

鸡兔舍耐药大肠杆菌气溶胶向环境扩散的研究

姚美玲,张 彬,柴同杰

(山东农业大学 动物科技学院,山东 泰安 271018)

[摘 要] 采用 Andersen-6 级撞击式和 RCS(Reuter-Centrifugal sampler)离心式空气微生物采样器,分别对泰安市一兔场舍内及舍外下风向 10,50,100,200 m,以及莱芜市一种鸡场舍内及舍外下风向 10,50,100,200,400,600,800 m 处空气中的细菌总数及大肠杆菌含量进行了 2 个工作日的测量,同时以上风向 100 m 处空气中的菌群含量作为对照。结果显示,兔舍内气载细菌总数与舍外下风向 10 m 相比差异显著($P < 0.05$),与下风向 50,100,200 m 相比差异极显著($P < 0.01$),兔舍内气载大肠杆菌含量与舍外下风向 10,50,100,200 m 相比差异极显著($P < 0.01$),舍外上风向 100 m 细菌总数与舍内及下风向 10,50,100,200 m 相比差异极显著($P < 0.01$);鸡舍内气载细菌总数与舍外下风向 10,50,100,200,400,600,800 m 相比差异极显著($P < 0.01$),舍内气载大肠杆菌含量与舍外下风向 10,50,100,200 m 相比差异极显著($P < 0.01$),舍外上风向 100 m 细菌总数与舍内及下风向 10,50,100,200 m 相比差异极显著($P < 0.01$),与 400,600,800 m 相比差异不显著($P > 0.05$)。对分离鉴定的大肠杆菌进行的耐药性分析结果显示,兔舍粪便、饲料及舍内外空气中分离到的菌株均对 RIF 和 P-G 耐药,鸡舍粪便、饲料及舍内外空气中分离到的菌株均对 RIF、ERY 和 P-G 耐药。这在一定程度上可以证明,舍内微生物气溶胶及耐药细菌可随气体交换传播到周围环境中,使其周围环境受到微生物的污染。

[关键词] 鸡兔舍内外环境;气载细菌;耐药菌;微生物扩散;环境生物污染

[中图分类号] S852.61

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)08-0060-05

Antibiotic resistance of airborne *Escherichia coli* from hen house and rabbitry and their spreading to surroundings

YAO Mei-ling, ZHANG Bin, CHAI Tong-jie

(College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China)

Abstract: This study qualified the level of airborne microorganisms in one rabbitry in Tai'an Beijipo and one hen house in Laiwu. Indoor and outdoor (windward 100 m and rabbitry: downwind 10, 50, 100, 200 m; hen house: downwind 10, 50, 100, 200, 400, 600 and 800 m) air samples were collected by two 6-stage Andersen microbial samples and two Reuter-Centrifugal samples, and the total number of airborne bacteria and concentrations of airborne *Escherichia coli* were measured. The concentrations of airborne microorganisms of indoor air samples in the rabbitry were higher than those of downwind 10 m air samples ($P < 0.05$) and significantly higher than those of downwind 50, 100 and 200 m ($P < 0.01$). The total number of airborne bacteria of windward was significantly higher than those of indoor and downwind air samples ($P < 0.01$). The concentrations of airborne bacteria of indoor air samples in the hen house were significantly higher than those of outdoor (windward 100 m and downwind 10, 50, 100, 200, 400, 600 and 800 m) air samples ($P < 0.01$). The concentrations of airborne bacteria of windward air samples were significantly

[收稿日期] 2006-06-13

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30571381)

[作者简介] 姚美玲(1968-),女,山东临朐人,畜牧师,在读硕士,主要从事动物微生物学和免疫学研究。

[通讯作者] 柴同杰(1957-),男,山东德州人,教授,博士生导师,主要从事动物微生物学和免疫学研究。

E-mail: chaitj@sdau.edu.cn.

higher than those of downwind 10, 50, 100, 200 m ($P < 0.01$). The isolated *Escherichia coli* were analyzed if they resisted against antibiotics. The results showed that the isolates from indoor and outdoor air samples in the rabbitry, feed and feces resisted against RIF and P-G. The strains from indoor and outdoor air samples in the hen house, feed and feces resisted against RIF, ERY and P-G. It could be concluded that indoor microbial aerosols including antibiotic resistance bacteria could be transmitted to surroundings by air exchanging and cause microbiological contamination.

