

促生长抗生素禁用后养猪场多重耐药菌群及耐药特征变化

侯金江, 孙兴滨, 高浩泽, 王旭明, 郭雅杰, 高敏, 仇天雷

引用本文:

侯金江, 孙兴滨, 高浩泽, 王旭明, 郭雅杰, 高敏, 仇天雷. 促生长抗生素禁用后养猪场多重耐药菌群及耐药特征变化[J]. 农业环境科学学报, 2023, 42(3): 682-691.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2022-0874>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

规模化畜禽养殖场粪便中多重耐药菌分离鉴定及其耐药特征

唐伟欣, 孙兴滨, 高浩泽, 程首涛, 仇天雷, 王旭明

农业环境科学学报. 2020, 39(1): 207-216 <https://doi.org/10.11654/jaes.2019-0749>

鸡粪-堆肥中重金属残留、抗生素耐药基因及细菌群落变化研究

邓雯文, 陈姝娟, 何雪萍, 晋蕾, 杨盛智, 余秀梅, 刘书亮, 邹立扣

农业环境科学学报. 2019, 38(2): 439-450 <https://doi.org/10.11654/jaes.2018-0716>

兽用抗生素研究的文献计量学分析

李红娜, 阿旺次仁, 李斌绪, 叶婧, 朱昌雄

农业环境科学学报. 2017, 36(11): 2297-2306 <https://doi.org/10.11654/jaes.2017-0659>

堆肥过程逸散抗生素耐药菌气溶胶的浓度及粒径分布特征

陈默, 高敏, 宋渊, 程首涛, 高浩泽, 王旭明

农业环境科学学报. 2019, 38(7): 1633-1640 <https://doi.org/10.11654/jaes.2019-0009>

抗生素对雌二醇降解菌JX-2降解性能的影响

刘静娴, 刘娟, 孙敏霞, 高彦征, 李舜尧, 凌婉婷

农业环境科学学报. 2016, 35(8): 1488-1497 <https://doi.org/10.11654/jaes.2016-0620>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

侯金江, 孙兴滨, 高浩泽, 等. 促生长抗生素禁用后养猪场多重耐药菌群及耐药特征变化[J]. 农业环境科学学报, 2023, 42(3): 682–691.

HOU J J, SUN X B, GAO H Z, et al. Changes in a multidrug-resistant bacterial community and its antibiotic resistance characteristics in pig farms after the ban on antibiotic growth promoters[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2023, 42(3): 682–691.

促生长抗生素禁用后养猪场多重耐药菌群及耐药特征变化

侯金江^{1,2}, 孙兴滨^{1*}, 高浩泽², 王旭明², 郭雅杰², 高敏², 仇天雷^{2*}

(1. 东北林业大学林学院, 哈尔滨 150040; 2. 北京市农林科学院北京农业生物技术研究所, 北京 100097)

摘要: 由于频繁使用抗生素, 养殖动物粪便中多重耐药菌会给周边环境带来生态风险。为了解促生长类抗生素(Antibiotic growth promoters, AGPs)禁用后养猪场来源多重耐药菌群的变化特征, 本研究采集 AGPs 禁用前后猪场粪便样品, 开展了多重耐药菌计数、分离培养及鉴定, 并利用 16S rRNA 基因扩增子测序对可培养多重耐药菌群进行比对分析, 同时利用药敏试验分析了 AGPs 禁用前后多重耐药菌株的耐药变化特征。结果表明: 禁用 AGPs 后猪场粪便中多重耐药率显著下降。AGPs(主要为土霉素)残留浓度能够显著影响禁用前后的多重耐药菌群分布, 同时 AGPs 禁用也能够显著减少猪粪中的多重耐药菌种类。猪粪中多重耐药菌主要分布在变形菌门、放线菌门、厚壁菌门和拟杆菌门, *Escherichia* 在所有样本中均是优势多重耐药菌属, *Kurthia*、*Providencia*、*Leucobacter*、*Corynebacterium*、*Ignatzschineria*、*Lysinibacillus*、*Staphylococcus* 等多重耐药菌属相对丰度在禁用 AGPs 后有所减少。禁用 AGPs 能够降低猪粪中多重耐药菌的饲用抗生素的耐药率, 如四环素类、氯霉素类、大环内酯类等, 但也会升高治疗用抗生素如氨基糖苷类、头孢类、利福平类抗生素的耐药率。

关键词: 抗生素; 多重耐药菌; 养殖场; 动物粪便

中图分类号: S852.61 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2023)03-0682-10 doi:10.11654/jaes.2022-0874

Changes in a multidrug-resistant bacterial community and its antibiotic resistance characteristics in pig farms after the ban on antibiotic growth promoters

HOU Jinjiang^{1,2}, SUN Xingbin^{1*}, GAO Haoze², WANG Xuming², GUO Yajie², GAO Min², QIU Tianlei^{2*}

(1. College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; 2. Beijing Agricultural Biotechnology Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China)

Abstract: Due to the frequent use of antibiotics, multidrug-resistant bacteria in farm manure may pose ecological risks to natural environments. To understand the changes in multidrug-resistant bacterial communities in pig farms after the ban on antibiotic growth promoters (AGPs), we collected manure samples before and after the AGPs ban took effect, and counted, isolated, and identified the multidrug-resistant bacteria. We analyzed the community structure of multidrug-resistant bacteria by 16S rRNA gene amplicon sequencing. Multidrug-resistant strains present before and after the AGPs ban were analyzed by drug sensitivity testing. The residual concentration of AGPs (mainly oxytetracycline) significantly affected the distribution of multidrug-resistant bacteria, and after the AGPs ban the species abundance of multidrug-resistant bacteria in pig manure significantly decreased. The multidrug-resistant bacteria in pig manure mainly belonged to the four phyla Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, and Bacteroidetes. *Escherichia* was the dominant

收稿日期: 2022-09-01 录用日期: 2022-10-25

作者简介: 侯金江(1998—), 男, 山东威海人, 硕士研究生, 从事环境抗生素耐药菌与耐药基因研究。E-mail: 872514785@qq.com

*通信作者: 孙兴滨 E-mail: sunxingbin1025@163.com; 仇天雷 E-mail: qqray01@126.com

基金项目: 北京市自然科学基金面上项目(6222013, 5222005); 北京市农林科学院创新能力建设专项(KJCX20210424); 现代农业产业技术体系北京市创新团队专项(BJJQ-G08)

Project supported: The Natural Science Foundation of Beijing, China(6222013, 5222005); Special Program for Creative Ability of Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences(KJCX20210424); Beijing Agriculture Innovation Consortium(BJJQ-G08)

multidrug-resistant genus in all samples, and *Kurthia*, *Providencia*, *Leucobacter*, *Corynebacterium*, *Ignatzschinera*, *Lysinibacillus*, *Staphylococcus*, and other multidrug-resistant genera decreased in relative abundance after the AGPs ban. The AGPs ban reduced rates of resistance to feed antibiotics including tetracyclines, chloramphenicol, and macrolides in multidrug-resistant bacteria in pig manure. However, it also increased their rate of resistance to therapeutic antibiotics including aminoglycosides, cephalosporins, and rifampicin.

