

河南省某小型猪场废水中细菌耐药性调查

秦会玲,常导,刘阳坤,章伟成,付玲,李娜,姚伦广

(南阳师范学院 南水北调中线水源区水安全河南省协同创新中心;
河南省南水北调中线水源区生态安全重点实验室,河南 南阳 473061)

摘要:由于我国畜牧养殖业中抗生素长期使用,导致了养殖废水中的抗生素耐药菌(antibiotic resistant bacteria, ARB)的大量出现以及抗生素抗性基因(antibiotic resistant gene, ARG)的污染,给周边水源以及生态环境带来了巨大的风险.为调查河南区域小型养猪场废水中细菌的耐药性和抗生素抗性基因存在情况,对某小型猪场 8 个取样点的污水及底泥样品进行检测.利用抗生素药敏试验调查了废水中细菌的耐药性及 PCR 扩增技术检测抗生素抗性基因的存在情况.结果表明:(1)母猪舍、仔猪舍、育肥舍、妊娠舍和产房 5 个采样点的废水中细菌的耐药率较高,在经过处理后污水池和沉淀池废水中细菌耐药率显著下降,但与自然环境相比依然较高;(2)四环素类、磺胺类及氨基糖苷类抗生素抗性基因在猪场和生活区细菌中均有较高的检出率,可能在环境中发生迁移,进入附近生活水源区.该研究的调查数据为规范小型养猪场中抗生素的合理使用和进一步展开小规模养猪场中抗生素抗性细菌和抗性基因的污染研究提供了参考.

关键词:养猪废水;抗生素;耐药性;抗生素抗性基因;抗生素耐药细菌

中图分类号:S181

文献标志码:A

我国是世界生猪生产第一大国,年末生猪存栏量由 1990 年的 42.7% 上升至 2014 年的 47.2%,近几年也维持在 48% 左右,占世界生猪存栏量的一半左右^[1].而河南省是我国三大生猪主产省之一,生猪产业发展在农业生产中甚至国民经济中均占据重要地位^[2].

自 20 世纪 50 年代,美国食品与药物管理局(FDA)首次批准抗生素可以用作饲料添加剂以来,抗生素的使用总量在不断增多^[3].据统计,2013 年中国的抗生素使用量估计约为 162 000 t,其中动物消耗约占 52%^[4].由于我国养殖行业抗生素的大量使用,造成动物肠道内的细菌产生耐药性,这些抗生素耐药菌(antibiotic resistant bacteria, ARB)经动物粪便被排放到外界环境中死亡后,其本身携带的抗生素抗性基因(antibiotic resistant gene, ARG)会被释放到土壤及水环境中,并进入其他生物体内,经过结合、转导等方式成为宿主微生物的一部分继续编码抗生素抗性,引起环境中细菌耐药性的产生以及扩散^[5-7].因此,从环境和公共卫生的角度来看,残留的抗生素会诱发产生 ARB 并传播各类 ARG,进而对人类健康产生威胁.而目前已有研究表明,病原菌耐药性的获得与 ARB 和 ARG 紧密相关,抗生素与 ARB 和 ARG 之间存在一定的关系,甚至能够影响 ARG 的传播^[8-11].BROOKS 等人^[12]的研究表明,猪场的管理模式在很大程度上也会影响废水中的微生物耐药种群,而微生物群落和环境因素的改变将会影响 ARG 的出现.再者养猪废水中残留的抗生素诱导抗生素抗性微生物富集,通过抗性基因水平转移使微生物获得多重抗生素抗性进而产生“超级细菌”^[13-15].据报道^[10],美国每年有超过 200 万人因 ARB 的感染而导致死亡.研究表明抗生素抗性细菌的污染

收稿日期:2019-12-08;**修回日期:**2020-12-01.

基金项目:国家自然科学基金(U1804109);河南省高等学校重点科研项目(18A230011);河南省科技厅科技攻关项目(182102310077);河南省科研服务平台专项(2016151);南阳师范学院校级科研项目(2018ZX011);河南省南水北调中线水源区水生态安全创新型科技团队专项(17454).

作者简介:秦会玲(1993-),女,河南南阳人,南阳师范学院硕士研究生,研究方向为生物工程,E-mail:15238156776@139.com.

