

土壤抗生素抗性组:来源、扩散和驱动因子

安新丽, 苏建强*

中国科学院城市环境研究所城市环境与健康重点实验室, 福建省流域生态重点实验室, 厦门 361021

摘要 土壤是环境抗生素抗性基因的源与汇,也是抗性基因发生水平转移的重要热区。综述了土壤环境中抗性基因的主要来源及驱动因子,阐述了抗性基因在土壤-植物、土壤-动物及土壤-水体等不同系统中的传播过程,总结了抗性基因在土壤中的传播扩散机制,表明水平基因转移是抗性基因在环境中传播的主要分子机制之一;土壤-植物系统是抗性基因从环境向人类传播扩散的一个重要途经,是环境抗性基因人群暴露的主要来源;不是所有的抗性基因都具有严重的健康威胁,鉴定高风险的抗性基因对维护人类健康具有重要意义;源头控制是控制抗生素和抗性基因污染的重要手段之一。

关键词 土壤生态系统;抗生素抗性;水平基因转移;人类健康;环境污染

抗生素广泛应用于人类医疗和动物养殖中,为人类和动物感染性疾病的预防和治疗做出了巨大贡献。然而由于抗生素长期过度使用和滥用,抗生素抗性日趋加剧,极大地影响了抗生素的治疗效果,严重威胁人类和动物健康。对于抗生素抗性细菌及抗性基因的研究前期主要集中于医疗领域,然而近年来人们意识到抗生素抗性基因(以下简称抗性基因)在环境中的富集、传播和扩散可能比抗生素本身的危害要大,其最大威胁是它们可通过水平基因转移等途径进入人类病原菌中,形成新的、多重的抗性表型,降低现有的抗生素治疗效果甚至使其失效,危害人类健康^[1-2]。

人类活动,包括抗生素的大规模使用、动物养殖业的发展和废物废水的排放等,均可导致环境中抗性基因的富集,进而增加抗性基因从环境中转移到人类病原菌的几率。由于微生物可在人-动物-环境中传播,人群健康、动物健康和环境健康紧密联系。因此,世界卫生组织、联合国粮食及农业组织和世界动物卫生组织等明确提出应根据卫生一体化(One Health)方针,关注抗性基因在人类、动物和环境介质中的传播和扩散,来应对微生物抗性

土壤是与人类关系最为密切的环境介质之一,不仅是抗性基因的天然储库,同时也是环境中抗生

收稿日期:2021-06-28;修回日期:2021-12-20

基金项目:国家重点研发计划项目(2020YFC1806902);国家自然科学基金项目(81991535,21936006,42021005,32061143015)

作者简介:安新丽,助理研究员,研究方向为环境微生物生态,电子信箱:xlan@iue.ac.cn;苏建强(通信作者),研究方向为环境微生物学和生物分子生态学,电子信箱:jqsu@iue.ac.cn

引用格式:安新丽,苏建强.土壤抗生素抗性组:来源、扩散和驱动因子[J].科技导报,2022,40(3):64-74;doi:10.3981/j.issn.1000-7857.

2022.03.006

素和抗性基因的源与汇。抗生素大量使用于医疗和畜禽养殖以预防和治疗人体和动物疾病,使得人体及动物肠道富集大量抗性细菌和抗性基因,同时高比例的未被代谢的抗生素残留经粪便排出体外,导致施用有机粪肥或中水回用的土壤产生抗生素和抗性基因污染,进而可通过渗漏和地表径流等途径扩散到周边环境^[3-4]。最终,土壤及其周边环境的抗性基因可通过食物链传递、气溶胶吸入及饮用水摄入等途径进入人体,土壤细菌和人类病原体快速地交换抗性基因,进而威胁人类健康。因此,土壤抗生素抗性污染是影响人类健康的重要环境问题,保护土壤健康也是全球可持续发展和卫生一体化的重要战略目标。土壤抗生素抗性组(soil resistome)是指土壤中病原菌和非病原菌的所有抗生素抗性基因以及它们前体的集合^[5]。人类活动影响土壤抗性组的来源、分布与传播,因此,本文将系统阐述土壤环境中抗生素抗性污染的主要来源、驱动因子、传播过程及扩散机制等,并提出土壤环境抗生素抗性污染研究仍存在的科学问题。

1 土壤是环境中抗性基因的重要储库

1.1 土壤抗性基因的主要来源

土壤是一个高度异质化的生境,代表着显著多样化的生态位,蕴含极为丰富多样的微生物群落,为适应多变的环境压力,微生物自身固有多种不同的抗性基因以及与抗生素产生相关的基因。因此,土壤是抗性基因的一个重要的天然储库。研究表明,人为活动干扰较少的林地土壤中可检测到160个抗性基因^[6];在基本不受人活动干扰的阿拉斯加冻土中也筛选到多种新型的beta-内酰胺酶基因^[7];即使在古老(3万年前)的冰川冻土中依然可检测到编码抗beta-内酰胺类、四环素类、万古霉素类和糖肽类等多种抗生素的抗性基因^[8];北极土壤中可检测到131种抗性基因^[9]。这些数据都表明,土壤中的某些抗性基因早就存在于自然界中,并非由于现代临床抗生素使用压力而产生。

人为活动是土壤抗性基因外源输入的重要途径,其中,粪肥施用是外源抗性基因进入土壤环境

的一种主要方式。在集约化畜禽养殖过程中,抗生素和重金属常被用作饲料添加剂,由于长期的选择压力,动物肠道抗性基因和抗性菌不断富集,使得动物粪便成为抗性基因的重要储库。动物粪便及其制备的粪肥含有丰富的抗性基因和抗性菌,其丰度和种类均明显高于土壤中的抗性基因水平,这些抗性基因随着有机肥施用进入土壤后,可直接将抗性基因引入农田土壤中,造成土壤抗性基因丰度和多样性升高^[10];动物粪便及其制备的粪肥中含有较多抗生素和重金属残留以及有机质,可改变土壤物理结构,进而改变土壤微生物群落结构,抗生素和重金属残留为抗性基因进化提供选择压力,使得抗性菌不断增殖,可能通过基因突变产生新的抗生素抗性,部分抗性基因可在土壤中定殖,甚至长期存留于农田土壤中^[11]。

