

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (4) :457 - 466; 4 April 2015
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140352

肉鸭发酵床抗生素、重金属累积及细菌耐药性的演变特性

林勇^{1,2#}, 章小婷^{1#}, 计徐¹, 邹雪婷¹, 赵伟², 施振旦², 顾洪如², 姚文^{1*}

¹南京农业大学动物科技学院, 江苏 南京 210095

²江苏省农业科学院畜牧研究所, 江苏 南京 210014

摘要:【目的】了解肉鸭发酵床使用过程中抗生素、各类金属元素累积特性, 细菌抗生素耐受性演变特性。【方法】2011年11月至2013年7月, 江苏某肉鸭发酵床养殖场饲养肉鸭期间, 选取刚制作完成发酵床的鸭舍, 和饲养4批次、8批次肉鸭时的鸭舍, 检测发酵床中抗生素、金属元素含量, 及发酵床中细菌的抗生素耐受水平。【结果】肉鸭发酵床垫料内强力霉素残留量因每批次肉鸭饲料中的使用而显著上升, 氧氟沙星未现在垫料内累积。发酵床垫料饲养至8批次肉鸭时, 垫料内耐受16、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 强力霉素三种可培养细菌的平均菌落数与比例为最高, 而耐受8、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氧氟沙星的平均菌落数、菌落数比例未现明显的增长趋势。发酵床使用过程中, 垫料内As、Pb、Hg元素含量未显著增加, Cd元素检测量极低, Zn、Mn元素含量增加趋势明显, Cu、Cr元素累积速度缓慢。【结论】每批次使用强力霉素可在多批次肉鸭饲养后显著增加发酵床垫料中强力霉素含量, 显著增强垫料中肠道菌群耐受强力霉素能力, Zn、Mn元素含量总体呈上升趋势。

关键词: 发酵床, 抗生素, 金属, 耐药, 累积

中图分类号: R37 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 04-0457-10

肉鸭发酵床早养模式是一种基于控制鸭只粪便排放与污染、特殊饲养设施设计的新型养殖方式, 可解决肉鸭规模饲养带来的严重环境污染问题。发酵床体主要由木屑、稻壳以及各类农作物秸秆混制而成, 以商品菌剂、肉鸭排泄物、环境等来源微生物为接种物, 床体为微生物的生长提供了各类有机与无机养分^[1-3], 以及适宜的温湿度条件, 也为各类细菌特别是重要致病菌间的耐药基因水平转移创造了类似于动物肠道环境的绝佳场所^[4]。目前, 畜禽养殖业依赖使用各类抗生素来满足动物疫病防治、促生

长等生产需求^[5], 这些抗生素除部分吸收以外, 也会以原形或代谢物形式进入发酵床, 并伴随发酵床使用时间的延长而累积^[1], 这或将促使发酵床内细菌面对抗生素的直接选择作用而加快耐药性的进化和传播^[6]; 另外, 面对养殖环境中重金属高残留量的选择压力, 同一遗传片段中的耐重金属、耐药基因可在同一微生物区系的不同菌体间共同水平转移与表达^[7], 这也是近年来一些欧盟国家严格限制使用抗生素后仍未能有效控制细菌耐药性的进化与传播的可能原因^[8]。

基金项目: 国家自然科学基金项目(31372321); 国家重大基础计划项目(973)(2012CB017576); 江苏省农业科技自主创新资金 [CX(14)2079]

* 通信作者。Tel: +86-25-84395523; E-mail: yaowen67jp@njau.edu.cn

作者简介: # 共同第一作者。林勇(1982-), 男, 江苏江阴人, 助理研究员, 博士研究生, 从事肠道微生物与家禽生态养殖研究, E-mail: linyong0616@yeah.net; 章小婷(1990-), 女, 浙江金华人, 硕士研究生, 从事肠道微生物与家禽生态养殖研究, E-mail: zhangxiaoting1002@126.com

收稿日期: 2014-07-08; 修回日期: 2014-09-10

发酵床中抗生素、金属的持续累积不仅可直接影响发酵床的使用效果与使用年限,还将因触发、加速发酵床内细菌耐药性的进化与传播而严重危及畜禽养殖、人类的生物安全性。目前,国内有关该养殖方式下抗生素、各类金属元素累积特性,重要致病菌抗生素耐药特性的演变及相关影响因素的研究鲜有报道。本研究依据鸭场饲养肉鸭过程中防治大肠杆菌病、沙门氏菌病的抗生素使用类别与用量,追踪研究发酵床使用过程中相应抗生素、饲料源金属累积特性,以及总菌与肠道菌群耐药能力演变特性,并尝试将细菌耐药能力与发酵床内抗生素、各金属残留量进行相关性分析与初步探讨,以便为改善发酵床垫料的生物与生态安全性提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 采样地点

样品采集地为江苏某肉鸭发酵床养殖场。每栋鸭舍发酵床垫料均采用相同原料与比例、同批次制作而成,垫料主要由木屑、稻壳、少量麸皮按特定比例混合制作而成,厚约 40 cm,选取 3 栋未饲养肉鸭、未接种菌剂的垫料进行取样并作为对照(0 批次)。发酵床自 2011 年 11 月制作完成并投入使用,初次使用时接种有芽孢杆菌与放线菌等菌剂,至 2013 年 7 月间共饲养 8 批次樱桃谷肉鸭。每批次肉鸭 1-15 日龄期间于特定育雏舍进行育雏,15 日龄至出栏时(38-39 日龄)均于发酵床鸭舍饲养。每栋饲养 1200-1800 羽,饲养密度为 2.4-3.6 羽/平米,待饲养至 34 日龄(进入鸭舍第 20 天)时进行垫料采样。发酵床垫料在使用过程中存在消耗,一旦发酵床垫料消耗接近 40%,就必需及时添加新的垫料与发酵床启动菌剂,以维系发酵床的有效发酵。本研究为避免新添加垫料及菌剂对研究结果的影响,选取垫料消耗未超过 40% 的时期进行采样,设

置了 0、4、8 批次 3 个采样时间点,期间每 2 天需充分翻耙垫料 1 次,饲养期间雇佣同一批饲养员。

1.2 采样方法

本试验于饲养 0、4、8 批次肉鸭时,跟踪采集 3 栋鸭舍(长:53 m,宽:9.5 m)的垫料样品。进入不同鸭舍时,试验人员均需更换无菌手套、鞋套,并佩戴医用口罩,按照五点采样法采集相邻 5 个点的发酵床垫料样品,将各点垫料充分混匀后分别装入各个无菌冻存管,立即放入冷藏盒内,并于 1 小时内带入实验室立即进行细菌计数试验或者放入 -30℃ 冰箱保存,用于金属与抗生素含量测定。