通信作者:李娜(1983-),女,河南南阳人,南阳师范学院讲师,博士,主要从事畜禽养殖范围内土壤与地下水微生物多样性研究,E-mail:lina330077@163.com.

能够导致抗生素抗性基因的传播和环境菌群结构失调,对人类健康和生态环境造成潜在风险^[16]。

猪场污水池是一个汇集了不同来源的抗生素、ARB 和 ARG 的场所,会造成细菌的相互作用和基因的水平交换^[17-18]。ARG 一旦产生便长期存在,虽然在污水处理过程中会发生减弱,但难以消除^[19-20]。猪场排污会经过一定的处理,来降低抗生素残留和 ARBs 的存在,才能将废水排入自然环境,但是各种污水处理方法对 ARG 作用较小或根本不起作用,ARG 的长期存在也将造成一种新型污染—基因污染^[21-23]。因此有必要对猪场废水中细菌耐药情况和 ARG 的分布进行探究。本研究主要通过抗生素药敏试验和 PCR 扩增技术检测了河南唐河区域一规模化养猪场中 8 个不同位点环境中细菌的耐药性和抗性基因存在情况,来判断猪场废水中和附近生活区水环境中细菌的耐药情况和 ARG 的污染水平,以监测规模化养猪场中抗生素的合理使用和排放。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验材料:琼脂粉、琼脂糖、蒸馏水、无菌 PBS(磷酸盐缓冲液),rTaq mix(购自大连宝生物工程有限公司)、32 种抗生素(购自杭州微生物试剂有限公司)、引物(购自苏州泓迅生物科技股份有限公司)、试剂盒 E. Z.N.A.TM Water DNA Kit(购自上海斯信生物科技有限公司)。

1.2 样品采集与处理

样品采集严格按照《采样方案设计技术规范》(GB12997-91)与环境监测技术规范中关于监测断面、监测点的布设原则来布点采集。

(1)采样点基本情况:本研究中的废水样品是从位于河南省南阳市某县郊外的小型猪场采集,该猪场占地面积共达 20 万 m²,在养猪数量近 2 000 头,设有母猪舍、仔猪舍、育肥舍、妊娠舍、产房共 20 间,周边皆为农田,附近有河流,方圆 1 km 环绕村庄。

(2)样品采集:分别从母猪舍、仔猪舍、育肥舍、妊娠舍、产房、污水池、沉淀池共 7 个位点采集 1 L 水样及 200 g 底泥,再从附近居民生活区采集水样及底泥作为对照,在 24 h 内对采集的 16 个样品进行处理。

(3)处理方法:将在各采样点收集的废水样品与底泥搅拌混合,放置于 4 ℃ 环境中沉降过夜,定性滤纸过滤上清部分,沉淀部分加入 20~50 mL 无菌的 PBS 缓冲液洗涤沉降,再在超净台中过滤上清,重复该操作 2~3 次。然后在超净台中分别使用规格为 0.45 μm、0.22 μm 的一次性针型过滤器将水样进行过滤集菌处理,后将过滤器中滤膜取出,置于装有 40 mL 无菌 PBS 缓冲液的离心管中,置于 4 ℃ 暂存。

1.3 药敏试验

本次选用常用兽药抗生素中的 32 种药物进行检测各样品中细菌耐药性,抗生素分类如下表 1 所示。

表 1 抗生素的分类及种类

Tab. 1 The classification and kinds of antibiotic

分类	抗生素
四环素类	四环素、多西环素
磺胺类	磺胺异噁唑、复方新诺明
氯霉素类	氟苯尼考、氯霉素
喹诺酮类	环丙沙星、氧氟沙星、诺氟沙星
大环内酯类	红霉素、乙酰螺旋霉素、克林霉素、万古霉素
β内酰胺类	头孢拉定、青霉素、头孢吡肟、头孢噻肟、头孢唑啉、美洛西林、阿洛西林、氨苄西林
氨基糖苷类	链霉素、庆大霉素、卡那霉素、新霉素、妥布霉素
硝基咪唑类	呋喃唑酮、呋喃妥因
其他复合类	利福平、萘定酸、奥格门汀、甲氧苄啶

吸取 100 μL 水样于 5 mL LB(Luria-Bertani)液体培养基中,置于 37 ℃ 摇床中 200 r · min⁻¹ 过夜。取 200 μL 新鲜菌液涂布于 LB 固体培养基上,涂布至半干状态,用镊子夹取抗生素药敏片,轻按在培养基表面,最后置于 37 ℃ 恒温培养箱中培养过夜。14~16 h 后观察药敏片周围是否出现抑菌圈,测量抑菌圈的直径,并

做好记录.

