

DOI:10.7524/j.issn.0254-6108.2017.03.2016070102

金明兰, 孟庆玲, 赵玉鑫, 等. 养殖场空气中 *E. coli* 磺胺类抗生素的抗性[J]. 环境化学, 2017, 36(3):472-479.

JIN Minglan, MENG Qingling, ZHAO Yuxin, et al. Characterization of sulfa antibiotics resistance of *E. coli* from the air of poultry farms[J]. Environmental Chemistry, 2017, 36(3):472-479.

养殖场空气中 *E. coli* 磺胺类抗生素的抗性*

金明兰^{1,2} 孟庆玲¹ 赵玉鑫¹ 徐莹莹¹ 薛洪海¹ 齐子姝¹
李娜¹ 沈梦楠¹ 孙世梅¹ 金宁一^{2**}

(1. 吉林建筑大学松辽流域水环境教育部重点实验室, 长春, 130118;

2. 军事医学科学院军事兽医研究所, 长春, 130122)

摘要 本文从养殖场空气中分离出 360 株 *E. coli* (大肠杆菌, *Escherichia coli*), 应用肉汤微量稀释法和 PCR 方法, 分离磺胺甲噁唑敏感菌株, 检测抗生素抗性和抗性基因. 在分离的 *E. coli* 中, 对磺胺甲噁唑敏感菌株为 95 株 (26.4%), 有 48 株含有青霉素、氯霉素、四环素、环丙沙星、庆大霉素和利福平的抗性, 而 47 株未含有抗性. 其中, 7 株菌株含有 1 种抗生素抗性, 11 株菌株含有 2 种抗生素抗性, 17 株菌株含有 3 种抗生素抗性, 6 株菌株含有 4 种抗生素抗性, 4 株菌株含有 5 种抗生素抗性, 3 株菌株含有 6 种抗生素抗性. 对抗生素的耐受能力依次为: 氯霉素、青霉素、四环素、环丙沙星、庆大霉素、利福平. 磺胺甲噁唑敏感菌株共检出 163 个抗性基因, *sul1*、*int1*、*sul2*、*Int2*、*sul3* 检出数量依次为 49、44、29、20 和 19; 含一种、二种、三种、四种、五种抗性基因菌株分别为 45、22、10、7、2; 但有 6 株未检测出抗性基因. 结果表明养殖场建场时间、抗生素使用、养殖规模等与抗生素抗性菌的抗性呈正相关; 养殖场空气中分离的 *E. coli* 抗生素抗性较高, 且具有多重抗性; 抗生素抗性的表现型与其基因型之间出现不完全吻合现象.

关键词 磺胺类抗性菌, 抗性基因, *E. coli*, 养殖场空气.

Characterization of sulfa antibiotics resistance of *E. coli* from the air of poultry farms

JIN Minglan^{1,2} MENG Qingling¹ ZHAO Yuxin¹ XU Yingying¹ XUE Honghai¹
QI Zishu¹ LI Na¹ SHEN Mengnan¹ SUN Shimel¹ JIN Ningyi^{2**}

(1. Key Laboratory of Songliao Aquatic Environment, Ministry of Education, Jilin Architectural University, Changchun, 130118, China;

2. Institute of Military Veterinary Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Changchun, 130122, China)

Abstract: 360 *Escherichia coli* (*E. coli*) samples were isolated from the air of eight poultry farms. Microdilution and polymerase chain reaction (PCR) were used to evaluate the sulfonamides susceptibility and detect the sulphonamides resistance gene respectively. The results showed that 95 samples were found to be susceptible to sulfamethoxazole, and of which 48 samples showed resistance to at least one of six different kinds of antibiotics. Briefly, 7 samples were shown to be resistant to one antibiotics, 11 strains were resistant to two kinds of antibiotics, 17 samples were resistant to three kinds of antibiotics, 6 samples were resistant to four kinds of antibiotics, 4 samples were resistant to five kinds of antibiotics, and notably 3 strains were resistant to all six kinds

2016年7月1日收稿(Received: July 1, 2016).

* 国家自然科学基金重点项目(51408259)资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China (51408259).

** 通讯联系人, Tel:0431-84566408, E-mail:jinningyi100@126.com.cn

Corresponding author. E-mail: jinningyi100@126.com.cn

of antibiotics. The resistance abilities of the samples from highest to lowest were against to chloramphenicol, penicillin, tetracycline, ciprofloxacin, and rifampicin. Moreover, 163 resistance genes were detected from isolated sulfonamide resistance samples. There were 49 resistance genes of *sul1*, 44 resistance genes of *sul2*, 20 resistance genes of *sul3*, 20 resistance genes of *int1* and 19 resistance genes of *int2*. In addition, there were 45 stains contained one kind of resistance genes, 22 contained two kinds of resistance genes, 10 contained three kinds of resistance genes, 7 contained four kinds of resistance genes, and 2 contained five kinds of resistance genes. But 6 samples had no resistance genes mentioned above. Our study showed that the antibiotic resistance of bacteria was positively correlated with many factors, such as built time, antibiotic use, and breeding scale etc. The *E. coli* isolated from the air in the poultry farm was more resistant to antibiotics, and displayed multiple antibiotic resistances. Obviously, the sulfonamides resistance did not correlate with the presence of such genes.

