

北京温榆河流域耐药大肠杆菌的调查研究

施嘉琛^{1,2},胡建英^{2*},常红²,万祎²,张照斌²,相艳¹(1.北京航空航天大学环境工程系,北京 100083; 2. 北京大学城市与环境学院,北京 100871)

摘要:采用滤膜法结合大肠杆菌显色培养基,调查了北京地区温榆河流域氨苄青霉素、四环素、磺胺(磺胺甲噁唑-甲氧苄啶联用)和左旋氧氟沙星 4 类抗生素耐药大肠杆菌的发生情况.结果表明,温榆河流域总大肠杆菌数为 $10^3\sim 10^7$ 个/L,耐药大肠杆菌数为 $0\sim 10^6$ 个/L;大肠杆菌对氨苄青霉素、四环素和磺胺耐药率分别为 10%~35%、5%~25%、10%~35%,而使用时间最短的左氧氟沙星耐药率则低于 15%;受渔场排放影响的采样点,四环素耐药大肠杆菌数量显著高于该点其他抗生素耐药大肠杆菌数量,而左氧氟沙星耐药大肠杆菌数量百分比相对较高的采样点推测可能源于人类排放.

关键词: 耐药大肠杆菌; 温榆河; 抗生素; 调查

中图分类号: X171.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2008)01-0039-04

Investigation on the antibiotic-resistance *E.coli* in Wenyu river in Beijing. SHI Jia-chen^{1,2}, HU Jian-ying^{2*}, CHANG Hong², WAN Yi², ZHANG Zhao-bin², XIANG Yan¹ (1.Department of Environmental Engineering, Beijing University of Aeronautics and Astronautics, Beijing 100083, China; 2.College of Environmental Science, Peking University, Beijing 100871, China). *China Environmental Science*, 2008, 28(1): 39~42

Abstract: The occurrence of antibiotic-resistance *E.coli* to four classes of antibiotics including ampicillin, tetracycline, sulfonamide (sulfamethoxazole-trimethoprim) and levofloxacin in Wenyu river in Beijing was investigated by using membrane filter method with *E. coli* chromogenic culture media. In Wenyu river basin, the total number of *E. coli* was $10^3\sim 10^7$ cell/L and the number of antibiotic-resistance *E. coli* was $0\sim 10^6$ cell/L. The antibiotic-resistance rates to ampicillin, tetracycline, and sulfonamide were 10%~35%, 5%~25%, 10%~35% respectively; while the antibiotic-resistance rate of levofloxacin which was recently using in hospital was lowered than 15%. At the sampling point influenced by the fishery discharge, the number of antibiotic-resistance *E. coli* to tetracycline was higher markedly than those of resistance *E. coli* to other antibiotics, while the highest levofloxacin-resistance rates could be inferred having source of human discharge.

Key words: antibiotic-resistance *E. coli*; Wenyu river; antibiotic; investigation

抗生素由于其良好的杀菌抑菌效果,成为医学上常用药物.对抗生素的不当使用,造成了医学上耐药微生物的泛滥^[1],环境中耐药微生物的污染已引起研究者的关注^[2-3].近几年的调查显示,在美国某些河道中,微生物对氨苄青霉素的耐药率最高为 73%,以革兰氏阴性菌为主^[4];日本一些河道中,大肠杆菌对氨苄青霉素、四环素和磺胺的耐药率最高分别为 81.5%、69.6%和 55.6%^[5].我国 1999 年抗生素的产量已达 3.5 万 t^[6],是美国 2000 年产量的 2 倍^[7],存在潜在的抗生素和耐药微生物的污染.但是环境中耐药微生物的污染在我国尚未引起足够的重视.

本研究采用滤膜法结合大肠杆菌显色培养

基,调查了北京温榆河流域中氨苄青霉素、四环素、磺胺和左旋氧氟沙星 4 类常见抗生素的耐药大肠杆菌的污染情况,为我国的抗生素生态环境风险评价提供基础数据.

1 材料与方法

1.1 样品采集

温榆河上游流经大型生活社区,中下游分布渔场和农场,两岸以农田为主.本研究以温榆河为

收稿日期: 2007-04-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20610103);科技部国际科技合作项目(2006DFA91130)

* 责任作者, 教授, hujy@urban.pku.edu.cn

主,同时采集了其支流(A~F)汇入温榆河前1km的水样(图1)。采样点从上游起始处编号,流域调查河道总长度约为35km。于2006年8月上旬,使用灭菌离心管采集水样,每份水样各采集500mL,每个样品3个平行。4℃保存,并于6h内完成过滤检测。共采集样品21个。