1.3 发酵床强力霉素含量测定

1.3.1 样品前处理:准确称取无抗样品 1.00 g,加入强力霉素标准替代物 500 ng 作为回收率指示物,并加入 5 mL McIlvaine-Na₂EDTA 缓冲液,漩涡 1 min,振荡 10 min,再 2800 × g 离心 10 min,取上清,残渣中再加入 5 mL McIlvaine-Na₂EDTA 缓冲液重复提取 1 次(方法同上),然后 4400 × g 离心 10 min,合并两次上清,快速过滤。取待测溶液注入预先用 5 mL 甲醇,5 mL 水以及 5 mL McIlvaine-Na₂EDTA 活化的 HLB 小柱中,用 5 mL 5% 甲醇水溶液淋洗,弃去淋洗液,用 10 mL 甲醇:乙酸乙酯(V/V 为 1:9)溶液洗脱,收集洗脱液,样品装载和洗脱过程流速 0.5 mL/min,洗脱液于 40℃ 水浴中氮气吹干,用 1 mL 甲醇溶解残留物,涡旋混合 1 min,过 0.45 μm 滤膜后供 LC-MS/MS 测定。其余待测垫料样品方法同上。

1.3.2 色谱条件:色谱柱:Agilent RX-C8 (150 × 2.1 mm,3.5 μm),流速:0.3 mL/min;柱温:30℃;进样量:10 μL。流动相:0.1% 甲酸水(A),乙腈(B),洗脱梯度为:0 min (10% B) → 2 min (20% B) → 2.01 min (23% B) → 5 min (35% B) → 8 min (77% B) → 13 min (77% B) → 13.01 min (10% B) → 20 min (10% B)。

1.3.3 质谱条件:离子化模式:ESI+;脱溶剂气温:300℃,脱溶剂气流速:12 L/min。其它条件见表 1。

表 1. 强力霉素和氧氟沙星的优化质谱条件

Table 1. The mass spectral parameters of doxycycline and ofloxacin

Antibiotics	Precursor ion/(m/z)	Fragmentor/V	Product ion/(m/z)	Collision energy/(eV)
Doxycycline	445.1	135	428.2	15
			321	25
			154	28
Ofloxacin	362.1	95	318.1	15
			261	25

1.4 发酵床氧氟沙星含量测定

1.4.1 样品前处理: 准确称取无抗样品 1.00 g, 加入氧氟沙星标准替代物 400 ng 作为回收率指示物, 并加入 3 mL 磷酸盐提取液, 漩涡 1 min, 振荡 10 min, 再 $1100 \times g$ 离心 10 min, 取上清, 残渣中再加入 3 mL 磷酸盐提取液重复提取一次 (方法同上), 然后 $3600 \times g$ 离心 10 min, 合并两次上清, 快速过滤。取待测溶液注入预先用 2 mL 乙腈, 2 mL 乙腈 (40%) - 缓冲液和 2 mL 磷酸盐提取液活化的 HLB 小柱中, 用 5 mL 水淋洗, 弃去淋洗液, 用乙腈 (40%) - 缓冲液洗脱, 收集洗脱液, $21100 \times g$ 离心 5 min, 经过 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜后供 LC-MS / MS 测定。其余待测垫料样品方法同上。

1.4.2 色谱条件: 色谱柱: Agilent XDB-C8 ($150 \times 2.1 \text{ mm}$, 3.5 m), 流速: 0.3 mL/min ; 柱温: 25°C ; 进样量: $10 \mu\text{L}$ 。流动相: 5 mmol/L 乙酸铵 (A), 乙腈 (B), 洗脱梯度为: 0 min (15% B) \rightarrow 1 min (20% B) \rightarrow 2 min (20% B) \rightarrow 2.01 min (30% B) \rightarrow 10 min (35% B) \rightarrow 10.01 min (15% B)。

1.4.3 质谱条件: 同上, 其它检测参数见表 1。

1.5 发酵床金属含量测定

肉鸭配合饲料 (15 - 39 日龄) 与发酵床垫料 As、Zn、Pb、Cd、Fe、Hg、Mn、Cr、Cu 含量测定: 用硝酸: 高氯酸 = 4:1 在 $130 - 170^\circ\text{C}$ 条件下消煮。采用 ICP (Inductively Coupled Plasma) 电感耦合等离子体测定样品中全量含量。

1.6 发酵床各类细菌耐受强力霉素、氧氟沙星计数

准确称取每栋鸭舍各采样点样品 2 g, 将 10 g 垫料样/栋放入含 90 mL 无菌 PBS 的锥形瓶中 (含玻璃珠), 漩涡 3 min 制成垫料悬液并进行 10 倍系列稀释, 选择 3 个适宜稀释度的样品匀液, 各取 200 mL 分别加入平板计数琼脂培养基 (PCA), 麦康凯琼脂培养基 (Mac), SS 琼脂培养基 (SS), 以及含两种浓度梯度强力霉素 ($16, 100 \mu\text{g/mL}$) 或者氧氟沙星 ($8, 50 \mu\text{g/mL}$) 的以上 3 种培养基, 每个稀释度做 3 个平行培养皿^[9]。每个平板倒置于 37°C 恒温培养箱, 培养 24 h 后对各种培养基分别计数。加入培养基的抗生素均按照药物本身的效价进行计算与称重。含强力霉素 ($16, 100 \mu\text{g/mL}$) 或者氧氟沙星 ($8, 50 \mu\text{g/mL}$) 的培养基上生长菌落, 定为耐受该浓度药物的菌落^[10]。随机挑取并分离含 $16 \mu\text{g/mL}$ 强力霉素或者 $8 \mu\text{g/mL}$ 氧氟沙星的 Mac 平板上的大

肠杆菌进行强力霉素、氧氟沙星敏感性测定, 检验培养基上生长菌落最低抑菌浓度值 (MIC 值) 是否分别 $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ 或者 $\geq 8 \mu\text{g/mL}$ 。

