

牛粪沼渣中多重耐药细菌的环境风险

胡涛, 宋籽霖, 谷洁, 王小娟, 孙一凡, 江澜, 张艺冉, 陈志辉, 刘玉成

(西北农林科技大学资源环境学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 为研究牛粪厌氧发酵沼渣中多重耐药细菌的环境污染风险, 选用畜禽养殖中常用的 5 种抗生素(红霉素、氨苄青霉素、金霉素、链霉素、环丙沙星)对牛粪沼渣中可培养抗生素抗性细菌进行筛选。结果表明: 多重耐药细菌的比例高达 76.5%, 其中, 抗 5 种和 4 种抗生素的细菌分别有 11, 21 株。所有多重耐药细菌均对氨苄青霉素具有抗性, 抗红霉素、金霉素和链霉素的细菌分别占总多重耐药细菌数的 92.0%, 89.3%, 61.3%。通过细菌 16S rRNA 测序鉴定, 32 株具有 4 种以上抗性的细菌分别属于福氏志贺氏菌、摩根氏菌和假中间苍白杆菌, 均为重要的临床致病菌。使用全基因组测序对 7 株典型多重耐药细菌携带的抗性基因进行分析, 共检测出 28 种抗生素抗性基因, 对应 9 种抗生素抗性类型。通过分析抗性基因及插入序列所在位点信息发现, 多重耐药细菌普遍携带含有抗性基因和插入序列共存的质粒, 表明抗性基因具有高度的可移动性和较强的传播风险。综上所述, 牛粪沼渣中含有大量的多重耐药细菌, 可视作抗生素抗性基因的储存库, 应重视沼渣农业资源化利用过程中的环境风险监测与评估。

关键词: 沼渣; 多重耐药细菌; 抗生素抗性基因; 质粒

中图分类号: S154.3

文献标识码: A

文章编号: 1009-2242(2023)06-0350-08

DOI: 10.13870/j.cnki.stbcxb.2023.06.044

Study on Environmental Risks of Multidrug-Resistant Bacteria in Biogas Residue of Cattle Manure

HU Tao, SONG Zilin, GU Jie, WANG Xiaojuan, SUN Yifan,

JIANG Lan, ZHANG Yiran, CHEN Zhihui, LIU Yucheng

(College of Natural Resources and Environment, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract: In order to investigate the pollution risk of multidrug-resistant bacteria in biogas residue from anaerobic digestion of cattle manure, five antibiotics (erythromycin, ampicillin, chlortetracycline, streptomycin and ciprofloxacin) that commonly used in livestock and poultry breeding were used to screen the culturable antibiotic-resistant bacteria from biogas residue of cattle manure. The results showed that the proportion of multidrug-resistant bacteria was as high as 76.5%, with 11 and 21 strains of bacteria resistant to five and four antibiotics, respectively. All multidrug-resistant bacteria were resistant to ampicillin, and bacteria resistant to erythromycin, chlortetracycline and streptomycin accounted for 92.0%, 89.3% and 61.3% of the total multidrug-resistant bacteria count, respectively. Through bacterial 16S rRNA sequencing, 32 strains with more than four kinds of resistance were identified as *Shigella flexneri*, *Morganella morganii* and *Ochrobactrum pseudointermedia*, respectively, all of which were important clinical pathogens. Resistance genes carried by seven typical multi-drug resistant bacteria strains were analyzed using whole genome sequencing, and a total of 28 antibiotic resistance genes were detected, corresponding to nine antibiotic resistance types. Analysis of the antibiotic resistance genes and insertion sequences locus information revealed that multidrug-resistant bacteria generally carried plasmids containing both resistance genes and insertion sequences, indicating that these resistance genes had high mobility and strong transmission risk. In conclusion, the biogas residue of cow manure contains a large number of multidrug-resistant bacteria, which can be regarded as a reservoir

收稿日期: 2023-05-17

资助项目: 国家重点研发计划项目(2021Yfd1600400); 陕西省科技重大专项(2020zdzx03-02-01); 陕西省农业科技创新驱动项目(NYKJ-2021-YL(XN)15); 国家自然科学基金项目(32201386); 陕西省创新能力支撑计划项目(2022Pt-13)

第一作者: 胡涛(1998—), 男, 硕士研究生, 主要从事农业废弃物无害化处理与资源化利用研究。E-mail: ht@nwfau.edu.cn

通信作者: 宋籽霖(1983—), 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事农业废弃物无害化处理与资源化利用研究。E-mail: zilinsong@nwfau.edu.cn

of antibiotic resistance genes, and attention should be paid to the environmental risk monitoring and assessment during the agricultural resource utilisation of biogas residue.

Keywords: biogas residue; multidrug-resistant bacteria; antibiotic resistance gene; plasmid

抗生素在畜禽养殖业中的广泛使用,对动物肠道微生物造成持续的选择性压力,导致畜禽粪便中存在着大量的抗生素抗性细菌和抗生素抗性基因^[1]。厌氧发酵是处理畜禽粪便的有效方式,沼渣作为厌氧发酵的副产物,常被用作农作物有机肥被施加到土壤中,以提高土壤肥力,具有良好的资源化应用前景。有研究^[2]表明,厌氧发酵不能完全去除抗生素抗性细菌和抗性基因,残留在沼渣中的抗生素抗性细菌随着沼肥的农业利用进入土壤环境,将耐药基因转移给土著微生物,进而通过可食用植物的吸收或泄漏至地下水而进入人类食物链,对人类健康产生潜在的不利影响。因此,对厌氧发酵沼渣中的抗生素抗性细菌及其携带的抗生素抗性基因进行有效的分析研究,对评估沼渣农业资源化利用的环境风险至关重要。

在多种抗生素的共胁迫和水平基因转移作用下,抗生素抗性细菌会进化为具有 3 种及以上抗性的多重耐药细菌^[3]。临床上具有多重耐药性的病原菌,是人类健康最主要的威胁之一。Pulami 等^[4]在沼气厂的粪便原料和最终消化物中均检测到具有多重耐药性的重要致病菌。因此,探明沼渣中多重耐药细菌的赋存情况,对沼肥安全施用、有机农业发展及人类健康均有重要意义。