1.4 细菌总 DNA 的提取

依照 E.Z.N.A.T M Water DNA Kit 试剂盒中的说明书,提取水样中细菌总基因组 DNA.用微量核酸蛋白质分析仪检测提取的 DNA 浓度(A260/A280 值在 1.8~2.2 之间).

1.5 PCR 分析

本研究选取了 6 类抗生素中的 23 种抗生素抗性基因,分别是四环素类:*tetA*,*tetB*,*tetC*,*tetE*,*tetW*;磺胺类:*sul1*,*sul2*,*sul3*,*sulA*;大环内酯类:*ermB*,*ermC*,*ermF*;氟喹诺酮类:*qnrD*,*qnrB*,*qnrS*,*qepA*;氨基糖苷类:*aph(3')* I *a*,*aph(3')* II *a*,*aac(6')* I *b*;β-内酰胺类:*blaTem*,*blaSHV*,*blaCTX*,*ampC*.抗性基因引物序列见下表 2.

表 2 抗生素抗性基因的引物序列

Tab. 2 Primers sequence of antibiotic resistance genes

目的基因	引物序列		文献出处
<i>tetA</i>	F:GCTACATCCTGCTTGCCTTC	R: CATAGATCGCCGTGAAGAGG	[6]
<i>tetB</i>	F:TACGTGAATTTATTGCTTCGG	R: ATACAGCATCCAAAGCGCAC	[6]
<i>tetC</i>	F:TGCCTTGATGCAATTTCTATGC	R: GGAATGGTGCATGCAAGGAG	[22]
<i>tetE</i>	F:GGCGCTGTATGCAATGATGC	R: ATACGAAGCGCTCTTCTCG	[23]
<i>tetW</i>	F:GAGAGCTGCTATATGCCAGC	R: GGGCGTATCCACAATGTTAAC	[22]
<i>sul1</i>	F:CCGTTGGCCTTCTGTAAAG	R: TTGCCGATCGCGTGAAGT	[3]
<i>sul2</i>	F:CTCCGATGGAGGCCGGTAT	R: GGAATGCCATCTGCCTTGA	[3]
<i>sul3</i>	F:TCCGTTACGCAATTGGTGCAG	R: TTCGTTACGCCTTACACCAGC	[24]
<i>sulA</i>	F:TCTTGAGCAAGCACTCCAGCAG	R: TCCAGCCTTAGCAACCACATGG	[3]
<i>ermB</i>	F:CCGTGCGTCTGACATCTATCT	R: GTGGTATGGCGGGTAAGTTTT	[6]
<i>ermC</i>	F:GAAATCGGCTCAGGAAAAGG	R: TAGCAAACCCGTATTCCACG	[6]
<i>ermF</i>	F:TCGTTTTACGGGTCAGCACTT	R: CAACCAAAGCTGTGTCGTTT	[6]
<i>qnrD</i>	F:GGAGCTGATTTTCGAGGG	R: AGAAAAATTAGCGTAACTAAGATTTGTC	[16]
<i>qnrB</i>	F:GGMATHGAAATTCGCCACTG	R: TTYGCBGYCYGCCAGTCG	[16]
<i>qnrS</i>	F:GTGAGTAATCGTATGTACTT	R: AAACACCTCGACTTAAGTCT	[16]
<i>qepA</i>	F:GCCGGTGATGCTGCTGA	R: CAGRAACAGCGSCCS	[16]
<i>aph(3')-I a</i>	F:ATGTGCCATATTCACGGGAAACG	R:TCAGAAAAACTCATCGAGCATCAA	[25]
<i>aph(3')-II a</i>	F:GGCTAAAATGAGAATATCACCGG	R: CTTTAAAAAATCATAACAGCTCGCG	[26]
<i>aac(6')-I b</i>	F:ATGACTGAGCATGACCTTGC	R: TTAGGCATCACTGCGTGTTT	[27]
<i>ampC</i>	F:GGGAATGCTGGATGCACAA	R: CATGACCCAGTTCGCCATATC	[28]
<i>blaTem</i>	F:TCGGGAAATGTGCG	R: GGAATAAGGGCGACA	[6]
<i>blaSHV</i>	F:TGATTTATCTGCGGGATACG	R: TTAGCGTTGCCAGTGCTCG	[6]
<i>blaCTX</i>	F:ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC	R: ATCACKCGGRTCGCCNGGRAT	[6]