Keywords: antibiotics; multi-drug resistant bacteria; livestock farm; animal feces

为了促进动物生长、预防和治疗疾病,抗生素被广泛应用于集约化畜禽养殖^[1]。一方面,长期过量使用抗生素会加速动物肠道中抗生素多重耐药菌的产生,若动物粪便不经过有效的无害化处理,其中的多重耐药菌会给环境和周边人群带来生物安全风险^[2]。另一方面,由于持续的抗生素选择压力以及抗性基因的水平转移,多重耐药菌在畜禽粪便中的检出率越来越高,并且其携带的耐药基因可能随粪肥施用传播到周边农田、水体等其他环境^[3]。我国是世界上最大的畜禽生产国之一,每年生产和排放的畜禽粪便高达20亿t^[4]。为了遏制全国范围内抗生素耐药性的增长,2019年7月,我国农业农村部颁布了第194号公告,要求2020年起禁止在饲料里添加使用促生长类药物(Antibiotic growth promoters, AGPs)。瑞典禁用AGPs后,养殖场中粪肠球菌对大环内酯类、林可霉素和四环素耐药率比禁用前有明显下降^[5]。但根据欧盟国家的禁抗经验,AGPs禁用后几年内治疗用的抗生素发生替代性的增长^[6],同时也发现致病菌的耐药性并没有相应出现明显下降^[7]。而我国食品动物的养殖规模较欧盟禁抗时期更为复杂,AGPs对养殖源粪便中多重耐药菌群及其耐药基因的影响规律缺乏相关研究。

在我国北方地区养殖场,畜禽粪便中四环素类抗生素残留检出率最高,其次为喹诺酮类、磺胺类和大环内酯类^[8]。吴聪明等^[9]的研究发现,长期添加磺胺类和氨基糖苷类抗生素后,从猪粪中分离的菌株对多种抗生素表现出耐药性。Zhu等^[10]也发现畜禽粪便中的耐药基因与青霉素、磺胺甲噁唑、杆菌肽和四环素等抗生素残留密切相关。已有报道显示^[11],越南某地区磺胺甲噁唑耐药细菌数量与使用磺胺甲噁唑的浓度呈正相关,以上结论均说明养殖过程中抗生素使用种类和浓度,对养殖粪便中多重耐药菌及耐药基因有较大影响。因此,为了揭示多重耐药菌群在养殖源猪粪中的变化特征,本研究采集AGPs禁用前后我国北方地区典型集约化养猪场的粪便样品进行分析比对。通过多重耐药菌选择性计数及耐药率计算,评估AGPs禁用对猪粪中多重耐药菌污染的消减作用;其

次利用16S rRNA扩增子测序技术解析猪粪中多重耐药菌群特征;进一步对猪粪中多重耐药菌进行分离、纯化及鉴定,并对比不同批次猪粪中多重耐药菌的耐药表型特征。本次研究为对比AGPs禁用前后,养猪场来源多重耐药菌群的变化特征,评估AGPs禁用对养殖源多重耐药菌污染的减量作用,为养殖源抗生素污染监测和防控提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 样品的来源及采集

本次试验所用猪粪均取自我国北方地区养猪场,采取5点混合取样的方法,共采集13个养猪场的猪粪样品,每个粪便样品收集3组重复。AGPs禁用前(2018年)采集河北省滦平县养猪场4个;AGPs禁用后(2022年)分别采集河北省滦平县养殖场3个,以及宁夏回族自治区石嘴山地区养殖场6个。所有养猪场的存栏量均在2 000~4 000头之间。其中,河北省2018年与2022年猪粪样品取自相同养猪场。所采样品均低温运输,并在进行多重耐药菌培养前于4℃保存。

1.2 抗生素及培养基的配制

将溶化的LB固体培养基降温至50℃左右,加入4种抗生素后倒入平板。抗生素的最终浓度为四环素16 μg·mL⁻¹,恩诺沙星1 μg·mL⁻¹,磺胺甲噁唑76 μg·mL⁻¹,泰乐菌素1 μg·mL⁻¹。同时设置不加抗生素的LB培养基平板,进行多重耐药菌和细菌总数的测定^[12]。

1.3 多重耐药菌的计数

称取10 g粪便样品,倒入装有已灭菌的90 mL生理盐水的三角瓶中,制成均匀的悬液,按10倍法进行梯度稀释,将稀释液进行涂布接种:空白板选取10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵三个浓度,添加抗生素板选取10⁻²、10⁻³、10⁻⁴三个浓度^[12]。每个平板重复3次。涂布后平板倒置于28℃恒温箱中,培养48 h,使用迅数全自动菌落计数仪(icount33)对菌落数在30~300的平板进行计数,并将10⁻²浓度的添加抗生素板刮板与40%甘油1:1保存在-80℃冰箱。根据公式计算细菌耐药率:

细菌耐药率(%)=(多重耐药菌数/细菌总数)×100%

1.4 多重耐药菌的鉴定

将分离纯化后菌株接种到灭菌的LB肉汤中,置于35℃、150 r·min⁻¹的摇箱中培养24 h。采用Easy-Pure Bacteria Genomic DNA Kit试剂盒提取菌株DNA,PCR扩增16S rRNA基因序列,引物为:27F、1492R^[13]。PCR反应体系:PCR mix为25 μL,上下游引物各2 μL,ddH₂O为19 μL,模板DNA为2 μL,共50 μL。PCR反应条件:初始98℃变性3 min;98℃变性10 s,55℃退火10 s,72℃延伸20 s,循环32次;最终72℃延伸2 min。待PCR反应结束后,将扩增产物送到北京擎科生物科技有限公司测序。

1.5 药敏试验

本次试验采用药敏纸片琼脂扩散法(K-B)检测细菌耐药性。菌株不能在纸片周围抑菌浓度范围内生长,但在抑菌范围外可以生长,从而在纸片的周围形成透明的抑菌圈。使用菌落计数仪测量抑菌圈直径。再参照药敏试验标准及抑菌圈的直径判定菌株对不同抗生素的敏感性。抑菌浓度参考2011年美国临床实验室标准化协会(CLSI)规定值^[14]。所用的药敏纸片共包括11类18种抗生素^[15]:头孢哌酮(CFP)、头孢西丁(FOX)、青霉素(P)、氨苄西林(AMP)、链霉素(S)、阿米卡星(AK)、庆大霉素(CN)、四环素(TC)、恩诺沙星(ENR)、诺氟沙星(NOR)、环丙沙星(CIP)、左氧氟沙星(LEV)、万古霉素(VA)、氯霉素(CHL)、克林霉素(DA)、红霉素(ERY)、磺胺甲噁唑(SMX)、利福平(RIP)。

1.6 多重耐药菌多样性检测

使用TIANamp Bacteria DNA Kit试剂盒,从-80℃保存条件下10⁻²浓度的多重耐药菌混菌中提取总细菌DNA,经检测后送往上海美吉生物科技有限公司进行16S rRNA基因扩增子测序。

1.7 猪粪中残留抗生素检测

本次试验采用超高效液相色谱-串联质谱法检测猪粪中的15种抗生素残留^[16]。所检测的抗生素有盐酸土霉素(OTC)、强力霉素(DOX)、盐酸金霉素(CTC)、四环素(TC)、磺胺二甲氧嘧啶(SDM)、磺胺氯哒嗪(SCP)、磺胺甲噁唑(SMX)、磺胺对甲氧嘧啶(SM)、磺胺二甲嘧啶(SM2)、磺胺喹噁啉(SQ)、恩诺沙星(ENR)、盐酸环丙沙星(CIP)、诺氟沙星(NOR)、罗红霉素(ROX)、红霉素(ERY)。其中OTC、CTC为促进生长类抗生素。本方法的15种抗生素的回收率^[16]为54.50%~97.90%,方法相对偏差为2.60%~19.80%,检出限为0.01~2.50 μg·kg⁻¹,定量限为0.05~7.90 μg·kg⁻¹。

