 3 System 纯水系统，美国 Millipore 公司；高速冷冻离心机，德国 Sigma 公司；均质器，西班牙 IUL 公司，组织匀浆仪，美国 MP 公司；Qubit 2.0 荧光计，美国 Invitrogen 公司。

1.3 样品前处理

处理样品前, 将所有器具包括砧板、解剖刀、剪刀、镊子、研钵等进行灭菌处理; 样品解剖过程带无菌乳胶手套。

(1) 鱼样: 取解冻后的鱼清洗表面, 用解剖刀分离出肉及内脏。取约 25 g 肉或内脏放入带侧滤的一次性无菌均质袋中称重, 加入 10 倍体积 0.1% (m/V) 蛋白胨水, 放入拍打式均质器中拍打 2 min~3 min; 用无菌移液管吸出滤液, 于 -80 °C 保存以备下一步提取 DNA。

(2) 畜禽肉: 取解冻后的样品, 清洗表面, 取约 25 g 肉或内脏放入带侧滤的一次性无菌均质袋中称重, 加入 10 倍体积 0.1% (m/V) 蛋白胨水, 放入拍打仪拍打 2 min~3 min; 用无菌移液管吸出滤液, 于 -80 °C 保存以备下一步提取 DNA。

(3) 蔬菜: 方法 1: 用研钵研磨或用剪刀剪碎样品, 取约 25 g 左右样品放入带侧滤的一次性无菌均质袋中称重, 加入 10 倍体积 0.1% (m/V) 蛋白胨水。放入拍打仪拍打 2 min~3 min; 用无菌移液管吸出滤液, 于 -80 °C 保存以备下一步提取 DNA。方法 2: 取蔬菜日常可食用部分, 经无菌水清洗后, 称量按叶菜类 1:4、根茎类 1:1 的比例加入 0.1% (m/V) 蛋白胨水, 浸泡 30 min 后超声 5 min, 将上清用 0.22 μm 滤膜抽滤, 用无菌剪刀剪碎滤膜以备下一步提取 DNA。

(4) 发酵食品: 直接取 0.5 g 样品, 进行下一步 DNA 提取。

1.4 总 DNA 的提取

采用 EZNA™ Mag-Bind Food DNA kit (Omega Bio-Tek, Inc., Norcross, GA, 美国) 提取样品中的总 DNA, 每个样 3 个重复。DNA 浓度和质量采用 Qubit 2.0 进行测定和评估, 提取的 DNA 保存于 -20 °C, 以备后续分析。

1.5 ARGs 和 MGEs 的高通量测定

抗生素抗性基因检测使用 SmartChip 高通量荧光定量 PCR 系统完成, 该系统每次能够并行 5 184 个纳升级 qPCR 反应。本次实验中共设置 296 对引物, 其中 285 对抗性基因引物、10 对可转移基因引物对 (包括 2 对 I 类整合酶基因、8 对转座酶基因)、1 对细菌通用 16S rRNA 基因内参引物。高通量荧光定量 PCR 扩增体系的体积为 100 nL, 其反应体系为: 1×LightCycler 480 SYBR Green I Master、500 nmol/L each primer、DNA 模板 2 ng/ μL 。PCR 反应混合液先使用纳升级多样品点样仪 (MSND) 的 16 (Samples) × 296 (Assays) 模式

加入到微孔芯片中, 随后在 cycler 上进行 qPCR 反应, 共运行 3 张芯片。PCR 反应程序为: 预变性 95 °C, 10 min; 接着 95 °C 变性 30 s、60 °C 退化 30 s, 共 40 个循环。使用仪器的 qPCR 软件对 qPCR 结果进行自动分析。检测阈值 $C_t=31$, 每个样品进行 3 次技术重复, 至少 2 次技术重复都扩增出来则被认为目的基因在该样品中有检出。做相对定量时, 作图数据采用 $Relative\ copy\ number = Copy_{(gene)} / Copy_{(16S)}$, 其中 $Copy_{(gene)}$ 和 $Copy_{(16S)}$ 均来自同一样品。其中, $Copy = 10^{(31-C_t)/(10/3)}$ 。将 $Relative\ copy\ number \times 10^6$, 然后取以 10 为底的对数值, 进行热图绘制。采用利用 R package pheatmap (版本 1.0.8) 绘制聚类热图。