不同位点的抗性基因移动性不同,在环境中的传播风险也不同。位于染色体上的抗性基因移动性较差,难以在细菌间传播,而位于质粒等移动基因元件上的抗性基因则具有更强的移动性和传播能力。多重耐药细菌在环境中主要通过移动遗传元件介导的水平基因转移,传播并吸收多种抗生素抗性基因^[5]。质粒和转座子均是重要的移动遗传元件,携带抗性基因的转座子能够在质粒和染色体或不同质粒之间转移,促进抗生素抗性基因在环境中传播^[6]。插入序列(IS)是最简单的转座子,能够将抗性基因作为复合转座子的一部分,随机移动到细胞或 DNA 分子中^[7]。因此,有必要分析多重耐药细菌质粒上携带的抗性基因和转座子的共现情况,从而更全面地评估抗生素抗性基因的传播风险。

目前,对于牛粪发酵沼渣中多重耐药细菌的赋存情况未见报道,关于其中多重耐药细菌携带的抗生素抗性基因的传播风险也尚不清楚。鉴于此,选择牛粪厌氧发酵后的沼渣进行可培养的抗生素抗性细菌筛选,探究沼渣中多重耐药细菌的分布和对不同抗生素的抗性水平,通过全基因组测序和细菌 16S rRNA 测

序,对多重耐药细菌进行鉴定分析,明确沼渣中多重耐药细菌的种类,分析多重耐药细菌所携带的抗生素抗性基因及基因遗传信息,为评估沼渣中抗生素抗性细菌的环境风险提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 供试样品

对牛粪厌氧发酵后的沼渣进行多重耐药菌筛选。厌氧发酵的原材料牛粪于 2021 年 8 月 24 日采集自中国陕西杨凌某养牛场,并以该养牛场正常发酵池的沼液作为发酵接种物。厌氧发酵牛粪和接种物的总碳、总氮分别为 421.9, 17.5 和 278.6, 14.4 g/kg, C/N 分别为 24.1, 19.3, pH 分别为 7.34, 8.07, 固体含量分别为 17.22%, 6.50%。在 500 mL 锥形瓶(工作体积:400 mL)中进行中温厌氧消化(35 °C),接种量为 20%,总固体含量为 8%^[8]。发酵试验在恒温培养箱中进行,发酵开始前向反应器中充入氮气 5 min,以保持初始厌氧环境,发酵过程中每天手动混合 2 次。发酵实验于 2021 年 8 月 26 日至 10 月 5 日在西北农林科技大学资源环境学院进行,总周期 40 天。发酵结束后采集沼渣鲜样进行后续细菌筛选。

基础培养基:采用麦康凯琼脂(MacConkey Agar),购自青岛海博生物技术有限公司,分别含蛋白胨、乳糖、牛胆盐、氯化钠、中性红和琼脂 20, 10, 5, 5, 0.075, 12 g。使用时取麦康凯琼脂 52 g,溶解于 1 L 的蒸馏水中, pH 为 7.4, 121 °C 高压灭菌 15 min, 备用。

抗性细菌筛选培养基:向基础培养基中分别加入红霉素、氨苄青霉素、金霉素、链霉素、环丙沙星 48, 60, 16, 30, 8 µg/mL。

1.2 抗生素抗性细菌筛选

1.2.1 菌株初筛 用于筛菌的原始样本由 2 mL 沼渣和 18 mL 无菌水组成,使用螺旋接种仪(Interscience, 法国),将原液梯度稀释为 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} 浓度,并将每个稀释梯度下等分的 100 µL 菌液分别涂布在 5 种抗生素筛选培养基上(每组设置 5 个平板重复)。所有培养皿在 37 °C 厌氧培养箱中黑暗培养 48 h。

1.2.2 分离纯化 对所有单抗菌株进行显微观察,根据形态学特征进行初步去重。对于所有的单菌落,采用平板划线法进行纯化培养,新获得的单菌落再重复划线,共进行 3 次分离纯化,以确保获得完全纯化的单菌种^[9]。

1.2.3 多重抗性筛选 将纯化后的单抗细菌在 5 种不同抗生素抗性平板上进行涂布,37 °C 培养 48 h 后

观察菌落生长情况,统计各菌株对 5 种抗生素的抗性,以计算所有菌株中多重耐药细菌比例。

1.3 菌株鉴定

选择所有具有 5 种及 4 种抗生素抗性的菌株,使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(TIANamp Bacteria DNA Kit,北京天根生物技术有限公司)提取细菌 DNA,使用通用引物 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R(5'-GGTTACCTGTTACGACTT-3')扩增菌株 16S rRNA 序列。将获得的 PCR 产物送北京擎科生物科技有限公司进行测序。将获得的序列使用 MAFFT 7.037 进行多重序列比对去重,并与 NCBI 数据库进行比对,利用 Mega 10.0 构建系统发育树对菌株进行鉴定。

1.4 全基因组测序和注释

选择代表性的多重耐药细菌,在北京诺禾致源科技有限公司进行全基因组测序,以获得菌株基因和物种信息。使用 Nanopore PromethION 和 Illumina NovaSeq PE150 进行基因组测序。基因组使用 SPAdes(<https://github.com/ablab/spades>)进行组装,物种信息通过 GTDB-Tk(<https://github.com/ECogenomics/GTDBTk>)进行注释,抗生素抗性基因和质粒信息分别通过 ABRicate(<https://github.com/tseemann/abricate>)和 PlasFlow(<https://github.com/smaegol/PlasFlow>)进行注释。