应用 PCR 扩增技术^[29],PCR 反应体系体积为 20 μL,包括 10 μL rTaq mix DNA 聚合酶(TaKaRa),上下游引物各 0.4 μL,DNA 样品 1 μL,无菌水 8.2 μL.PCR 反应条件:95 °C 下预变性 5 min,95 °C 变性 30 s,55 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 1 min,34 个循环,72 °C 下延伸 10 min.取 10 μL PCR 产物与 2 μL 6×Loading buffer(TaKaRa)混匀,用经 EB 染色的琼脂糖凝胶进行电泳检测.根据待检测目标片段的大小,选择琼脂糖质量分数为 1%的核酸胶,1 000 DNA Marker,电压为 150 V,30 min.电泳结束后在核酸蛋白凝胶成像仪中成像,注释并保存检测结果.

1.6 数据处理

本实验数据是利用 Microsoft Excel 2010 进行统计,利用 Graphpad prism.v5.0 进行作图及统计分析.耐药率=耐药数/总检测量;抗性基因检出率=抗性基因检出样本数/抗性基因总检测样本.

2 结 果

2.1 药敏试验结果

研究选用常用兽药抗生素中的 32 种药物进行检测各样品中细菌耐药性.抗生素分类见表 1,接种药敏片 14 h 之后的结果统计如表 3 所示.表 4 数据为 8 个取样点样品中细菌的药敏检测实验重复 3 次的结果.通过统计耐药情况来判断细菌耐药性的强弱.

综合表 3 和图 1 结果可以看出:母猪舍、仔猪舍、育肥舍、妊娠舍和产房 5 个猪舍废水中细菌耐药性较高,污水池和沉淀池细菌的耐药性低,而生活区水样中细菌的耐药性最低,与其他采样点均存在显著差异.因此,场内猪舍、废水处理区、生活水源区 3 个位置的样品中细菌的耐药性存在逐次递减关系.

2.2 抗生素抗性基因检测结果

为了调查养殖场内抗生素抗性基因的存在情况,初步选择了 6 类抗生素的 23 种抗性基因进行研究,利用 PCR 扩增技术和琼脂糖凝胶电泳法进行了检测,结果统计如下表 4 所示.

表 4 ARGs 在各采样点的检测情况

Tab. 4 Detection of ARGs at each location

抗性基因	母猪舍	仔猪舍	育肥舍	妊娠舍	产房	污水池	沉淀池	生活区	检出率/%
<i>tetA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	100.0
<i>tetB</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	100.0
<i>tetC</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	100.0
<i>tetE</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	100.0
<i>tetW</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0
<i>sul1</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	100.0
<i>sul2</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	100.0
<i>sul3</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	100.0
<i>sulA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0
<i>ermB</i>	-	-	+	+	+	-	-	-	37.5
<i>ermC</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0
<i>ermF</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	62.5
<i>qnrD</i>	-	+	-	+	-	+	+	-	50.0
<i>qnrB</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0
<i>qnrS</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0
<i>qepA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0
<i>aph(3')-Ia</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	100.0
<i>aph(3')-IIa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	100.0
<i>aac(6')-Ib</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	100.0
<i>ampC</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0
<i>blaTem</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	75.0
<i>blaSHV</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0
<i>blaCTX</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	87.5
检出种类	13	14	14	15	14	13	12	10	

注: + 表示样品中已检测到该抗性基因; - 表示样品中未检测到该抗性基因.

