

刘伟杰,贺小娜,韩珊珊,等. 禽畜粪便中抗生素耐药菌的分离与分子鉴定[J]. 江苏农业科学,2019,47(1):291-293.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.01.068

# 禽畜粪便中抗生素耐药菌的分离与分子鉴定

刘伟杰,贺小娜,韩珊珊,孙 地,董 振,付 娟

(江苏师范大学生命科学学院/江苏省药用植物生物技术重点实验室,江苏徐州 221116)

**摘要:**近年来,各种抗生素在禽畜养殖业中被大量滥用,导致抗生素耐药菌大量产生,严重危害生态环境和人体健康。通过对 4 个不同地区禽畜粪便中的抗生素耐药菌进行分离,共分离到 17 株不同的耐药菌,其中 12 株可以耐受 2 种及以上的抗生素。通过 16S rRNA 序列比对分析确定了耐药菌株的种属地位,对于了解喂食抗生素禽畜粪便中常见的耐药菌具有一定的理论指导意义,同时也为含有抗生素废水的治理积累了菌种资源。

**关键词:**禽畜粪便;抗生素;耐受性;分离;分子鉴定

**中图分类号:** S852.6      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1002-1302(2019)01-0291-03

我国是抗生素生产和使用大国,每年生产抗生素 20 万 t,其中有 40% 左右被用于禽畜养殖业,尤其在鸡、鸭、猪的养殖中使用更为严重<sup>[1-2]</sup>。常见的抗生素如四环素、氨基青霉素、庆大霉素、卡那霉素、红霉素等可以有效杀灭病原菌,在短时间内可以减少畜牧养殖业因病原菌引起的经济损失<sup>[3]</sup>。然而,随着我国规模化、集约式畜禽养殖业的快速发展,抗生素

的使用量急剧增加。养殖户为了追逐经济利益,滥用抗生素,使得大部分抗生素未被利用便随粪便和尿液排出体外,造成动物粪便中抗生素含量严重超标<sup>[4]</sup>,因此,在畜禽粪便中产生了大量的抗生素耐药微生物<sup>[2,5]</sup>,甚至是超级细菌。

在我国,越来越多的禽畜粪便被资源化利用,制成有机肥被施用于农田土壤中。粪便中含有的耐药微生物所携带的质粒、转座子等成为抗性基因转移和传播的主要因素,这些耐药微生物可以通过直接或者间接接触(如食物链)等途径进入人体,从而给人类公共健康带来威胁<sup>[6-7]</sup>。耐药微生物和耐药基因已经成为新型的污染源,引起人们的广泛关注,然而目前对禽畜养殖粪便中常见耐药菌的研究还较少。

本研究从江苏不同地区的养殖场采集了 4 个禽畜粪便样品,分别为无锡市宜兴养鸭场粪便、徐州市沛县养鸭场粪便、徐州市沛县养鸡场粪便、徐州市丰县养鸭场粪便。通过耐药

收稿日期:2017-08-28

基金项目:国家自然科学基金(编号:31300054);江苏省自然科学基金青年科学基金(编号:BK20130228);江苏省自然科学基金面上项目(编号:BK20171163);江苏省徐州市科技计划(编号:KC15N0014);江苏省高校优势学科建设工程(PAPD)。

作者简介:刘伟杰(1982—),男,黑龙江讷河人,博士,副教授,主要从事环境微生物学研究。E-mail:leonliu2013@126.com。

[23]李文娇,王 慧,赵建宁,等. 氮素和水分添加对贝加尔针茅草原植物功能群地上生物量的影响[J]. 中国草地学报,2015,37(2):7-13.

[24]Haugwitz M S,Michelsen A. Long-term addition of fertilizer,labile carbon,and fungicide alters the biomass of plant functional groups in a subarctic-alpine community[J]. Plant Ecology,2011,212(4):715-726.

[25]古 琛,杜宇凡,乌力吉,等. 载畜率对荒漠草原群落及植物功能群生物量的影响[J]. 生态环境学报,2015,24(12):1962-1968.

[26]王亚婷,王 玺,赵天启,等. 不同放牧强度上内蒙古短花针茅草原植物功能群水分和氮素利用效率相关分析[J]. 生态环境学报,2017,26(6):964-970.