2 结果与分析

2.1 沼渣中可培养细菌的抗生素抗性

使用 5 种不同类型抗生素进行单抗菌株筛选,分别为红霉素(大环内酯类)、氨苄青霉素(β -内酰胺类)、金霉素(四环素类)、链霉素(氨基糖苷类)及环丙沙星(氟喹诺酮类)。共从牛粪厌氧发酵沼渣中筛选 98 株可培养的抗生素抗性细菌,其中可培养抗性细菌对金霉素和红霉素的抗性比例最高,分别达到 32.7% 和 26.5%,具有氨苄青霉素抗性和链霉素抗性的细菌占比相似,分别为 16.3% 和 18.4%,具有环丙沙星抗性的细菌占比最低,仅为 6.1%。

进一步调查初筛的 98 株单抗细菌对不同抗生素的抗性水平,图 1 为抗性细菌抗生素抗性种类的分布。结果表明,多重耐药细菌共有 75 株,其中具有 3 种抗生素抗性的细菌数最多,占总多重耐药菌数的 43.9%。此外,能够抗 5 种和 4 种抗生素的细菌分别有 11 和 21 株。

由图 2 可知,75 株多重耐药菌对 5 种抗生素的抗性分布情况。经统计,所有多重耐药菌均对氨苄青霉素具有抗性,其次是对红霉素和金霉素具有抗性的多重耐药菌,抗性菌数目分别为 69 株和 67 株,分别占总多重耐药菌数的 92.0% 和 89.3%。对链霉素具有抗性的多重耐药菌为 46 株,占比 61.3%。多重耐药菌对环丙沙星的抗性比例最低,仅有 12 株菌具

有环丙沙星抗性,占比 16.0%。

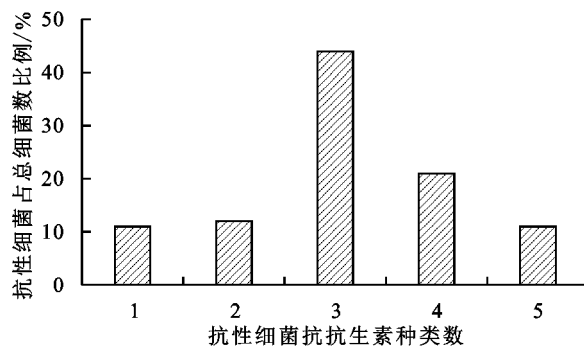


图 1 牛粪沼渣中抗性细菌抗抗生素种类数分布

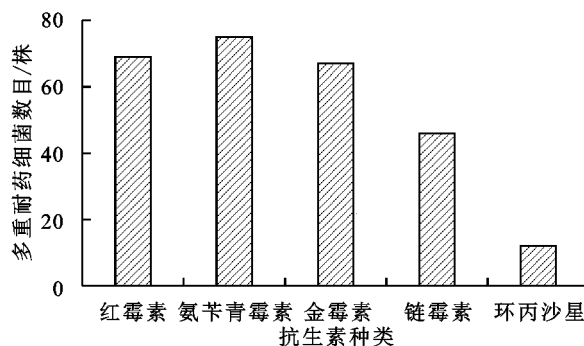


图 2 多重耐药细菌对 5 种抗生素的抗性分布

2.2 多重耐药细菌的鉴定及系统进化树构建

对 32 株具有 5 种或 4 种抗生素抗性的多重耐药菌进行 16S rRNA 测序鉴定。与 NCBI 数据库比对结果显示,32 株多重耐药菌均属于变形菌门,其中有 28 株属于福氏志贺氏菌属,3 株属于苍白杆菌属,1 株属于摩根氏菌属。多重序列比对结果显示,福氏志贺氏菌属中有 24 株菌的序列完全一致,其他 4 株菌的序列存在 1~5 处不同序列;3 株布鲁氏菌的基因序列完全吻合。通过合并相同序列的菌株,选出 7 株细菌作为典型多重耐药菌,进行后续的全基因组测序分析。

通过与 NCBI 数据库进行比对,筛选下载同源序列以及典型菌株的 16S rRNA 基因序列,在 Mega 10.0 中构建系统进化树,显示牛粪沼渣中部分多重耐药细菌的系统进化树(图 3)。有 6 株多重耐药菌聚集在福氏志贺氏菌属,且与 *Shigella flexneri* SGM2 亲缘性最高,最终鉴定为福氏志贺氏菌。HT27 与 *Morganella morganii* M11 亲缘性最高,最终被鉴定为摩根氏菌。HT13、HT15 和 HT17 均属于布鲁氏菌科苍白杆菌属,与 *Ochrobactrum pseudintermedium* ADV43 亲缘性最高,被鉴定为假中间苍白杆菌。

2.3 多重耐药细菌所携带的抗性基因多样性及遗传环境

使用全基因组测序对 7 株典型多重耐药细菌的抗性基因进行分析,共检测出 28 种抗生素抗性基因,分别对应 9 种抗生素抗性类型(表 1)。表 2 显示 7 株多重耐药菌所携带的抗生素抗性基因及插入序列所在位点信息。分析结果表明, β -内酰胺类抗性基因在菌株的中的

检出率达到 100%,且种类最多。其次是四环素类抗性基因,在除 *Ochrobactrum pseudintermedium* HT13 外的所有菌株中均被检出。氨基糖苷类抗性基因在福氏志贺氏菌中均被检出。值得注意的是,另外 4 种并未使用

的抗生素对应的抗性基因在一些菌株中也被检出,如磺胺类抗性基因(*sul2,sul3,dfrA7,dfrA14*)和酰胺醇类抗性基因(*floR,catA2*),表明多重耐药菌株可能对更多种类的抗生素存在抗性。