中水回用是土壤中抗性基因外源输入的另一重要途径^[12]。污水处理厂每天接收大量人类生活污水、医疗废水、养殖废水及工业污水等污水,人类和动物排泄物、医院出水及制药厂出水等含有大量抗性菌和抗性基因,使得污水处理厂成为一个巨大的抗性基因储存库^[13]。然而,目前污水处理工艺并不能完全去除污水中的抗性基因,随出水排放入下游环境,如河流、海洋、土壤等^[14]。在一些欠发达国家,富含营养物质的原始污水或者处理工艺较差的出水常用于灌溉农田土壤,从而可能造成农田土壤抗性基因污染严重^[15]。研究表明污水处理厂过程可以有效消减抗性基因丰度,但出水中依然可检测到大量抗性基因的存在;与对照公园土壤相比,长期中水灌溉的公园土壤抗性基因的丰度和多样性显著升高,108个抗性基因显著富集^[14,16-17]。

大气干湿沉降也是引起土壤环境抗性基因污染的来源之一。研究表明,污水处理厂曝气搅拌、养殖场上方空气及医院空调和通风系统等都含有大量抗性菌和抗性基因,污水处理厂、养殖场、医院等可能是空气中抗性基因的主要来源。此外,陆地上的抗性基因会以生物气溶胶的形式进入大气中。这些空气中抗性菌和抗性基因又会通过雨雪、灰尘等干湿沉降的方式返回至地面,进入土壤环境,促进抗性基因在环境中的传播扩散^[18]。全球新鲜降

雪样品的研究发现雪水中含有多种不同的抗性基因,并发现它们的存在与传播和大气污染相关^[19]。此外,家庭窗台沉降灰尘也检测到丰富多样的抗性基因,它们没有表现出明显的地域分布特征^[20]。这些研究暗示了空气中的抗性基因可能通过大气干湿沉降进入土壤环境。

1.2 土壤抗性基因分布的驱动因子

土壤环境是一个较为复杂的环境,土壤中抗性基因丰度和组成受到多种生物与非生物因子的影响。首先,不同类型土壤内源性抗性基因组成有显著差异;其次,多种抗性基因的外源输入可改变土壤抗性基因组成;再次,人类活动导致的抗生素残留、重金属、微塑料等可选择性地诱导土壤微生物产生抗性;最后,有机粪肥或污水中含有丰富的营养元素,这些营养元素的输入可改变土壤细菌群落组成,进而影响土壤抗性基因。

1) 土壤类型。不同的土壤类型具有不同的土壤质地,例如沙土、黏土和粉土的比例不同,进而影响土壤理化性质及其功能。有机质,例如根、腐烂有机质以及其他因子也共同决定了土壤结构,持水以及营养等能力。不同土壤类型的农田土壤由于其土壤结构和理化性质等的不同,其中的微生物群落结构和组成也具有不同程度的差异。因此,微生物群落携带的抗性基因的组成和丰度也具有不同差异。研究表明,由褐土、潮土及盐碱地土为主的温室大棚土壤检测到不同的抗性基因,土壤种类影响抗性基因的分布,与褐土相比,潮土和盐碱地土壤中具有更多数目和更高丰度的抗性基因,其中抗生素、沙土比例、pH值和金属锌显著影响了褐土中抗性基因的分布,而沙土比例、黏土比例、镉和铅显著影响了潮土和盐碱地土壤中抗性基因的分布^[21]。此外,耕作系统不同,抗性基因的分布格局也具有差异,例如,种植花生的旱地和水稻田土壤中的抗性基因分布差异显著,这主要是由于好氧和厌氧土壤环境导致微生物群落结构显著差异所致^[22]。同时,各地区土壤由于地域差异和理化性质不同,也可能影响粪肥施用后土壤抗性基因的动态变化过程。

2) 外源输入。畜禽养殖粪便及其制备的有机肥施用可以介导大量的抗性菌和抗性基因进入土

壤环境中,显著改变土壤微生物群落结构。畜禽养殖业中抗生素长期使用使得动物肠道诱导多种抗性基因,携带大量抗性基因的粪肥不断施用到土壤中,将为土壤中的微生物抗性的产生提供持续的选择压力,促成抗性基因在土壤环境中的增殖与扩散。笔者前期工作研究了不同类型有机肥(猪粪、鸡粪和牛粪)施用对蔬菜大棚生产基地土壤抗性基因的影响。发现施用粪肥增加了土壤中抗性基因多样性和绝对丰度,不同类型粪肥对土壤抗性基因的影响无显著差异^[23]。在施肥土壤中存在50个特有抗性基因和4个特有遗传元件,表明粪肥所携带的外源抗性基因输入是导致土壤抗性基因富集的主要原因^[23]。此外,长期无机肥和有机肥施用也可以增加土壤中抗性基因的丰度和多样性,几乎所有的土壤核心抗性基因都在有机肥施用的土壤中检测到,有机肥可能是土壤中抗性基因增加的来源,表明有机肥施用促进抗性基因在土壤中的扩散与富集。即使一次施肥对农田土壤抗性基因也具有长期影响,与对照土壤相比一次施肥后的土壤抗性基因组成和丰度仍显著增加^[24]。这些研究表明无论长期还是短期施加粪肥,都会显著增加农田土壤中抗性基因的数目与丰度,改变抗性基因分布。此外,中水回用和干湿沉降等在携带抗性基因进入土壤环境的同时,也会影响抗性基因在土壤中的分布与丰度。中水残留的抗性菌及抗性基因通过灌溉等途径从水体环境进入土壤,改变土壤中微生物群落,影响土壤中抗性基因的分布^[25-26];土壤颗粒或者灰尘中的抗性基因随风附着在生物气溶胶中进入大气圈层,通过频繁发生的雾霾、高水平的PMs (Particulate Matters)以及严重的烟雾等随着气流在全球扩散,通过降雨、降雪等地表径流或者灰尘沉降等过程,使得气溶胶中的抗性基因可以最终返回地球表面,促进土壤中抗性基因的传播扩散^[27-29]。