[27]林 丽,李以康,张法伟,等. 高寒草地土壤有机碳含量同植物功能群数量特征关联度或然性初探[J]. 草地学报,2015,23(1):55-61.

[28]Barbour M,Burk G,Pitts J H. Terrestrial plant ecology[M]. London:The Benjamin Publishing Company,1980.

[29]任继周. 草业科学研究方法[M]. 北京:中国农业出版社,1998:95.

[30]赵新全. 三江源区退化草地生态系统恢复与可持续管理[M]. 北京:科学出版社,2011:127-128.

[31]鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京:中国农业出版社,1999:28-

106.

[32]王长庭,龙瑞军,丁路明. 高寒草甸不同草地类型功能群多样性及组成对植物群落生产力的影响[J]. 生物多样性,2004,12(4):403-409.

[33]赵建中,彭 敏,刘 伟,等. 矮嵩草草甸不同功能群主要植物种生长特征与地表温度的相关性分析[J]. 西北植物学报,2012,32(3):559-565.

[34]Colwell R K,Futuyma D J. On the measurement of niche breadth and overlap[J]. Ecology,1971,52(4):567-576.

[35]Pianka E R. The structure of Lizard communities[J]. Annual Review of Ecology and Systematics,1973(4):53-74.

[36]牛钰杰,杨思维,王贵珍,等. 放牧干扰下高寒草甸植物功能群组成的时空变化——以甘肃省天祝县为例[J]. 草原与草坪,2017,37(3):29-35.

[37]张小红,宋彦涛,乌云娜,等. 放牧强度对克氏针茅草原植物功能群的影响[J]. 草业科学,2017,34(10):2033-2041.

[38]包秀霞,易 津,廉 勇,等. 放牧方式对中蒙典型草原植物功能群特征的影响[J]. 植物研究,2013,33(2):159-165.

[39]Zhang R,Shi X M,Li W J,et al. Responses of plant functional groups to natural nitrogen fertility on an alpine grassland in the Qinghai-Tibet plateau[J]. Russian Journal of Ecology,2016,47(6):532-539.

菌的分离纯化共筛选到 17 株不同的耐药菌株,并对所获得的菌株进行了多重抗生素耐药菌分析。在此基础上,利用 16S rRNA 分子生物学技术分析了所获得的耐药菌株的种属地位。本研究对于了解禽畜粪便中常见的耐药微生物、指导抗生素在畜牧养殖业中的合理使用具有很好的理论意义,同时也为抗生素废水和抗生素污染土壤的修复提供了菌种资源。

1 材料与方法

1.1 禽畜粪便的来源与采集

禽畜粪便样品分别采集于江苏省无锡市宜兴养鸭场、徐州市沛县养鸭场、徐州市沛县养鸡场、徐州市丰县养鸭场。采集粪便样品后,迅速带回实验室于 4 ℃ 保藏,并及时进行菌种分离。

1.2 分离培养基

LB 培养基:10 g/L 胰蛋白胨,5 g/L 酵母粉,10 g/L 氯化钠,20 g/L 琼脂,于 115 ℃ 灭菌 30 min。灭菌后待温度降至 55 ℃ 左右,加入相应的抗生素后倒平板。抗生素的使用浓度为其常用的抑菌浓度:50 mg/L 卡那霉素,20 mg/L 四环素,50 mg/L 氨苄青霉素,50 mg/L 红霉素,50 mg/L 庆大霉素。

1.3 抗生素耐药菌的分离

分别取 4 个禽畜粪便样品各 1 g,加入 9 mL 0.9% NaCl 溶液中,利用涡旋振荡器充分混匀。静置 5 min 后,取 0.1 mL 上层液体均匀涂布于含有不同抗生素的固体培养基平板上(以没有抗性的 *Escherichia coli* DH5α 作为阴性对照,涂布于抗性平板上以验证抗性平板的有效性),于 37 ℃ 恒温培养箱中倒置培养 24 h 后,从形态学上排除从同一样品中分离获得的相同菌株,然后从平板上挑取单菌落在同种抗生素培养基平板上进行四区划线纯化,将纯化后的单菌落接种于含有相应抗生素的液体培养基中进行摇瓶培养,于 37 ℃、180 r/min 培养 24 h 验证其耐药性。将获得的纯种耐药菌株发酵液与 30% 甘油等体积比混合后,保藏于 -80 ℃ 冰箱中待用。