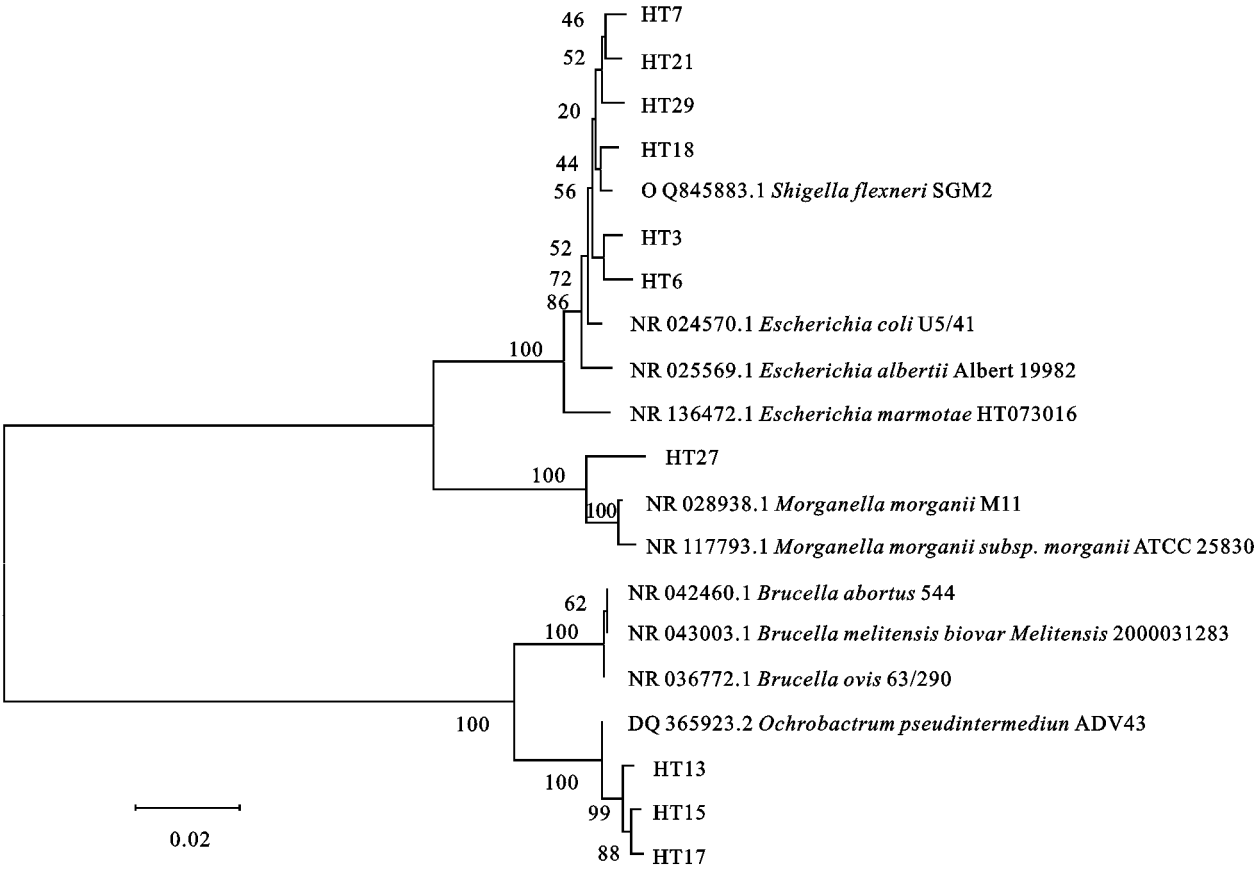


图 3 牛粪沼渣中部分多重耐药细菌的系统进化树

表 1 多重耐药细菌所携带的抗生素抗性基因种类

抗性类型	抗性基因
β-内酰胺类	<i>blaTEM</i> -1, <i>blaLAP</i> -2, <i>blaCTX</i> -M-55, <i>blaEC</i> , <i>blaEC</i> -15, <i>blaEC</i> -18, <i>blaOCH</i> -3, <i>blaDHA</i> -10
四环素类	<i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>tetD</i>
氨基糖苷类	<i>aph</i> (6)-Id, <i>aph</i> (3)-Ib, <i>aadA22</i> , <i>aph</i> (3)-Ia, <i>aac</i> (3)-IIId
氟喹诺酮	<i>qnrS1</i> , <i>qnrD1</i>
大环内酯	<i>mphA</i> , <i>mphB</i>
磺胺	<i>sul2</i> , <i>sul3</i> , <i>dfrA7</i> , <i>dfrA14</i>
酰胺醇类(氯霉素;氟苯尼考)	<i>floR</i> , <i>catA2</i>
利福霉素	<i>arr</i> -2
林可霉素	<i>linG</i>

进一步鉴定 7 株多重耐药菌株所携带的抗生素抗性基因和插入序列所在位点,以剖析菌株中抗生素抗性基因的遗传环境和传播风险。在 7 株多重耐药细菌中,仅 *Shigella flexneri* HT6 和 *Ochrobactrum pseudintermedium* HT13 仅携带位于染色体上的抗生素抗性基因,其余 5 株多重耐药细菌普遍携带位于质粒上的抗生素抗性基因。*Shigella flexneri* HT6 携带位于染色体上的 *tetA*、*blaEC*-18 和 *mphB* 3 种抗性基因,对除环丙沙星外的 4 种抗生素均表现出抗性。虽然,该菌株未直接携带氨基糖苷类的抗生素抗性基因,但在其

染色体上发现氨基糖苷外排泵 *acrD*,导致其对链霉素表现出抗性。*Ochrobactrum pseudintermedium* HT13 仅携带位于染色体上的 *blaOCH*-3,但对 5 种抗生素均表现出抗性。位于染色体上的抗性基因更易通过世代垂直遗传进行传播。

四抗菌株 *Shigella flexneri* HT7 含有 pHT7-1、pHT7-2 和 pHT7-3 的 3 个质粒,其长度分别为 9 132, 8 006, 6 311 bp,遗传图谱通过 Geneious Prime 可视化(图 4)。*floR*、*tetA* 同时位于质粒 pHT7-1 上,且该质粒上检测出 *ISVsa3*、*ISKpn19*

2 个插入序列。质粒 pHT7-1 的图谱显示 *ISVsa3* 与 *floR* 相距仅 1 135 bp, *ISKpn19* 与 *tetA* 仅 747 bp,表明该质粒具有很高的抗性基因传播潜力。pHT7-2 上同时含有 *blaLAP-2*、*qnrS1* 及 3 段 *ISKpn19* 插入序列。pHT7-3 上携带的 *aph(6)-Id*、*aph(3'')-Ib* 和 *sul2* 距离很近,表明 3 个基因可能更易同时进行转移传播。值得注意的是 *aph(6)-Id*、*aph(3'')-Ib* 在 *Shigella flexneri* HT3 的染色体上也被检出,意味着 2 个基因既可以遗传给后代细菌又能够向其他细菌传播。