1.8 数据分析

利用软件Origin(v9.6.5)进行试验数据的整理和制图;利用R软件中vegan统计学程序包计算AGPs禁用前后多重耐药菌数量、耐药率及相对丰度的差异显著性^[17];利用MEGA7软件进行16S rRNA基因序列比对和系统发育树分析。

2 结果与讨论

2.1 猪粪中多重耐药菌的分布特征

本次研究共计对13个养殖场来源的猪粪样品进行实验分析,选择养猪场常用的且易环境残留的泰乐菌素、四环素、磺胺甲噁唑以及恩诺沙星4种抗生素进行多重耐药菌的培养计数。结果表明,禁用AGPs前养殖源猪粪中多重耐药菌数量较高(图1),范围在2.8×10⁴~2.4×10⁷ cfu·g⁻¹(以湿质量计,下同)之间,禁用后猪粪中多重耐药菌的数量在2.4×10⁶~1.6×10⁷ cfu·g⁻¹之间。AGPs禁用前猪粪中多重耐药菌平均数量较高,为7.13×10⁶ cfu·g⁻¹,多重耐药率在0.21%~35.90%之间;AGPs禁用后猪粪多重耐药菌平均数量为1.14×10⁶ cfu·g⁻¹,多重耐药率在0.41%~17.80%之间。与AGPs禁用前相比,禁用后猪粪平均多重耐药率下降了81.30%(P<0.05),多重耐药菌平均数量降低84.00%。AGPs禁用前猪粪中多重耐药率高可能是因为饲料中常规添加抗生素,生猪肠道中残留的抗生素消除了部分抗生素敏感菌株^[18]。另一方面,在抗生素的选择性压力下,动物肠道菌群可能通过突变产生耐药性,从而导致粪便中多重耐药率升高^[19]。此外,吴翠蓉等^[20]的研究发现,动物粪便中细菌耐药性的产生与抗生素药物的使用情况有着密切联系。AGPs与多重耐药菌的产生存在相关性,随着饲料中AGPs浓度的增加,多重耐药菌的耐药率升高。同时,动物肠道中耐药菌对抗生素的耐药特征与饲喂抗生素剂量也存在显著的正相关关系^[21]。以上结果表明,AGPs禁用能够在一定程度上降低养殖源猪粪多重耐药率,并对动物粪便中多重耐药菌的污染减量具有积极作用。

2.2 猪粪中多重耐药菌群落组成变化分析

进一步利用16S rRNA扩增子测序对AGPs禁用前后猪粪可培养多重耐药菌群进行解析。基于OTU水平的α多样性分析结果(图2)表明,2018年(禁用前)河北猪粪中多重耐药菌的Sobs指数要显著高于2022年(禁用后)猪粪样品,说明禁止AGPs饲喂能够显著减少猪粪中的多重耐药菌种类。另一方面,同时

间取样的宁夏地区和河北地区的Sobs也有显著差异($P<0.01$),说明不同养殖地区的多重耐药菌种类丰度有所不同。Shannon指数表征菌群的均匀度,AGPs禁用前后虽然均值有所区别,但差异不显著,说明多重耐药菌群的均匀度差异较小。这与Agyare等^[22]的研究结果较为类似,养殖过程中使用抗生素会加速动物胃肠道中多重耐药菌的产生。

前期相关研究表明,长期使用抗生素会影响畜禽粪便中的细菌多样性以及群落结构组成^[23]。有学者对江苏养猪场粪样进行研究发现^[24],饲喂四环素类抗生素会影响猪粪中的细菌多样性;与不同农场相比,同一农场内的菌群结构更相似^[25]。但已有研究较少关注多重耐药菌群的变化,本研究基于OTU(operational taxonomic units)水平的主成分分析(图3A)表明,养殖源猪粪中多重耐药菌群组成在时间和空间上均存在差异,且时间(即AGPs禁用前后)对猪粪中多重耐药菌群落构成影响较大。禁用AGPs前养殖源猪

粪中多重耐药菌群落结构显著区别于禁用后的猪粪样品($P=0.001$)。虽然2022年河北猪粪样品与2018年为同一地区养殖场,但两者有明显区别,且与2022年宁夏地区的多重耐药菌群结构更为类似。

进一步将各样品中抗生素残留与多重耐药菌群OTU数据结合,经过方差膨胀因子分析(Variance inflation factor, VIF)筛选了显著影响群落结构的抗生素残留种类,再进行典型相关分析(Canonical correlation analysis, CCA)。结果表明,OTC残留浓度会明显影响AGPs禁用前后的多重耐药菌群分布。2018年河北猪粪样品中OTC、CTC、SMX较高,同时AGPs禁用前多重耐药菌群会明显受OTC浓度影响,而AGPs禁用后治疗用抗生素CTC残留浓度对多重耐药菌群影响更大。宁夏地区2022年猪粪样品,受喹诺酮类抗生素ENR和CIP残留影响更大。2018—2019年我国猪源大肠杆菌的多重耐药率达到91.00%,而且发现了与新型治疗用抗生素黏菌素、碳青霉烯类和替