表 3 各采样点细菌的耐药情况(种类)

Tab. 3 Drug resistance of bacteria in each sample

组别	母猪舍	仔猪舍	育肥舍	妊娠舍	产房	污水池	沉淀池	生活区
1	28	27	28	30	27	12	11	8
2	28	29	26	28	28	15	14	8
3	29	29	28	30	24	13	10	8
平均	28	28	27	29	26	13	12	8

检测结果显示(表4),仔猪舍、育肥舍、妊娠舍和产房4个采样点检测到的ARG种类较多,污水池和沉淀池检测到的ARG种类相对猪舍采样点存在降低,生活区水样中检测到的抗性基因种类最少.由此可见,猪舍、污水池、沉淀池和生活区检测到的抗性基因种类存在递减现象.

另外,四环素类、磺胺类、大环内酯类、喹诺酮类、氨基糖苷类及 β -内酰胺类ARGs都在各采样点被检测到,其中在8个采样点废水中均检测到检出率高达100%的四环素类抗性基因*tetA*,*tetB*,*tetC*,*tetE*,磺胺类抗性基因*sul1*,*sul2*,*sul3*,以及氨基糖苷类抗性基因*aph(3')-Ia*,*aph(3')-IIa*,*aac(6')-Ib*.仅部分采样点检出了大环内酯类抗性基因*ermB*,*ermF*,喹诺酮类抗性基因*qnrD*,及 β -内酰胺类抗性基因*blaTem*,*blaCTX*.而抗性基因*ermB*检出率为37.5%,抗性基因*ermF*检出率为62.5%,抗性基因*qnrD*检出率为50.0%,抗性基因*blaTem*检出率为75.0%,抗性基因*blaCTX*检出率为87.5%.

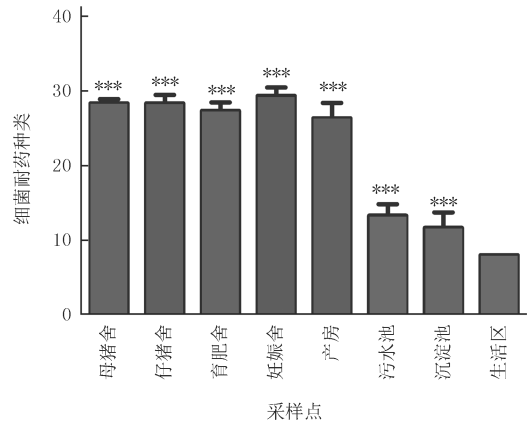
综上所述,该猪场废水经过污水池和沉淀池中废水工艺处理之后仍存在ARGs,四环素类、磺胺类和氨基糖苷类抗性基因稳定存在, β -内酰胺类与大环内酯类ARGs被消减.

3 讨论与结论

河南省是我国连续多年名列前茅的养猪大省,其中小型养猪企业在河南省的数量较多,分布较为广泛^[30].虽然我国畜牧养殖业的总体技术水平逐渐提升,但小型养殖企业中依旧存在养殖技术落后、滥用抗生素的情况,导致生态环境以及人类健康都面临着威胁.

通过本次研究发现:(1)所调查的猪场内不同猪舍所排放的废水中细菌存在较高的耐药率,经过管道排放进入的污水池和沉淀池中,细菌的耐药率下降.可能是由于废水在污水池和沉淀池中经过曝气处理导致大量耐药细菌死亡所造成的.之前SHARMA等人^[31]的研究也表示,常用的消毒工艺会造成废水中的耐药细菌的死亡.场内猪舍、废水处理区、生活水源区3个位置的样品中细菌的耐药率逐次递减,推测一部分原因是场内猪舍、废水处理区、生活水源区3个位置的抗生素残留存在较大的差别,且PRUDEN^[15]在研究中也表明抗生素的残留会造成耐药微生物的富集.(2)所检测样本中四环素类、磺胺类、氨基糖苷类部分抗性基因的检出率较高,可能是由于养殖户长期大量这3类抗生素导致残留抗生素的积累,而且这4类抗生素结构稳定、自然状态下难以降解,使得废水中抗性细菌的富集.马光强^[32]在研究中也提到,养殖场最常用的抗菌药物有四环素类、磺胺类和氨基糖苷类等药物.而ARG会因为相应抗生素的广泛使用和和环境中的持久性被普遍检测到^[33].(3)四环素类、磺胺类和氨基糖苷类3类ARGs在养殖场废水处理依然存在.而BEN和BENGTSSON-PALME等人的研究报道废水处理工艺对抗性基因的消减存在一定的效果,但难以完全去除^[19,34].(4)生活区水环境及检测到与猪场废水相同的四环素类、磺胺类和氨基糖苷类抗性基因,可能是猪场废水排放过程中,抗性基因在猪场与生活区的土壤和水体微生物之间迁移,进入生活区的水环境中.