在所有菌株中 *Shigella flexneri* HT29 含有最多抗性基因数和质粒数,且 10 个质粒中有 4 个质粒上存在抗生素抗性基因与插入序列的共现。图 5 显示 pHT29-1 和 pHT29-2 的遗传图谱。pHT29-2 质粒中存在 3 种广谱 β -内酰胺类抗性基因,分别为 *blaCTX-M-55*、*blaLAP-2* 和 *blaTEM-1*。质粒图谱表明在 pHT29-2 质粒中同时存在插入序

列 *ISEc9*、转座子 *Tn2* 和 DNA 转化酶 *tnpR* 分布在 3 种抗性基因周围。其中 *blaCTX-M-55* 的上下端被 *Tn2* 和 *ISEc9* 包围,表明该基因具有高度可移动性。总体而言,*Shigella flexneri* HT29 具有较强的抗性基因传播风险。

Shigella flexneri HT18 对 5 种抗生素均表现出抗性,注释结果表明,该菌株携带对应抗生素的 *tetA*、*aph(3'')-Ib*、*blaTEM-1*、*mphB* 等抗性基因。同时在该菌株的染色体上还发现 *emrB*、*emrA* 和 *emrR* 多药外排泵调剂基因,赋予该菌株氟喹诺酮类抗生素抗性。

Morganella morganii HT27 具有 4 种不同类型的抗生素抗性基因分别位于 4 条质粒上,其中 pHT27-1 (图 6a)和 pHT27-3(图 6b)上均存在插入序列与抗生素抗性基因的共现。值得注意的是,该菌株染色体上存在全局调控因子 *CRP*,能够控制 *mdtEF* 多药外排泵表达,从而对大环内酯类抗生素产生耐药性。

表 2 多重耐药细菌所携带的抗生素抗性基因和插入序列所在位点

菌株	基因位点	片段大小/bp	基因	插入序列
<i>Shigella flexneri</i> HT3	pHT3-1	94979	<i>blaTEM-1</i>	<i>IS1133</i>
	pHT3-2	6651	<i>tetB</i>	/
	染色体	/	<i>mphA</i> , <i>aph(6)-Id</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>blaEC-18</i>	/
<i>Shigella flexnerii</i> HT6	染色体	/	<i>tetA</i> , <i>blaEC-18</i> , <i>mphB</i> , <i>acrD</i>	/
<i>Shigella flexneri</i> HT7	pHT7-1	9132	<i>floR</i> , <i>tetA</i>	<i>ISVsa3</i> , <i>ISKpn19</i>
	pHT7-2	8006	<i>blaLAP-2</i> , <i>qnrS1</i>	<i>ISKpn19</i>
	pHT7-3	6311	<i>aph(6)-Id</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>sul2</i>	<i>IS5075</i>
	染色体	/	<i>mphB</i> , <i>blaEC-15</i> , <i>acrD</i>	/
<i>Shigella flexneri</i> HT18	pHT18-1	19993	<i>tetA</i>	/
	pHT18-2	2716	<i>dfrA7</i>	/
	pHT18-3	2591	<i>floR</i>	/
	pHT18-4	1886	<i>aph(6)-Id</i> , <i>aph(3'')-Ib</i>	/
	pHT18-5	1593	<i>blaTEM-1</i>	/
	染色体	/	<i>blaEC</i> , <i>acrD</i> , <i>mphB</i> , <i>emrR</i> , <i>emrA</i> , <i>emrB</i>	/
	pHT29-1	16391	<i>sul3</i>	<i>IS1B</i>
	pHT29-2	11033	<i>blaCTX-M-55</i> , <i>blaLAP-2</i> , <i>blaTEM-1</i>	<i>ISEc9</i>
	pHT29-3	6368	<i>floR</i>	<i>ISKpn19</i>
	pHT29-4	4409	<i>qnrS1</i>	<i>ISVsa3</i> , <i>ISKpn19</i>
<i>Shigella flexneri</i> HT29	pHT29-5	4091	<i>tetA</i>	/
	pHT29-6	3908	<i>aac(3)-IIId</i>	/
	pHT29-7	3704	<i>mphA</i>	/
	pHT29-8	2401	<i>arr-2</i> , <i>dfrA14</i>	/
	pHT29-9	1992	<i>ant(3'')-IIa</i> , <i>linG</i>	/
	pHT29-10	1333	<i>aph(3'')-Ia</i>	/
	染色体	/	<i>blaEC-18</i>	/
	染色体	/	<i>blaOCH-3</i>	/
	pHT27-1	151031	<i>tetD</i>	<i>ISCfr4</i>
	pHT27-2	103443	<i>blaDHA-10</i>	/
<i>Morganella morganii</i> HT27	pHT27-3	69575	<i>catA2</i>	<i>ISEc75</i>
	pHT27-4	2760	<i>qnrD1</i>	/
	染色体	180451	<i>CRP</i>	/