1.6 数据分析

采用 Excel 2019 进行数据整理, 采用 GraphPad Prism 8 进行柱状图作图。

2 结果与讨论

2.1 ARGs 和 MGEs 的多样性

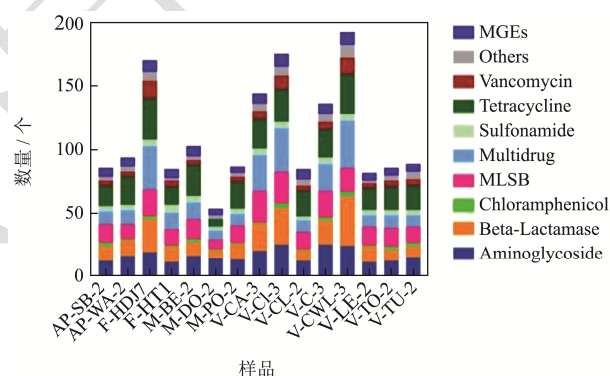


图 1 不同样品中 ARGs 的数量及多样性

Fig.1 Numbers and diversity of ARGs detected in various samples

在所有检测的样品中, 共检测到 9 个大类的抗生素抗性基因 (图 1), 分别是氨基糖苷类 (Aminoglycoside)、 β -内酰胺类 (Beta-Lactamase)、氯霉素类 (Chloramphenicol)、大环内酯-林可霉素-链阳霉素类 (Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B, MLSB)、多重耐药类 (Multidrug)、磺胺类 (Sulfonamide)、四环素类 (Tetracycline)、万古霉素 (Vancomycin) 以及其他类。其中, 样品 F-HDJ7 (黄豆酱)、V-CA-3 (大白菜)、V-CI-3 (香菜)、V-CL-3 (生菜) 和 V-CWL-3 (枸杞叶) 检出的 ARGs 较多, 分别检测出 ARGs 161 个、136 个、165 个、128 个和 182 个。这些样品中检测到的 ARGs 数量与前人在即食沙拉样品到的大致相同 (156 个) [19]。上述 15 个样品共

检出 ARGs 亚类（指具体的 ARG）234 个（氨基糖苷类 33 个， β -内酰胺类 45 个，氯霉素类 3 个，多重耐药类 45 个，MLSB 33 个，磺胺类 6 个，四环素类 36 个，万古霉素类 21 个、其他类 12 个以及移动基因元件 10 个（*IS613*、*Tp614*、*cIntI-1(class1)*、*intI-1(clinic)*、*tnpA-01*、*tnpA-02*、*tnpA-03*、*tnpA-04*、*tnpA-05*、*tnpA-07*）（表 1）。

细菌可以通过可移动遗传元件（MGEs）如整合子、转座子、质粒的水平基因转移而获得 ARGs^[5]，从而使该菌获得抗生素抗性。MGEs 是部分 ARGs 的携带载体，在 ARGs 的水平转移中起着非常重要的作用，其转移不但可以发生在同一种属细菌甚至还发生在细菌和真菌之间^[21]。对 MGEs 的分布研究发现（表 1），所有样品均可检出整合酶和转座酶基因。具体而言，所有样

均能检测整合子基因 *intI-1(clinic)*；除了 M-DO-2 和 V-CA-3 外，其余样品均能检出转座酶基因 *tnpA-01* 和 *Tp614*，所分析的 8 个转座酶基因均能在 2 个蔬菜样品（V-CI-3 和 V-CWL-3）被检出。*intI-1* 属于 I 类整合子，在前人对水产品^[9]和零售食品^[22]的研究中也均有发现。研究发现，超过 80% 的人体或畜禽体内的肠细菌（Enterobacteria）中存在该整合子^[23]。整合子是一种重要的基因捕获和传播元件，能够通过整合酶从外界环境中捕获和堆积一个或多个 ARGs，在微生物的耐药性中具有重要作用，是耐药基因水平传播的重要机制。在所有样品中均检测到 I 类整合子，说明抗生素的使用增加了这类基因尤其 *intI-1 (clinic)* 的丰度，这些 MGEs 介导的细菌耐药性传播而引起的食源性疾病应引起重视。