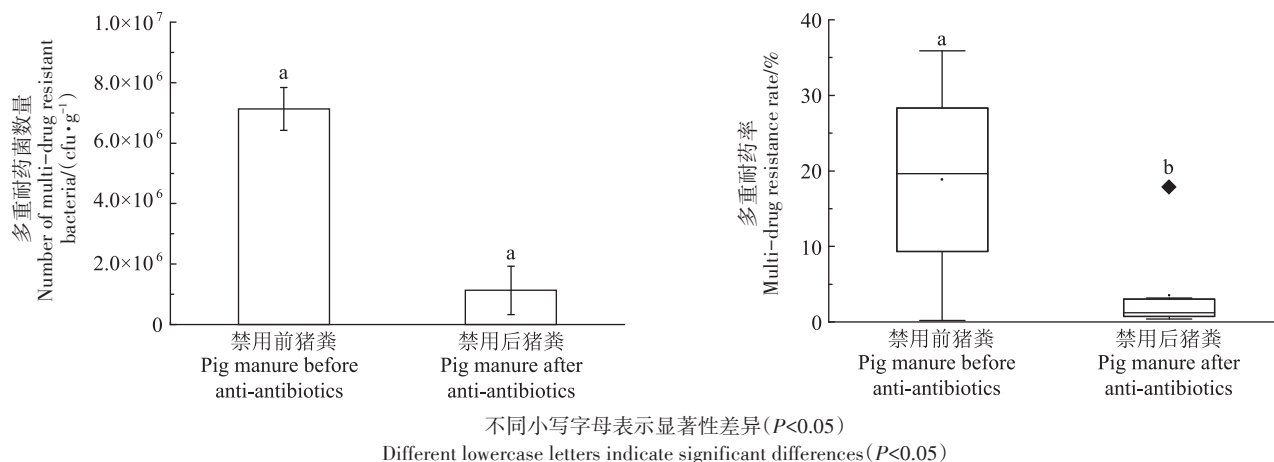


图1 猪粪中可培养多重耐药菌计数结果

Figure 1 Counting results of multidrug-resistant bacteria in pig manure

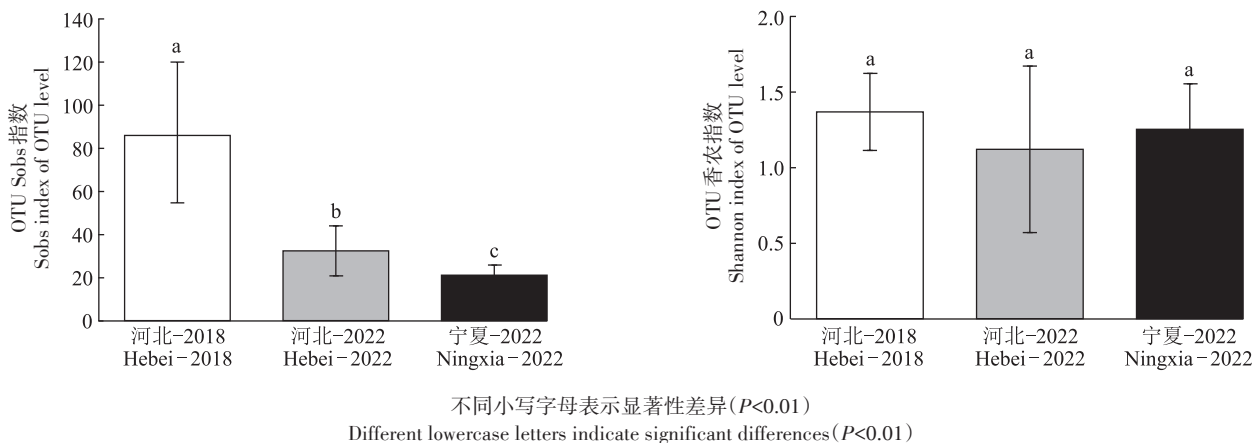


图2 猪粪样品中可培养多重耐药菌菌群的 α 多样性分析

Figure 2 Alpha diversity of culturable multidrug-resistant bacteria in pig manure sample

加环素等最新型抗生素相关的耐药性^[26]。而治疗用抗生素如多黏菌素的使用也会显著提高肉鸡粪污中的耐药菌检出率和数量^[27]。以上结果说明,虽然随着 AGPs 禁用土霉素对多重耐药菌的影响变小,但是其他治疗用抗生素如 CTC、ENR、CIP 等替代性的增长和残留,仍然有可能引起多重耐药菌的增长或群落变化。

AGPs 禁用后猪粪中多重耐药菌门水平相对丰度变化如图4所示。总体来说,猪粪中多重耐药菌主要分布在变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)和拟杆菌门(Bacteroidetes)。2018年 AGPs 禁用前河北猪粪中多重耐药菌群主要分布在变形菌门(71.60%)、放线菌门(20.00%)、厚壁菌门(7.30%)、拟杆菌门(1.10%)。2022年 AGPs 禁用后河北猪粪中变形菌门、厚壁菌门的相对丰度分别上升至80.50%、13.30%,放线菌门、拟杆菌门相对丰度分别下降到5.40%、0.83%。在禁止添加 AGPs 后,多重耐药菌中厚壁菌门占比有所上升,放线菌门占比有所下降,说明 AGPs 在一定程度上抑制了厚壁菌门的多重耐药菌生长,并促进放线菌门的耐药菌生长。此外,2022年宁夏猪粪中门水平相对丰度从高到低依次为变形菌门(65.40%)、拟杆菌门(18.10%)、放线菌门(8.20%)、厚壁菌门(8.00%)。与2022年河北猪粪样品相比拟杆菌门多重耐药菌较高,说明即使在 AGPs 禁用后,不同养殖地区的多重耐药菌群组成也有所差异。

进一步对比禁用 AGPs 前后猪粪中多重耐药菌属水平上相对丰度变化(图5)。结果表明, *Escherichia* 在所有样品中占绝对优势。这与宏基因组学分析结果类似, *Escherichia* 是肉鸡和生猪粪中主要的多重耐药基因的宿主^[28]。另一种广泛优势的多重耐药菌为

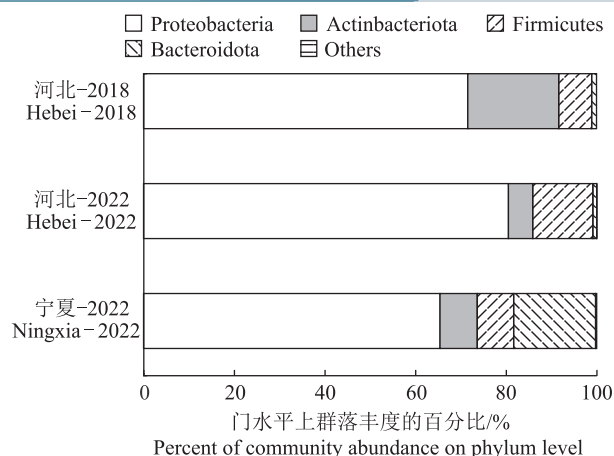


图4 多重耐药菌菌群在门水平上的分布

Figure 4 Distribution of multidrug-resistant bacterial community at the phylum level

Psychrobacter, 其在 AGPs 禁用前样品中分布比较广泛,但在 AGPs 禁用后的河北猪粪中相对丰度有所减少。禁用前多重耐药菌属的种类明显高于禁用后,禁用前菌属相对丰度明显偏高,其中包含 *Kurthia*、*Providencia*、*Leucobacter*、*Corynebacterium*、*Ignatzschineria*、*Lysinibacillus*、*Staphylococcus*, 而在河北和宁夏的 AGPs 禁用后粪样中,这些多重耐药菌属的丰度有明显下降。*Kurthia* 广泛分布于自然界中^[29],暂未发现其致病性,常见于肉制品及畜禽粪便中。*Ignatzschineria* 是一种致病性革兰氏阴性菌,其对四环素类、氟喹诺酮类抗生素有较高的耐药性^[30],因此其在禁用 AGPs 前样品中分布较多。另一方面, *Acinetobacter*、*Enterococcus*、*Sphingobacterium* 等多重耐药菌属相对丰度有所上升,其中 *Acinetobacter* 目前被怀疑是一种食品源多重耐药菌的重要成员,受其污染的乳制品、水果和蔬菜是医院外多重耐药菌的重要储存库,会给免疫力低下群体或者儿童带来食品安全风险^[31]。对比

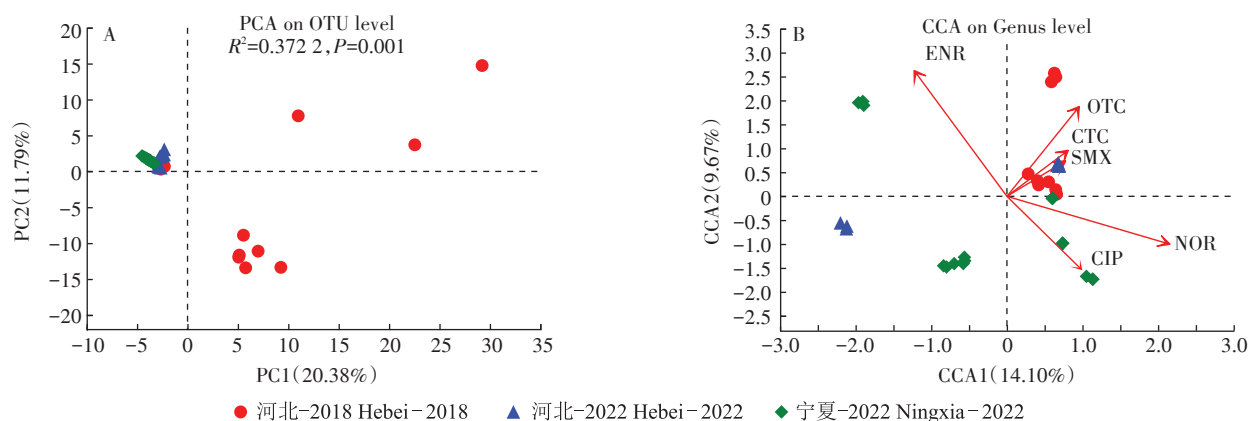


图3 猪粪样品中可培养多重耐药菌菌群的PCA(A)及CCA(B)分析

Figure 3 PCA (A) and CCA (B) analysis of culturable multidrug-resistant bacterial flora in pig manure samples