耐受某浓度抗生素菌落数比例 = 该浓度抗生素平板菌落计数 / 对应未加抗生素平板菌落计数。 $16, 8 \mu\text{g/mL}$ 分别为参照美国临床与实验标准协会 (CLSI, 2012) 判定大肠杆菌耐受强力霉素与氧氟沙星的临界点, $100, 50 \text{ mg/kg}$ 分别为强力霉素与氧氟沙星家禽养殖常用治疗浓度, 也是本试验鸭场饲养每批次肉鸭至 15 日龄后添加入饲料的浓度, 用于预防或治疗肉鸭大肠杆菌病、沙门氏菌病等常见肠道细菌性疾病。本试验利用 PCA 旨在反映肉鸭发酵床垫料可培养的总细菌菌落计数, Mac 反映大肠杆菌为主的肠杆菌科类细菌菌落计数, SS 反映以志贺氏菌 + 沙门氏菌为主的肠杆菌科类细菌菌落计数情况。

1.7 统计方法

采用 ANOVA、GLM 单因素方差分析分别对各组间肉鸭发酵床垫料强力霉素残留量、不同琼脂培养基细菌计数差异进行显著性比较。使用基于秩的方差分析比较各组间肉鸭发酵床垫料耐药细菌数比例差异显著性。使用 ANOVA 进行不同组肉鸭发酵床垫料内金属含量显著性比较。对垫料强力霉素、金属含量与耐受抗生素菌落计数比例进行简单相关分析。

2 结果和分析

2.1 不同使用阶段发酵床垫料抗生素积累特性

由图 1 所知, 肉鸭饲料中强力霉素添加浓度为 100 mg/kg , 发酵床饲养多批次肉鸭可显著增加垫料内强力霉素残留量。0 批次组发酵床垫料为刚制作完成、未饲养过肉鸭的新垫料, 检测不到强力霉素的存在, 饲养过 4 与 8 批次肉鸭后垫料内强力霉素平均含量分别为 $53.3, 63.4 \mu\text{g/kg}$, 且各组间存在极显著差异 ($P < 0.01$)。而 0 批次组、饲养 4 与 8 批次肉鸭时发酵床垫料内均未检测出氧氟沙星。

2.2 发酵床使用过程中垫料总菌计数、耐强力霉素 ($16 \mu\text{g/mL}$, $100 \mu\text{g/mL}$) 以及氧氟沙星 ($8 \mu\text{g/mL}$, $50 \mu\text{g/mL}$) 总菌计数以及相应耐药菌落数比例

如表 2 所示, 0 批次组肉鸭舍发酵床垫料平均总菌数为 6.70 log cfu/g , 显著低于 4 批次的 7.58

log cfu/g 与 8 批次的 7.42 log cfu/g, 4 与 8 批次间无显著差异。发酵床垫料耐受 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 强力类霉素的平均总菌数由 0 批次组的 4.53 log cfu/g, 显著上升至 4 批次组的 5.74 log cfu/g, 以及 8 批次组的 7.05 log cfu/g, 且各组间存在极显著差异 ($P < 0.01$)。0 批次组发酵床垫料耐受 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 强力类霉素的平均总菌数为 4.56 log cfu/g, 4 批次组为 < 2.70 log cfu/g, 8 批次组为 6.26 log cfu/g, 且各组间存在极显著差异 ($P < 0.01$)。发酵床垫料耐受 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氧氟沙星的平均总菌数由 0 批次组的 4.80 log cfu/g, 极显著上升至 4 批次组的 6.44 log cfu/g, 以及 8 批次组的 6.14 log cfu/g ($P < 0.01$), 4 与 8 批次组间差异不显著。发酵床垫料耐受 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氧氟沙星的平均总菌数由 0 批次组的 4.62 log cfu/g, 显著上升至 4 批次组的 5.30 log cfu/g, 8 批次组为 4.69 log cfu/g、显著低于 4 批次组, 但与对照无显著差异。

耐受 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 强力类霉素的总菌数比例由 0 批次组的 0.70% 上升至 4 批次的 1.46%, 以及 8 批次的 50.83%, 且各组间差异显著。8 批次耐受 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 强力类霉素的总菌数比例为 9.57%, 显著高于 0 批次组的 0.74%, 以及 4 批次组的

0.00%, 且对照与 4 批次组间差异显著。耐受 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氧氟沙星的总菌数比例最高为 4 批次的 7.55%, 其次为 8 批次的 6.51%, 以及 0 批次组的 1.33%, 但各组间差异均不显著。耐受 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氧氟沙星的总菌数比例由 0 批次组的 0.92% 降至 4 批次的 0.53%, 以及 8 批次的 0.21%, 但各组间差异均不显著。

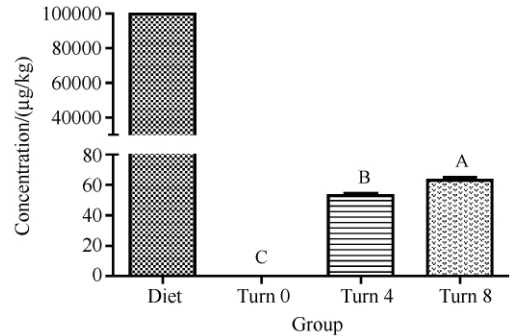


图 1. 肉鸭饲料强力霉素添加量与发酵床垫料强力霉素积累特性

Figure 1. Doxycycline level in the diet and accumulation of doxycycline in the litter. Data with different capital letter are significantly different ($P < 0.01$)

表 2. 发酵床垫料总菌计数, 耐 2 种浓度强力霉素、氧氟沙星总菌计数 (log cfu/g)

Table 2. Abundance of cultivable bacteria in PCA and PCA amended with doxycycline (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), or ofloxacin (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (log cfu/g)

Flock	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA
		(Doxycycline, 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	(Doxycycline, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	(Ofloxacin, 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	(Ofloxacin, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
Turn 0	6.70 b	4.53C (0.70% c)	4.56 B (0.74% b)	4.80B (1.33% a)	4.62 b (0.92% a)
Turn 4	7.58 a	5.74 B (1.46% b)	< 2.70 C (0.00% c)	6.44 A (7.55% a)	5.30 a (0.53% a)
Turn 8	7.42 a	7.05 A (50.83% a)	6.26 A (9.57% a)	6.14 A (6.51% a)	4.69 b (0.21% a)

Data with different capital letter or small letter in the same column are significantly different at $P < 0.01$ or $P < 0.05$; The same is in the following tables.