3) 抗生素残留。随着集约化畜禽养殖业的发展,越来越多的抗生素用于畜禽疾病的防治。这些抗生素大多数不能被动物完全吸收,约30%~90%的抗生素以母体或代谢物的形式随粪便排出体外,畜禽养殖场动物粪便中高浓度的抗生素通过施肥

进入农田土壤中,多数抗生素(如beta-内酰胺类)进入土壤中容易降解,然而有些抗生素具有很长的半衰期(如大环内酯类和喹诺酮类),易在土壤中积累和扩散,进而导致环境中抗性基因的增加和抗菌耐药性不断变强。Cheng等发现温室土壤中各种抗生素的检出率和含量普遍高于大田土壤,大田土壤和温室土壤中磺胺类抗生素和四环素类抗生素的检出率均为100%,喹诺酮类抗生素的检出率分别为69.23%和73.68%。通过进一步相关分析发现,大田土壤中磺胺类抗性基因*sul2*的相对丰度与磺胺二甲嘧啶和强力霉素的含量显著正相关($P < 0.05$),*tetL*相对丰度与检测的抗生素间无明显相关性($P > 0.05$)^[30]。McKinney等发现农田土壤和养殖场粪污中四环素和磺胺ARGs与抗生素含量显著正相关^[31]。这主要是由于抗生素影响了土壤中微生物群落分布,可以选择抗性微生物,进而影响抗性基因丰度。由于农田土壤环境主要检测的是四环素、磺胺、大环内脂、喹诺酮类等,可部分解释相关抗性基因的变化,但对其他类型抗生素的抗性基因其相关性较低。这表明抗生素浓度不是影响抗性基因丰度的唯一因素,还可能受到环境中其他因素如重金属、pH值及有机质含量等的影响^[32]。

4) 重金属残留。为了增强畜禽防病能力、提高畜禽生长性能,重金属在规模化畜禽养殖中的滥用现象导致畜禽粪便中重金属富集,随着粪肥施用导致农田土壤重金属污染。与抗生素相比,重金属不易降解,在环境中更加稳定存在,可以在农田土壤中存留成百上千年,因此可能对土壤中抗生素抗性的产生提供长期的选择压力。许多微生物抗生素抗性和重金属抗性体系共享相同的结构和功能特征,重金属例如铜、锌、汞和砷可以通过共选择作用间接增强抗生素抗性基因的扩散。关于重金属和抗生素的共选择(co-selection)的机理已经有较为清晰的认识,共选择机理主要包括以下3种:(1)交叉抗性,细菌的同一种抗性系统能对抗生素和重金属同时产生抗性,例如外排泵系统。(2)协同抗性,指细菌携带的多种特定抗性基因位于同一遗传元件上,如质粒、整合子或者转座子等。(3)细菌抗生素抗性与重金属抗性的协同调控,指细菌在抗生

素或重金属任何一种压力下,细菌体内的一系列转录和翻译应答系统均会对其做出反应的作用过程^[33]。研究表明,施用粪肥30年的土壤中Cu、Zn、Pb含量增加,并且与*tet G*、*tet O*、*tet W*、*tet B(P)*、*sul1*、*sul2*、*erm B*和*erm F*成显著正相关,表明重金属可能参与细菌抗药性共选择过程^[34]。Hu等采用高通量定量PCR技术(HT-qPCR)研究并检测镍和铜污染的农田土壤中抗生素抗性基因的丰度,发现镍和铜可以显著改变抗生素抗性基因的多样性和丰度,并且这种改变可能是由微生物群落和可移动遗传元件所驱动^[35-36]。张毓森等比较了停施猪粪和铜10年后土壤抗性基因水平的差异,发现对照组与处理组土壤中铜的浓度分别为 34.3 ± 2.4 mg/kg和 69.34 ± 6.9 mg/kg,表明猪粪和CuCl₂的施用均导致土壤中的铜浓度显著升高($P < 0.001$)。猪粪和铜停施10年后,土壤抗性基因水平仍处于较高水平,说明猪粪和铜施用可导致土壤抗性基因的长期存在,其中*ycl_mdtH*和*cphA*基因在猪粪和铜施用两种处理中均显著富集。表明铜可能是增加土壤中抗生素抗性基因增殖扩散的主要因素,伴随着动物粪肥施用的重金属输入由于在土壤中难以去除,在较长时间尺度上可通过共选择效应导致农田土壤抗性基因富集,暗示着今后应特别关注随粪肥施用带来的重金属对土壤抗性基因的影响^[24]。

5) 其他新型污染物。人类活动产生的许多新兴污染物包括微塑料、纳米材料、个人护理用品、消毒副产物、杀虫剂等进入土壤环境,可对微生物产生选择压力,促进水平基因转移、遗传突变及微生物群落对抗性基因进化的调控。例如,微塑料为抗生素、抗性菌和病原菌提供粘附和混合的界面,帮助微生物形成生物膜,促进抗生素抗性进化^[37]。最近的研究发现微生物生长在污水处理厂污泥中的微塑料生物膜上时,其抗生素抗性增加了高达30倍^[38]。然而,目前针对微塑料对抗性基因的影响主要集中在水体环境中,土壤环境涉及较少。纳米材料对抗性基因的影响也逐渐受到越来越多的关注,其广泛应用于工业催化、电子设备、医学治疗制剂等,通过破坏细胞膜和胞内内容物可以有效缓解抗性菌感染。笔者前期的研究表明纳米银可以显著