1.4 菌株的多重抗生素耐受性分析

将分离得到的 17 株抗生素耐受菌株进行多重抗生素耐受性分析。将纯化好的菌株进行活化培养,然后涂布在不同的抗生素平板上(分别含 50 mg/L 卡那霉素、20 mg/L 四环

素、50 mg/L 氨苄青霉素、50 mg/L 红霉素、50 mg/L 庆大霉素),检测其耐受性,若生长,即为耐受,若不生长,即为不耐受,统计菌株对抗生素的多重耐药性。

1.5 抗生素耐药菌的分子鉴定

将分离获得的 17 株耐药菌株接种于含有相应抗生素的 LB 液体培养基中,摇瓶过夜培养。于 10 000 r/min、4 ℃ 离心收集菌体,利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]提取菌株的基因组 DNA。以提取获得的基因组 DNA 作为模板,分别扩增菌株的 16S rRNA 序列。用于 PCR 扩增的上下游引物分别为 5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'和 5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3'。PCR 反应体系的总体积为 50 μL,在 0.2 mL Eppendorf 管中依次加入 5 μL 10 × buffer、1 μL dNTP、1 μL 正向引物、1 μL 反向引物、1 μL 模板 DNA、0.5 μL DNA 聚合酶,加 ddH<sub>2</sub>O 补足总体积至 50 μL。PCR 反应条件如下:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 90 s,30 个循环;72 ℃ 10 min。将扩增获得的 16S rRNA 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,利用 PCR 产物纯化试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]纯化后,交北京博迈德基因技术有限公司测序。将测得的 16S rRNA 序列提交至 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对分析,确定耐药菌株的种属地位。

2 结果与分析

2.1 抗生素耐受菌株的分离

本研究利用含有常用抑菌浓度的卡那霉素、四环素、氨苄青霉素、红霉素、庆大霉素的平板分离禽畜粪便中的耐药菌株。如表 1 所示,从 4 份禽畜粪便样品中共分离获得 17 株不同种属的抗生素耐药菌株,其中从无锡市宜兴养鸭场分离到 5 株,从徐州市沛县养鸭场分离到 4 株,从徐州市沛县养鸡场分离到 4 株,从徐州市丰县养鸭场分离到 4 株。4 个样品中的耐药菌都以耐受四环素为主,这一趋势符合当前四环素被大量用于畜禽养殖业的现状。四环素是在禽畜养殖业中实际使用量最大的抗生素<sup>[8-9]</sup>,在抗生素的选择性压力下,导致禽畜养殖粪便中四环素耐药菌最多。

表 1 不同禽畜粪便样品中耐药菌的分离结果(n=4)

抗生素	宜兴鸭粪(n=5)		沛县鸭粪(n=4)		沛县鸡粪(n=4)		丰县鸭粪(n=4)	
	耐药菌数(株)	耐受率(%)	耐药菌数(株)	耐受率(%)	耐药菌数(株)	耐受率(%)	耐药菌数(株)	耐受率(%)
四环素	4	80	4	100	2	50	4	100
卡那霉素	3	60	1	25	1	25	1	25
氨苄青霉素	4	80	3	75	1	25	2	50
红霉素	2	40	3	75	3	75	2	50
庆大霉素	2	40	0	0	1	25	0	0

2.2 抗生素耐受菌株的分子生物学鉴定

对分离获得的 17 株抗生素耐药菌的 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增和序列分析,将得到的序列结果通过与 NCBI(美国国立生物技术信息中心)数据库中目前已报道的 16S rRNA 序列进行比对,确定耐药菌种的种属地位。如表 2 所示,从无锡宜兴养鸭场粪便中分离到的 5 株抗生素耐药菌分别为气味类香菌(*Myroides odoratus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*)、吉氏库特菌(*Kurthia gibsonii*)、坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus*);从徐州沛县养鸭场粪便中分

离到的 4 株耐药菌分别为汉氏盐单胞菌(*Halomonas hamiltonii*)、肠球菌(*Enterococcus eurenkensis*)、贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)、嗜气芽孢杆菌(*Bacillus aerophilus*);从徐州沛县养鸡场粪便中分离到的 4 株耐药菌分别为副凝胶短状杆菌(*Brachybacterium paraconglomeratum*)、尿道气球菌(*Aerococcus urinaeequi*)、孔氏葡萄球菌(*Staphylococcus cohnii*)、弯曲芽孢杆菌(*Bacillus flexus*);从徐州丰县养鸭场中分离到的 4 株耐药菌分别为酯香微杆菌(*Microbacterium esteraromaticum*)、微杆菌(*Microbacterium suwonense*)、玫瑰红