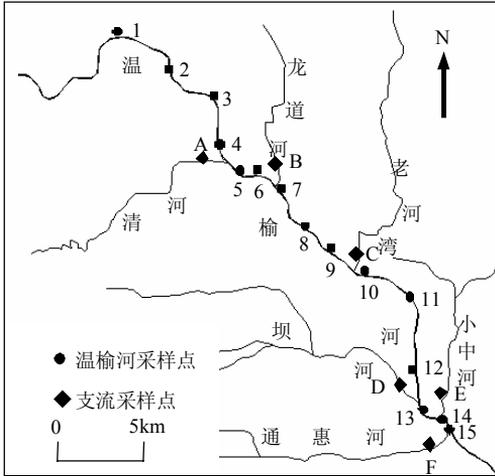


图1 温榆河采样点分布示意

Fig.1 Sample sites in Wenyu river of Beijing

A.清河 B.龙道河 C.老河湾 D.坝河 E.小中河 F.通惠河

1.2 总大肠杆菌与耐药大肠杆菌的检测方法

参照滤膜法^[8-9]对采集水样中的大肠杆菌进行检测分离。取1mL水样,采用10倍梯度稀释的方法,将水样依次梯度稀释至 10^4 倍,原水水样与各梯度稀释液均取1mL,与50mL无菌生理盐水(0.7% NaCl溶液)充分混匀后,用口径为47mm的过滤器和直径47mm、孔径 $0.45\mu\text{m}$ 的无菌网格滤膜(美国,Millipore)过滤,对每批水样进行过滤时均以50mL灭菌生理盐水作为空白对照,每个样品做2个平行。滤膜细菌截留面向上,置于大肠杆菌显色培养基(法国,CHROMagar)上,44℃培养24h,对蓝色菌落数介于30~300平板上的菌落进行计数,计算原水样中大肠杆菌的密度(个/L)。

根据文献[10]中界定耐药大肠杆菌抗生素耐受浓度的参考标准,在培养基中添加抗生素制成不同抗生素培养基。抗生素添加浓度分别为氨苄青霉素 $32\mu\text{g/mL}$,四环素 $16\mu\text{g/mL}$,磺胺(磺胺甲噁唑-甲氧苄啶联用) $152.8\mu\text{g/mL}$,左旋氧氟沙星

$8\mu\text{g/mL}$ 。耐药大肠杆菌的检测方法与总大肠杆菌的检测方法相同,通过计数各种不同抗生素培养基上出现的菌落,计算水样中不同抗生素耐药大肠杆菌的密度(个/L)。

1.3 耐药大肠杆菌的发生率及数量百分比的计算方法

将总大肠杆菌密度计为 N ,氨苄青霉素、四环素、磺胺、左氧氟沙星耐药大肠杆菌密度分别计为 A, T, S, L ,则4种抗生素的耐药发生率分别为 $a=A/N, t=T/N, s=S/N, l=L/N$ 。

为探讨不同采样点中耐药类型的变化,用数量百分比表示各采样点各类耐药大肠杆菌的组成,计算方法: $a'=A/(A+T+S+L), t'=T/(A+T+S+L), s'=S/(A+T+S+L), l'=L/(A+T+S+L)$ 。

2 结果与讨论

2.1 温榆河流域总大肠杆菌数

由图2可见,温榆河流域总大肠杆菌数为 $10^3\sim 10^7$ 个/L。上游(样点1~样点4)总大肠杆菌数下降较快,这可能是大肠杆菌在自然环境中存活周期较短导致;中下游河段受支流和周围环境影响,河道中总大肠杆菌数呈现明显的波动。由于清河、龙道河、坝河和通惠河中总大肠杆菌数处于相对较高水平,汇入温榆河后导致总大肠杆菌数升高;而老河湾和小中河中总大肠杆菌数较低,对温榆河总大肠杆菌数影响不明显。样点9,样点10处总大肠杆菌数的升高推测是除了支流以外的污染源的排放所致。

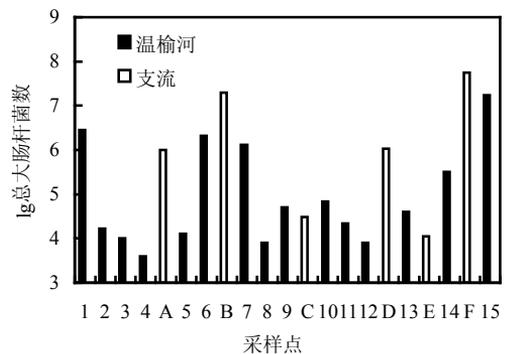


图2 温榆河及其支流中总大肠杆菌数

Fig.2 Number of total *E. coli* of Wenyu river and its confluent

由图 3 可见,温榆河中普遍存在 4 类抗生素的耐药大肠杆菌,各类抗生素的耐药大肠杆菌数为 0~10⁶ 个/L.由于上游流经大型生活社区,样点 1 处各类耐药大肠杆菌数较高.温榆河中游,在汇入支流影响下,各支流汇入点周围各类抗生素耐药大肠杆菌数较高,其中清河、龙道河、坝河和通惠河对温榆河的影响比较明显.样点 9 和样点 10 处各类耐药大肠杆菌数量的升高,表明这 2 个采样点受到周围环境的影响.值得注意的是,不同采样点中总大肠杆菌数量越高,耐药大肠杆菌数量也越高,耐药大肠杆菌的数量取决于总大肠杆菌的排放.