增加外排泵抗性基因的丰度,并显著改变了微生物群落及抗性组的分布^[39]。因此,在今后的研究工作中,也应关注其他新型污染物对抗性基因的影响与响应。

2 土壤环境中抗性基因的传播过程

2.1 抗性基因在土壤-植物系统中的传播

植物尤其农产品作为抗性基因的潜在储库和传播工具,是抗性基因进入人体最直接的载体,通过食物链将人体直接暴露于抗性基因污染中。研究表明,几乎所有种类的抗性基因都在植物(如新鲜果蔬、即食蔬菜沙拉等)中检出,例如链霉素类、磺胺类、四环素类、氯霉素类、甲氧苯胺嘧啶类以及beta-内酰胺类抗性基因^[40]。笔者前期的研究发现,超市售卖的有机蔬菜(施加有机粪肥)表面的抗性基因丰度显著高于传统种植蔬菜(施加化肥)^[41]。另有研究表明,从生菜、灌溉水和土壤中分离出的大肠杆菌中都表现不同程度的抗生素耐药性^[42]。Wang等采用长期施加粪肥的农田土壤进行盆栽试验,发现收获后的生菜内生菌中含有丰富的抗性基因^[43]。采用养殖废水来源的鸟粪石作为有机肥料添加到种植蔬菜的土壤中,结果发现抗性基因在蔬菜根际、非根际和叶表都有显著富集^[44]。这些研究说明有机肥施用和中水灌溉等人为活动不仅加剧了抗性基因在土壤中富集,也促进了抗性基因向植物中的扩散。因此,当人类在食用未经加工或未煮熟的蔬菜、水果时,可能会摄入果蔬表面或内部的抗性菌和抗性基因,这些抗性菌和抗性基因可能在肠道内定殖并传播扩散到其他肠道菌群中,进而影响人类健康^[45]。然而,目前国内外对抗性基因的研究多集中在土壤、水体和大气等环境介质,对植物及植物进入人体环境后抗性基因的传播扩散缺乏系统性探索研究,尤其缺乏植物中的抗性菌和抗性基因是否可以持续定殖在人类肠道中的直接证据。

2.2 抗性基因在土壤-水体系统中的传播

地表水体、污水和饮用水中都已检测到大量抗性菌和抗性基因的存在,水体中的抗性基因可以通过灌溉、渗透等途径进入土壤环境。土壤中的抗性

基因经雨水冲刷、地表径流溶解可能在地表水和地下水等不同环境介质中进行迁移^[46]。现代农业整合了农、林、渔、牧等的融合发展,然而,畜禽粪肥排放及水产养殖饲料投喂造成抗生素、抗性菌和抗性基因外溢,带来潜在的食品安全问题,例如粪源动物病原菌的出现和抗生素及其他化学物残留的积累^[47]。此外,抗生素和其他污染物通过沉降在沉积物中不断积累,从而使得微生物群落在沉积物这一复杂界面相互作用,促进抗性菌和抗性基因的增殖,从而使得抗性菌和抗性基因在水体、沉积物及周围土壤等生态系统中传播扩散^[48]。

2.3 土壤动物肠道中抗性基因的扩散

土壤动物是土壤生态系统的重要组成部分,在废物分解、营养循环、能量转移、生物多样性维持及污染物降解等方面发挥着重要作用,长期的演化使得土壤动物肠道定殖着独特的“隐藏”微生物基因库,以帮助其自身抵御外界病原菌的入侵和定殖^[49-50]。据报道,蚯蚓组织中已分离到许多抗微生物的多肽,跳虫基因组中也鉴定到负责合成beta-内酰胺类抗生素的基因通路^[51-52]。人类活动改变了土壤中抗性基因的丰度和多样性,栖息的土壤动物在摄食土壤有机质或微生物时,其肠道微生物也可能暴露到抗生素和抗性基因污染。研究表明,饮食暴露抗生素14 d后,跳虫肠道微生物抗性基因的数目和丰度显著增加,表明跳虫在土壤生态系统抗性基因的积累和扩散中发挥重要作用^[53];纳米银摄入则可以显著减少跳虫肠道抗性基因的丰度和多样性,暗示了土壤动物肠道抗性基因对土壤污染物的响应是较为复杂的^[54]。

3 土壤中抗性基因传播扩散机制

随机突变和水平基因转移是抗性基因传播扩散的主要分子机制,随机突变增加了部分抗性基因库的多样性,但水平基因转移是一种更快的方式来赋予细菌抗生素抗性 or 致病性的进化优势,它允许细菌将DNA片段传递给其他种属,进而在受体菌中稳定地传给子代^[55]。水平基因转移需要可移动遗传元件(如质粒、整合子、转座子、插入序列等)介导来

进行,主要通过3种机制来完成:接合、自然转化和转导。此外,膜囊泡在抗性基因的水平基因转移中也发挥着重要作用,目前已引起越来越多的关注。

3.1 细菌的接合作用

细菌的接合是最常见的基因水平转移机制,需要借助可自主转移的质粒或接合性转座子作为载体携带抗性基因片段通过供体菌和受体菌间形成的抗性菌毛进行转移。Fan等构建了微宇宙培养体系,研究了广宿主质粒RP4在土壤环境中的扩散。通过流式细胞分选接合子和测序表明RP4质粒可向土壤微生物群落转移,转移频率约为 10^{-4} , Proteobacteria、Bacteroidetes、Firmicutes 和 Actinobacteria 是RP4质粒在土壤中的主要受体菌群,同时在受体菌群中发现包括 *Acinetobacter baumannii*、*Aeromonas veronii*、*Bordetella avium*、*Staphylococcus* spp. 等潜在人类病原菌,表明质粒介导的抗性基因在土壤环境中可转移到人类致病菌中,对人群健康造成潜在威胁^[56]。抗性质粒的接合转移是一个受调控的分子转移机制,土壤理化性质如土壤质地、温度、pH值和湿度等均可影响质粒接合转移效率,土壤动物如原生动物和蚯蚓等生物因素也会影响质粒接合转移。Pu等研究发现非抗生素类环境因子——重金属镉与纳米铁可显著促进质粒的接合转移,重金属镉与纳米铁的共暴露可以通过协同效应显著促进质粒介导的抗性基因从 *Pseudomonas putida* KT2442 到水体微生物群落的转移,进一步分析表明镉与/或纳米铁暴露可通过改变供体和受体菌细胞膜通透性、刺激活性氧(ROS)系统和增强接合转移相关基因的表达等机制促进质粒接合转移。该结果进一步补充了重金属对抗性基因的共选择机制,同时也表明除抗生素以外,还应关注非抗生素类化学因子通过影响水平基因转移导致抗性基因扩散的效应^[57-58]。