表 1 样品中的 MGEs 分布
Table 1 The diversity of MGEs

样品	整合酶基因	转座酶基因
AP-SB-2	<i>intI-1(clinic)</i> 、 <i>cIntI-1(class1)</i>	<i>tnpA-01</i> 、 <i>tnpA-03</i> 、 <i>tnpA-04</i> 、 <i>IS613</i> 、 <i>Tp614</i>
AP-WA-2	<i>intI-1(clinic)</i>	<i>tnpA-01</i> 、 <i>tnpA-02</i> 、 <i>tnpA-04</i> 、 <i>tnpA-05</i> 、 <i>IS613</i> 、 <i>Tp614</i>
F-HDJ7	<i>intI-1(clinic)</i> 、 <i>cIntI-1(class1)</i>	<i>tnpA-01</i> 、 <i>tnpA-03</i> 、 <i>tnpA-04</i> 、 <i>tnpA-05</i> 、 <i>tnpA-07</i> 、 <i>IS613</i> 、 <i>Tp614</i>
F-HT1	<i>intI-1(clinic)</i>	<i>tnpA-01</i> 、 <i>tnpA-03</i> 、 <i>tnpA-05</i> 、 <i>tnpA-07</i> 、 <i>IS613</i> 、 <i>Tp614</i>
M-BE-2	<i>intI-1(clinic)</i> 、 <i>cIntI-1(class1)</i>	<i>tnpA-01</i> 、 <i>tnpA-02</i> 、 <i>tnpA-03</i> 、 <i>tnpA-04</i> 、 <i>tnpA-05</i> 、 <i>Tp614</i>
M-DO-2	<i>intI-1(clinic)</i>	<i>tnpA-03</i> 、 <i>tnpA-04</i> 、 <i>tnpA-05</i> 、 <i>Tp614</i>
M-PO-2	<i>IntI-1(clinic)</i>	<i>tnpA-01</i> 、 <i>tnpA-04</i> 、 <i>S613</i> 、 <i>Tp614</i>
V-CA-3	<i>cIntI-1(class1)</i> 、 <i>intI-1(clinic)</i>	<i>tnpA-02</i> 、 <i>tnpA-03</i> 、 <i>tnpA-04</i> 、 <i>tnpA-05</i> 、 <i>IS613</i> 、 <i>Tp614</i>
V-CI-3	<i>intI-1(clinic)</i> 、 <i>cIntI-1(class1)</i>	<i>tnpA-01</i> 、 <i>tnpA-02</i> 、 <i>tnpA-03</i> 、 <i>tnpA-04</i> 、 <i>tnpA-05</i> 、 <i>tnpA-07</i> 、 <i>IS613</i> 、 <i>Tp614</i>
V-CL-2	<i>intI-1(clinic)</i>	<i>tnpA-01</i> 、 <i>tnpA-02</i> 、 <i>tnpA-04</i> 、 <i>tnpA-05</i> 、 <i>tnpA-07</i> 、 <i>IS613</i> 、 <i>Tp614</i>
V-CL-3	<i>intI-1(clinic)</i> 、 <i>IntI-1(class1)</i>	<i>tnpA-01</i> 、 <i>tnpA-02</i> 、 <i>tnpA-04</i> 、 <i>tnpA-05</i> 、 <i>S613</i> 、 <i>Tp614</i>
V-CWL-3	<i>intI-1(clinic)</i> 、 <i>cIntI-1(class1)</i>	<i>tnpA-01</i> 、 <i>tnpA-02</i> 、 <i>tnpA-03</i> 、 <i>tnpA-04</i> 、 <i>tnpA-05</i> 、 <i>tnpA-07</i> 、 <i>IS613</i> 、 <i>Tp614</i>
V-LE-2	<i>IntI-1(clinic)</i>	<i>tnpA-01</i> 、 <i>tnpA-04</i> 、 <i>tnpA-05</i> 、 <i>S613</i> 、 <i>Tp614</i>
V-TO-2	<i>IntI-1(clinic)</i>	<i>tnpA-01</i> 、 <i>tnpA-04</i> 、 <i>tnpA-07</i> 、 <i>S613</i> 、 <i>Tp614</i>
V-TU-2	<i>intI-1(clinic)</i>	<i>tnpA-01</i> 、 <i>tnpA-04</i> 、 <i>tnpA-05</i> 、 <i>IS613</i> 、 <i>Tp614</i>