Key words: animal house surroundings; microbial aerosol; antibiotic resistance bacteria; spreading; microbial pollution

气溶胶是固态或液态微粒悬浮在气体介质中的分散体系。微生物以单独(单细胞)悬浮状态或与干燥固体颗粒(尘埃)、液体微粒(液体小滴)相连接悬浮于空气中,就形成生物气溶胶,又称微生物气溶胶^[1]。在规模化、集约化养殖条件下,由于舍饲动物高度密集,动物体、排泄物、垫料等产生大量的微生物气溶胶,加之通风换气不畅(尤其是冬季),气溶胶不断积聚,浓度往往很高,这不仅给动物健康造成威胁,使生产效益下降,而且气溶胶还能借助舍内外气体交换传播到舍外环境,造成生物污染,给附近社区居民的健康带来极大威胁,甚至导致传染病的迅速传播^[2]。另外,来自动物舍内的耐药细菌给临床用药也带来很大困难。

大肠杆菌是温血动物肠道内的常在菌,也是条件性致病菌。本研究以大肠杆菌为指示菌种,对其在兔舍、鸡舍及其周围环境气溶胶中的浓度进行了测定及耐药性分析,旨在探讨耐药性微生物气溶胶在环境中的传播状况。

1 材料与方法

1.1 兔舍和鸡舍概况

试验兔场位于山东泰安市岱岳区,共包括 4 个半封闭式兔舍,兔舍结构为双列三层式,舍内有长毛兔或肉兔 240 只,幼兔 800 只。兔舍自然通风,每日清理粪便一次。

试验种鸡场位于莱芜市莱城区,鸡舍为全封闭式,机械通风,鸡群散养,2/3 棚架(木制,占地面积 2/3,木条宽 5 cm,厚 2.5 cm,间距 2 cm)。试验鸡舍为产蛋期种鸡舍,舍内饲养种鸡 5 000 只,地面每周撒稻糠一次,每周带鸡消毒 2 次。

1.2 空气样品收集

利用 Andersen-6 级撞击式和 RCS 离心式空气微生物采样器(均购自辽宁省辽阳市康洁仪器研究所)收集空气样品。兔场分别于 2005-03 和 2005-05,种鸡场分别于 2005-10 和 2005-11 选 2 个工作日

进行样品收集。Andersen-6 级撞击式采样器标准流量为 28.3 L/min^[3],RCS 离心式采样器流量为 40 L/min。采样器使用前用体积分数 70%酒精棉球擦拭消毒。采样器驱动时间根据采样点的卫生情况掌握在 1~8 min,以每个平板上的菌落数在 30~300 为宜,采样器放置高度为 50~80 cm。空气样品分别取自舍内及舍外下风向不同位置(鸡舍为 10, 50, 100, 200, 400, 600 和 800 m 处,兔舍由于周围环境所限仅取 10, 50, 100 和 200 m 处),每一位置选不同点平行收集样品,在舍外上风向 100 m 处收集空气样品作为对照。同时测量取样时的风速、气温及空气相对湿度。

空气样品收集介质为血琼脂平板(血琼脂基础加 10 g/L 葡萄糖,配制灭菌,待冷至 50℃左右,加入 50 mL/L 无菌的脱纤维公绵羊血制成)。粪便、饲料样品均随机在舍内 5 个不同笼中收集。

1.3 气载大肠杆菌的分离与鉴定

取血琼脂平板上革兰氏染色阴性短杆菌接种到伊红美兰琼脂平板上,37℃培养 24 h,挑取伊红美兰琼脂上圆形、湿润、黑色带金属光泽的菌落进行纯培养,然后用 API 20E(BioMerieux)系统进行鉴定。

1.4 粪便和饲料样品中大肠杆菌的分离与鉴定

取粪便或饲料样品 0.5 g,加入到 4.5 mL 营养肉汤中,37℃培养 24 h,用接种环挑取一环在伊红美兰平板上划线,挑取可疑菌落纯培养,然后用 API 20E 系统进行鉴定。

1.5 大肠杆菌药物敏感性试验

采用同一工作日由兔舍或鸡舍内外空气及粪便、饲料中分离到的大肠杆菌菌株,每个取样点取 20 株(鸡舍外下风向 400, 800 m 及上风向 100 m 均只分离到 1 株大肠杆菌,药敏试验未做),选择氟哌酸(NOR)、头孢哌酮(CFP)、氯霉素(CMP)、复合磺胺(SXT)、庆大霉素(GEN)、链霉素(STR)、四环素(TET)、利福平(RIF)、红霉素(ERY)、青霉素(P-G)、妥布霉素(TOB)、呋喃妥因(Ni)等药敏纸片,按