Keywords: sulfanilamide resistance bacteria, ARGs, *E. coli*, air in the poultry farm.

随着畜禽产业的迅猛发展,抗生素的滥用情况日趋严重,环境空气介质中抗生素抗性菌、抗性基因(Antibiotic resistance genes, ARGs)很可能通过水、土壤、空气等媒介传播扩散,致使抗生素抗性更为复杂、严重,阻碍畜牧业生产效率的提高,污染赖以生存的生态环境,威胁人类的健康和生命^[1].近年来,国内外已系统地开展水、土壤环境抗生素抗性基因的研究,但对空气中抗生素抗性的研究相对滞后^[2].*E. coli* 是机体和环境中最常见的细菌,是生物圈重要的成员,在空气微生物中也占据较高比例,与空气质量、生命现象及其生态系统功能相关.磺胺类药物是对大多数革兰氏阳性、革兰氏阴性细菌十分有效的廉价、广谱、合成的抑菌药,广泛地用于预防和治疗多种感染性疾病^[3].由于磺胺类药物的广泛使用导致细菌的敏感性减弱,致使抗生素抗性菌株和抗性基因残留污染环境,威胁人类健康而备受关注.已在水环境、土壤、动物病变组织、粪便中检测出 *sul1*、*sul2*、*sul3*、*int1* 和 *int2* 等磺胺类抗生素基因.

目前许多城市细颗粒物污染严重,空气中的细颗粒物可能成为传播抗生素抗性的暴露途径.动物和人类更易吸入空气中抗生素抗性菌、携带抗性基因的微生物,可能造成更直接的危害^[4].兽用抗生素的广泛使用,含有致病微生物气溶胶通过空气介质进行长距离的传播,导致养殖场及其周边环境抗生素抗性基因丰度的增加,存在抗性基因的传播风险^[5].房文燕等研究结果表明活禽交易区空气介质中抗生素抗性基因 *tetG*、*tetW*、*sul1* 和 *sul2* 检出率达 70% 以上,空气中抗生素抗性基因含量与活禽交易区距离的增加呈显著下降趋势^[6].Just 和 Hong 等通过养殖场空气中 *tetA*、*tetC*、*tetO*、*tetW* 的 ARGs 研究,认为养殖场是抗生素多重抗性基因的存储库^[7-8].Liu 等从鸡场空气中分离出携带抗性基因的金黄色葡萄球菌,表明携带抗生素抗性的微生物污染养殖场空气^[9].随着养殖业快速发展,饲养动物数量的增加,养殖密度不断增高,抗生素大量使用,空气中微生物和有害气体含量持续升高,抗生素抗性基因不断传播、扩散,空气环境可能成为一个潜在、庞大的抗性基因的存储库^[10].目前,有关养殖场环境中空气微生物的抗生素抗性相关研究较少,逸散在空气中抗生素抗性基因的来源、浓度、影响因素、传播扩散机制、生态风险等方面的信息匮乏,某种特定的致病菌、某一类抗生素抗性、抗性基因更鲜见报道.因此,养殖场自然环境、抗生素使用与某类抗生素抗性菌抗性、抗性基因之间关系需亟待进行研究.

本研究从吉林省某 8 家养殖场空气中分离、鉴定 360 株 *E. coli*,检测其磺胺类抗生素抗性、抗性基因,分析抗生素抗性与抗性基因的相关性,旨在了解不同养殖场空气中 *E. coli* 的抗生素抗性,为进一步揭示抗生素的传播、扩散机制,评估养殖场空气质量状况、有效控制空气污染物,保障人类的健康奠定基础.