经过调查发现该猪场的污水排放对周边居民的生活造成的生态和安全隐患,急需采取一定的治理措施.同时该实验结果也为进一步展开各小规模养猪场中抗生素抗性细菌和抗性基因的污染研究提供了数据基础,也为当下兽药的使用提供了参考.



该图为两组样品之间进行单因素T检验计算结果,*表示各采样点与生活区细菌耐药性存在显著性差异,***分别表示 $P<0.05$, $P<0.001$,均与生活区比较.

图1 猪场各采样点与生活区废水中分离细菌的耐药性差异

Fig. 1 The diversity of drug resistance for isolate bacteria in each location of swine feedlot and living quarters

参 考 文 献

[1] 王玲玲.中国生猪产品国际竞争力研究[D].泰安:山东农业大学,2017.

- WANG L L.A study on the international competitiveness of swine products in china[D].Taian:Shandong Agricultural University, 2017.
- [2] 张振旺.河南省养猪业风险管理研究[D].郑州:郑州大学,2010.
- ZHANG Z W.Risk management of pig industry in Henan Province[D].Zhengzhou:Zhengzhou University,2010.
- [3] 王盼亮.医院废水和城市污水处理系统中多重耐药细菌的分子转移特征及相关性研究[D].新乡:河南师范大学,2017.
- WANG P L.A Dissertation Submitted to the Graduate School of Henan Normal University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science[D].Xinxiang:Henan Normal University, 2017.
- [4] ZHANG Q, YING G, PAN C, et al.Comprehensive Evaluation of Antibiotics Emission and Fate in the River Basins of China:Source Analysis, Multimedia Modeling, and Linkage to Bacterial Resistance[J].Environmental Science & Technology, 2015, 49(11): 6772-6782.
- [5] 郭瑞鹏, 吴银宝.兽用抗生素残留对环境中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, WU Y B.Research progress on the impact of veterinary drugs residues on bacteria resistance in environment[J].Acta Ecologiae Animalis Domastici, 2013, 34(2): 1-5.
- [6] 李佳楠.城市污水系统中典型抗生素、抗性基因和抗性细菌的丰度与关联性研究[D].杭州:浙江大学, 2014.
- LI J N.The abundance and relationships between typical antibiotics and corresponding resistance in municipal wastewater treatment system[D].Hangzhou: Zhejiang University, 2014.
- [7] SARMAH A K, MEYER M T, BOXALL A A, et al.A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment [J].Chemosphere, 2006, 65(5): 725-759.
- [8] 徐永刚, 宇万太, 马强, 等.环境中抗生素及其生态毒性效应研究进展[J].生态毒理学报, 2015, 10(3): 11-27.
- XU Y G, YU W T, MA Q, et al.The Antibiotic in Environment and Its Ecotoxicity: A Review[J].Asian Journal of Ecotoxicology, 2015, 10(3): 11-27.
- [9] 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.
- XU L K.The behavior of antibiotic resistance genes in urban drinking water treatment systems[D].Hangzhou: Zhejiang University, 2015.
- [10] HUANG J, SHANG K, KASHIF J, et al.Genetic diversity of Streptococcus suis isolated from three pig farms of China obtained by acquiring antibiotic resistance genes[J].Journal of the Science of Food and Agriculture, 2015, 95(7): 1454-1460.
- [11] WANG J, BEN W, YANG M, et al.Dissemination of veterinary antibiotics and corresponding resistance genes from a concentrated swine feedlot along the waste treatment paths[J].Environment International, 2016, 92: 317-323.