Kirby-Bauer 纸片扩散法进行测定,结果参照 2006 版美国 CLSI 抗微生物药物敏感性试验执行标准^[4]进行判定。

1.6 数据统计

采用 SAS 统计软件对数据进行统计分析。细菌含量的计算是将菌落总数除以通气量,得出每 m³ 空气中的菌落数,其单位为 CFU/m³。

2 结果与分析

2.1 畜禽舍内外气载细菌的含量

2.1.1 兔舍内外气载细菌的含量 由表 1 可知,兔舍内气载细菌总数为 6 100~20 000 CFU/m³,大肠杆菌为 350~490 CFU/m³。舍外下风向 10~200 m

气载细菌总数为 290~7 100 CFU/m³,大肠杆菌为 25~74 CFU/m³。舍外上风向 100 m 处气载细菌总数为 240~500 CFU/m³,未检测到大肠杆菌。统计分析结果显示,舍内气载细菌总数明显高于舍外下风向,与 10 m 处相比差异显著($P<0.05$),与 50, 100 和 200 m 处相比差异极显著($P<0.01$);舍内气载大肠杆菌浓度与舍外下风向 10,50,100 和 200 m 处相比差异极显著($P<0.01$);舍外上风向 100 m 处细菌总数与舍内及下风向 10,50,100 和 200 m 处相比差异极显著($P<0.01$);下风向 10 与 50 m 处气载菌群含量差异极显著($P<0.01$);下风向 50, 100 和 200 m 处气载菌群含量虽呈依次递减的态势,但统计结果显示其差异并不显著($P>0.05$)。

表 1 兔舍内外气载细菌含量 (n = 8)

取样地点 Sampling place	细菌总数 Culturable bacteria		大肠杆菌 Escherichia coli	
	最大值 Max	最小值 Min	最大值 Max	最小值 Min
舍内 Indoor	20 000	6 100	490	350
舍外下风向 10 m Downwind 10 m	7 100	2 600	74	48
舍外下风向 50 m Downwind 50 m	960	470	64	50
舍外下风向 100 m Downwind 100 m	860	470	50	29
舍外下风向 200 m Downwind 200 m	680	290	48	25
舍外上风向 100 m Windward 100 m	500	240	0	0

2.1.2 鸡舍内外气载细菌的含量 由表 2 可知,鸡舍内气载细菌总数为 97 000~490 000 CFU/m³,大肠杆菌为 950~1 300 CFU/m³。舍外下风向 10~800 m 气载细菌总数为 580~41 000 CFU/m³,大肠

杆菌为 0~420 CFU/m³,其中在 400 和 800 m 处分别仅分离到 1 株大肠杆菌,600 m 处未分离到大肠杆菌。舍外上风向 100 m 处气载细菌总数为 800~1 100 CFU/m³,仅分离到 1 株大肠杆菌。

表 2 鸡舍内外气载细菌含量 (n = 15)

取样地点 Sampling place	细菌总数 Culturable bacteria		大肠杆菌 Escherichia coli	
	最大值 Max	最小值 Min	最大值 Max	最小值 Min
舍内 Indoor	490 000	97 000	1 300	950
舍外下风向 10 m Downwind 10 m	41 000	36 000	420	320
舍外下风向 50 m Downwind 50 m	3 700	3 000	260	170
舍外下风向 100 m Downwind 100 m	2 800	2 100	61	41
舍外下风向 200 m Downwind 200 m	3 800	1 800	46	35
舍外下风向 400 m Downwind 400 m	1 500	580	4.2	0
舍外下风向 600 m Downwind 600 m	910	600	0	0
舍外下风向 800 m Downwind 800 m	810	600	4.2	0
舍外上风向 100 m Windward 100 m	1 100	800	4.2	0

统计结果显示,鸡舍内气载细菌总数明显高于舍外下风向 10,50,100,200,400,600 和 800 m 处的

菌群含量,其差异达极显著水平($P < 0.01$);舍内气载大肠杆菌含量与舍外下风向 10,50,100 和 200 m 处相比差异极显著($P < 0.01$);舍外上风向 100 m 处菌群含量与舍内及下风向 10,50,100 和 200 m 处相比差异极显著($P < 0.01$),与 400,600 和 800 m 处比较差异不显著($P > 0.05$);下风向 10 与 50 m 处菌群含量相比差异极显著($P < 0.01$),50 与 100 m 处相比差异显著($P < 0.05$),100 与 200 m 处相比