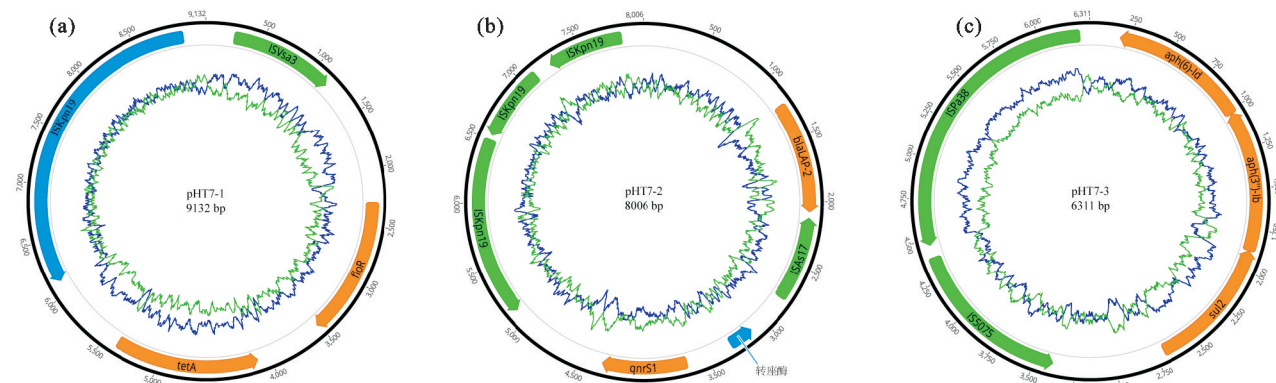


图 4 *Shigella flexneri* HT7 质粒图谱

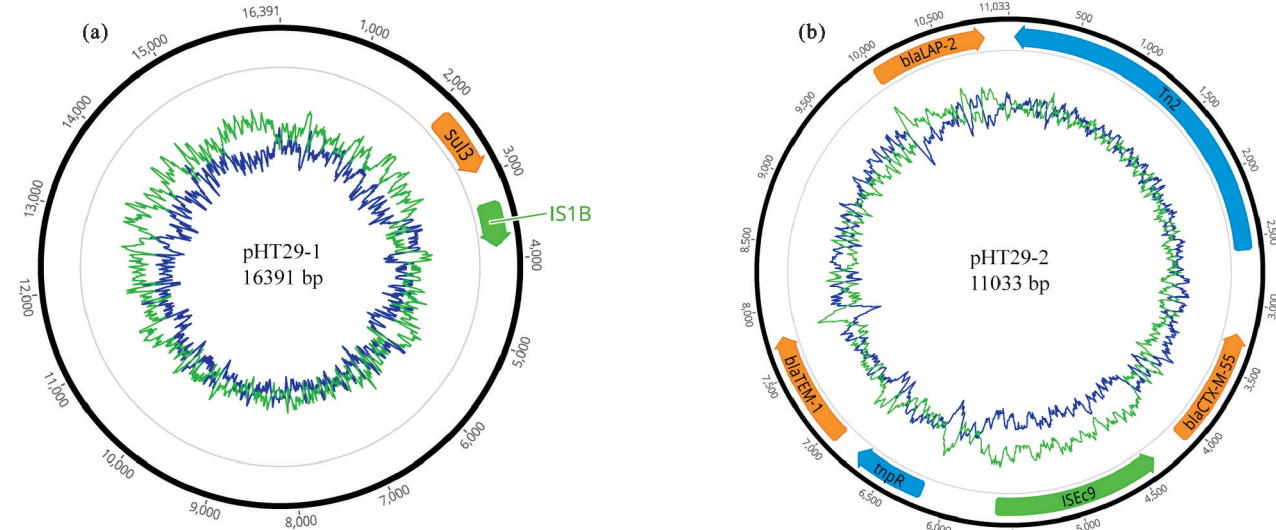


图 5 *Shigella flexneri* HT29 部分质粒图谱

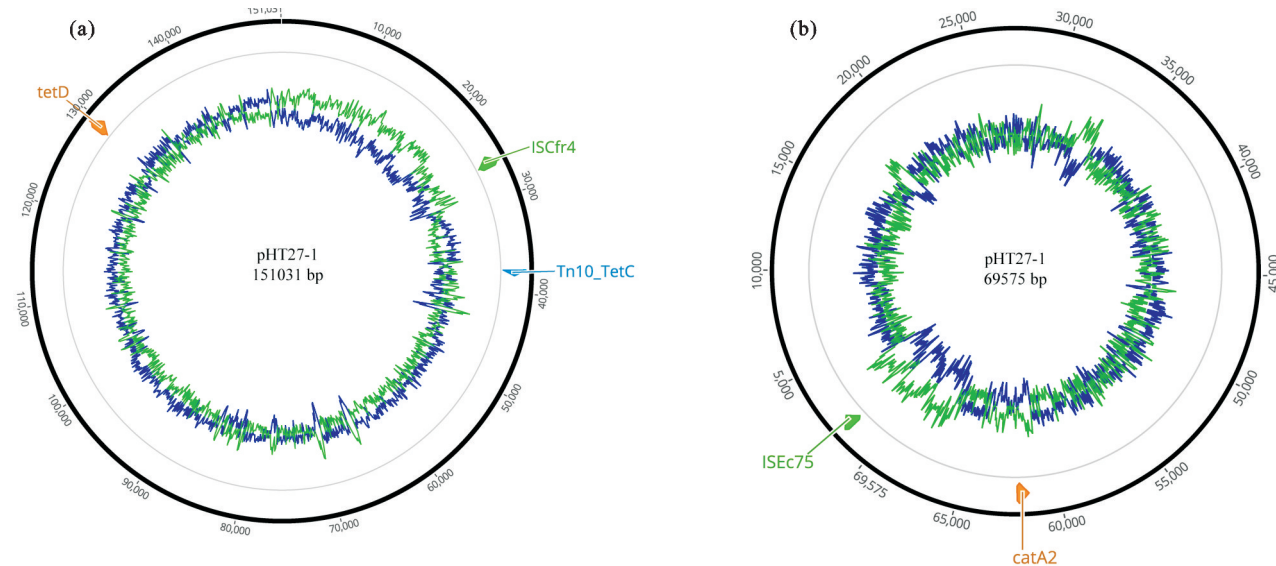


图 6 *Morganella morganii* HT27 部分质粒图谱

3 讨论

抗生素在畜禽养殖业的大量使用导致畜禽粪便中抗生素抗性细菌数量剧增,特别是多重耐药细菌和抗性致病菌的传播对环境 and 人类健康造成严重威胁。大量研究^[10]发现,厌氧发酵对抗生素抗性细菌和抗性基因的去除效果有限,导致沼渣中仍残留有大量的抗生素抗性细菌。本试验表明,牛粪厌氧发酵沼渣中