2.3 发酵床垫料使用过程中 Mac 肠道菌群计数、耐强力霉素 (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 以及氧氟沙星 (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) Mac 肠道菌群计数

如表 3 所示, 0 批次组、4 批次以及 8 批次发酵床垫料 Mac 平均肠道菌群数量范围在 5.91 - 6.21 log cfu/g 间, 且各组间无显著差异。发酵床垫料耐受 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 强力霉素的 Mac 平均肠道菌群计数随使用批次的累积由 0 批次组的 3.71 log cfu/g 显著上升至 4 批次组的 5.03 log cfu/g, 以及 8 批次组的 6.18 log cfu/g, 且各组间存在极显著差异 ($P <$

0.01)。发酵床垫料耐受 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 强力霉素的 Mac 平均肠道菌群计数由 0 批次组的 2.21 log cfu/g, 极显著上升至 4 批次组的 4.34 log cfu/g, 以及 8 批次组的 5.41 log cfu/g ($P < 0.01$), 4 与 8 批次组间无显著差异。0 批次组发酵床垫料耐受 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氧氟沙星的 Mac 平均肠道菌群计数为 3.20 log cfu/g, 极显著低于 4 批次组的 5.77 log cfu/g, 以及 8 批次组的 5.11 log cfu/g ($P < 0.01$), 且 8 批次组极显著低于 4 批次组 ($P < 0.01$)。0 批次组发酵床垫料耐受 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氧氟沙星的 Mac 平均肠道菌群计数

为 0 CFU/g, 极显著低于 4 批次组的 4.81 log cfu/g 与 8 批次组的 4.69 log cfu/g ($P < 0.01$), 8 批次组低于 4 批次组, 但无显著差异。

耐受 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或者 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 强力霉素的发酵床垫料 Mac 肠道菌群计数比例均由 0 批次组的 0.51%、0.03%, 4 批次的 7.52%、3.35% 显著上升至 8 批次的 226.09%、43.25%, 且各组间均差异显著。4 或 8 批次耐受 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氧氟沙星的发酵床垫料 Mac 肠道菌群计数比例分别为 47.99%、24.23%, 两组间无显著差异, 且均显著高于 0 批次组的 0.18%。0 批次组耐受 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氧氟沙星的

发酵床垫料 Mac 肠道菌群计数比例为 0.0%, 显著低于 4 批次的 14.36%, 但与 8 批次的 12.33% 接近差异显著 ($P = 0.06$)。

从 0、4 及 8 批次发酵床垫料耐 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 强力霉素 Mac 计数平板上挑取、纯化的大肠杆菌菌株数分别为 9 株、29 株及 23 株, 在强力霉素敏感性测定实验中 MIC 值均 $\geq 16 \mu\text{g}/\text{mL}$; 从相同发酵床垫料样品耐 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氧氟沙星 Mac 计数平板上挑取、纯化的大肠杆菌菌株数分别为 10 株、19 株及 21 株, 在氧氟沙星敏感性测定实验中 MIC 值均 $\geq 8 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

表 3. 发酵床垫料 Mac 肠道菌群计数, 耐 2 种浓度强力霉素以及氧氟沙星 Mac 肠道菌群计数 (log cfu/g)

Table 3. Abundance of cultivable bacteria in Mac and Mac amended with doxycycline (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), or ofloxacin (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (log cfu/g)

Flock	Mac	Mac (Doxycycline, 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	Mac (Doxycycline, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	Mac (Ofloxacin, 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	Mac (Ofloxacin, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
Turn 0	6.21	3.71C (0.51% c)	2.21 B (0.03 % c)	3.20 C (0.18% b)	—B (0.00 % b)
Turn 4	6.17	5.03 B (7.52% b)	4.34 A (3.35 % b)	5.77 A (47.99% a)	4.81 A (14.36% a)
Turn 8	5.91	6.18 A (226.09% a)	5.41 A (43.25% a)	5.11 B (24.13% a)	4.69 A (12.33% ab)

2.4 发酵床垫料使用过程中 SS 肠道菌群计数、耐强力霉素 (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 以及氧氟沙星 (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) SS 肠道菌群计数

如表 4 所示, 0 批次组、4 批次以及 8 批次发酵床垫料平均 SS 肠道菌群数量范围在 5.81 - 6.32 log cfu/g 间, 各组间均无显著差异。发酵床垫料耐受 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 强力霉素的平均 SS 肠道菌群计数随使用批次的累积, 由 0 批次组的 3.05 log cfu/g 极显著升高至 4 批次组的 5.49 log cfu/g, 以及 8 批次组的 6.01 log cfu/g ($P < 0.01$), 4 批次与 8 批次组间差异接近显著 ($P = 0.057$)。各阶段发酵床垫料耐受 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 强力霉素的 SS 平均肠道菌群计数随使用批次的累积, 由 0 批次组的 0 CFU/g, 升高至 4 批次组的 4.92 log cfu/g, 以及 8 批次组的 5.98 log cfu/g, 且各组间存在极显著差异 ($P < 0.01$)。发酵床垫料耐受 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或者 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氧氟沙星的 SS 平均肠道菌群计数均由 0 批次组的 3.00 log cfu/g、0.82 log cfu/g, 极显著升高至 4 批次组的 5.75 log cfu/g、4.87 log cfu/g, 以及 8 批次组的 5.09 log cfu/g、4.79 log cfu/g ($P < 0.01$), 且 8 批次组均略低于 4 批次组, 但差异不显著。

耐受 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或者 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 强力霉素的发

酵床垫料 SS 肠道菌群计数比例均由 0 批次组的 0.19%、0.00%, 4 批次的 15.02%、5.13% 显著上升至 8 批次的 130.36%、116.84%, 且各组间均差异显著。耐受 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氧氟沙星的发酵床垫料 SS 肠道菌群计数比例由 0 批次组的 0.26%, 显著上升至 4 批次的 32.02%, 但到 8 批次时降为 17.76%, 其 8 批次组与 0 批次组或者 4 批次组差异不显著。耐受 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氧氟沙星的发酵床垫料 SS 肠道菌群计数比例由 0 批次组的 0.02% 上升至 4 批次的 5.73%, 但差异不显著, 8 批次组为 13.58%, 显著高于 0 批次组, 但与 4 批次差异不显著。