2.2 ARGs 抵抗机制分析

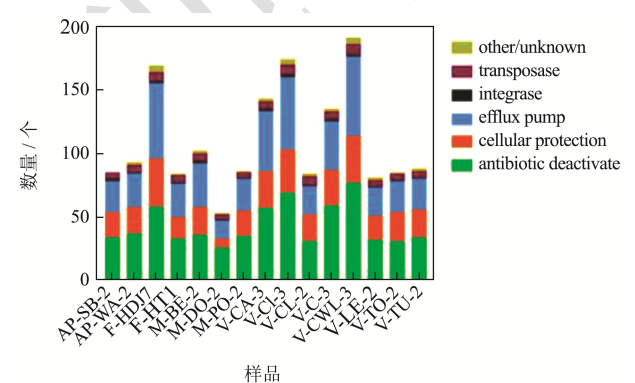


图 2 ARGs 的抵抗机制分析

Fig.2 Analysis of antibiotic resistance mechanism detected in ARGs

ARGs 抵抗机制见图 2。检测到 ARGs 抵抗机制包括：抗生素灭活机制（Antibiotic Deactivate）、细胞保护机制（Cellular Protection）、外排泵机制（Efflux Pump）、Integrase、Transposase 及其他机制。其中，抗生素灭活机制、外排泵机制和细胞保护机制为主要的 ARGs 抵抗机制，它们丰度占比最高，在样品中的平均数量分别为 44 个、34 个和 24 个，即这些样品中 ARGs 抵抗机制贡献大小依次为：抗生素灭活机制>外排泵机制>细胞保护机制，该结果与前人的报道相同^[19]。抗生素灭活机制、外排泵机制和细胞保护机制为目前已知的三种主要细菌耐药机制。外排泵在细菌中广泛存在，是引起细菌多重耐药的重要机制^[24]。细菌细胞膜上的主动外排泵可将抗菌药物排至细菌外，从而阻碍抗菌药物与细菌内的靶点结合，从而引起耐药^[25]。