1 材料与方 法 (Materials and methods)

1.1 材料

DNA 提取试剂盒购于 TIANGEN; Ex Taq DNA 聚合酶、DL2000 Marker、质粒抽提试剂盒购置上海生工公司;五糖微量发酵管购自北京九州天瑞科技有限公司.标准大肠杆菌菌株购于中国菌种保藏中心.磺

胺甲噁唑、庆大霉素、青霉素、四环素、环丙沙星、氯霉素和利福平等抗生素药物购置中国药品监督所。

1.2 养殖场调研

本研究于2014年6月至2015年6月(一年内持续重复采样3次),对吉林省某8家养殖场进行调研,了解养殖场饲养规模、自然地理位置、建场时间、饲料品种、疫苗接种、抗生素使用、动物品种、室内外温度、养殖场湿度、清洁度等自然情况。

1.3 实验方法

1.3.1 样品采集及处理

利用撞击型空气采样器采集养殖场舍内空气样本。每家养殖场按5点法(中、东、西、南、北部)重复3次采样,每个采样点分离3株,共分离360株 *E. coli*,使用70%酒精对采样器进行消毒。采样器放置距离地面60—90 cm,流量为100 L·min⁻¹,采样时间1 min。

1.3.2 菌株分离、鉴定

常规方法分离菌株。应用葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘糖、蔗糖发酵试验,枸橼酸盐试验,甲基红/VP和吲哚试验等方法鉴定。

1.3.3 抗生素敏感性检测

将分离、鉴定 *E. coli* 培养后,按照 CLSI(临床实验室标准化协会, Clinical and laboratory standards institute)的规则,通过微量肉汤稀释法测定抗生素 MIC(最小抑菌浓度, Minimal inhibitory concentration),进行磺胺甲噁唑敏感性检测,对药物敏感的临界点进行判定^[11-12]。所有检测均设3次平行重复。

1.3.4 *E. coli* 耐药性分析

分离、鉴定的 *E. coli* 采用微量液体稀释法进行抗生素耐药性检测^[13]。将磺胺类抗生素敏感的 *E. coli* 接种磺胺类营养培养基中,继续培养至对数生长期后,接种于青霉素、氯霉素、四环素、环丙沙星、庆大霉素和利福平的浓度梯度为2¹—2⁹ mg·L⁻¹的培养基中,在37℃、生化培养箱培养12—24 h测定OD₆₀₀。

1.3.5 抗性基因 PCR 检测

选取磺胺类抗生素抗性基因 *sul1*、*sul 2*、*sul 3*、*int 1*、*int 2* 为目的基因,引物设计参考已发表的文献^[14-15]。PCR反应体系(25 μL):2.5 μL 10×PCR buffer, 3 μL dNTPs(2.5 mmol·L⁻¹),1 μL 上游引物,1 μL 下游引物(10 μmol·L⁻¹),2 μL DNA 模板,0.15 μL Taq DNA 聚合酶(5 U·μL⁻¹),15.35 μL ddH₂O。PCR反应程序为参考文献[14]中报道进行预变性、退火、延伸。取10 μL PCR产物在1%的用琼脂糖凝胶电泳检测。出现目的条带为阳性,未出现目的条带为阴性。

1.4 统计方法

采用 Microsoft Excel 2010 进行数据统计和绘图,采用 SPSS 19.0 进行数据分析。

2 结果与讨论(Results and discussion)

2.1 养殖场自然情况调查

经调查发现,8个养殖场为预防和治疗动物疫病,提高养殖效益,通过饮水、注射、拌料等方法交替使用8—15种抗生素(青霉素、氯霉素、磺胺甲噁唑、磺胺嘧啶、四环素、环丙沙星、庆大霉素、阿莫西林、头孢菌素、土霉素、金霉素、强力霉素、万古霉素和利福平)。具体情况见表1。

2.2 *E. coli* 磺胺类抗生素菌株分离

本研究中,对分离的360株 *E. coli*,95株(26.4%)对磺胺甲噁唑有抗性,推测临床上磺胺甲噁唑用量较多原因所致。8个养殖场磺胺类抗性菌株数量分别为17(37.8%)、15(33.3%)、14(31.1%)、14(31.1%)、7(15.6%)、11(24.4%)、9(20.0%)、8(17.8%)。养殖场中心区域、东部、南部、西部、北部区域的抗性菌株分别为:32、18、9、14、16。不同来源的磺胺类抗生素抗性菌株比例也存在着差异,依次为鸡、鹌鹑、鸽子,可能与养鸡场饲养规模、密度、建场时间、饲养方式、抗生素种类、剂量、畜舍面积、动物种类、饲养规模、动物日龄、粪便和垫料等废弃物的处理方式及消毒灭菌情况具有一定相关性。养殖场抗生素使用数量多,建场时间长的养殖场检出的菌株数量高于抗生素使用数量少,建场时间短的养殖场。结果见图1。

表 1 养殖场情况调查结果
Table 1 Poultry farm investigation

养殖场种类 Poultry farm types	养殖规模 Scale	建场时间 Build time	密度 Density/m ⁻³	日龄* Age day	抗生素使用数量 Number of antibiotics	饲养方式 Feeding way
蛋鸡 1 Laying hen1	6000	10	23	360	15	笼养 Cage
蛋鸡 2 Laying hen2	7000	8	32	280	13	笼养 Cage
蛋鸡 3 Laying hen3	3000	5	12	170	12	平养 Plane-raising
肉鸡 1 Chicken1	2000	1	13	35	8	平养 Plane-raising
肉鸡 2 Chicken2	5000	3	14	24	9	平养 Plane-raising
肉鸡 3 Chicken3	4000	2	16	18	10	平养 Plane-raising
鹌鹑 Quail	4000	2	60	60	8	笼养 Cage
肉鸽 Pigeon	1000	3	16	260	9	平养 Plane-raising

注: * 到养殖场采集样品时的动物日龄 day age of animal by collect to arrived in farm.