2.5 发酵床垫料使用过程中金属累积特性

由表 5 所知, 肉鸭配合饲料 (15 - 39 日龄) 未检测到 As、Hg 元素; 检测值最高的三类金属元素依次为: Fe (594.86 mg/kg), Mn (142.17 mg/kg), Zn (92.82 mg/kg); 其余各金属元素含量很低, 均在 0 - 10 mg/kg 间。

各使用阶段发酵床垫料内 As、Pb 以及 Hg 元素含量均无显著差异, 且平均含量很低或未检测到; 0 批次组、4 批次发酵床垫料内 Cd 元素含量均未能检测到, 均显著低于 8 批次的 0.91 mg/kg; 0 批次组发酵床垫料内 Fe 与 Cr 元素含量均显著低于 4 批次,

但与 8 批次无显著差异,但 4 批次 Fe 元素平均含量高至 2391.52 mg/kg;发酵床垫料内 Zn、Mn 以及 Cu 元素含量随使用批次累积有增加趋势,其中 4 批次发酵床垫料内 Zn 与 Mn 元素含量均显著高于 0 批

次组,但与 8 批次无显著差异,而 0 批次组发酵床垫料内 Cu 元素含量显著低于 8 批次,但 0 批次组与 4 批次间以及 4 批次与 8 批次间均无显著差异。

表 4. 发酵床垫料 SS 肠道菌群计数,耐 2 种浓度强力霉素以及氧氟沙星 SS 肠道菌群计数 (log cfu/g)

Table 4. Abundance of cultivable bacteria in SS and SS amended with doxycycline (16 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$), or ofloxacin (8 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$) (log cfu/g)

Flock	SS	SS (Doxycycline, 16 $\mu\text{g/mL}$)	SS (Doxycycline, 100 $\mu\text{g/mL}$)	SS (Ofloxacin, 8 $\mu\text{g/mL}$)	SS (Ofloxacin, 50 $\mu\text{g/mL}$)
Turn 0	5.81	3.05 B (0.19% c)	— C (0.00 % c)	3.00B (0.26 % b)	0.82 B (0.02% b)
Turn 4	6.32	5.49 A (15.02% b)	4.92 B (5.13 % b)	5.75 A (32.02 % a)	4.87 A (5.73 % ab)
Turn 8	5.91	6.01 A (130.36% a)	5.98 A (116.84 % a)	5.09 A (17.76% ab)	4.79 A (13.58 % a)

表 5. 肉鸭饲料金属含量与发酵床垫料金属积累特性 (mg/kg)

Table 5. Metals level in the diet and accumulation of metals in the litter (mg/kg)

Metals	Diet (15-39 day)	Turn 0	Turn 4	Turn 8
As	0.00	1.70 \pm 2.12	0.04 \pm 0.08	0.95 \pm 0.95
Zn	92.82	9.77 \pm 8.96 b	110.56 \pm 13.75 a	167.90 \pm 82.90 a
Pb	3.50	2.27 \pm 0.81	2.77 \pm 0.62	3.14 \pm 1.17
Cd	0.51	0.00 \pm 0.00 b	0.00 \pm 0.00 b	0.91 \pm 0.45 a
Fe	594.86	355.24 \pm 181.10 b	2391.52 \pm 656.49 a	1101.54 \pm 654.89 b
Hg	0.00	0.05 \pm 0.09	1.95 \pm 1.75	0.00 \pm 0.00
Mn	142.17	65.90 \pm 36.51 b	198.96 \pm 11.44 a	212.55 \pm 108.80 a
Cr	6.23	9.85 \pm 4.82 b	57.68 \pm 5.84 a	27.71 \pm 20.19 b
Cu	4.08	2.67 \pm 0.18 b	15.87 \pm 1.28 a b	18.61 \pm 11.76 a

2.6 发酵床垫料强力霉素、金属含量与耐受抗生素菌落数比例的相关性

由表 6 所知,垫料使用过程中强力霉素含量与 PDM、MDM、MDR、SDM、SDR5 种含强力霉素培养基菌落计数比例呈显著正相关,氧氟沙星在垫料中未显现累积现象,因此其与含氧氟沙星的 6 种培养基菌落计数比例未作相关性分析;垫料中 Cd 含量与 PDM、PDR、MDM 等 7 种培养基菌落计数比例呈显著正相关;Zn 含量与 PDM、MDM、MDR 等 6 种培养基菌落计数比例呈显著正相关;Cu 含量与 PDM、MDM、MDR 等 5 种培养基菌落计数比例呈显著正相关;Mn 含量与 PDM、MDM、MDR 等 4 种培养基菌落计数比例呈显著正相关;其余种类金属含量与培养基菌落计数比例呈显著正相关的均少于或等于 1 种。

3 讨论

本试验肉鸭养殖场自发酵床制作完成以后,共饲养 8 批次肉鸭,每批次肉鸭均使用氧氟沙星与强力霉素,作为防治大肠杆菌病、沙门菌病等肠道类疾病的主要用药。畜禽养殖使用的抗生素除少量为动物体吸收以后,其余会以原形或初级代谢产物的形式随粪便排出体外^[11-12],最终伴随粪便堆肥与还田而污染了土壤环境。2002 至 2003 年间,C. S. Hölzel 随机选取德国 305 家规模化养猪场采集粪样并检测其中抗生素残留含量,检测结果表明,猪粪中多西环素平均含量为 0.29 mg/kg,最高达 0.7 mg/kg,四环素平均含量为 0.71 mg/kg,最高达 46.0 mg/kg,土霉素平均含量为 0.14 mg/kg,最高达 0.9 mg/kg^[13]。万位宁等对天津、沈阳地区牛粪、鸡粪以

及猪粪三类畜禽粪便氟喹诺酮残留的检测结果显
示,天津与沈阳地区样品含量分别为 2.1 - 10110
 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 1.1 - 279 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[14]。本试验肉鸭发酵床内
强力霉素残留量呈显著增长趋势,饲养 4 与 8 批次
肉鸭时强力霉素平均含量分别为 53.3、63.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$,
而所有发酵床垫料样品中均未检测出氧氟沙星。四

环素类药物在环境中半衰期长是引发肉鸭发酵床强
力霉素残留量显著增长的主要因素之一^[14],氧氟沙
星进入动物体内几乎不代谢,其未被吸收部分仍以
原形物随粪尿排出,但此次试验中各使用阶段肉鸭
发酵床垫料样品均未被检出,其机理有待进一步研
究^[15]。