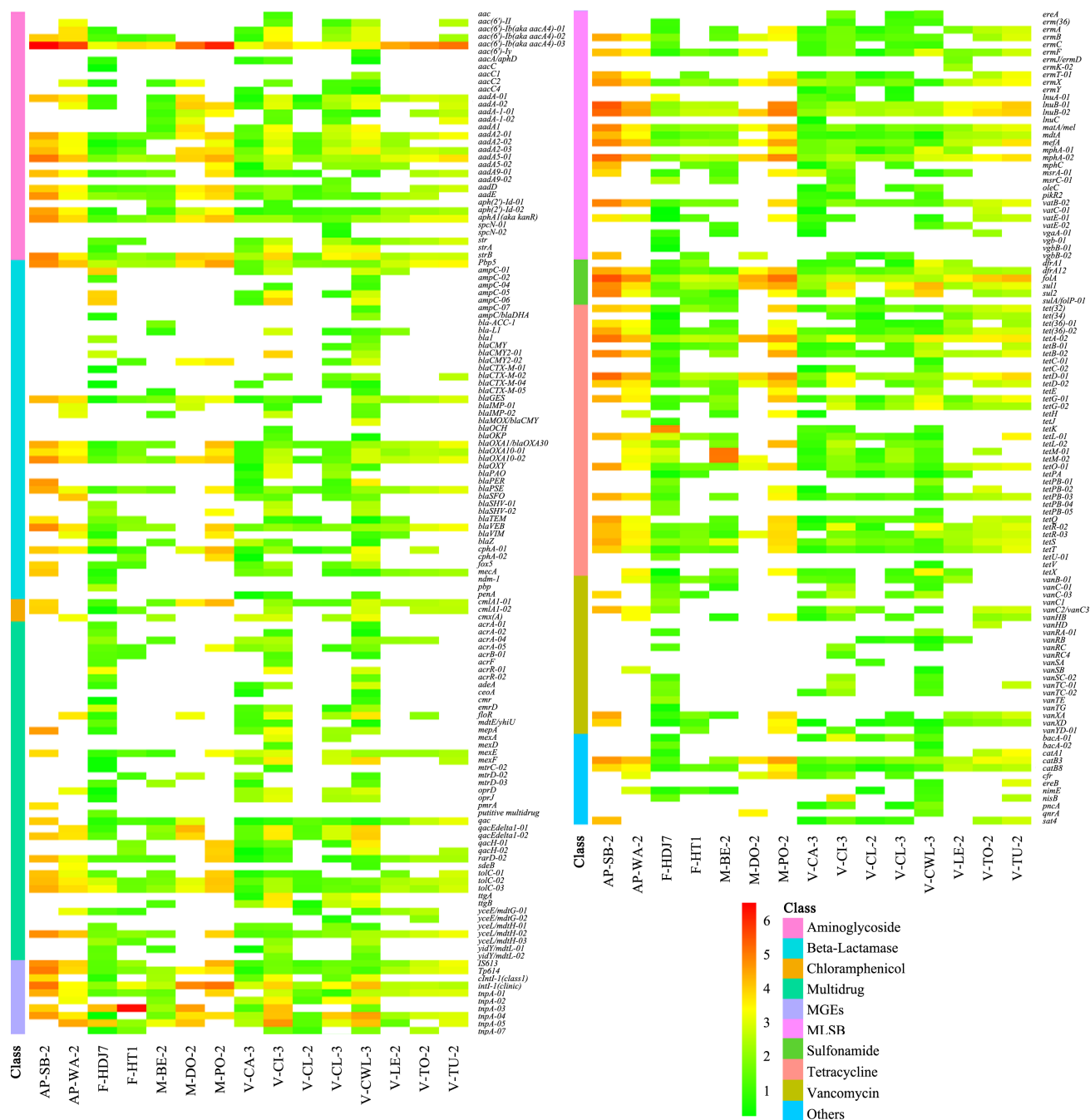


图3 聚类热图

Fig.3 Heatmap of ARG subtypes in different samples

2.3 样品中 ARGs 的热图分析

本研究利用 R package pheatmap 绘制聚类热图, 通过热图展现 ARGs 在不同样品中的丰度分布模式(图3)。图中颜色由绿色-黄色-红色, 表示 ARGs 的丰度逐渐递增, 白色表示样品未检出该抗生素抗性基因。从图 3 可以看出, 三个样品即 V-CWL-3 (182 个)、V-CI-3 (165 个) 和 F-HDJ7 (161 个) 富集的 ARGs 数量最多。但是水产品 (AP-SB-2、AP-WA-2) 和肉类样品 (M-DO-2、M-PO-2) 中含有的 ARGs 丰度较高, 其中海鲈

(AP-SB-2)、鸽肉 (M-DO-2) 和猪肉 (M-PO-2) 富集多种 ARGs, 如氨基糖苷类 (*aac(6')-Ib(aka aacA4)-03*、*aadA5-01*、*strB*)、磺胺类 (*folA*、*sul1*) 和四环素类 (*tetA-02*、*tetD-01*), 其中 *aac(6')-Ib(aka aacA4)-03* 在 AP-SB-2 样品中的相对丰度高达 3.6 copies/16S rRNA gene。其他研究采用 HT-qPCR 对海鲈中的 11 个 ARGs 进行了分析, 但只检测到 8 个 ARGs: *sul1*、*sul2*、*floR*、*tetQ*、*tetM-01*、*cmlA1-01*、*tetG-01* 和 *vanA*^[20]。本研究也在水产样品检测到上述 7 个 ARGs (*vanA* 除外)。本研究结果表明, 水产品 and 肉类样品富集多种高丰度的