差异不显著($P > 0.05$);下风向 400 m 与 10,50,100 和 200 m 处气载菌群含量差异极显著($P < 0.01$),但与 600 和 800 m 处相比差异不显著($P > 0.05$)。

2.2 大肠杆菌药敏试验

2.2.1 兔舍大肠杆菌药敏试验 由表 3 可知,从兔舍粪便、饲料及舍内外空气中分离到的大肠杆菌均对 RIF、P-G 耐药,且有不同数量的菌株对 ERY、NOR、CFP、CMP、SXT、STR 和 TET 等有耐药性。

表 3 兔舍内外分离鉴定的大肠杆菌的耐药率($n = 20$)

Table 3 Results of antimicrobial susceptibility testing of <i>E. coli</i> from the rabbitry ($n = 20$)												%
采样地点 Sampling place	NOR	CFP	CMP	SXT	GEN	STR	TET	RIF	ERY	P-G	TOB	Ni
舍内 Indoor	15	15	15	70	0	30	70	100	80	100	0	0
舍外下风向 10 m Downwind 10 m	15	0	15	50	0	25	50	100	90	100	0	0
舍外下风向 50 m Downwind 50 m	15	0	15	35	0	30	45	100	100	100	0	0
舍外下风向 100 m Downwind 100 m	20	0	15	45	0	15	55	100	100	100	0	0
舍外下风向 200 m Downwind 200 m	10	0	0	20	0	20	50	100	100	100	0	0
粪便 Feces	20	20	15	75	0	50	70	100	100	100	0	0
饲料 Feed	10	0	10	20	0	35	50	100	100	100	0	0

2.2.2 鸡舍大肠杆菌药敏试验 由表 4 可知,从鸡舍粪便、饲料及舍内外空气中分离到的大肠杆菌均

对 RIF、ERY、P-G 耐药,且有些菌株对 NOR、CFP、CMP、SXT、STR、TET 等也具有耐药性(表 4)。

表 4 鸡舍内外分离鉴定的大肠杆菌的耐药率($n = 20$)

Table 4 Results of antimicrobial susceptibility testing of <i>E. coli</i> from the hen houses ($n = 20$)												%
采样地点 Sampling place	NOR	CFP	CMP	SXT	GEN	STR	TET	RIF	ERY	P-G	TOB	Ni
舍内 Indoor	55	0	0	55	0	45	80	100	100	100	0	10
舍外下风向 10 m Downwind 10 m	0	0	0	50	0	0	50	100	100	100	0	0
舍外下风向 50 m Downwind 50 m	0	0	0	40	0	0	45	100	100	100	0	0
舍外下风向 100 m Downwind 100 m	0	0	15	35	0	30	50	100	100	100	0	0
舍外下风向 200 m Downwind 200 m	0	0	0	0	0	40	50	100	100	100	0	0
粪便 Feces	30	20	0	70	0	40	70	100	100	100	0	0
饲料 Feed	20	0	0	25	0	50	50	100	100	100	0	0

3 讨 论

本试验结果显示,兔舍内气载细菌总数为 6 100 ~ 20 000 CFU/m³,大肠杆菌含量为 350 ~ 490 CFU/m³;鸡舍内气载细菌总数为 97 000 ~ 490 000 CFU/m³,大肠杆菌含量为 950 ~ 1300 CFU/m³。与 Wiegand 等^[5]、Zucher 等^[6]、Duan 等^[7]和 Chang 等^[8]的研究结果有差异,这可能与畜禽舍的建筑形式及畜禽的饲养方式、密度、卫生管理状况等有直接关系。畜禽舍微生物气溶胶主要来源于动物本身,其通过排泄物、体表以及呼吸向周围环境散发微生物,因此,合理的饲养方式和密度、必要的通风和清

洁消毒是减少舍内气载细菌含量的有效措施。

与舍内气载菌群含量相比,舍外下风向空气中相应菌群随大气扩散,其含量迅速降低,表明畜禽舍内微生物气溶胶能借助舍内外气体交换传播到舍外,并能够在养殖场周围形成一个含量较高的区域,给附近居民的健康造成威胁:致病性大肠杆菌可引起人类腹泻、出血性结肠炎、泌尿系统炎症等。