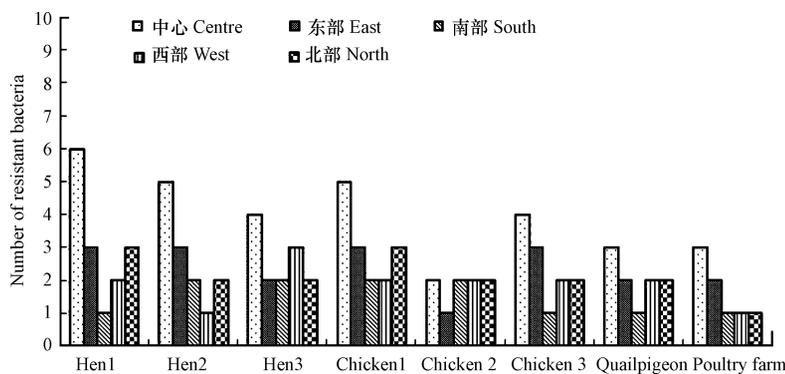


图 1 养殖场 *E. coli* 磺胺类抗生素检测结果

Fig.1 The result of sulfanilamide antibiotic of *E. coli* in poultry farms

空气是人和动物赖以生存的重要因素之一, *E. coli* 是人和动物肠道内的正常菌群, 养殖场空气中 *E. coli* 很有可能来自于未及时清除的动物粪便、废弃物、排泄物及垫料等所形成的气溶胶^[16]. 少数养殖场过量使用抗生素导致微生物长期处于低浓度抗生素的驯化状态, 其抗生素抗性增强, 抗性菌株增多^[17]. 同时, 温度、氧气、溶解氧、光照、pH 值、重金属、氮、磷的含量等环境地球化学因素的变化将导致整体微生物的丰度与种群结构的差异, 影响抗性菌株的抗性. 在养殖过程中, 饲养密度高、空气流动性差、湿度大、缺乏直射阳光, 空气微生物的存活和繁殖能力强, 导致养殖场及周边空气中抗生素抗性菌株暴露, 导致耐药性可通过土壤、空气、水等环境介质更广泛、快速地向全球范围的传播与扩散, 逸散的抗生素抗性菌的潜在危害性增强, 严重威胁着人类和动物健康^[18]. 值得关注的是, 在养殖场中心区域分离的抗性菌株较多, 而在四周区域中检出抗性菌株数量较少, 其中南部区域的抗性菌株最少, 推测是因为中部区域的空气流动最弱, 且受到饲养动物的排泄物数量最高的原因所致. 其中南部区域的抗性菌株最少推测南部区域受到阳光直射, 或是季节风向等有关.

2.3 敏感性抗性菌的耐药性

将对磺胺类抗生素敏感的菌株进行青霉素、氯霉素、四环素、环丙沙星、庆大霉素和利福平等常用 6 种抗生素的最小抑制浓度检测. 抗性菌以 CLSI 规定的浓度判定抗生素抗性. 结果如图 2.95 株磺胺类抗性菌中, 有 47 株不含其他抗生素抗性, 而 48 株含有多重抗生素抗性. 其中, 3 株菌株含有 6 种抗生素抗性, 4 株菌株含有 5 种抗生素抗性, 6 株菌株含有 4 种抗生素抗性, 17 株菌株含有 3 种抗生素抗性, 11 株菌株含有 2 种抗生素抗性, 而 7 株菌株含有 1 种抗生素抗性. 8 家养殖场的抗性菌株数量分别为 10、8、6、6、6、4、5、3; 累计有 30、26、19、17、18、11、13、8. 分离的磺胺类抗性菌对青霉素、氯霉素、四环素、环丙沙星、庆大霉素和利福平耐受菌株数量分别为: 23、11、24、25、27、32. 由此可知, 对氯霉素的耐受能力最强, 青霉素、四环素、环丙沙星和庆大霉素的耐受性次之, 对利福平的耐受性最弱.