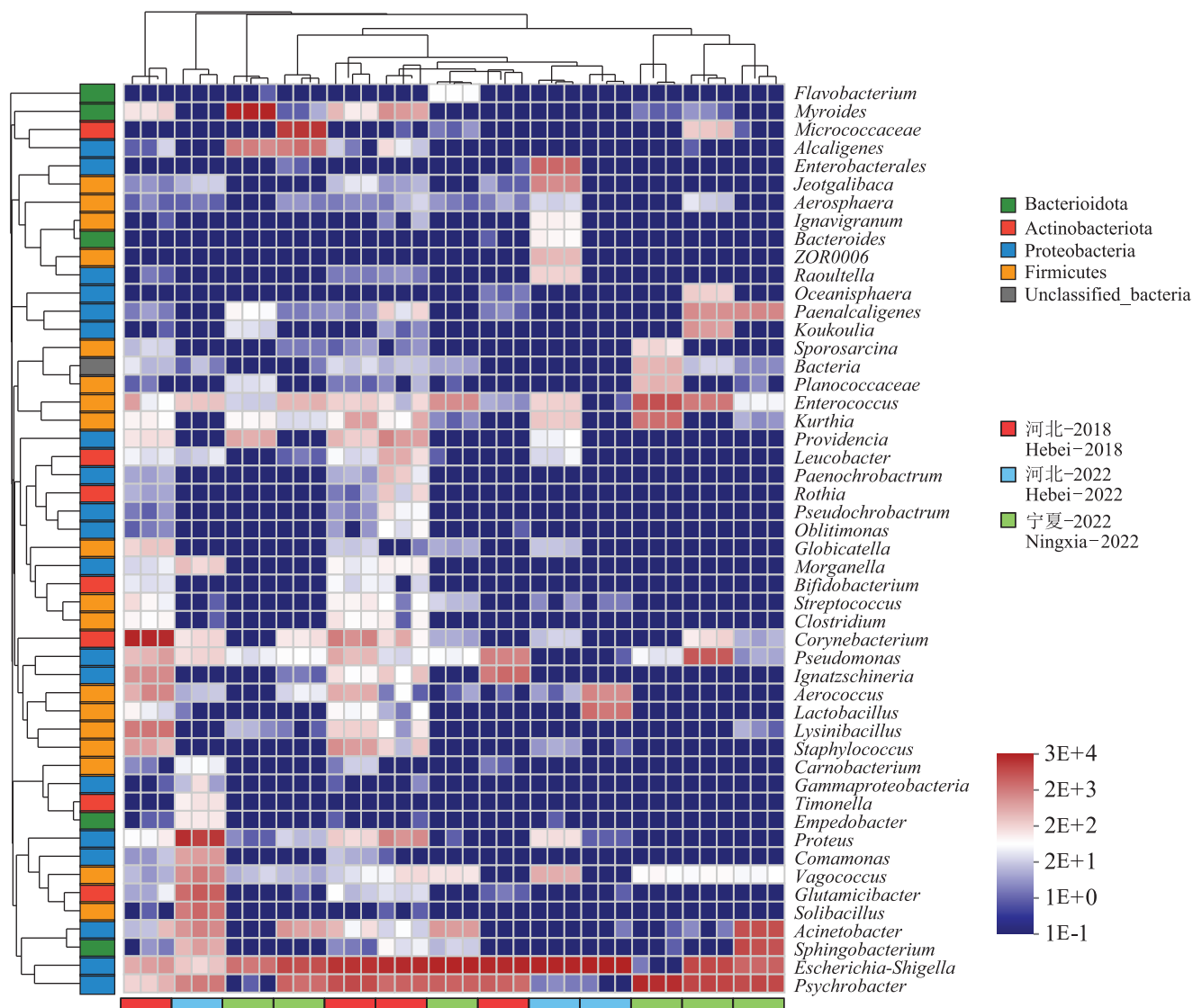


图5 多重耐药菌菌群在属水平上的分布

Figure 5 Distribution of multidrug-resistant bacterial flora at the genus level

宁夏和河北猪粪样品可以发现,在河北猪粪样品中 *Proteus*、*Glutamicibacter*、*Enterobacterales* 等菌属占明显优势;而在宁夏猪粪样品中 *Psychrobacter*、*Myroides*、*Micrococcaceae* 等菌属优势明显,说明养猪场中多重耐药菌构成也有一定的地域差异。

2.3 猪粪中多重耐药菌多样性分析

经过多重耐药培养基的筛选、分离和纯化,共分离出51株多重耐药菌,其中来自AGPs禁用前的有15株,禁用后的有36株。经16S rRNA基因全长比对,得到系统进化树(图6)。51株多重耐药菌共有20个种分布于14个属、12个科、4个门中。在门水平上,分离培养与群落测序结果一致,猪粪中可培养多重耐药菌分布在变形菌门、厚壁菌门、放线菌门、拟杆菌门等4个门中。其中,AGPs禁用前属于变形菌门的有10

株,分布在放线菌门的有5株;AGPs禁用后分布在变形菌门的有21株,分布在厚壁菌门的有7株,分布在放线菌门的有5株,分布在拟杆菌门的有3株。在属水平上, *Escherichia* 菌株数量占绝对优势,分别占禁用前、后分离多重耐药菌株的60.00%、48.38%。该属多重耐药菌中主要以 *E. coli* 为主(65.00%),其次是 *E. fergusonii*,两者均是常见动物肠道肠杆菌,也是多种耐药基因的携带者^[32-33]。多重耐药菌 *Corynebacterium* 主要有 *C. stationis* 与 *C. glutamicum*,这两种菌均为非致病的饲料添加剂生产菌株,但 *Corynebacterium* 中有人类条件致病菌 *Corynebacterium glutamicum*^[34]。虽然未在本研究中分离到,但由于近缘关系,多重耐药基因有可能向致病菌中转移。在所有多重耐药菌株中,仅在2022年宁夏猪粪分离出的菌属有 *Sphingobacteri-*