红球菌 (*Rhodococcus rhodochrous*)、蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)。

2.3 多重抗生素耐受菌株分析

如表 2 所示,从 4 个禽畜粪便样品中分离到的 17 株耐药菌中有 4 株可以耐受 2 种抗生素,3 株可以耐受 3 种抗生素,4 株可以耐受 4 种抗生素[分别为气味类香菌 (*Myroides*

*odoratus*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*)和孔氏葡萄球菌 (*Staphylococcus cohnii*)] , 1 株可以耐受 5 种抗生素,为粪产碱杆菌 (*Alcaligenes faecalis*)。多重抗生素耐药菌的出现会导致抗生素失效,威胁禽畜养殖的安全,同时对环境与健康构成严重威胁,因此应采取积极措施引导和监督养殖户减少或避免使用抗生素。

表 2 不同禽畜粪便样品中耐药菌的分离及抗生素耐受结果

取材地点	不同样品中的耐药菌及抗生素耐受结果
宜兴鸭场 (n = 6)	BWL1103 <sup>abce</sup> , <i>Myroides odoratus</i> ( 气味类香菌 ); BWL1105 <sup>abcd</sup> , <i>Escherichia coli</i> ( 大肠杆菌 ); BWL1106 <sup>abcde</sup> , <i>Alcaligenes faecalis</i> ( 粪产碱杆菌 ); BWL1109 <sup>a</sup> , <i>Kurthia gibsonii</i> ( 吉氏库特菌 ); BWL1108 <sup>c</sup> , <i>Bacillus firmus</i> ( 坚强芽孢杆菌 )
沛县鸭场 (n = 5)	BWL1057 <sup>a</sup> , <i>Halomonas hamiltonii</i> ( 汉氏盐单胞菌 ); BWL1054 <sup>acd</sup> , <i>Enterococcus eurekaensis</i> ( 肠球菌 ); BWL1058 <sup>abcd</sup> , <i>Bacillus velezensis</i> ( 贝莱斯芽孢杆菌 ); BWL1059 <sup>acd</sup> , <i>Bacillus aerophilus</i> ( 嗜气芽孢杆菌 )
沛县鸡场 (n = 4)	BWL1110 <sup>ad</sup> , <i>Brachy bacterium paraconglomeratum</i> ( 副凝胶短状杆菌 ); BWL1111 <sup>d</sup> , <i>Aerococcus urinaequi</i> ( 尿道气球菌 ); BWL1112 <sup>abde</sup> , <i>Staphylococcus cohnii</i> ( 孔氏葡萄球菌 ); BWL1115 <sup>c</sup> , <i>Bacillus flexus</i> ( 弯曲芽孢杆菌 )
丰县鸭场 (n = 5)	BWL1120 <sup>ad</sup> , <i>Microbacterium esteraromaticum</i> ( 酯香微杆菌 ); BWL1121 <sup>ad</sup> , <i>Microbacterium suwonense</i> ( 微杆菌 ); BWL1122 <sup>abc</sup> , <i>Rhodococcus rhodochrous</i> ( 玫瑰红红球菌 ); BWL1125 <sup>ac</sup> , <i>Bacillus cereus</i> ( 蜡样芽孢杆菌 )

注: a、b、c、d、e 表示菌株对 5 种抗生素的耐受性,其中 a 表示耐受四环素, b 表示耐受卡那霉素, c 表示耐受氨基青霉素, d 表示耐受红霉素, e 表示耐受庆大霉素。

3 讨论

近年来,多种抗生素被添加到禽畜饲料中,用于防范养殖过程中病害的发生。抗生素的大规模滥用导致抗生素耐药菌问题恶化,而且出现了多重耐药菌,甚至是超级细菌。耐药菌的产生严重威胁着环境安全和人类健康<sup>[10]</sup>。耐药菌导致抗生素效果减弱,如药物使用剂量增大、抑菌过程延长、疾病复发率升高等,甚至会使抗生素失效,导致禽畜或病人的死亡率升高。目前,人们已经发现了多株多重耐药病菌,如粪肠球菌、肺炎分支杆菌和绿脓假单胞菌,因此可见耐药菌的问题引起了人们的广泛关注<sup>[11-12]</sup>。然而,目前对抗生素滥用导致禽畜粪便中耐药菌形成情况的研究还较少。