ARGs, 可能与这些水产和畜禽在养殖过程中大量使用抗生素有关。发酵食品及蔬菜中 ARGs 的丰度普遍较低, 但发酵食品中也有个别 ARG 的丰度较高, 如黄豆酱样品(F-HDJ7)中 *tetK*, 其相对丰度为 0.07 copies/16S rRNA gene。

2.4 样品中共有及特有的 ARGs

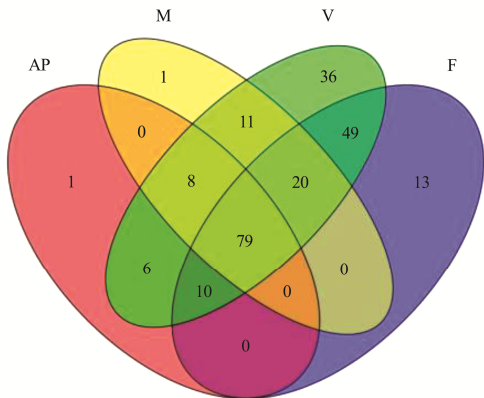


图 4 不同样品中 ARGs 的维恩图

Fig.4 Venn diagram of the unique and overlapping of ARG subtypes among different sample types

最后, 本文还分析了水产品、发酵食品、肉类、蔬菜四类样品中共有及特有的 ARGs, 结果如图 4 所示。结果表明, 四类样品中共有的 ARGs 达 79 个, 其中四环素类达 19 个 (*tet*(32), *tet*(36)-01, *tet*(36)-02, *tetA*-02, *tetB*-02, *tetD*-01, *tetD*-02, *tetG*-01, *tetL*-01, *tetL*-02,

tetM-01, *tetM*-02, *tetO*-01, *tetPB*-03, *tetR*-02, *tetR*-03, *tetS*, *tetT*, *tetX*)、氨基糖苷类 15 个 (*aac*(6')-Ib(*aka aacA4*)-02, *aac*(6')-Ib(*aka aacA4*)-03, *aacC2*, *aadA*-01, *aadA*-02, *aadA2*-01, *aadA2*-02, *aadA2*-03, *aadA5*-01, *aadA9*-01, *aadD*, *aadE*, *aph*(2')-Id-02, *aphA1*(*aka kanR*), *strB*)、多耐药性 5 个 (*floR*, *qac*, *qacEdelta1*-01, *qacEdelta1*-02, *rarD*-02)、磺胺类 3 个 (*folA*, *sul1*, *sul1*)、氯霉素类 1 个 (*cmlA1*-01)。

特有的 ARGs 分析表明, 总共发现有 51 个特有的 ARGs (表 2), 其中蔬菜样品中特有的 ARGs 最多 (36 个), 其次是发酵食品 (13 个); 含特有的 ARG 最少的是水产品 and 肉类, 均只含有 1 个, 分别是 *pmrA* 和 *bla-ACC-1*。*pmrA* 属于多重耐药类 ARGs, 而 *bla-ACC-1* 属于 β -内酰胺类 ARGs。蔬菜中特有的 ARGs 主要属于氨基糖苷类 (*Aac*, *aac*(6')-Iy, *aacC1*, *aacC4*, *aadA9*-02, *spcN*-01, *spcN*-02)、 β -内酰胺类 (*ampC*-04, *ampC*-07, *blaCMY*, *blaCTX-M*-02, *blaMOX/blaCMY*, *blaOCH*, *blaOKP*, *blaOXY*, *blaPAO*) 和 MLSB 类 (*ceoA*, *ereA*, *ermJ/ermD*, *ermK*-02, *ermY*, *lnuC*, *mexA*, *mexD*, *oleC*, *pikR2*, *yceE/mdtG*-02); 而发酵食品中特有的 ARGs 主要属于 β -内酰胺类 (*blaCTX-M*-01, *ndm*-1, *Pbp*)、四环素类 (*tetJ*, *tetPB*-04, *tetU*-01) 和万古霉素类 (*vanC1*, *vanTE*, *vanTG*) (表 2)。发酵食品和肉类含有较多固有的 ARGs, 推测可能与这些样品中含有某些高丰度的微生物物种有关。