普遍存在抗生素抗性细菌,且筛选出的 98 株抗生素抗性细菌对金霉素和红霉素的抗性比例最高,2 类抗生素在养殖业中的高使用率可能是导致沼渣中可培养细菌对其抗性比例高的主要原因^[11]。

本试验中,多重耐药细菌比例达到 76.5%,表明厌氧发酵并不能完全去除来源于畜禽粪便的多重耐药细菌,在牛粪沼渣中多重耐药细菌仍普遍存在。Beneraga-

ma 等^[12]在中温条件下进行以奶牛粪为原料的厌氧发酵试验,在该发酵系统的产物中同样检测到多重耐药细菌的存在。广谱类抗生素的大量开发使用,促进抗生素抗性基因在细菌间和不同物种之间的水平转移,是导致环境中多重耐药细菌数量增加的重要原因^[13]。随着沼渣在土壤中的施用,具有强环境适应性的多重耐药细菌,造成土壤微生物群落的变化,成为优势群体而大量繁殖,对公共卫生安全造成严重威胁。

近年来,多项研究^[14]表明,沼渣中普遍存在抗生素抗性基因残留。本试验在典型多重耐药细菌中检测多种不同类型的抗生素抗性基因,且在所有典型多重耐药细菌中均检出 β -内酰胺类抗性基因,包括 *blaTEM*-1, *blaEC* 等,能够对青霉素和头孢菌素产生耐药性^[15],解释了多重耐药菌株对青霉素的 100% 耐药率的结论。Schauss 等^[16]在沼气厂的消化产物中筛选到 43 株携带广谱类 β -内酰胺类抗性的大肠杆菌,均表现出对青霉素类抗生素的高耐药性,与本研究结果一致。随着沼渣在土壤中的施用,抗生素抗性基因可以在土壤环境中持续存在。Cao 等^[17]研究发现,施用猪粪厌氧发酵沼渣后的苹果园土壤中的抗生素抗性基因相对丰度是原始土壤的 1.4 倍,在苹果表皮上检测到的抗性基因丰度是原始土壤的 122.5 倍。因此,沼渣在农业利用过程中的抗生素抗性基因风险不容忽视。

沼渣中多重耐药细菌的致病性是其环境风险的主要因素之一。菌株鉴定结果显示,从沼渣中分离出的 32 株具有 4 种以上抗性的细菌分别属于福氏志贺氏菌,摩根氏菌和假中间苍白杆菌,也有研究^[18-20]表明,以上 3 种菌均为重要的人类致病菌。随着沼渣在土壤中的施用,残留在环境中的致病菌可能通过多种途径进入人体,危害人类健康。

多重耐药细菌向其他细菌传播抗生素抗性基因的能力是其环境风险最重要因素。质粒是介导抗生素抗性基因进行水平基因转移的重要移动遗传元件,位于质粒上的抗生素抗性基因随质粒移动在细菌间传播^[21]。本试验中,5 株多重耐药细菌的大部分抗性基因均位于质粒上,表明沼渣中多重耐药细菌所携带的抗性基因普遍具有可移动性。位于质粒上的基因,更易通过水平基因转移作用,传播到土著微生物当中,通过食物链对人类健康造成危害。Zhang 等^[22]研究认为,在抗生素抗性基因上下端 5 000 bp 范围内存在的移动遗传元件,会赋予抗性基因高度的可移动性。插入序列位点分析显示, *Shigella flexneri* HT7 和 *Shigella flexneri* HT29 的质粒中均存在插入序列和抗性基因共存且距离接近的情况,意味着抗性基因将具有高度的传播风险。根据 Zhang 等^[23]基于微生物组学提出的抗生素抗性基因的健康风险评估框架,本试验中,检出的

aph(6)-*Id*、*blaTEM*-1 和 *floR* 等基因均属于 I 类高风险抗性基因,与人类高度相关且具有很强的移动性和致病性。高风险基因存在于 *Shigella flexneri* HT29 等多个多重耐药细菌中,也进一步凸显出沼渣中多重耐药细菌的高环境风险。

值得注意的是, *Ochrobactrum pseudintermedium* HT13 仅携带位于染色体上的 *blaOCH*-3,能够对 5 种抗生素均表现出抗性。 *Ochrobactrum pseudintermedium* 被认为是重要的机会性致病菌^[24]。 *Ochrobactrum* 物种由于能够产生可诱导的和染色体编码的 *ampC* 型 β -内酰胺酶,该属的成员对 β -内酰胺类抗菌剂表现出耐药性^[25]。Alonso 等^[26]在 24 株 *Ochrobactrum* 分离细菌中均检出 *blaOCH*,且所有分离菌株均对广谱 β -内酰胺类、氨基青霉素及链霉素具有耐药性,45.8% 的分离菌株对环丙沙星具有耐药性,与本试验研究结果相似。因此,牛粪沼渣可能是多重耐药 *Ochrobactrum* 物种和 *ampC* 型基因的重要来源之一。

总之,沼渣是多重耐药细菌和抗生素抗性基因的重要富集点,多重耐药细菌的致病性以及多重耐药细菌携带的质粒中存在的插入序列与抗性基因共现情况,进一步增加多重耐药细菌的环境风险和抗性传播能力。

4 结论

从牛粪沼渣中共筛选出 98 株抗生素抗性细菌,其中多重耐药细菌的比例高达 76.5%,多重耐药细菌对氨基青霉素、红霉素、金霉素和链霉素的抗性比例达到 61.3%~100%。32 株具有 4 种以上抗性的细菌经鉴定后分别属于福氏志贺氏菌、摩根氏菌和假中间苍白杆菌,均为重要的临床致病菌。在 7 株典型多重耐药细菌的染色体和质粒中共检测出 28 种抗生素抗性基因,其中 5 株细菌的大部分抗性基因均由质粒携带,且普遍存在抗性基因和插入序列在质粒中共存的情况,表明多重耐药细菌所携带的抗性基因具有高度的可移动性,更易通过水平基因转移作用在环境中传播。综上所述,多重耐药细菌在牛粪沼渣中分布广泛,具有较强的抗生素抗性基因传播风险,因此,在牛粪沼渣农业资源化应用过程中开展相关的环境风险评估,并采取有效手段进一步削减抗生素抗性细菌和抗生素抗性基因,对保障沼渣的安全使用至关重要。