3.2 细菌自然转化

细菌自然转化是细菌进行水平基因转移的另一个主要方式,细菌可以直接吸收环境中胞外裸露DNA,并整合到自身基因组上进行功能表达。转化过程需要细菌处于自然可转化的或者“感受态”。实验室研究已证明有超过80株细菌是可以自然转

化的,许多菌株中都存在参与DNA获取的基因暗示了自然转化特性是广泛分布的^[59]。外源刺激可导致自然转化细菌处于“感受态”,例如营养缺乏或者感受态诱导物多肽等^[60]。研究表明,抗生素暴露可诱导许多细菌进入“感受态”,表明抗生素不仅可以选择抗性菌株,而且可以诱导这些菌株中抗性基因发生转化^[61]。Wang等报道了非抗生素类药物可以通过外源DNA的摄入显著促进抗性基因的水平转移,通过全基因组测序和蛋白组分析发现,抗性基因转化的增强主要是由于细菌感受态、压力水平、膜通透性以及ROS增强有关^[62]。Traglia等发现血清白蛋白和 Ca^{2+} 可以增强感受态细胞 *Acinetobacter baumannii* 的抗性基因自然转化频率^[63]。Balsalobre等发现氟喹诺酮抗性基因(*parC*、*parE*和*gyrA*) 在 *Streptococcus pneumoniae*、*Streptococcus mitis* 和 *Streptococcus oralis* 之间发生转化^[64]。目前对抗性基因自然转化的研究还主要集中在实验室研究,由于土壤环境的复杂性,对原位土壤中抗性基因的自然转化及其发生频率的研究相对较少。

3.3 噬菌体介导的转导

转导是噬菌体媒介(细菌病毒)介导的染色体与非染色体DNA之间的转移,主要的转导机制包括普遍性转导、特异性转导和横向转导,它们可共同引起任何一个细菌基因组片段的转移^[65]。普遍性转导即裂解期噬菌体在衣壳形成过程中结合细菌宿主的DNA片段。在特异性转导中,溶原性噬菌体整合位点侧翼区域剪切并包裹进衣壳中。相比前两种转导,当前噬菌体启动DNA复制并依然整合到宿主中时,横向转导才发生,该过程在前噬菌体从宿主基因组上剪切之前可形成多个DNA拷贝。高通量测序数据分析表明环境噬菌体在抗生素抗性的获得、维持和扩散等中发挥着比以前更为重要的角色,是环境中抗性基因一个重要的基因库^[66]。土壤是噬菌体及其宿主的一个重要栖息环境,然而由于土壤组成成分复杂,人们对于土壤噬菌体介导的抗性基因水平转移的认识远远落后于水体环境。Ross等^[67]采用定量PCR手段对施用原始粪肥、厌氧消化处理粪肥、脱水或堆肥处理肥料的土壤样品的细菌和病毒DNA进行抗性基因定量

分析,发现在病毒 DNA 中都可检测到目标抗性基因(*strA*, *strB*, *sull* 和 *aadA*)。同时,研究发现抗生素(磺胺二甲嘧啶,氨苄青霉素头孢西丁)添加可促进噬菌体介导的抗性基因水平转移的发生^[68]。Larrañaga 等在蔬菜土壤病毒 DNA 中也检测出甲氧苯青霉素类、喹诺酮类、beta-内酰胺酶类等抗性基因,并通过传代培养实验发现部分携带抗性基因的病毒表现出了再侵染能力,这表明土壤噬菌体可以携带多种抗性基因,并具有传播抗性基因的潜能^[69]。采用宏基因组测序不同农田施肥措施(有机肥和无机肥施用)土壤中病毒以及其携带的抗性基因的影响,有机肥施用促进细菌和病毒抗性基因丰度,尤其氯霉素类、磺胺类、氨基糖苷类、万古霉素类四环素类及大环内酯类抗性基因菌显著增加,不同施肥处理显著改变了细菌及病毒抗性基因的分布特征(数据未发表)。由于目前对于土壤中噬菌体的研究还相对有限,噬菌体对土壤中抗性基因的水平转移的定量贡献还需深入研究。

3.4 膜囊泡介导的抗性基因水平转移

膜囊泡是直径 20~250 nm 大小的球状结构,细胞外膜凸起随后通过收缩而释放胞外,主要由 G-细菌产生。膜囊泡可以与靶细胞进行融合,进而释放他们所携带的“cargo”。在水平基因转移过程中,细菌内膜和外膜凸起产生的膜囊泡,可以包含细胞内容物,例如 DNA。研究表明,细菌属 *Acinetobacter* 分离的囊泡可以在体外转移抗生素抗性质粒^[70]。相似地, *Escherichia coli* 分泌的囊泡也可以介导 DNA 转移^[71]。然而,目前针对土壤环境群落水平细菌群落产生的囊泡在抗性基因水平基因转移的贡献仍不明确。

4 结论

土壤是抗性菌和抗性基因的重要储库,同时也是它们传播扩散的重要热区。不同类型土壤抗性基因组成和丰度具有显著差异,人类活动选择和富集抗性基因在土壤环境中的定殖,这些抗性可通过水平基因转移在不同细菌物种间传播,甚至转移到潜在病原菌中,对人类健康造成潜在威胁。厘清土

壤环境中抗性基因的发生、分布特征、进化、传播扩散等特征有助于阐明土壤生态系统中抗性基因的环境传播机制和健康风险,为遏制抗生素抗性的环境传播提供科学依据(图 1)。目前基于土壤环境抗性菌和抗性基因的研究仍有一些亟待解决的科学问题需要阐明,归纳总结如下。