- [12] BROOKS J P, ADELI A, McLaughlin M R, et al.Microbial ecology, bacterial pathogens, and antibiotic resistant genes in swine manure wastewater as influenced by three swine management systems[J].Water Research, 2014, 57: 96-103.
- [13] 李兆君, 姚志鹏, 张杰, 等.兽用抗生素在土壤环境中的行为及其生态毒理效应研究进展[J].生态毒理学报, 2008, 3(1): 15-20.
- LI Z J, YAO Z P, ZHANG J, et al.A Review on Fate and Ecological Toxicity of Veterinary Antibiotics in Soil Environments[J].Asian Journal of Ecotoxicology, 2008, 3(1): 15-20.
- [14] 刘蓓, 李艳霞, 张雪莲, 等.兽药抗生素对土壤微生物群落的影响[J].生态毒理学报, 2013, 8(6): 839-846.
- LIU B, LI Y X, ZHANG X L, et al.Effects of veterinary antibiotics on soil microbial community: A review [J].Asian Journal of Ecotoxicology, 2013, 8(6): 839-846.
- [15] PRUDEN A.Balancing water sustainability and public health goals in the face of growing concerns about antibiotic resistance[J].Environmental science and technology, 2014, 48(1): 5-14.
- [16] 李超.新疆地区典型污染源抗生素抗性基因的污染分布的研究分析[D].石河子:石河子大学, 2016.
- LI C.Distribution and Contamination Levels of ARGs From Typical Pollution Sources in Xinjiang[D].Shihezi: Shihezi University, 2016.
- [17] BERENDONK T U, MANAIA C M, MERLIN C, et al.Tackling antibiotic resistance: the environmental framework[J].Nature Reviews Microbiology, 2015, 13(5): 310-317.
- [18] KARKMAN A, DO T T, WALSH F, et al.Antibiotic-Resistance Genes in Waste Water[J].Trends in Microbiology, 2017, 26(3): 220-228.
- [19] BENGTTSSON-PALME J, HAMMAREN R, PAL C, et al.Elucidating selection processes for antibiotic resistance in sewage treatment plants using metagenomics[J].Science of The Total Environment, 2016, 572: 697-712.
- [20] YANG Y, LI B, ZOU S, et al.Fate of antibiotic resistance genes in sewage treatment plant revealed by metagenomic approach[J].Water Research, 2014, 62: 97-106.
- [21] 朱丹, 张瑞, 杨琳.生活污水中四环素类抗生素抗性基因污染的初步研究[J].西南师范大学学报(自然科学版), 2017, 42(2): 49-52.
- ZHU D, ZHANG R, YANG L.Tentative Research on Tetracycline Resistance Genes in Domestic sewage.Journal of Southwest China Normal University(Nature Science Edition), 2017, 42(2): 49-52.
- [22] 刘锐.规模化猪场废水典型抗生素抗性基因的调查研究[J].家畜生态学报, 2017, 38(11): 68-71.
- LIU R.A Study on Typical Antibiotic Resistance Genes in Largescale Pig Farm Wastewater[J].Acta Ecologiae Animalis Domastici, 2017, 38(11): 68-71.
- [23] 徐艳.石家庄汪洋沟地区抗生素、抗性细菌和抗性基因污染特征研究[D].泰安:山东农业大学, 2014.
- XU Y.Pollution Characteristics of Antibiotics, Antibiotic Resistance Bacteria and Genes in Wangyanggou River, ShiJiaZhuang[D].Taian:

Shandong Agricultural University, 2014.