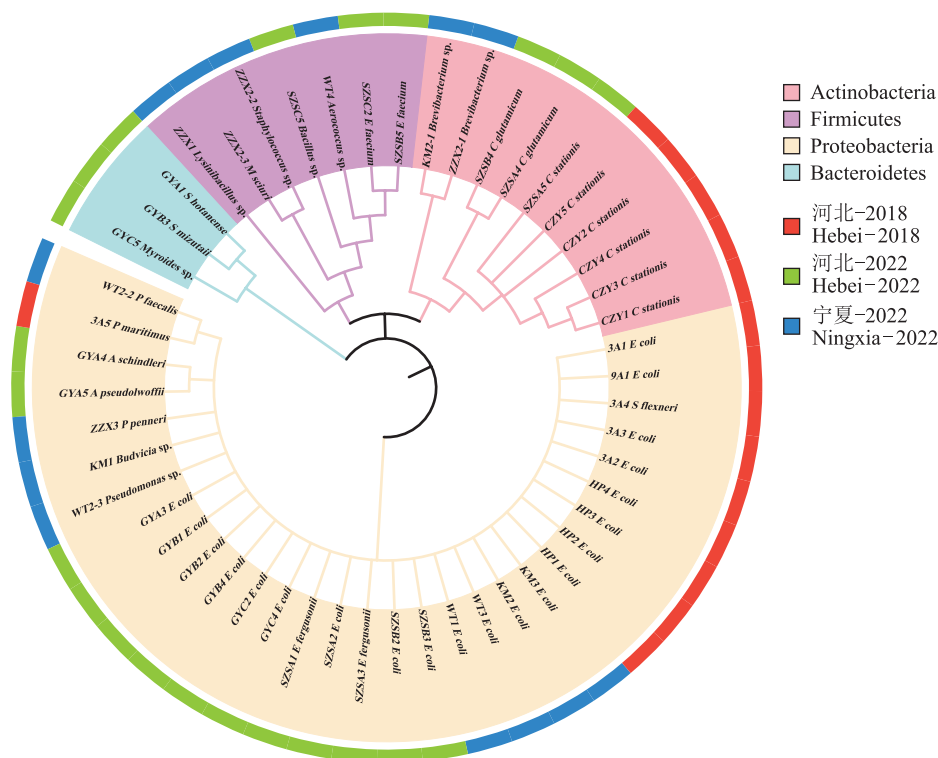


图6 猪粪中多重耐药菌系统发育树

Figure 6 Phylogenetic tree of multidrug-resistant bacteria in pig manure

um、Acinetobacter、Myroides、Bacillus、Enterococcus。Enterococcus是一种主要的医院感染病原菌,可以导致尿路感染和术后感染^[35];仅在2022年河北猪粪分离出的菌有Aerococcus、Lysinibacillus、Psychrobacter、Brevibacterium。其中Psychrobacter主要存在于家禽和鱼类中^[36],目前并未发现其致病性。现有研究已经阐明了一些多重耐药菌从环境转移和扩散到人体的机制^[37],如Enterococcus、Sphingobacterium对公共健康存在潜在威胁,因此需要进一步关注养殖粪便中多重耐药菌的环境污染及有效控制。综上所述,禁用前后的猪粪中主要的多重耐药菌株变化较小,肠杆菌仍然是主力,但不同用药水平下其他携带多重耐药基因的细菌类型有明显区别,这一点除了体现在AGPs禁用前后的河北地区猪场外,也体现在不同地域的养殖场上。

2.4 分离多重耐药菌株的耐药性特征

对15株2018年河北猪粪多重耐药菌、16株2022年河北猪粪多重耐药菌、20株2022年宁夏猪粪多重耐药菌进行药敏试验。表1为多重耐药菌的抗生素耐药率统计数据。

在2018年河北猪粪中分离出的15株多重耐药菌中,对18种抗生素的耐药率由弱至强依次为阿米卡星=庆大霉素<头孢哌酮=头孢西丁<万古霉素=利福

平<链霉素=克林霉素<左氧氟沙星<青霉素<诺氟沙星=氨苄西林<恩诺沙星=环丙沙星<磺胺甲噁唑<氯霉素<四环素=红霉素;在2022年河北猪粪中分离的16株多重耐药菌中,对18种抗生素的耐药率由弱至强依次为阿米卡星<头孢哌酮=头孢西丁<左氧氟沙星<庆大霉素=利福平=氨苄西林<恩诺沙星=万古霉素=环丙沙星=青霉素<诺氟沙星<链霉素<磺胺甲噁唑<氯霉素<四环素=红霉素=克林霉素。在2022年宁夏猪粪中分离的20株多重耐药菌中,对18种抗生素的耐药率由弱至强依次为头孢西丁<头孢哌酮<庆大霉素<阿米卡星<利福平<左氧氟沙星<青霉素=万古霉素<氨苄西林<氯霉素<磺胺甲噁唑<恩诺沙星=克林霉素=四环素=环丙沙星=诺氟沙星<链霉素=红霉素。AGPs禁用后庆大霉素、万古霉素、克林霉素等抗生素耐药率排名升高,氯霉素、左氧氟沙星、头孢西丁等抗生素耐药率排名下降。其中,2018年河北猪粪分离的菌株对四环素的耐药率为100.00%,这可能与生猪养殖过程长期添加四环素类抗生素有关^[38]。而禁用AGPs后,2022年宁夏及河北样品中分离菌株对四环素的耐药率有所下降,说明AGPs禁用能减少多重耐药菌对四环素类抗生素的耐药性。

对比三种不同分离源菌株耐药率可以发现,在

2018年河北猪粪分离菌株中有6种抗生素的耐药率在66.67%以上,而2022年河北和宁夏猪粪分离菌株中抗生素耐药率在66.67%以上的仅分别为4种和2种。2018年河北猪粪分离菌株中,对红霉素、四环素、氯霉素、恩诺沙星、环丙沙星、磺胺甲噁唑的耐药率均达到66.67%以上,而对阿米卡星、庆大霉素的耐药率低于10.00%。2022年河北猪粪分离菌株中耐药率除红霉素、四环素为75.00%外,克林霉素也为75.00%;对头孢哌酮、头孢西丁、阿米卡星耐药率均低于20.00%。2022年宁夏猪粪分离菌株中红霉素及链霉素耐药率最高均为70.00%;对头孢类抗生素耐药率较低,为10.00%~20.00%。

相较于禁用AGPs后的2022年河北、宁夏猪粪,2018年河北猪粪中分离出的多重耐药菌对氟喹诺酮类、四环素类、大环内酯类、氯霉素类以及磺胺类等生猪养殖过程中常用的抗生素有着较高的耐药率,而三种分离源的多重耐药菌株对头孢类及氨基糖苷类抗生素耐药率较低,尤其是头孢西丁和阿米卡星,猪粪中多重耐药菌对其耐药率均低于20.00%。有研究对新疆耆县猪粪中多重耐药大肠杆菌进行药敏试验发现^[39],其对恩诺沙星、诺氟沙星、庆大霉素以及氨苄西林四种抗生素耐药率在26.50%~66.30%,武汉养猪场分离源菌株对头孢西丁、头孢哌酮及阿米卡星耐药率

均在20.00%以下^[40],与本研究结果一致。

药敏试验结果表明,禁用AGPs后多重耐药菌对氨基糖苷类、头孢类及利福平类抗生素的耐药率均有所上升(表1)。同一养殖场在禁用AGPs后,氨基糖苷类抗生素耐药率上升了5.83%~30.83%,头孢类抗生素耐药率上升了5.42%,利福平类抗生素耐药率上升了17.50%。这与韩国猪场禁用AGPs后致病性大肠杆菌治疗类抗生素耐药率上升相类似^[41],禁用AGPs后其对链霉素(从45.80%到67.90%)、头孢噻吩(从34.00%到59.40%)和头孢唑啉(从10.40%到28.80%)的耐药率显著增加;Kyung等^[42]也发现,禁用AGPs后猪粪中致病性大肠杆菌对头孢噻吩(从51.40%到66.50%)、头孢吡肟(从0到2.40%)和黏菌素(从7.30%到11.00%)的耐药率也会有所增加。可能原因是禁用AGPs后,养殖场使用治疗用抗生素部分替代了促生长抗生素,导致其抗生素耐药率有所上升。

综上所述,禁用AGPs能够降低猪粪中多重耐药菌的部分抗生素的耐药率,如四环素类、氯霉素类、大环内酯类等饲用抗生素的耐药率,但也会升高药用抗生素如氨基糖苷类、头孢类、利福平类抗生素的耐药率。因此,在养殖AGPs禁用后需要关注是否出现药用抗生素替代性增长现象,以及相应耐药菌和耐药基