表 6. 发酵床垫料强力霉素、金属含量与耐受强力霉素 (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$),
氧氟沙星 (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 菌落数比例的相关性

Table 6. Correlation between content of doxycycline, metals in the litter and the percentage of resistant cultivable
bacteria in the three sorts of medium amended with 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ doxycycline, or 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ofloxacin

Items	PDM	PDR	MDM	MDR	SDM	SDR	POM	POR	MOM	MOR	SOM	SOR
Doxy	0.9154**	0.4828	0.9323**	0.8815**	0.8815**	0.9662**	—	—	—	—	—	—
As	0.0522	0.4958	-0.1654	-0.1045	-0.0957	0.0261	-0.1828	-0.0348	-0.4787	-0.4700	-0.4091	-0.4090
Zn	0.8167**	0.1865	0.7833*	0.7333*	0.6667*	0.8500**	0.7000*	-0.8333**	0.6500	0.6333	0.5833	0.6000
Pb	0.3833	0.1695	0.3167	0.4833	0.6667*	0.4000	0.2000	-0.3166	0.2500	0.3833	0.5167	0.4500
Cd	0.7822*	0.7956*	0.7624*	0.8218**	0.8218**	0.7624*	0.2079	-0.7822*	0.1980	0.3763	0.3070	0.6833*
Fe	0.3500	-0.5425	0.4667	0.3167	0.2833	0.3500	0.6000	-0.3500	0.7167*	0.6000	0.6500	0.4333
Hg	-0.2374	-0.8913**	-0.0730	-0.1826	-0.1826	-0.2008	0.2556	0.2008	0.4930	0.3469	0.4017	0.0730
Mn	0.7500*	0.1356	0.7167*	0.6667*	0.5667	0.5667*	0.6167	-0.7167*	0.5833	0.5500	0.5667	0.5333
Cr	0.1333	-0.6611	0.2167	0.1167	0.0000	0.1833	0.4667	-0.2500	0.7000*	0.5000	0.5000	0.2333
Cu	0.7667*	0.1356	0.8333**	0.6833*	0.6167	0.8000**	0.6833*	-0.8333**	0.6500	0.6333	0.5333	0.6000

** Significant at $P < 0.01$ level; * Significant at $P < 0.05$ level; Doxy: Doxycycline; PDM, MDM, SDM: PCA/ Mac /SS amended with 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ doxycycline; PDR, MDR, SDR: PCA/ Mac /SS amended with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ doxycycline; POM, MOM, SOM: PCA/ Mac /SS amended with 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ofloxacin; POR, MOR, SOR: PCA/ Mac /SS amended with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ofloxacin.

发酵床垫料中抗生素的累积也存在着加速床体
中复杂的微生物区系耐药能力的进化与传播的风
险。本研究采用 PCA、Mac、SS 三种培养基同时检测
各阶段肉鸭发酵床中可培养总细菌、肠杆菌科类细
菌(大肠杆菌、沙门氏菌等)耐受常用抗生素的水
平。本研究从含 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 强力霉素或者 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$
氧氟沙星的 Mac 平板上随机挑取并分离的大肠杆
菌进行抗生素敏感性测定,试验结果表明,分离的大
肠杆菌耐受强力霉素的 MIC 值均 ≥ 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 并且
耐受氧氟沙星的 MIC 值均 ≥ 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 验证了含特
定浓度强力霉素或者氧氟沙星培养基进行菌落计数
的方法的可靠性。

使用 PCA、Mac 与 SS 三种均含 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或者
100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 强力霉素培养基进行的耐药菌落计数试
验表明,除 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 强力霉素 PCA 培养基外,其
余均呈现出耐药菌落数随饲养批次的累积而增长的
规律,相应的耐药菌落数比例增长趋势也与之对应。
另外,8 批次发酵床垫料耐受 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 强力霉素
Mac 或者 SS 培养基,以及 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 强力霉素 SS
培养基的平均菌落数比例均已超出 100%, 分别为

226.09%, 130.26% 以及 116.84%, 说明 8 批次发酵
床垫料中可培养细菌耐受强力霉素情况已经相当严
重,甚至在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 强力霉素条件下仍可存活,
可能原因是该鸭场频繁使用强力霉素,在诱发鸭只
体内微生物耐药的同时,也因半衰期长在垫料中持
续累积、长期诱导垫料内微生物耐药能力的进化与
传播,甚至某些细菌可能进化至通过降解抗生素、作
为自身生长所需的营养元素^[14-16]。耐受 100 $\mu\text{g}/$
mL 强力霉素 PCA 培养基平板菌落计数与相应的耐
受菌落数比例菌均显著低于 0 批次垫料,其机理有
待进一步的探索。

使用 PCA、Mac 与 SS 三种均含 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氧氟沙
星培养基进行的耐受菌落计数试验中,4 批次垫料
耐受该浓度氧氟沙星的平均菌落数值为最大,均显
著高于 0 批次组 ($P < 0.05$), 相应的平均耐受菌落
数比例也以 4 批次组为最高,分别为 7.55%、
47.99% 以及 32.02%, 除 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PCA 培养基外,
均显著高于 0 批次组;使用相同三种均含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$
氧氟沙星培养基进行的耐受菌落计数试验结果表
明,4 批次垫料耐受该浓度氧氟沙星的平均菌落数

值为最大,均显著高于0批次组($P < 0.05$),4批次与8批次组相应的平均耐受菌落数比例均无显著差异,各组间50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氧氟沙星 PCA 平均耐受菌落数比例均无显著差异。氧氟沙星在本试验鸭场使用频率与强力霉素相当,但未能在发酵床内形成累积,可能是造成耐受氧氟沙星菌落数以及相应耐受菌落数比例并未呈现明显增长趋势的主因。