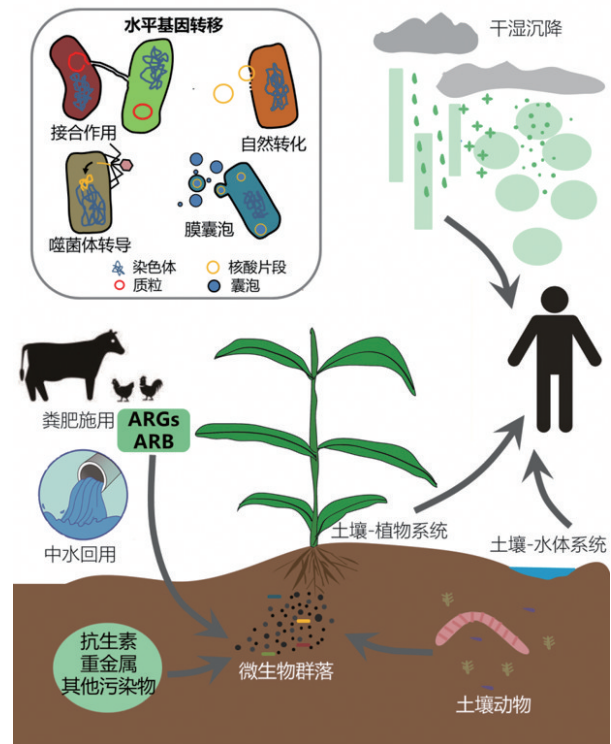


图 1 土壤生态系统中抗生素抗性基因的传播机制和健康风险

1) 水平基因转移是抗性基因在环境中传播的主要分子机制之一。目前主要集中在质粒介导的抗性基因水平转移的研究,然而针对其他可移动遗传元件如整合接合元件(ICE)、插入元件、噬菌体在土壤环境中的分布特征、驱动因子以及它们介导抗性基因传播扩散机制的研究相对较少,因此,今后更多的研究应关注噬菌体、插入元件等介导的抗性基因的水平转移机制。

2) 土壤-植物系统是抗性基因从环境向人类传播扩散的一个重要途径,是环境抗性基因人群暴露的主要来源。食物链是土壤-植物系统中的抗性细菌和抗性基因进入人体最直接、最主要的途

径。当人们摄入未经加工的蔬菜、水果等时,蔬果携带的抗生素抗性基因直接进入人体,从而对人类健康造成潜在威胁。然而,目前关于土壤-植物系统抗性基因传播的研究仍然很少,一些传播相关的关键问题仍不明晰,如土壤-植物系统发生高频传播的抗性基因类型,不同土壤-植物系统抗性基因传播的共性和个性等;不同土壤-植物系统中移动元件介导的潜在高风险抗性基因库及其丰度仍未全面认识。因此,土壤-植物系统中抗性基因的分布特征及传播扩散机制等仍需进一步深入研究。

3) 不是所有的抗性基因都具有严重的健康威胁,鉴定高风险的抗性基因对维护人类健康具有重要意义。前期研究和国际该领域研究结果都表明,在环境中通常可以检测到数十到数百种抗性基因,并且其丰度不同环境介质间具有巨大差异。然而,高丰度抗性基因并不意味着就具有高风险,且不同抗性基因之间其风险也有显著差异,环境中抗性基因的高度多样性和风险差异为制定有效合理的抗性基因监测方法和标准带来挑战。因此,十分必要对土壤环境中的抗性基因收集相关暴露数据,评估人群健康效应,建立标准、定量可行的抗生素抗性基因人类健康风险评价体系。

4) 源头控制是控制抗生素和抗性基因污染的重要手段之一。然而目前针对动物养殖废弃物、污水处理厂出水和剩余污泥中的抗生素和抗性基因的相应消减技术,环境中抗性基因的监测及防控的相关标准建立,非抗生素类化学品如重金属等对抗性基因的选择效应等的研究相对缺乏。仍需进一步优化或发展新型消减技术例如生物炭吸附和土壤动物消化(如蚯蚓等)等去除环境中的抗生素和抗性基因污染。

参考文献(References)

- [1] Forsberg K J, Reyes A, Wang B, et al. The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens[J]. *Science*, 2012, 337(6098): 1107-1111.
- [2] 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(6): 1269-1279.
- [3] Tiedje J M, Wang F, Manaia C M, et al. Antibiotic resistance genes in the human-impacted environment: A one health perspective[J]. *Pedosphere*, 2019, 29(3): 273-282.
- [4] Cytryn E. The soil resistome: The anthropogenic, the native, and the unknown[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2013, 63: 18-23.
- [5] D'Costa V M, McGrann K M, Hughes D W, et al. Sampling the antibiotic resistome[J]. *Science*, 2006, 311: 374-377.
- [6] Hu H W, Wang J T, Singh B K, et al. Diversity of herbaceous plants and bacterial communities regulates soil resistome across forest biomes[J]. *Environmental Microbiology*, 2019, 20(9): 3186-3200.
- [7] Allen H K, Moe L A, Rodbumre J, et al. Functional metagenomics reveals diverse β -lactamases in a remote Alaskan soil[J]. *The ISME Journal*, 2009, 3: 243-251.
- [8] D'Costa V, King C, Kalan L, et al. Antibiotic resistance is ancient[J]. *Nature*, 2011, 477: 457-461.
- [9] McCann C M, Christgen B, Roberts J A, et al. Understanding drivers of antibiotic resistance genes in high arctic soil ecosystems[J]. *Environment International*, 2019, 125: 497-504.
- [10] 张毓森, 叶军, 苏建强. 农田生态系统抗生素抗性研究进展与挑战[J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2017, 43(6): 691-699.
- [11] 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*, 2013, 110(9): 3435-3440.
- [12] Christou A, Agüera A, Bayona J M, et al. The potential implications of reclaimed wastewater reuse for irrigation on the agricultural environment: The knowns and unknowns of the fate of antibiotics and antibiotic resistant bacteria and resistance genes: A review[J]. *Water Research*, 2017, 123: 448-467.
- [13] 安新丽, 苏建强. 活性污泥抗生素抗性基因研究进展[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(8): 2069-2079.
- [14] An X L, Su J Q, Li B, et al. Tracking antibiotic resistome during wastewater treatment using high throughput quantitative PCR[J]. *Environment International*, 2018, 117: 146-153.
- [15] Thebo A L, Drechsel P, Lambin E F, et al. A global, spatially-explicit assessment of irrigated croplands influenced by urban wastewater flows[J]. *Environmental Research Letters*, 2017, 12: 074008.