由于氯霉素属抑菌性广谱抗生素, 在临床使用量较大, 通过抑制肽酰基转移酶, 使新肽链的形成受

阻而抑制蛋白质合成,可能是通过基因的突变而产生耐药性比较慢.利福平对需氧革兰阳性菌和部分需氧革兰阴性菌具良好抗菌作用,抑制细菌 RNA 的合成,防止 RNA 多聚酶与 DNA 连接,从而阻断 RNA 转录过程,使 DNA 和蛋白的合成停止,且存在较高的副作用,临床使用相对较少.究其原因在于临床上人畜共用的青霉素类、磺胺类、氨基糖苷类等抗生素,空气中残留着较多的抗性菌株.学者认为抗生素的使用强度、频率与细菌抗生素抗性的产生密切相关^[19].许多养殖场抗生素使用种类繁多,抗生素抗性更易于传播,变得更加复杂,导致空气中蕴藏着大量具有多重抗生素抗性“超级细菌”,使得人类、动物成为抗生素抗性菌的贮存库,致使饲养环境中抗性基因丰度增加,预示着动物、养殖场空气受到污染,从而威胁动物和从业人员健康^[20-21].

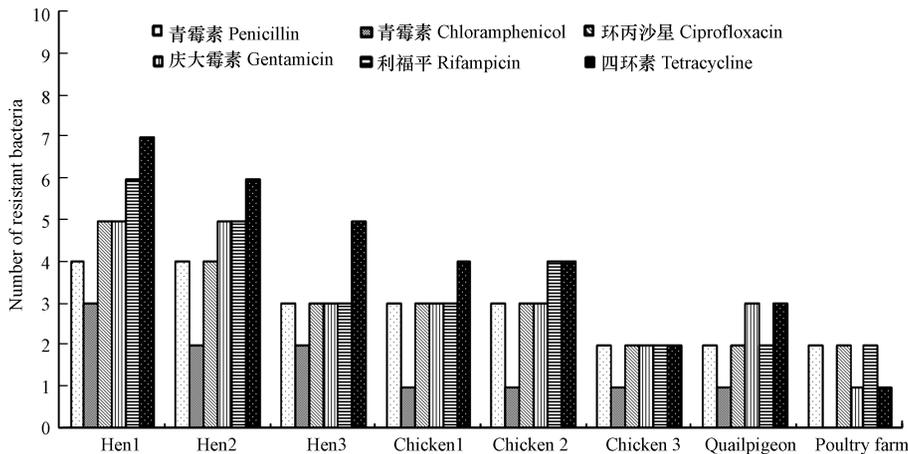


图2 养殖场磺胺类抗生素 *E. coli* 对 6 种抗生素抗性

Fig.2 Antibiotic resistance of sulfonamides resistant *E. coli* to 6 antibiotics in poultry farms

2.4 抗性基因分析

应用 PCR 方法检测分离的 *E. coli* 中 *Sul 1*、*Sul 2*、*Sul 3*、*int 1* 和 *int 2* 种磺胺类抗性基因,结果见表 2、表 3.在磺胺类抗性 *E. coli* 菌株中共测到 163 个抗性基因,8 家养殖场的抗性基因数量分别为 29、24、21、25、13、19、17、15. *Sul 1*、*Sul 2*、*Sul 3*、*int 1* 和 *int 2* 检测率分别为 49 (21.7%)、29 (12.9%)、20 (8.9%)、44 (19.6%)、19 (8.4%).鸡场有 2 株含有五种抗性基因;含有四种抗性基因的菌株为 7 株,为鸡饲养场 6 个和鹌鹑饲养场 1 个;含有 3 种抗性基因的菌株为 10 株,其中鸡和鹌鹑分别为 8、1、1;含有 2 种基因的菌株为 25 株,鸡、鹌鹑、鸽子饲养场分别为 20、3、2;含有一种抗性基因的菌株为 45 株,鸡、鹌鹑、鸽子饲养场分别为 33、6、6.值得关注的是,在磺胺类抗生素敏感菌株中,鸡场有 6 株未检出抗性基因,而鹌鹑场和鸽场中未出现.

表 2 磺胺类抗性基因检出率

Table 2 Detection rate of sulfa classification resistance gene

养殖场种类 Poultry farm types	分类检出率* Classification of detection	<i>Sul 1</i>	<i>Sul 2</i>	<i>Sul 3</i>	<i>Int 1</i>	<i>Int 2</i>
蛋鸡 1 Laying hen1	29 (38.7%)	8 (53.3%)	6 (40.0%)	4 (26.7%)	8 (53.3%)	3 (20.0%)
蛋鸡 2 Laying hen2	24 (36.9%)	7 (53.8%)	4 (30.8%)	3 (6.7%)	7 (53.8%)	3 (6.7%)
蛋鸡 3 Laying hen3	21 (35.0%)	6 (10.0%)	3 (23.1%)	2 (16.7%)	3 (23.1%)	4 (33.3%)
肉鸡 1 Chicken1	25 (35.7%)	7 (50.0%)	4 (28.7%)	4 (28.9%)	6 (42.9%)	4 (28.9%)
肉鸡 2 Chicken2	13 (37.1%)	4 (57.1%)	2 (28.6%)	1 (14.3%)	4 (57.1%)	2 (28.6%)
肉鸡 3 Chicken3	19 (34.5%)	6 (54.5%)	4 (36.4%)	2 (18.2%)	5 (45.5%)	2 (18.2%)
鹌鹑 Quail	17 (37.8%)	6 (66.7%)	3 (33.3%)	2 (22.2%)	5 (44.4%)	2 (22.2%)
肉鸽 Pigeon	15 (37.5%)	5 (62.5%)	3 (37.5%)	2 (25.0%)	6 (75.0%)	2 (25.0%)
合计 Total	163 (36.6%)	49 (55.1%)	29 (32.6%)	20 (22.5%)	44 (49.4%)	19 (21.3%)