2.2 温榆河流域大肠杆菌耐药率

研究表明,温榆河中氨基青霉素、四环素、磺胺、左氧氟沙星的耐药率分别为 10%~35%, 5%~25%, 10%~35%,0~15%.此结果与国外相关研究结果相似^[4-5].比较 4 类抗生素的耐药率发现,氨基青霉素、四环素和磺胺的耐药率高于左氧氟沙星的耐药率,由于前 3 类抗生素的使用始于 20 世纪的 50、60 年代,而左氧氟沙星于 20 世纪 90 年代以后才用于临床,结合医学上随着抗生素使用年代的增长,耐药率也持续升高的现象^[11],推测环境中不同抗生素耐药率的高低与抗生素的使用年限有较密切的关系.

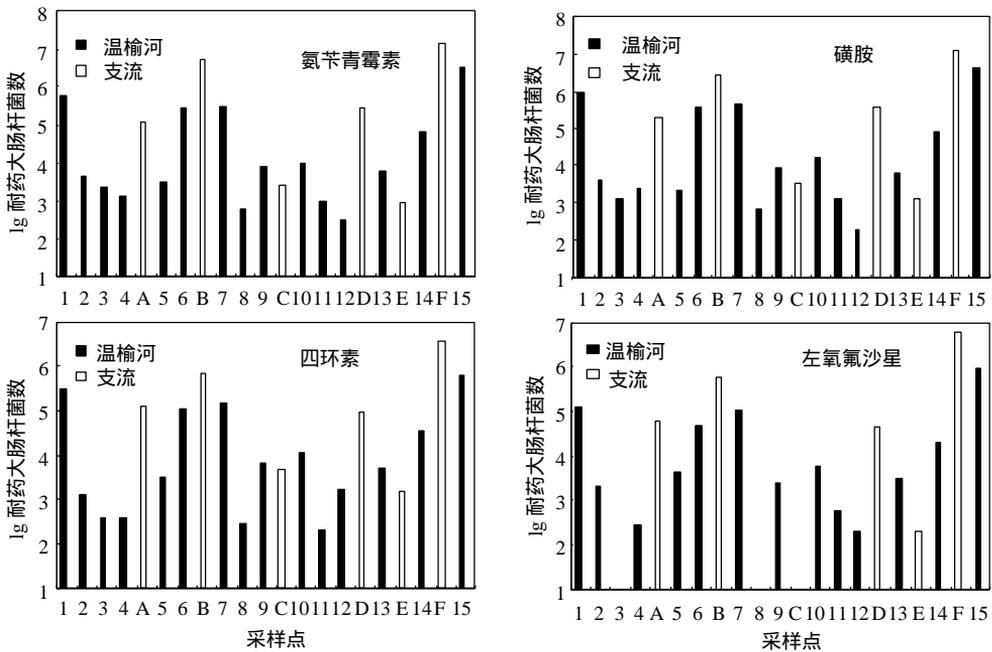


图 3 温榆河及其支流中各类抗生素耐药大肠杆菌数

Fig.3 Number of antibiotic resistance *E. coli* of Wenyu river and its confluent

2.3 各类耐药大肠杆菌数量组成

由图 4 可见,各采样点 4 种抗生素耐药大肠杆菌数量组成总体上比较接近,反映环境中 4 类耐药大肠杆菌的发生情况相似.在某些特殊采样点耐药大肠杆菌数量组成有显著变化,如样点 12 处,四环素耐药大肠杆菌的数量显著高于其他 3 种.由于样点 12 周围有渔场,而渔场经常将四环素类抗生素中的土霉素作为预防和治疗鱼类疾病的药物或者促生长剂^[12],国内也有从

水产品中检测出四环素类抗生素残留物质的报道^[13],渔场中由于土霉素的使用产生的耐药基因亦表现为对四环素的耐药性^[14],使该处四环素耐药大肠杆菌数高于其他抗生素.因此通过耐药大肠杆菌数量组成的变化可以初步判断环境中耐药微生物的来源.如样点 5 处,左氧氟沙星耐药大肠杆菌的数量百分比高于其他采样点.由于目前左氧氟沙星主要用于人类疾病的治疗^[2,15],调查发现样点 5 周围以生活社区为主,人

口密度较高,有药房和社区医院,因此该样点的耐药大肠杆菌可能来源于人类排放.抗生素耐药谱分析(ARA)作为环境中微生物来源的分析方法,有望应用于环境调查中^[16].