- [16] Wang F H, Qiao M, Lv Z E, et al. Impact of reclaimed water irrigation on antibiotic resistance in public parks, Beijing, China[J]. *Environmental Pollution*, 2014, 184: 247–253.
- [17] Wang F H, Qiao M, Su J Q, et al. High throughput profiling of antibiotic resistance genes in urban park soils with reclaimed water irrigation[J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(16): 9079–9085.
- [18] Ahmed W, Zhang Q, Lobos A, et al. Precipitation influences pathogenic bacteria and antibiotic resistance gene abundance in storm drain outfalls in coastal sub-tropical waters[J]. *Environment International*, 2018, 116: 308–318.
- [19] Zhu G B, Wang X M, Yang T, et al. Air pollution could drive global dissemination of antibiotic resistance genes [J]. *The ISME Journal*, 2021, 15: 270–281.
- [20] Ding L J, Zhou X Y, Zhu Y G. Microbiome and antibiotic resistome in household dust from Beijing, China[J]. *Environment International*, 2020, 139: 105702.
- [21] Wang L J, Wang J H, Wang J, et al. Soil types influence the characteristic of antibiotic resistance genes in greenhouse soil with long-term manure application[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 392: 122334.
- [22] Wang F, Xu M, Stedtfeld R D, et al. Long-term effect of different fertilization and cropping systems on the soil antibiotic resistome[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(22): 13037–13046.
- [23] Pu Q, Zhao L X, Li Y T, et al. Manure fertilization increase antibiotic resistance in soils from typical greenhouse vegetable production bases, China[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 391: 122267.
- [24] 张毓森, 叶军, 苏建强. 粪肥与铜一次性施用对农田土壤抗生素抗性基因的长期影响[J]. *应用与环境生物学报*, 2019, 25(2): 328–332.
- [25] Fahrenfeld N, Ma Y J, O'Brien M, et al. Reclaimed water as a reservoir of antibiotic resistance genes: Distribution system and irrigation implications[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2013, 4: 130.
- [26] Lu J, Zhang Y X, Wu J, et al. Fate of antibiotic resistance genes in reclaimed water reuse system with integrated membrane process[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 382(15): 121025.
- [27] Hu J L, Zhao F Z, Zhang X X, et al. Metagenomic profiling of ARGs in airborne particulate matters during a severe smog event[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 615: 1332–1340.
- [28] Li J, Cao J J, Zhu Y G, et al. Global survey of antibiotic resistance genes in air[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(19): 10975–10984.
- [29] Hu X, Zhou Q, Luo Y. Occurrence and source analysis of typical veterinary antibiotics in manure, soil, vegetables and groundwater from organic vegetable bases, northern China[J]. *Environmental Pollution*, 2010, 158(9): 2992–2998.
- [30] Cheng W, Li J, Wu Y, et al. Behavior of antibiotics and antibiotic resistance genes in eco-agricultural system: A case study[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2016, 304: 18–25.
- [31] McKinney C W, Loftin K A, Meyer M T, et al. Tet and sul antibiotic resistance genes in livestock lagoons of various operation type, configuration, and antibiotic occurrence[J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44(16): 6102–6109.
- [32] Larsson D G J, Flach C F. Antibiotic resistance in the environment[J]. *Nature Review Microbiology*, 2021, 4: 1–13.
- [33] Pal C, Asiani K, Arya S, et al. Metal resistance and its association with antibiotic resistance[J]. *Advances in Microbial Physiology*, 2017, 70: 261–313.
- [34] Yin Y, Gu J, Wang X, et al. Effects of copper addition on copper resistance, antibiotic resistance genes, and intl1 during swine manure composting[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 344.
- [35] Hu H W, Wang J T, Li J, et al. Field-based evidence for copper contamination induced changes of antibiotic resistance in agricultural soils[J]. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(11): 3896–3909.
- [36] Hu H W, Wang J T, Li J, et al. Long-term nickel contamination increases the occurrence of antibiotic resistance genes in agricultural soils[J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 51(2): 790–800.
- [37] Bank M S, Ok Y S, Swarzenski P W. Microplastic's role in antibiotic resistance[J]. *Science*, 2020, 369(6509): 1315.
- [38] Pham D N, Clark L, Li M Y. Microplastics as hubs enriching antibiotic-resistant bacteria and pathogens in municipal activated sludge[J]. *Journal of Hazardous Materials Letters*, 2021, 2: 100014.
- [39] Chen Q L, Zhu D, An X L, et al. Does nano silver promote the selection of antibiotic resistance genes in soil and plant[J]. *Environment International*, 2019, 128: 399–406.