- [24] 杨芳.人工湿地中抗生素耐药菌和耐药基因环境行为研究[D].广州:暨南大学, 2013.
YANG F.Environment Behavior of Antibiotic Resistance Bacteria and Genes in Constructed Wetlands[D].Guangzhou:JINAN University, 2013.
- [25] 邢丽丹, 糜祖煌, 徐鑫鑫, 等.36株多重耐药鲍曼不动杆菌对氨基糖苷类药物耐药基因的流行病学研究[J].中国感染与化疗杂志, 2013, 13(6):442-445.
XING L D, MI Z H, XU X X, et al.Epidemiological study of the genes conferring aminoglycoside resistance in 36 strains of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*[J].Chin J Infect Chemother, 2013, 13(6):442-445.
- [26] 张凡.铜绿假单胞菌氨基糖苷类抗生素耐药机制及同源性分析[D].合肥:安徽医科大学, 2018.
ZHANG F.analysis of drug resistance mechanism and homology of aminoglycoside antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*[D].Hefei: Anhui Medical University, 2018.
- [27] 杜亚涛.保定市多重耐药铜绿假单胞菌氨基糖苷类修饰酶基因的检测及分析[D].石家庄:河北医科大学, 2017.
DU Y T.Genotyping Analysis of Aminoglycoside Modifying Enzyme in Multiple Drug Resistance *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates in Baoding Distract[D].Shijiazhuang: HeBei Medical University, 2017.
- [28] 李超, 鲁建江, 童延斌, 等.乌鲁木齐市医院医疗废水中细菌对抗生素的抗性水平[J].环境与职业医学, 2016, 33(8):758-762.
LI C, LU J J, TONG Y B, et al.Antibiotic Resistance Levels of Pathogens Isolated from Medical Wastewater in Urumqi[J].J Environ Occup Med, 2016, 33(8):758-762.
- [29] VOLKMANN H, SCHWARTZ T, BISCHOFF P, et al.Detection of clinically relevant antibiotic-resistance genes in municipal wastewater using real-time pcr(taqman)[J].Journal of Microbiological Methods, 2004, 56(2):277-286.
- [30] 郑宝亮, 边传周, 叶传林.河南养猪业面临的问题及对策探讨[J].郑州牧业工程高等专科学校学报, 2012, 32(3):28-30.
ZHENG B L, BIAN C Z, YE C L.Problems and Countermeasures of pig industry in Henan Province[J].Journal of Zhengzhou College of Animal Husbandry Engineering, 2012, 32(3):28-30.
- [31] SHARMA V K, JOHNSON N M, CIZMAS L, et al.A review of the influence of treatment strategies on antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes[J].Chemosphere, 2016, 150:702-714.
- [32] 马光强.贵州省畜禽主要病原菌耐药性及耐药基因研究[D].贵阳:贵州大学, 2016.
MA G Q.Study on Antibiotic Resistance and Drug Resistance Gene of Main pathogenic Bacteria From Livestock and Poultry in Guizhou Province[D].Guiyang, Guizhou University, 2016.
- [33] QIAO M, YING G, SINGER A C, et al.Review of antibiotic resistance in China and its environment[J].Environment International, 2018, 110:160-172.
- [34] BEN W, WANG J, PAN X, et al.Dissemination of antibiotic resistance genes and their potential removal by on-farm treatment processes in nine swine feedlots in Shandong Province, China[J].Chemosphere, 2017, 10:262-268.

Investigation of bacterial resistance in wastewater from a small-scale swine feedlot in Henan province

Qin Huiling, Chang Dao, Liu Yangkun, Zhang Weicheng, Fu Ling, Li Na, Yao Lunguang

(Collaborative Innovation Center of Water Security for Water Source Region of Mid-line of

South-to-North Diversion Project of Henan Province; Henan Key Laboratory of Ecological Security for

Water Source Region of Mid-line of South-to-North Diversion Project, Nanyang Normal University, Nanyang 473061, China)

Abstract: The excessive use of antibiotics in animal husbandry in China induces the increasing emergence of antibiotic resistance bacteria (ARB) and antibiotic resistance genes (ARG), which results in the wide dissemination of bacterial resistance and great risks to the surrounding water source and the ecological environment. Samples were collected from a small-scale swine feedlot in Henan province to investigate the bacterial resistance and ARGs in the wastewater. Using antimicrobial susceptibility test and PCR amplification technique can demonstrate that: (1) the drug resistance rate of bacteria from the five lagoons including sow houses, nursery houses, finisher houses, gestation houses and farrowing houses are higher than that in the lagoon wastewater, settling tank and living quarters. And there were significant differences in drug resistance; (2) the frequency of detection for ARGs of tetracycline, sulfonamide and aminoglycoside were higher in swine feedlot and living quarters. ARGs may present translocation in environment and transfer into bacteria of water source in living quarters. This study provides valuable data for regulating the fair use of antibiotics and conducting further researches on investigating the ARB and pollution status of ARGs in swine feedlot wastewater.

Keywords: lagoon wastewater; antibiotic; resistance; antibiotic resistance gene; antibiotic resistant bacteria