表1 猪粪中抗生素耐药检测结果(株)

Table 1 Statistical results of antibiotic resistance test in swine manure

		河北-2018年 ^[12]		河北-2022年		宁夏-2022年	
		耐药菌株数(株)	耐药率/%	耐药菌株数(株)	耐药率/%	耐药菌株数(株)	耐药率/%
氟喹诺酮类	恩诺沙星 ENR	10	66.67	7	43.75	13	65.00
	诺氟沙星 NOR	9	60.00	8	50.00	13	65.00
	环丙沙星 CIP	10	66.67	7	43.75	13	65.00
	左氧氟沙星 LEV	7	46.67	4	25.00	10	50.00
氨基糖苷类	链霉素 S	4	26.67	9	56.25	14	70.00
	阿米卡星 AK	1	6.67	2	12.50	6	30.00
	庆大霉素 CN	1	6.67	6	37.50	5	25.00
头孢类	头孢哌酮 CFP	2	13.33	3	18.75	4	20.00
	头孢西丁 FOX	2	13.33	3	18.75	2	10.00
β-内酰胺类	青霉素 P	8	53.33	7	43.75	11	55.00
	氨苄西林 AMP	9	60.00	6	37.50	12	60.00
四环素类	四环素 TC	15	100.00	12	75.00	13	65.00
糖肽类	万古霉素 VA	3	20.00	7	43.75	11	55.00
氯霉素类	氯霉素 CHL	12	80.00	11	68.75	12	60.00
林可霉素类	克林霉素 DA	4	26.67	12	75.00	13	65.00
大环内酯类	红霉素 ERY	15	100.00	12	75.00	14	70.00
磺胺类	磺胺甲噁唑 SMX	11	73.33	10	62.50	12	60.00
利福平类	利福平 RIP	3	20.00	6	37.50	9	45.00

因的风险水平的变化规律,开展养殖源高风险耐药菌及耐药基因预警,保证 AGPs 禁用后养殖业绿色发展。

3 结论

(1)禁用促生长类抗生素(AGPs)后养殖场猪粪中可培养多重耐药菌数量有所降低,多重耐药率显著下降,说明 AGPs 禁用对生猪养殖中多重耐药菌的污染减量具有积极作用。

(2)土霉素残留浓度会显著影响 AGPs 禁用前后的多重耐药菌群分布,AGPs 禁用能够显著减少猪粪中的多重耐药菌种类;此外,不同地域(宁夏与河北)间养殖场猪粪中多重耐药菌构成也有所差异。

(3)养殖场猪粪中多重耐药菌主要分布在变形菌门、放线菌门、厚壁菌门和拟杆菌门,*Escherichia* 在所有样本中均是优势多重耐药菌属,*Kurthia*、*Providencia*、*Leucobacter*、*Corynebacterium*、*Ignatzschineria*、*Lysinibacillus*、*Staphylococcus* 等多重耐药菌属相对丰度在禁用 AGPs 后有所减少。

(4)禁用 AGPs 能够降低猪粪中多重耐药菌的饲用抗生素的耐药率,如四环素类、氯霉素类、大环内酯类等,但也会升高治疗用抗生素如氨基糖苷类、头孢类、利福平类抗生素的耐药率,需要进一步关注相关耐药污染风险。

参考文献:

- [1] SUN W, QIAN X, GU J, et al. Mechanisms and effects of arsanilic acid on antibiotic resistance genes and microbial communities during pig manure digestion[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 234: 217–223.
- [2] LOOFT T, ALLEN H K, CANTAREL B L, et al. Bacteria, phages and pigs: The effects of in-feed antibiotics on the microbiome at different gut locations[J]. *The ISME Journal*, 2014, 8(8): 1566–1576.
- [3] YANG Q, REN S, NIU T, et al. Distribution of antibiotic-resistant bacteria in chicken manure and manure-fertilized vegetables[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2014, 21(2): 1231–1241.
- [4] XIE W Y, SHEN Q, ZHAO F. Antibiotics and antibiotic resistance from animal manures to soil: A review[J]. *European Journal of Soil Science*, 2018, 69(1): 181–195.
- [5] BOERLIN P, WISSING A, AARESTRUP F M, et al. Antimicrobial growth promoter ban and resistance to macrolides and vancomycin in enterococci from pigs[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39(11): 4193–4195.
- [6] BENGTSOON B, WIERUP M. Antimicrobial resistance in Scandinavia after a ban of antimicrobial growth promoters[J]. *Animal Biotechnology*, 2006, 17(2): 147–156.
- [7] CASEWELL M, FRIIS C, MARCO E, et al. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human

- and animal health[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2003, 52(2): 159–161.
- [8] HOU J, WAN W, MAO D, et al. Occurrence and distribution of sulfonamides, tetracyclines, quinolones, macrolides, and nitrofurans in livestock manure and amended soils of Northern China[J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2015, 22(6): 4545–4551.
- [9] 吴聪明, 陈杖榴. 猪场大肠杆菌 I 型整合子及其基因盒的分子流行病学研究[J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(9): 931–936. WU C M, CHEN Z L. Molecular epidemiology studies on Class I Integron and its gene cassette of *Escherichia coli* strains isolated from a swine farm[J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2005, 36(9): 931–936.
- [10] ZHU Y G, JOHNSON T A, SU J Q, et al. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farm[J]. *PNAS*, 2013, 110(9): 3435–3440.
- [11] HOA P T P, MANAGAKI S, NAKADA N, et al. Antibiotic contamination and occurrence of antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments of northern Vietnam[J]. *Science of the Total Environment*, 2011, 409(15): 2894–2901.
- [12] 唐伟欣. 好氧堆肥对畜禽养殖粪污中抗生素耐药整合子的影响规律研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2020. TANG W X. Study on the influence of aerobic composting on antibiotic-resistant integrations in livestock and poultry breeding manure[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2020.
- [13] RAIYANI N M, GEORRGE J J, HERMA T H, et al. Designing and evaluation of metagenomics 16S rRNA gene primers: Proceedings of the National Conference on Innovations in Biological Sciences (NCIBS)[C]. India: Saurashtra University, 2020: 10–14.
- [14] LIMBAGO B J C M N. M100–S11, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[J]. *Clinical Microbiology Newsletter*, 2001, 23(6): 49.
- [15] 唐伟欣, 孙兴滨, 高浩泽, 等. 规模化畜禽养殖场粪便中多重耐药菌分离鉴定及其耐药特征[J]. 农业环境科学学报, 2020, 39(1): 207–216. TANG W X, SUN X B, GAO H Z, et al. Isolation and identification of multidrug-resistant bacteria in feces from large-scale livestock and poultry farms and their antibiotic-resistance characteristics[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2020, 39(1): 207–216.
- [16] 吴丹, 韩梅琳, 邹德勋, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法检测鸡粪中 16 种残留抗生素[J]. 分析化学, 2017, 45(9): 1389–1396. WU D, HAN M L, ZOU D X, et al. Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of 16 kinds of residual antibiotics in chicken manure[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2017, 45(9): 1389–1396.
- [17] 彭玺, 冯凯, 厉舒祯, 等. 宏基因组学技术与微生物群落多样性分析方法[J]. 科技导报, 2022, 40(3): 99–111. PENG X, FENG K, LI S Z, et al. Metagenomics technology and microbial community diversity analysis methods[J]. *Science Technology Review*, 2022, 40(3): 99–111.
- [18] 郭瑞鹏. 兽用抗生素残留对环境细菌耐药性影响的研究进展[J]. 家畜生态学报, 2013, 34(2): 1–5. GUO R P. Research progress on the effects of veterinary antibiotic residues on bacterial resis-