- [40] Campos J, Mourão J, Pestana N, et al. Microbiological quality of ready-to-eat salads: An underestimated vehicle of bacteria and clinically relevant antibiotic resistance genes[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 166(3): 464–470.
- [41] Zhu B K, Chen Q L, Chen S C, et al. Does organically produced lettuce harbor higher abundance of antibiotic resistance genes than conventionally produced[J]. *Environment International*, 2017, 98: 152–159.
- [42] Holvoet K, Sampers I, Callens B, et al. Moderate prevalence of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from lettuce, irrigation water, and soil[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(21): 6677–6683.
- [43] Wang F H, Qiao M, Chen Z, et al. Antibiotic resistance genes in manure-amended soil and vegetables at harvest [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2015, 299: 215–221.
- [44] Chen Q L, An X L, Zheng B X, et al. Long-term organic fertilization increased antibiotic resistome in phyllosphere of maize[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 645: 1230–1237.
- [45] Marti R, Tien Y C, Murray R, et al. Safely coupling livestock and crop production systems: How rapidly do antibiotic resistance genes dissipate in soil following a commercial application of swine or dairy manure[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80: 3258–3265.
- [46] Wang F, Fu Y H, Sheng H J, et al. Antibiotic resistance in the soil ecosystem: A One Health perspective[J]. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 2021, 20: 100230.
- [47] Watts J E M, Schreier H J, Lanska L, et al. The rising tide of antimicrobial resistance in aquaculture: Sources, sinks and solutions[J]. *Marine Drugs*, 2017, 15(6): 158.
- [48] Marti E, Variatza E, Luis Balcazar J. The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance[J]. *Trends in Microbiology*, 2014, 22(1): 36–41.
- [49] Zhu Y G, Zhao Y, Zhu D, et al. Soil biota, antimicrobial resistance and planetary health[J]. *Environment International*, 2019, 131: 105059.
- [50] 朱冬, 陈青林, 丁晶, 等. 土壤生态系统中抗生素抗性基因与星球健康: 进展与展望[J]. *中国科学: 生命科学*, 2019, 49(12): 1652–1663.
- [51] Liu Y Q, Sun Z J, Wang C, et al. Purification of a novel antibacterial short peptide in earthworm *Eisenia foetida* [J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2004, 36(4): 297–302.
- [52] Li W L, Li S S, Zhong J, et al. A novel antimicrobial peptide from skin secretions of the earthworm, *Pheretima guillelmi* (Michaelsen) [J]. *Peptides*, 2011, 32(6): 1146–1150.
- [53] Zhu D, An X L, Chen Q L, et al. Antibiotics disturb the microbiome and increase the incidence of resistance genes in the gut of a common soil collembolan[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(5): 3081–3090.
- [54] Zhu D, Zheng F, Chen Q L, et al. Exposure of a soil collembolan to Ag nanoparticles and AgNO₃ disturbs its associated microbiota and lowers the incidence of antibiotic resistance genes in the gut[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52: 12748–12756.
- [55] Lerminiaux N A, Cameron A D S. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments[J]. *Canada Journal of Microbiology*, 2019, 65(1): 34–44.
- [56] Fan X T, Li H, Chen Q L, et al. Fate of antibiotic resistant *Pseudomonas Putida* and broad host range plasmid in natural soil microcosms[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10(194): 194.
- [57] Pu Q, Fan X T, Li H, et al. Cadmium enhances conjugative plasmid transfer to a fresh water microbial community[J]. *Environmental Pollution*, 2021, 268: 115903.
- [58] Pu Q, Fan X T, Sun A Q, et al. Co-effect of cadmium and iron oxide nanoparticles on plasmid-mediated conjugative transfer of antibiotic resistance genes[J]. *Environment International*, 2021, 152: 106453.
- [59] Johnston C, Martin B, Fichant G, et al. Bacterial transformation: Distribution, shared mechanisms and divergent control[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12: 181–196.
- [60] Chen I, Dubnau D. DNA uptake during bacterial transformation[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2004, 2: 241–249.
- [61] Seitz P, Blokesch M. Cues and regulatory pathways involved in natural competence and transformation in pathogenic and environmental Gram-negative bacteria [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2013, 37(3): 336–363.
- [62] Wang Y, Lu J, Engelstädter J, et al. Non-antibiotic pharmaceuticals enhance the transmission of exogenous antibiotic resistance genes through bacterial transformation [J]. *The ISME Journal*, 2020, 14(8): 2179–2196.
- [63] Traglia G M, Quinn B, Schramm S T, et al. Serum albumin and Ca²⁺ are natural competence inducers in the human pathogen *Acinetobacter baumannii*[J]. *Antimicrobial*

- Agents and Chemotherapy, 2016, 60(8): 4920–4929.
- [64] Balsalobre L, Ferrándiz M J, Liñares J, et al. Viridans group streptococci are donors in horizontal transfer of topoisomerase IV genes to *Streptococcus pneumoniae*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2003, 47(7): 2072–2081.
- [65] McInnes R S, McCallum G E, Lamberte L E, et al. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in the human gut microbiome[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2020, 53: 35–43.
- [66] Lekunberri I, Subirats J, Borrego C M, et al. Exploring the contribution of bacteriophages to antibiotic resistance [J]. *Environmental Pollution*, 2017, 220: 981–984.
- [67] Ross J, Topp E. Abundance of antibiotic resistance genes in bacteriophage following soil fertilization with dairy manure or municipal biosolids, and evidence for potential transduction[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(22): 7905–7913.
- [68] 陈莫莲, 安新丽, 杨凯, 等. 土壤噬菌体及其介导的抗生素抗性基因水平转移研究进展[J]. *应用生态学报*, 2021, 32(6): 2267–2274.
- [69] Larrañaga O, Brown-Jaque M, Quirós P, et al. Phage particles harboring antibiotic resistance genes in fresh-cut vegetables and agricultural soil[J]. *Environment International*, 2018, 115: 133–141.
- [70] Rumbo C, Fernandez-Moreira E, Merino M, et al. Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: A new mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011, 55: 3084–3090.
- [71] Yaron S, Kolling G L, Simon L, et al. Vesicle-mediated transfer of virulence genes from *Escherichia coli* O157:H7 to other enteric bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(10): 4414–4420.

The soil resistome: Origin, dissemination and driving factor

AN Xinli, SU Jianqiang*

Fujian Key Laboratory of Watershed Ecology, Key Laboratory of Urban Environment and Health, Institute of Urban Environment, Chinese Academy of Sciences, Xiamen 361021, China

Abstract Soil is a heterogeneous habitat and serves as the major reservoir and sink of antibiotic resistance. In this review, we summarize the sources and driving factors in shaping soil resistome, and the mechanisms underlying the transfer of antibiotic resistance genes (ARGs) amongst soil bacteria. We also present current knowledge on dissemination of ARG among soil, water, plant and soil fauna, and propose the future perspectives in this field. This review will help illustrate mechanisms underpinning the dissemination of ARGs in soil.

Keywords soil ecosystem; antibiotic resistance; horizontal gene transfer; human health; environmental pollution ●



(责任编辑 徐丽娇)