注: * 基因检测数量/该养殖场磺胺类敏感菌株应检测出基因总数

Number of tested genetic / total number of genes of sulfa sensitive strains which should be detected in the farm.

表 3 磺胺类抗性基因分类检出数量

Table 3 Detection number of sulfa classification resistance gene

养殖场种类 Poultry farm types	一种基因 1 kind of gene	二种基因 2 kinds of gene	三种基因 3 kinds of gene	四种基因 4 kinds of gene	五种基因 5 kinds of gene
蛋鸡 1 Laying hen1	6	4	2	1	1
蛋鸡 2 Laying hen2	6	3	1	1	1
蛋鸡 3 Laying hen3	6	4	1	1	0
肉鸡 1 Chicken1	7	4	2	1	0
肉鸡 2 Chicken2	2	2	1	1	0
肉鸡 3 Chicken3	6	3	1	1	0
鹌鹑 Quail	6	2	1	1	0
肉鸽 Pigeon	6	3	1	0	0
合计 Total	45	25	10	7	2

我国对于空气环境中 ARGs 的研究尚处于起步阶段.李楠等^[22]在养殖场分离出含有较高的 β -内酰胺类、四环素和大环内酯类抗性、携带多种抗性基因的葡萄球菌.本实验中, *sul1*、*sul2* 和 *int1* 检出率较高, *sul3* 和 *int2* 检出率较低, 与前人的研究结果相似^[23]. 由于结合性质粒具有携带多种抗性基因的潜力和强大的传播能力, 可诱变、传播、扩散抗生素抗性基因, 致使空气、水和土壤等环境介质受到污染, 环境中的各种生物受到危害^[24]. 国外学者认为抗生素抗性是由于结构基因发生突变、插入、缺失, 改变结构蛋白的氨基酸序列, 降低或丧失抗生素的敏感性; 抑或是获得外源性抗性基因而改变抗生素抗性^[25]. 当空气中的 ARGs 整合到质粒、转座子、整合子等移动基因元件上, 通过转化、转导、接合等作用, 在微生物种内、种间传递转移, 或在不同微生物物种间传播扩散^[26]. 虽然具有传播、复制、持久等特点的 ARGs 是一种比化学污染物更难以控制新型的污染物, 但是, 抗性基因基本上都位于质粒、转座子、噬菌体等转移遗传因子上, 较少在染色体上, 基因突变引起的抗生素抗性的传播几率非常小, 只有获得外源抗性基因引起的抗生素抗性发生传播^[27].

特别值得关注的是, *E. coli* 的抗生素抗性表现型与抗生素抗性基因型的检出率有较高的相关性, 但不完全吻合. 在敏感菌株中有 6 株未检测到抗性基因, 推测是由于某些未知因素导致菌株中的基因缄默; 或是 *E. coli* 中含有未知、变异的二氢叶酸合成酶, 抑或含有未知的磺胺抗性基因所致, 可能整合子潜在的基因捕获及整合表达能力影响抗生素抗性传播, 但需要更多研究证明^[28]. 王娜等研究结果表明磺胺耐药菌的抗性基因表达与磺胺嘧啶暴露浓度呈现的线性相关, 都存在一定的有效浓度范围, 如果磺胺嘧啶浓度超过最高限值将会影响耐药菌的生长和繁殖, 使 *sul 1* 基因表达量减少^[29]. 秦丽婷等从土壤中分离的炭疽芽孢杆菌和弗氏志贺菌在含有不同浓度磺胺类药物的培养基中培养不同时间后进行 *sul 1*、*sul 2*、*sul 3* 检出率略有差异^[30]. Ji 研究认为, 磺胺类 *sul A* 和 *sul3* 与重金属 Cu、Zn、Hg 呈显著正相关, 表明重金属的选择压力可能导致微生物产生耐药性. 因此, 有理由相信多种因素共同和交叉选择的结果导致 ARGs 的产生^[31].