表 2 样品中特有的 ARGs 统计分析

Table 2 The unique ARG subtypes in different types of samples

样品	特有的 ARGs
水产品 AP	<i>pmrA</i>
肉类 M	<i>bla-ACC-1</i>
蔬菜 V	<i>Aac</i> , <i>aac</i> (6')-Iy, <i>aacC1</i> , <i>aacC4</i> , <i>aadA9</i> -02, <i>ampC</i> -04, <i>ampC</i> -07, <i>blaCMY</i> , <i>blaCTX-M</i> -02, <i>blaMOX/blaCMY</i> , <i>blaOCH</i> , <i>blaOKP</i> , <i>blaOXY</i> , <i>blaPAO</i> , <i>ceoA</i> , <i>ereA</i> , <i>ereB</i> , <i>ermJ/ermD</i> , <i>ermK</i> -02, <i>ermY</i> , <i>lnuC</i> , <i>mexA</i> , <i>mexD</i> , <i>oleC</i> , <i>pe0</i> , <i>pikR2</i> , <i>pncA</i> , <i>spcN</i> -01, <i>spcN</i> -02, <i>tetV</i> , <i>tigA</i> , <i>vanHD</i> , <i>vanRB</i> , <i>vanRC4</i> , <i>vanSA</i> , <i>yceE/mdtG</i> -02
发酵食品 F	<i>aacC</i> , <i>blaCTX-M</i> -01, <i>ndm</i> -1, <i>Pbp</i> , <i>putitive multidrug</i> , <i>tetJ</i> , <i>tetPB</i> -04, <i>tetU</i> -01, <i>vanC1</i> , <i>vanTE</i> , <i>vanTG</i> , <i>vgb</i> -01, <i>vgbB</i> -01

3 结论

本研究对四个不同类别食品 (发酵食品、水产品、禽畜肉、蔬菜) 中的 285 种 ARGs 及 10 种 MGEs 进行了分析。结果表明, 这些样品中含有较多的 ARGs, 特别是部分蔬菜样品中的 ARG 甚至可达 182 个。15 个被分析的样品中, 共检出 234 个 ARGs, 其中 79 个为所有样品中共有的 ARGs, 51 个为特有的 ARGs; 水产品 and 肉类样品富集多种 ARGs。这 15 个样品中的 ARGs 耐药机制主要是抗生素灭活机制、外排泵机制和细胞保护机制。与普通荧光定量 PCR 相比, 本研究采用的

Smartchip 超高通量荧光定量 PCR 方法能检出较多的 ARGs, 对于研究样品中的 ARGs 和 MGEs 多样性和丰度具有显著的优势。分析更多的样品以及对样品中微生物组成与 ARGs 和 MGEs 相关性研究, 将是未来的一个研究方向。总之, 本研究对于了解不同类别食品中 ARGs 的赋存情况以及为食品安全风险分析提供了数据支持。

参考文献

[1] 王云鹏,马越.养殖业抗生素的使用及其潜在危害[J].中国抗生素杂志,2008,33(9):519-523.