畜禽舍内气载微生物随气体交换传播到舍外,传播的方向、距离及强度受到风向、风速及舍内菌群含量的影响。3 月份在兔场取样时,舍内温度较低,兔舍很少开窗通风,且风速较小(1.0 m/s),因此,虽然当时舍内大肠杆菌含量较 5 月份高,但在下风向

100 和 200 m 处未分离到大肠杆菌,在 10 和 50 m 处的含量分别为 25 和 17 CFU/m³,仅是 5 月份所测含量的 1/3。5 月份取样时,风速较大(1.7 m/s),在下风向 100 m 处,气载细菌总数是上风向 100 m 处的 2.7 倍,统计分析结果显示差异极显著($P < 0.01$)。

药敏试验结果表明,兔舍粪便中分离到的大肠杆菌对 NOR、CFP、SXT、STR、ERY 耐药菌株的耐药率分别为 20%,20%,75%,50%,100%,分别较舍内气载大肠杆菌相应抗菌药物的耐药率高 15%,15%,70%,30%,80%;对 TET、CMP 耐药菌株的耐药率相等,且都对 P-GT 和 RIF 耐药(表 3);鸡舍分离到的大肠杆菌的耐药试验结果也有类似的情形(表 4)。这与作者在取样时了解到的兔场、鸡场的日常药物使用情况相吻合,大肠杆菌对频繁使用的药物呈现出不同程度的耐药性,而对较少使用的药物则较为敏感。同时,粪便大肠杆菌和气载大肠杆菌耐药性相似的现象,可以在一定程度上证明畜禽舍内空气中的耐药大肠杆菌来自舍内饲养畜禽的粪便^[9]。

从药敏试验的结果可以看出,兔舍及周围环境空气中分离到的大肠杆菌菌株,全部对 P-G 和 RIF 耐药,由鸡舍及其周围环境中分离到的大肠杆菌则对 RIF、ERY、P-G 均耐药,试验菌株对其余抗菌药物耐药的比例有一定的一致性。说明这些耐药菌株也来源于畜禽舍内,它们能够从舍内向舍外环境传播。

本试验发现,兔舍下风向 10,50,100 和 200 m 处的气载大肠杆菌对 ERY 的耐药率(分别为 90%,100%,100%和 100%)高于舍内(80%),下风向 100 m 处气载大肠杆菌对 NOR 的耐药率(20%)也高于

舍内(15%),说明兔舍下风向环境中的耐药大肠杆菌除来源于本舍外,还可能来自于其他的地方,譬如居民区或其他养殖场等。试验种鸡场由于周围没有养殖场,而且离最近的村庄也有 1 000 m 的距离,其环境相对隔离,故未发现这种情况。

[参考文献]

- [1] 于玺华,车风翔.现代空气微生物学及采检鉴技术[M].北京:军事医学科学出版社,1998:21-31.
- [2] 柴同杰,赵云玲,刘 辉,等.鸡舍耐药细菌气溶胶及其向环境传播的研究[J].中国预防兽医学报,2003,25(3):209-214.
- [3] Andersen A A. New sampler for the collection, sizing and enumeration of viable airborne particles[J]. Bacteriol, 1958, 76: 471-484.
- [4] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Sixteenth informational supplement [M]. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006:25-29.
- [5] Wiegand B, Hartung J, Hinz T. Bacteria and endotoxin levels in airborne dust [J]. Landbauforschung-Voelkenrode, 1993, 43 (4):236-241.
- [6] Zucher B A, Muller W. Airborne microorganisms in animals stable. 3: Relationship between inhaled endotoxins, dust and airborne bacteria in a poultry housing unit[J]. Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift, 2000, 113(7/8):279-283.
- [7] Duan H Y, Chai T J, Müller W, et al. Concentration of airborne endotoxins and airborne bacteria in Chinese rabbit houses[J]. Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift, 2006, 119 (1/2):40-44.
- [8] Chang C W, Chung H, Huang C F, et al. Exposure of workers to airborne microorganisms in open-air swine houses[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(1):155-161.
- [9] Platz S. Menge und ausbreitung von aus geflügelställen emittierten bakterien und die durch sie verursachte kontamination der Umwelt[J]. Tierärztl Mschr, 1979, 92:297-301.