肉鸭发酵床中重金属含量主要受饲料中相应金属含量的影响。张霞等研究表明,使用7年的猪发酵床垫料 As、Zn、Pb、Cd、Cu 含量均高于使用两年的垫料^[17],不同原料构成的猪发酵床垫料内 As、Zn、Cr、Cu 含量均随垫料使用时间延长而显著增加^[18]。本试验中,肉鸭饲料中各金属元素含量与发酵床垫料内相应金属元素的累积特性存在较为明显的因果关系。各阶段发酵床垫料内 As、Pb、Hg 元素含量均无显著差异,并且仅在8批次垫料组中检测到 Cd (平均含量为0.91 mg/kg),这主要由于肉鸭饲料中未检测到 As、Hg 元素,而 Pb、Cd 元素检测值仅为3.50与0.51 mg/kg。4与8批次发酵床垫料内 Zn、Mn 元素均显著高于0批次组,有较为明显的累积趋势。发酵床垫料内 Cu、Cr 元素随肉鸭饲养批次的增加累积速度缓慢,8批次垫料组中 Cu 元素平均含量仅为18.61 mg/kg, Cr 元素于4批次组中平均含量为57.68 mg/kg,均远低于前人有关猪发酵床的研究结果^[17-19],养猪业内通常通过添加高 Cu 来达到促生长的目的,这可能是猪发酵床中 Cu 元素累积的成因。0批次组发酵床垫料内 Fe 元素含量显著低于4批次,但与8批次无显著差异,4批次 Fe 元素平均含量高至2391.52 mg/kg,可能由于肉鸭日粮含有硫酸亚铁脱毒过的棉籽粕,造成发酵床内 Fe 元素含量因为鸭粪的持续排泄而升高^[20]。

饲料中添加亚治疗剂量抗生素可引发动物肠道中细菌间耐药基因的水平转移^[4, 21]。Looft 等报道,与无抗对照组相比,饲料中添加亚治疗剂量氨苄西林等抗生素的试验组仔猪21天后粪便中耐药基因种类与数量显著增长^[21]。Shoemaker 等在对比研究1980前与1980年后不同人群来源拟杆菌属菌株的耐药基因携带类型以及序列相似度的试验中发现,低剂量四环素可引发同一环境中细菌间的耐药基因转移^[4]。本试验中,发酵床垫料饲养至4与8批次肉鸭时垫料内强力霉素平均含量分别为53.3、63.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$,0批次垫料未检测出强力霉素,且各阶段垫

料强力霉素含量与 PDM,MDM,MDR 等5种含强力霉素培养基菌落计数比例呈显著正相关,发酵床垫料内强力霉素低剂量的累积是否引发垫料内总菌与肠道菌群耐药能力的增强,贡献率是多少,还需后续试验的进一步的验证与探索。

重金属可引发细菌耐药性与耐金属特性的形成与传播,这一现象已愈发引起人们的关注。Hölzel 等随机选取德国各猪场粪样、研究猪粪中各重金属含量与相应分离的大肠杆菌耐药率相关性的结果显示:猪粪中 Cu、Zn 含量与受试菌青霉素等经典抗生素的耐药率呈显著正相关,另外 Zn 含量与受试菌多耐比例呈显著正相关^[2]。Knapp 等在土壤中 Cu、Zn、Cd 等各金属含量与 *tet*、*bla* 及 *erm* 类细菌耐药基因拷贝数是否存在显著相关性的研究中发现,Cu 含量与多种耐药基因拷贝数存在显著正相关,Cd、Ni、Pb、Fe 四类金属各自与特异性的耐药基因拷贝数存在显著正相关^[22]。本试验中 Cd、Zn、Cu 均与多种培养基耐药菌落计数比例呈显著正相关,表明发酵床垫料中 Cd、Zn、Cu 的累积存在引发细菌耐药性形成与传播的风险,但供本试验分析的垫料样品为9个,还需后续进一步的研究。

4 结论

本试验表明,肉鸭发酵床垫料内强力霉素残留量因每批肉鸭饲养中使用而显著增加,而使用同样频率的氧氟沙星未在垫料内形成累积。8批次发酵床垫料中可培养细菌耐受强力霉素情况最为严重,而床体内细菌耐受特定浓度氧氟沙星的平均耐药菌落数以及耐药菌落数比例并未呈现明显的增长趋势,其机理有待进一步研究。随着饲养批次的增加,垫料内 As、Pb、Hg 元素含量未发生显著变化,Cd 元素检测量极低,Zn、Mn 元素有较为明显的累积趋势,Cu、Cr 元素累积速度缓慢,Fe 元素累积规律有待进一步研究与探讨。

参考文献

- [1] Campagnolo ER, Johnson KR, Karpati A, Rubin CS, Kolpin DW, Meyer MT, Esteban JE, Currier RW, Smith K, Thu KM, McGeehin M. Antimicrobial residues in animal waste and water resources proximal to large-scale swine and poultry feeding operations. *The Science of the*