- [2] Hu Y F, Yang X, Qin J J, et al. Metagenome-wide analysis of antibiotic resistance genes in a large cohort of human gut microbiota [J]. Nature Communications, 2013, 4: 2151.
- [3] Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2010, 74(3): 417-433.
- [4] Pruden A, Pei RT, Storteboom H, et al. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern Colorado [J]. Environmental Science & Technology, 2006, 40(23): 7445-7450.
- [5] Tiedje J M, Fang W, Manaia C M, et al. Antibiotic resistance genes in the human-impacted environment: A one health perspective [J]. Pedosphere, 2019, 29: 273-282.
- [6] 徐莉柯.城市自来水处理系统中抗生素抗性基因的行为特征[D].杭州:浙江大学,2015.
- [7] 陈蕾,George (Zhi) Zhou.污水中抗生素抗性菌及抗性基因的去除技术[J].生态环境学报,2018,27(11):2163-2169.
- [8] 张宁,李森,刘翔.土壤中抗生素抗性基因的分布及迁移转化[J].中国环境科学,2018,38(7):2609-2617.
- [9] 王慧平,闫鹤,赵俊仁,石磊.水产品中 6 类抗生素抗性基因和 I 类整合子的定量检测[J].现代食品科技,2017,33(5):270-276.
- [10] 冯淑贞,郑艺,席晓霞,等.内蒙古锡林郭勒牧区发酵乳制品抗生素抗性基因多样性[J].微生物学通报,2016,43(8):1725-1731.
- [11] Xiong L N, Sun Y H, Shi L, et al. Characterization of antimicrobial resistance genes and class 1 integrase gene in raw meat and aquatic product, fresh vegetable and fruit, and swine manure in southern China [J]. Food Control, 2019, 104: 240-246.
- [12] 李娟,魏源送,陈倩.北京地区畜禽养殖场周边蔬菜地生食蔬菜抗生素耐药基因 (ARGs) 的赋存特性[J].环境化学,2018, 37(4):625-635.
- [13] Tan G L, Hu M, Li X Y, et al. Metagenomics reveals the diversity and taxonomy of antibiotic resistance genes in sufu bacterial communities [J]. Food Control, 2021, 121: 1-10.
- [14] Li Z H, Dong L, Zhao C, et al. Metagenomic insights into the changes in microbial community and antimicrobial resistance genes associated with different salt content of red pepper (*Capsicum annuum* L.) sauce [J]. Food Microbiology, 2020, 8: 1-10.
- [15] Rubiola S, Macori G, Chiesa F et al. Shotgun metagenomic sequencing of bulk tank milk filters reveals the role of Moraxellaceae and Enterobacteriaceae as carriers of antimicrobial resistance genes [J]. Food Research International, 2022, 158: 1-11.
- [16] Zhou S Y D, Zhu D, Giles M, et al. Phyllosphere of staple crops under pig manure fertilization, a reservoir of antibiotic resistance genes [J]. Environmental Pollution, 2019, 252: 227-235.
- [17] Zhao X, Shen J P, Shu C L, et al. Attenuation of antibiotic resistance genes in livestock manure through vermicomposting via *Protaetia brevitarsis* and its fate in a soil-vegetable system [J]. Science of the Total Environment, 2022, 807: 1-9.
- [18] Zhang Y J, Hu H W, Chen Q L, et al. Transfer of antibiotic resistance from manure-amended soils to vegetable microbiomes [J]. Environment International, 2019, 130: 1-10.
- [19] Zhou S Y D, Wei M Y, Giles M, et al. Prevalence of antibiotic resistome in ready-to-eat salad [J]. Frontiers in Public Health, 2020, 8: 1-9.
- [20] Ye L T, Liu G F, Yao T, et al. Monitoring of antimicrobial resistance genes in the spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*): Association with the microbiome and its environment in aquaculture ponds [J]. Environmental Pollution, 2021, 276: 1-8.
- [21] 向文良,张庆,卢倩文,等.获得性抗生素抗性基因:威胁发酵蔬菜食品安全的一种新型污染物[J].食品安全质量检测学报,2015,6(10):3917-3922.
- [22] Ye Q H, Wu Q P, Zhang S H, et al. Characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae from retail food in China [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1-12.
- [23] Gillings M R, Gaze W H, Pruden A, et al. Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution [J]. The ISME Journal, 2015, 9: 1269-1279.
- [24] 姚明晓,苑广盈,闻新棉.主动外排系统介导细菌多重耐药的研究进展[J].现代预防医学,2014,41:118-121.
- [25] 陈红玲,张兴桃,王晴,等.宏基因组方法分析医药化工污水厂中抗生素耐药菌及抗性基因[J].环境科学,2020,41:313-320.