3 结论 (Conclusion)

(1) 养殖场的抗生素使用种类、建场时间、饲养规模与空气中 *E. coli* 的磺胺类抗生素抗性、抗性基因呈现正相关.

(2) 养殖场空气中分离的磺胺类抗性 *E. coli* 含有多重抗生素抗性.

(3) 养殖场空气中 *E. coli* 的抗生素抗性表现型与抗生素抗性基因型的检出率有较高的相关性, 但不完全吻合.

参考文献 (References)

- [1] 高敏, 贾瑞志, 仇天雷, 等. 集约化养鸡场空气环境中生物气溶胶特点研究[J]. 农业环境科学学报, 2015, 34(4): 787-794.
GAO M, JIA R Z, QIU T L, et al. Characteristics of bioaerosols in air environment of confined poultry feeding operations [J]. Journal of

- Agro-Environment Science, 2015, 34(4): 787-794 (in Chinese).
- [2] GREGOVA G, KMETOVA M, KMET V, et al. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from a poultry slaughterhouses [J]. Ann Agric Environ Med, 2012, 19(1): 75-77.
- [3] 贺小萌, 曹罡, 邵明非, 等. 空气中抗性基因(ARGs)的研究方法及研究进展[J]. 环境化学, 2014, 33(5): 739-747.
HE X M, CAO G, SHAO M F, et al. Research method and progress on antibiotics resistance genes (ARGs) in air [J]. Environmental Chemistry, 2014, 33(5): 739-747 (in Chinese).
- [4] CHEN B W, LIANG X M, HUANG X P, et al. Differentiating anthropogenic impacts on ARG s in the pearl river estuary by using suitable gene indicators [J]. Water Research, 2013, 47: 2811-2820.
- [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.
XU B J, LUO Y, ZHOU Q X, et al. Sources, dissemination, and ecological risks of antibiotic resistances genes (ARGs) in the environment [J]. Environmental Chemistry, 2010, 29 (2): 169-178 (in Chinese).
- [6] 房文艳, 高新磊, 李继, 等. 城市社区农贸市场空气微生物及抗生素抗性基因研究[J]. 生态毒理学报, 2015, 10(5): 95-99.
FANG W Y, GAO X L, LI J, et al. Investigation on airborne bacteria and antibiotic resistance genes in urban community farmers market [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2015, 10(5): 95-99 (in Chinese).
- [7] JUST N A, LÉTOURNEAU V, KIRYCHUK S P, et al. Potentially pathogenic bacteria and antimicrobial resistance in bioaerosols from cage-housed and floor-housed poultry operations [J]. Annals of Occupational Hygiene, 2012, 56(4): 440-449.
- [8] HONG P Y, LI X, YANG X, et al. Monitoring airborne biotic contaminants in the indoor environment of pig and poultry confinement buildings [J]. Environmental Microbiology, 2012, 14(6): 1 420-1 431.
- [9] 柳敦江. 养鸡场舍环境携带耐药基因的金黄色葡萄球菌的气溶胶形成及传播研究[D]. 济南: 山东农业大学, 2012.
LIU D J. Chicken farm environment carry resistant gene of staphylococcus aureus formation and propagation of aerosol research [D]. Jinan: Shandong Agricultural University, 2012 (in Chinese).
- [10] LING A L, PACE N R, HERMANDEZ M T, et al. Tetracycline resistance and class 1 integron genes associated with indoor and outdoor aerosols [J]. Environmental Science & Technology, 2013, 47(9): 4046-4052.
- [11] 高新磊, 邵明非, 贺小萌, 等. 污水处理厂空气介质抗生素抗性基因的分布[J]. 生态毒理学报, 2015, 10(5): 89-94
GAO X L, SHAO M F, HE X M, et al. Distribution of airborne antibiotic resistance gene in wastewater treatment plant [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2015, 10(5): 89-94 (in Chinese).
- [12] Clinical and laboratory standards institute (CLSI). Method for broth dilution susceptibility testing of bacteria isolated [S]. Wayne, PA, USA: CLSI.2006.
- [13] National committee for clinical laboratory standards. NCCLS Document M1002S12, 2002b. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twelfth informational supplement [S].
- [14] 冀秀玲, 刘芳, 沈群辉, 等. 养殖场废水中磺胺类和四环素抗生素及其抗性基因的定量检测[J]. 生态环境学报, 2011, 20 (5): 927-933.
JI X L, LIU F, SHEN Q H, et al. Quantitative detection of sulfonamides and tetracycline antibiotics and resistance genes in sewage farms [J]. Ecology and Environmental Sciences, 2011, 20 (5): 927-933 (in Chinese).
- [15] 金明兰, 刘凯, 徐莹莹, 等. 污水处理厂中磺胺类抗生素抗性菌、抗性基因的特性[J]. 环境工程, 2015, 33 (11): 1-5.
JIN ML, LIU K, XU YY, et al. Characteristics of sulfonamide antibiotics, resistant bacteria, resistance genes in sewage treatment plant [J]. Environmental Engineering, 2015, 33 (11): 1-5 (in Chinese).
- [16] MARSHALL B M, LEVYS B. Food animals and antimicrobials; Impacts on human health [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2015, 24 (4): 718-733.
- [17] 隋倩雯, 张俊亚, 魏源送, 等. 畜禽养殖废水生物处理与农田利用过程抗生素抗性基因的转归特征研究进展[J]. 环境科学学报, 2016, 36 (1): 16-26.
SUI Q W, ZHANG J Y, WEI Y S, et al. Fate of antibiotic resistance genes in the process of biological treatment and land application of animals wastewater: An overview [J]. Acta scientiae Circumstantiae, 2016, 36 (1): 16-26 (in Chinese).
- [18] HVISTENDAHL M. China takes aim at rampant antibiotic resistance [J]. Science, 2012, 336(6083): 795.
- [19] 张晓丹, 高丽丽, 胡家卿, 等. 猪源携带质粒介导喹诺酮类耐药基因大肠杆菌气源性传播的研究[J]. 中国畜牧兽医, 2015, 33 (7): 739-747.
ZHANG X D, GAO L L, HU J Q, et al. Porcine carrying plasmid mediated class quinolone resistant gene of *E. coli* air sexually transmitted [J]. Journal of China ANIMAL Husbandry and Veterinary, 2015, 33 (7): 739-747 (in Chinese).
- [20] FANG H, HAN Y, YIN Y, et al. Variations in dissipation rate, microbial function and antibiotic resistance due to repeated introductions of manure containing sulfadiazine and chlortetracycline to soil. [J]. Chemosphere, 2014, 96: 51-56.
- [21] RUTGERSSON C, GUNNARSSON L, FICK J, et al. Oral exposure to industrial effluent with exceptionally high levels of drugs does not indicate acute toxic effects in rats [J]. Environ Toxicol Chem, 2013, 32(3): 577-584.
- [22] 李楠. 养殖场空气中细菌分布及耐药性研究[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2013.
LI N. Farms in the air bacteria distribution and drug resistance study [D]. Beijing: The Chinese People'S Liberation Army Military