- Total Environment*, 2002, 299 (1-3): 89-95.
- [2] Holzel CS, Muller C, Harms KS, Mikolajewski S, Schafer S, Schwaiger K, Bauer J. Heavy metals in liquid pig manure in light of bacterial antimicrobial resistance. *Environmental Research*, 2012, 113: 21-27.
- [3] Lu Y, Wu SH, Zhou DP, Xue HQ, Li RJ, Chen Y, Xia D. Nutrition Transformation and Phytotoxicity of Pig Litters Under Pig-on-Litter (POL) System. *Journal of Agro-Environment Science*, 2011, 30 (7): 1409-1412. (in chinese)
陆扬, 吴淑杭, 周德平, 薛惠琴, 李荣杰, 陈谊, 夏东. 发酵床养猪垫料的养分转化与植物毒性研究. 农业环境科学学报, 2011 (7): 1409-1412.
- [4] Shoemaker NB, Vlamakis H, Hayes K, Salyers AA. Evidence for extensive resistance gene transfer among *Bacteroides* spp. and among *Bacteroides* and other genera in the human colon. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67 (2): 561-568.
- [5] Zhu YG, Johnson TA, Su JQ, Qiao M, Guo GX, Stedtfeld RD, Hashsham SA, Tiedje JM. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110 (9): 3435-3440.
- [6] Wright GD. Q&A: Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it? *BMC Biology*, 2010, 8: 123.
- [7] Baker-Austin C, Wright MS, Stepanauskas R, McArthur JV. Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends in Microbiology*, 2006, 14 (4): 176-182.
- [8] Seiler C, Berendonk TU. Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 3: 399.
- [9] Hofacre CL, de Cotret AR, Maurer JJ, Garritty A, Thayer SG. Presence of fluoroquinolone-resistant coliforms in poultry litter. *Avian Diseases*, 2000, 44 (4): 963-967.
- [10] Wang Y, Zhang W, Wang J, Wu C, Shen Z, Fu X, Yan Y, Zhang Q, Schwarz S, Shen J. Distribution of the multidrug resistance gene *cfr* in *Staphylococcus* species isolates from swine farms in China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2012, 56 (3): 1485-1490.
- [11] Qiao M, Chen W, Su J, Zhang B, Zhang C. Fate of tetracyclines in swine manure of three selected swine farms in China. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 2012, 24 (6): 1047-1052.
- [12] Lan JL, Liu B, Tang JY, Zhen XF, Ye YH. Discussion on Ecological Security of Microbial Fermentation Bed in Pig Farming. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2010 (19): 324-326. (in chinese)
蓝江林, 刘波, 唐建阳, 郑雪芳, 叶耀辉. 基于微生物发酵床养猪模式的生态安全探讨. 中国农学通报, 2010 (19): 324-326.
- [13] Holzel CS, Harms KS, Kuchenhoff H, Kunz A, Muller C, Meyer K, Schwaiger K, Bauer J. Phenotypic and genotypic bacterial antimicrobial resistance in liquid pig manure is variously associated with contents of tetracyclines and sulfonamides. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 108 (5): 1642-1656.
- [14] Wan WN, Chen X, Ju XH, MU QH, Wang C, MAO DQ, Luo Y. Simultaneous Determination of Residual Antibiotics in Livestock Manure by Solid Phase Extraction-Ultra-high Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2013 (7): 993-999. (in chinese)
万位宁, 陈熹, 居学海, 母全华, 王冲, 毛大庆, 罗义. 固相萃取-超高效液相色谱串联质谱法同时检测禽畜粪便中多种抗生素残留. 分析化学, 2013 (7): 993-999.
- [15] Zhang DJ, Pan XC, Cheng BY, Zhao RH, Xu SF, Tang CL, Sun JX, Hu XM. Development of HPLC method for determination of ofloxacin levels in excrements of chicken. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2009 (1): 133-135. (in chinese)
张丹俊, 潘孝成, 程宝艳, 赵瑞宏, 许世富, 汤春莲, 孙军霞, 胡晓苗. 鸡排泄物中氧氟沙星含量 HPLC 检测方法的建立. 安徽农业大学学报, 2009 (1): 133-135.
- [16] Martinez JL. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science*, 2008, 321 (5887): 365-367.
- [17] Zhang X, Gu HR, Yang J, Feng GX, Xu XB, Yu G. Contents of total nitrogen, total phosphorus and heavy metal elements in padding of pig-on-litter system. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2011 (6): 414-415. (in chinese)
张霞, 顾洪如, 杨杰, 冯国兴, 徐小波, 余刚. 猪发酵床垫料中氮、磷、重金属元素含量. 江苏农业学报, 2011 (6): 414-415.
- [18] Zhang X, Yang J, Li J, Pan XQ, Qing F, Gu HR. Accumulated Characteristics of Heavy Metals in Different Pig Bio-bed Materials. *Journal of Agro-Environment Science*, 2013 (1): 166-171. (in chinese)

张霞, 杨杰, 李健, 潘孝青, 秦枫, 顾洪如. 猪发酵床不同原料垫料重金属元素累积特性研究. 农业环境科学学报, 2013 (1): 166-171.

- [19] Tiquia SM, Tam NFY. Elimination of phytotoxicity during co-composting of spent pig-manure sawdust litter and pig sludge. *Bioresource Technology*, 1998, 65 (1-2): 43-49.
- [20] Fu YG, Yi JM, Ma CR, Li AK. Effects of several factors on available lysine content in cottonseed meal. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 1998 (3): 225-231. (in chinese)
- 付裕贵, 易建明, 马承融, 李爱科. 影响棉籽饼有效赖氨酸含量因素的试验研究. 畜牧兽医学报, 1998

(3): 225-231.

- [21] Looft T, Johnson TA, Allen HK, Bayles DO, Alt DP, Stedtfield RD, Sul WJ, Stedtfield TM, Chai B, Cole JR, Hashsham SA, Tiedje JM, Stanton TB. In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109 (5): 1691-1696.
- [22] Knapp CW, McCluskey SM, Singh BK, Campbell CD, Hudson G, Graham DW. Antibiotic resistance gene abundances correlate with metal and geochemical conditions in archived Scottish soils. *PLoS One*, 2011, 6 (11): e27300.

Accumulation of antibiotics, heavy metals and antimicrobial-resistant bacteria in duck bio-bed

Yong Lin^{1,2#}, Xiaoting Zhang^{1#}, Xu Ji¹, Xueting Zou¹, Wei Zhao², Zhendan Shi², Hongru Gu², Wen Yao^{1*}

¹ College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China

² Institute of Animal Science, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] The objective of this study is to understand the accumulation of antibiotics, metals in the litter, and evolution features of bacterial antimicrobial-resistance during the fermentation of duck bio-bed. [Methods] The experiment was conducted in meat duck bio-bed farm of Jiangsu province from November 2011 to July 2013. The new litter and spent litter from 4th, 8th meat duck flock were studied for the accumulation of consumed antimicrobials and metals. Bacterial resistance levels to consumed antimicrobials were measured in the collected litter. [Results] The residues of doxycycline in the litter increased significantly after successive flocks of meat ducks, but ofloxacin had not been detected in all litter samples. The litter for the 8th meat duck flock had the highest level of resistant cultivable bacteria in the three sorts of medium amended with 16 µg/mL, 100 µg/mL doxycycline. Meanwhile, the level of resistant cultivable bacteria in the same sort of medium amended with 8 µg/mL, 50 µg/mL ofloxacin differed insignificantly between different flock litter sample. Different flock litter differed insignificantly in the accumulation content of As, Pb and Hg, and was low in Cd. The 4th, 8th flock litter increased significantly in Zn and Mn than new litter, and increased slowly in Cu and Cr. [Conclusion] With the application of doxycycline in each flock of meat ducks, the content of doxycycline and doxycycline resistance in enterobacteriaceae bacteria in the litter increased significantly, Zn and Mn had an increasing trend overall.

Keywords: bio-bed, antibiotic, metal, antimicrobial-resistant, accumulation

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31372321), by the Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2012CB017576) and by the Jiangsu Provincial Government [CX(14)2079]

[#]Those authors contributed equally to this work.

* Corresponding author. Tel: +86-25-84395523; E-mail: yaowen67jp@njau.edu.cn

Received: 8 July 2014 / Revised: 10 September 2014