- tance in the environment[J]. *Journal of Livestock Ecology*, 2013, 34(2):1-5.
- [19] 赵佳. 养殖业水土环境抗生素耐药菌分离鉴定及其潜在风险研究[D]. 济南: 山东建筑大学, 2021: 12-31. ZHAO J. Isolation and identification of antibiotic-resistant bacteria in soil and water environment of aquaculture and their potential risks[D]. Jinan: Shandong Jianzhu University, 2021: 12-31.
- [20] 吴翠蓉, 黄璐璐, 黄俊红, 等. 我国猪、鸡源沙门菌和大肠埃希菌的耐药研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2021, 46(6): 509-517. WU C R, HUANG L L, HUANG J H, et al. Research progress on drug resistance of *Salmonella* and *Escherichia coli* from pigs and chickens in my country[J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2021, 46(6): 509-517.
- [21] LANGFORD F, WEARY D, FISHER L J J O D S. Antibiotic resistance in gut bacteria from dairy calves: A dose response to the level of antibiotics fed in milk[J]. *Journal of Dairy Science*, 2003, 86(12): 3963-3966.
- [22] AGYARE C, BOAMAH V E, ZUMBI C N, et al. Antimicrobial resistance: Antibiotic use in poultry production and its effects on bacterial resistance[M]. London: Intechopen, 2018, 33-51.
- [23] 俞慎, 王敏. 环境介质中的抗生素及其微生物生态效应[J]. 生态学报, 2011, 31(15): 4437-4446. YU S, WANG M. Antibiotics and their microbial ecological effects in environmental media[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(15): 4437-4446.
- [24] 李会智. 抗生素对断奶仔猪的生长性能和粪便微生物的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2016: 23-36. LI H Z. Effects of antibiotics on growth performance and fecal microorganisms in weaned piglets[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2016: 23-36.
- [25] KRAEMER J G, RAMETTE A, AEBI S, et al. Influence of pig farming on the human nasal microbiota: Key role of airborne microbial communities[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2018, 84(6): e02470-02417.
- [26] PENG Z, HU Z, LI Z, et al. Antimicrobial resistance and population genomics of multidrug-resistant *Escherichia coli* in pig farms in mainland China[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 1116.
- [27] LE DEVENDEC L, MOURAND G, BOUGEARD S, et al. Impact of colistin sulfate treatment of broilers on the presence of resistant bacteria and resistance genes in stored or composted manure[J]. *Veterinary Microbiology*, 2016, 194: 98-106.
- [28] QIU T, HUO L, GUO Y, et al. Metagenomic assembly reveals hosts and mobility of common antibiotic resistome in animal manure and commercial compost[J]. *Environmental Microbiome*, 2022, 17(1): 42.
- [29] 韩娜娜, 刘万建, 耿伟光, 等. 锦鲤摩氏摩根氏菌的分离鉴定与药敏性研究[J]. 中国预防兽医学报, 2013, 35(9): 729-732. HAN N N, LIU W J, GENG W G, et al. Isolation, identification and drug susceptibility of *Morganella koi*[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2013, 35(9): 729-732.
- [30] DIFRANZA L T, ANNAVAJHALA M K, UHLEMANN A-C, et al. The brief case: A maggot mystery—*ignatzschineria* larvae sepsis secondary to an infested wound[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2021, 59(3): e02220-022790.
- [31] AMORIM A M, NASCIMENTO J D. Acinetobacter: An underrated foodborne pathogen? [J]. *Journal of Infection in Developing Countries*, 2017, 11(2): 111-114.
- [32] FORGETTA V, REMPEL H, MALOUIN F, et al. Pathogenic and multidrug-resistant *Escherichia fergusonii* from broiler chicken[J]. *Poultry Science*, 2012, 91(2): 512-525.
- [33] LIU X Q, LIU H X, WANG L, et al. Molecular characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing multidrug resistant *Escherichia coli* from swine in northwest China[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1756.
- [34] 杨雪静, 曹俊敏, 许志良, 等. 纹带棒状杆菌的分离鉴定及体外药敏试验分析[C]. 医药卫生科技: 浙江省检验医学学术年会, 浙江: 浙江省科学技术协会, 2006: 828-831. YANG X J, CAO J M, XU Z L, et al. Isolation and identification of *Corynebacterium striatum* and analysis of *in vitro* susceptibility test[C]. Medical and Health Science and Technology: Proceedings of Zhejiang Laboratory Medicine Annual Conference, Zhejiang: Zhejiang Science and Technology Association, 2006: 828-831.
- [35] YANG Q, TIAN T, NIU T, et al. Molecular characterization of antibiotic resistance in cultivable multidrug-resistant bacteria from livestock manure[J]. *Environmental Pollution*, 2017, 229: 188-198.
- [36] 曹俊敏, 杨雪静, 周宏伟, 等. 一株嗜冷杆菌属细菌的分离鉴定[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(12): 1183-1184. CAO J M, YANG X J, ZHOU H W, et al. Isolation and identification of a strain of *Bacillus cerophilus*[J]. *Chinese Journal of Laboratory Medicine*, 2012, 35(12): 1183-1184.
- [37] 张瑜. 医院周边水环境中美罗培南耐药菌的分布及其污染特征研究[D]. 济南: 山东建筑大学, 2018: 35-50. ZHANG Y. Distribution of meropenem resistant bacteria and its pollution characteristics in the surrounding water environment of hospital[D]. Jinan: Shandong Jianzhu University, 2018: 35-50.
- [38] 陈永山, 章海波, 骆永明, 等. 典型规模化养猪场废水中兽用抗生素污染特征与去除效率研究[J]. 环境科学学报, 2010, 30(11): 2205-2212. CHEN Y S, ZHANG H B, LUO Y M, et al. Characteristics of veterinary antibiotic pollution and removal efficiency in wastewater of typical large-scale pig farms[J]. *Journal of Environmental Science*, 2010, 30(11): 2205-2212.
- [39] 隆茂俊, 姚晓慧. 某猪场不同生长期猪源大肠杆菌耐药性分析[J]. 中国畜禽种业, 2018, 14(7): 29-30. LONG M J, YAO X H. Analysis of drug resistance of *E. coli* of pig sources in different growth periods of a pig farm[J]. *China Livestock and Poultry Breeding Industry*, 2018, 14(7): 29-30.
- [40] 邓均华, 熊忠良, 王红琳, 等. 规模化养殖场大肠杆菌的分离鉴定与耐药性监测[J]. 湖北农业科学, 2008, 47(6): 688-691. DENG J H, XIONG Z L, WANG H L, et al. Isolation, identification and drug resistance monitoring of *E. coli* in large-scale farms[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2008, 47(6): 688-691.
- [41] DO K H, BYUN J W, LEE W K. Virulence and antimicrobial resistance genes of pathogenic *Escherichia coli* from piglets showing diarrhea before and after ban on antibiotic growth promoters in feed[J]. *Korean Journal of Veterinary Research*, 2020, 60(3): 163-171.
- [42] KYUNG-HYO D, JAE-WON B, WAN-KYU L. Antimicrobial resistance profiles of *Escherichia coli* from diarrheic weaned piglets after the ban on antibiotic growth promoters in feed[J]. *Antibiotics*, 2020, 9(11): 755.

(责任编辑:叶飞)