Academy of Medical Sciences, 2013 (in Chinese).

- [23] SU HC, YING GG, TAO R, et al. Class 1 and 2 integrons, sul resistance genes and antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolated from Dongjiang River, South China[J]. Environmental Pollution, 2012, 169: 42-49.
- [24] FINLEY RL, CONLLIGON P, LARSSON DG J, et al. The scourge of antibiotic resistance; The important role of the environment [J]. Clin Infect Dis, 2013, 57(5): 704-710.
- [25] LOPES GV, PISSETTI C, DACRUZ P P D, et al. Resistance phenotypes and genotypes of *Salmonella enterica subsp. enterica* isolates from feed, pigs, and carcasses in brazil [J]. J Food Prot, 2015, 78(2): 407-413.
- [26] BRAYKOV NP, EISENBERG JN, GROSSMAN M, et al. Antibiotic resistance in animal and environmental samples associated with small-scale poultry farming in northwestern ecuador.[J]. Msphere, 2016,10 (1):1-15.
- [27] SIDRACH-C R, BÉCARES E. Fecal indicator bacteria resistance to antibiotics in experimental constructed wetlands [J]. Ecological Engineering, 2013, 50:107-111.
- [28] GAO P, MAO D Q, LUO Y, et al. Occurrence of sulfonamide and tetracycline resistant bacteria and resistance genes in aquaculture environment [J]. Water Research, 2012, 46:2355-2364.
- [29] 王娜,杨晓洪,郭欣妍,等. 磺胺类耐药菌中抗性基因 sul 的表达规律[J]. 生态毒理学报,2015, 10(5): 75-81.
WANG N, YANG X H, GUO X Y, et al. Expression patterns of sul genes in sulfonamide-resistant bacteria [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2015, 10(5):75-81 (in Chinese).
- [30] 秦丽婷,童蕾,刘慧,等.环境中磺胺类抗生素的生物降解及其抗性基因污染现状[J]. 环境化学,2016,35(5): 875-883.
QIN LT, TONG L, LIU H, et al. Biodegradation of sulfonamides and the pollution characteristics of sulfonamide resistance genes in the environment[J]. Environmental Chemistry, 2016, 35(5): 875-883 (in Chinese).
- [31] JI X L, SHEN Q H, LIU F, et al. Antibiotic resistance gene abundances associated with antibiotics and heavy metals in animal manures and agricultural soils adjacent to feedlots in Shanghai, China[J]. Journal of Hazardous Materials, 2012, 235:178-185.