参考文献:

- [1] Sarmah A K, Meyer M T, Boxall A B A. 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.
- [2] Sui Q W, Meng X S, Wang R, et al. Effects of endogenous inhibitors on the evolution of antibiotic resistance genes during high solid anaerobic digestion of swine

- manure[J].Bioresource Technology,2018,270:328-336.
- [3] Bennett P M. Plasmid encoded antibiotic resistance: Acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria[J]. British Journal of Pharmacology,2008,153(1):347-357.
- [4] Pulami D, Schauss T, Eisenberg T, et al. *Acinetobacter baumannii* in manure and anaerobic digestates of German biogas plants [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2020,96(10):e176.
- [5] Lin L, Ling B D, Li X Z. Distribution of the multidrug efflux pump genes, *adeABC*, *adeDE* and *adeIJK*, and class 1 integron genes in multiple-antimicrobial-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*-*Acinetobacter calcoaceticus* complex [J]. International Journal of Antimicrobial Agents,2009,33(1):27-32.
- [6] Ellabaan M M H, Munck C, Porse A, et al. Forecasting the dissemination of antibiotic resistance genes across bacterial genomes [J]. Nature Communications, 2021,12(1):e2435.
- [7] Lartigue M F, Poirel L, Aubert D, et al. In vitro analysis of *ISEcp1B*-mediated mobilization of naturally occurring β -lactamase gene *bla_{CTX-m}* of *Kluyvera ascorbata* [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy,2006,50(4):1282-1286.
- [8] Sun W, Qian X, Gu J, et al. Mechanism and effect of temperature on variations in antibiotic resistance genes during anaerobic digestion of dairy manure[J].Scientific Reports,2016,6:e30237.
- [9] 周俊雄,马荣琴,李冬松,等.家养禽类肠道可培养细菌抗生素抗性的种类、数量和分布[J].福建农林大学学报(自然科学版),2016,45(1):56-64.
- [10] Wolters B, Ding G C, Kreuzig R, et al. Full-scale mesophilic biogas plants using manure as C-source: Bacterial community shifts along the process cause changes in the abundance of resistance genes and mobile genetic elements[J].FEMS Microbiology Ecology,2016,92(2):e163.
- [11] Zhang Q Q, Ying G G, Pan C G, 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 and Technology,2015,49(11):6772-6782.
- [12] Beneragama N, Iwasaki M, Lateef S A, et al. The survival of multidrug-resistant bacteria in thermophilic and mesophilic anaerobic co-digestion of dairy manure and waste milk [J]. Animal Science Journal,2013,84(5):426-433.
- [13] 牛天琦.鸡粪中多重耐药细菌的分离鉴定及介导抗性基因水平转移元件的检测[D].河南 新乡:河南师范大学,2015.
- [14] 贺南南.沼液及施用沼液土壤中抗生素和抗生素抗性基因的污染特征研究[D].南京:南京农业大学,2017.
- [15] Bailey J K, Pinyon J L, Anantham S, et al. Distribution of the *bla_{TEM}* gene and *bla_{TEM}*-containing transposons in commensal *Escherichia coli* [J].Journal of Antimicrobial Chemotherapy,2011,66(4):745-751.
- [16] Schauss T, Glaeser S P, Gütschow A, et al. Improved detection of extended spectrum beta-lactamase (ES-BL)-producing *Escherichia coli* in input and output samples of German biogas plants by a selective pre-enrichment procedure [J]. PLoS One, 2015, 10 (3): e0119791.
- [17] Cao H, Jiao Q, Cheng L M, et al. Occurrence and prevalence of antibiotic resistance genes in apple orchard after continual application of anaerobic fermentation residues of pig manure[J].Environmental Science and Pollution Research,2023,30(11):29229-29242.
- [18] Nisa I, Qasim M, Yasin N, et al. *Shigella flexneri*: An emerging pathogen[J].Folia Microbiologica,2020,65(2):275-291.
- [19] Zaric R Z, Jankovic S, Zaric M, et al. Antimicrobial treatment of *Morganella morganii* invasive infections: Systematic review[J].Indian Journal of Medical Microbiology,2021,39(4):404-412.
- [20] Ryan M P, Pembroke J T. The genus *Ochrobactrum* as major opportunistic pathogens [J]. Microorganisms, 2020,8(11):e1797.
- [21] Sommer M O A, Munck C, Toft-Kehler R V, et al. Prediction of antibiotic resistance: Time for a new preclinical paradigm? [J].Nature Reviews Microbiology,2017,15(11):689-695.
- [22] Zhang Z Y, Zhang Q, Wang T Z, et al. Assessment of global health risk of antibiotic resistance genes [J]. Nature Communications,2022,13(1):e1553.
- [23] Zhang A N, Gaston J M, Dai C L, et al. An omics-based framework for assessing the health risk of antimicrobial resistance genes[J].Nature Communications, 2021,12(1):e4765.
- [24] Leclercq S O, Cloeckaert A, Zygmunt M S. Taxonomic organization of the family *Brucellaceae* based on a phylogenomic approach[J].Frontiers in Microbiology, 2020,10:e3083.
- [25] Higgins C S, Murtough S M, Williamson E, et al. Resistance to antibiotics and biocides among non-fermenting Gram-negative bacteria [J]. Clinical Microbiology and Infection,2001,7(6):308-315.
- [26] Alonso C A, Kwabugge Y A, Anyanwu M U, et al. Diversity of *Ochrobactrum* species in food animals, antibiotic resistance phenotypes and polymorphisms in the *bla_{OCH}* gene [J]. FEMS Microbiology Letters, 2017,364(17):e178.