本研究从 4 种禽畜粪便样品中共分离获得 17 株不同的耐药菌,并分析了这些菌株对多重抗生素的耐受性。结果表明,在 17 株耐药菌中有 3 株可以耐受 3 种抗生素;4 株可以耐受 4 种抗生素,分别为气味类香菌、大肠杆菌、贝莱斯芽孢杆菌和孔氏葡萄球菌;1 株可以耐受 5 种抗生素,为粪产碱杆菌。本研究新发现了多株多重耐药菌,其中包括致病菌株,如气味类香菌、大肠杆菌、葡萄球菌和粪产碱杆菌等,粪产碱杆菌可寄生在动物的肠腔中,可机会性致病,引起肠炎等。本研究对于指导禽畜养殖中合理使用抗生素具有一定的理论指导意义。

抗生素在畜牧养殖业中的长期滥用导致养殖动物粪便中耐药菌株数增加,这些携带抗生素抗性基因的菌株是环境中抗生素抗性基因最重要的来源之一<sup>[5]</sup>。目前从世界上很多国家、地区的肉、牛奶等样品中检测到的肠球菌均携带抗生素抗性基因。虽然一些耐药性菌株不具有致病性,却能够将耐药基因水平转移给致病菌,因此严格控制禽畜养殖等领域的抗生素使用量迫在眉睫。

4 结论

本研究从 4 个地区的禽畜粪便样品中共分离出 17 株不同的耐药菌,其中有 4 株可以耐受 2 种抗生素,3 株可以耐受

3 种抗生素,4 株可以耐受 4 种抗生素,1 株可以耐受 5 种抗生素。本研究对于了解禽畜养殖业中常见的耐药菌具有一定的理论指导意义,同时也为含有抗生素废水的处理积累了菌种资源。

参考文献:

[1] 佟盼盼. 鸡粪便菌耐药基因及其产 ESBLs 大肠杆菌耐药性的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2015.

[2] 佟 娟, 魏源送. 污水处理厂削减耐药菌与抗性基因的研究进展[J]. 环境科学学报, 2012, 32(11): 2650 - 2659.

[3] 王珊珊. 厦门某屠宰场猪肉中四环素耐药菌的分离鉴定及耐药基因的分布研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2014.

[4] 杨晓洪, 王 娜, 叶波平. 畜禽养殖中的抗生素残留以及耐药菌和抗性基因研究进展[J]. 药物生物技术, 2014(6): 583 - 588.

[5] 徐冰洁, 罗 义, 周启星, 等. 抗生素抗性基因在环境中的来源、传播扩散及生态风险[J]. 环境化学, 2010, 29(2): 169 - 178.

[6] 吴 楠, 乔 敏. 土壤环境中四环素类抗生素残留及抗性基因污染的研究进展[J]. 生态毒理学报, 2010, 5(5): 618 - 627.

[7] 张兰河, 王佳佳, 高 敏, 等. 施用畜禽粪便有机肥土壤抗生素抗性基因污染状况[J]. 生态与农村环境学报, 2016, 32(4): 664 - 669.

[8] 王 瑞, 魏源送. 畜禽粪便中残留四环素类抗生素和重金属的污染特征及其控制[J]. 农业环境科学学报, 2013, 9(9): 1705 - 1719.

[9] 张 俊, 杨晓洪, 葛 峰, 等. 长期施用四环素残留猪粪对土壤中耐药菌及抗性基因形成的影响[J]. 环境科学, 2014, 35(6): 2374 - 2380.

[10] Rysz M, Alvarez P J. Amplification and attenuation of tetracycline resistance in soil bacteria: aquifer column experiments[J]. Water Research, 2004, 38(17): 3705 - 3712.

[11] 司振书, 张海涛, 邵 丹, 等. 肉杂鸡肺炎克雷伯菌耐药菌株的分离鉴定[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(8): 152 - 153.

[12] 杨 华, 许冰白. 畜禽产品中药物残留监控的进展及重要意义[J]. 兽药与饲料添加剂, 2001, 6(4): 39 - 41.