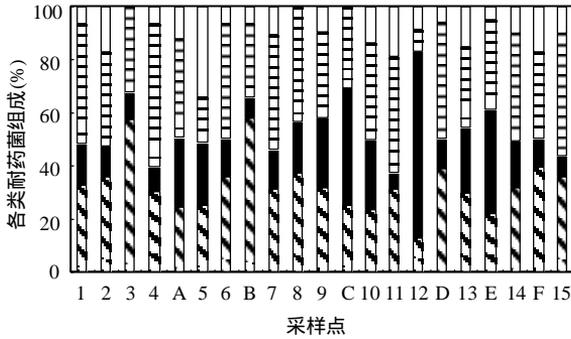


图4 不同抗生素耐药大肠杆菌数量组成

Fig.4 Profile of different kinds of antibiotic resistance *E. coli*

▨ 氨基青霉素 ■ 四环素 □ 氨基青霉素
□ 左氧氟沙星

3 结论

3.1 北京温榆河流域总大肠杆菌数为 $10^3 \sim 10^7$ 个/L,耐药大肠杆菌数为 $0 \sim 10^6$ 个/L;河道中总大肠杆菌数和耐药数呈现波动,主要受5条支流和河道周围环境的影响.

3.2 大肠杆菌对氨基青霉素、四环素和磺胺的耐药率分别为10%~35%、5%~25%和10%~35%,而近年才开始使用的左氧氟沙星的耐药率则低于15%.

3.3 四环素耐药大肠杆菌数相对较高的样点12,可能受周围渔场环境的影响;左氧氟沙星的耐药大肠杆菌数相对较高的样点5,推测污染源更多来自人类排放.通过不同采样点抗生素耐药大肠杆菌数量百分比组成的变化,可初步判定各采样点耐药微生物来源.

参考文献:

- [1] 叶贺佳,叶万树,黄东璋.细菌耐药性的产生机理及其控制对策[J]. 动物医学进展, 2005,26(10):33-38.
- [2] Schmidt C W. Antibiotic resistance in livestock: more at stake than steak [J]. Environmental Health Perspectives, 2002,110:396-

402.

- [3] D'Costa V M, McGram K M, Hughes D W, et al. Sampling the antibiotic resistome [J]. Science, 2006,311:374-377.
- [4] Ash R J, Mauck B, Morgan M. Antibiotic resistance of gram-negative bacteria in rivers, United States [J]. Emerging Infectious Diseases, 2002,8(7):713-716.
- [5] Seino A, Hasegawa Y, Masunaga S. Distribution of antibiotic-resistant *E. coli* in Kaname, Tsurumi, and Tama Rivers [J]. Journal of Japan Society on Water Environment, 2004,27(11): 693-698.
- [6] 中国化学制药工业协会,中国医药工业公司. 1999年化学医药工业统计资料 [Z]. 2000.
- [7] Kümmerer K. Significance of antibiotics in the environment [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2005,52:5-7.
- [8] Parveen S, Murphree R L, Edmiston L, et al. Association of multiple-antibiotic-resistance profiles with point and nonpoint sources of *Escherichia coli* in Apalachicola Bay [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997,63:2606-2612.
- [9] Whitlock J E, Jones D T, Harwood V J. Identification of the sources of fecal coliforms in an urban watershed using antibiotic resistance analysis [J]. Water Research, 2002,36:4273-4282.
- [10] M100-S16,美国临床实验室标准化协会(CLSI)抗微生物药物敏感性试验执行标准 [S]. 2005.
- [11] 吴聪明,陈杖榴.微生物耐药性扩散的机制 [J]. 动物医学进展, 2003,24(4):6-11.
- [12] 冷向军,李小勤.水产饲料中抗生素的应用 [J]. 饲料研究, 2003,1:38-41.
- [13] 黄志勇,蔡洪基,黄高凌,等.水产品中四环素类抗生素残留量的高效液相色谱测定方法 [J]. 福建分析测试, 2005,14(1): 2093-2095.
- [14] Seok-Ryel Kim, Lisa Nonaka, Satoru Suzuki. Occurrence of tetracycline resistance genes tet(M) and tet(S) in bacteria from marine aquaculture sites [J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 237:147-156.
- [15] Hooper D C. Clinical applications of quinolones [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1998,1400:45-61.
- [16] Whitlock J E, Jones D T, Harwood V J. Identification of the sources of fecal coliforms in an urban watershed using antibiotic resistance analysis [J]. Water Research, 2002,36:4273-4282.

作者简介:施嘉琛(1982-),男,江苏南通人,北京航空航天大学环境工程系硕士研究生,主要从事环境中耐药微生物及其机理的研究.