

# 豬糞尿和廢水中抗生素與四環素抗性基因流布研究<sup>(1)</sup>

程梅萍<sup>(2)</sup> 蕭庭訓<sup>(2)</sup> 廖仁寶<sup>(3)(4)</sup>

收件日期：106 年 1 月 13 日；接受日期：106 年 7 月 26 日

## 摘 要

本研究旨在瞭解養豬場使用抗生素對環境之影響，調查新鮮豬糞、排放水、堆肥及施用養豬廢水之土壤等樣品中抗生素含量與四環素抗性基因分布。試驗選擇 2 家養豬場，其中 A 場在飼料中添加抗生素，C 場飼料中則無添加抗生素，以液相層析串聯式質譜儀分析結果顯示，A 場在各項樣品中檢出之抗生素含量皆明顯較 C 場高。堆肥處理對於糞便中四環素類去除率達 94.9 – 98.1%，豬糞尿廢水厭氧處理對四環素類去除率為 77.3 – 92.4%，對磺胺劑磺胺一甲氧嘧啶 (sulfamonomethanoxine, SMM) 去除率則高達 98.8%；好氧活性污泥處理對四環素類去除率為 57.7 – 75.8%，對 SMM 去除率則為 36.4%。將 A 場高床豬舍新鮮糞尿施灌於水稻田，在施灌後 15 天，即未檢出四環素殘留。以抗四環素基因引子進行聚合酶連鎖反應檢測，結果 2 場樣品顯示，除了堆肥與土壤外，其餘樣品大多數都呈正反應 (91.3%)，與抗藥性生菌數試驗相符，即未添加四環素之豬場環境中亦有抗藥性微生物之存在。此外，使用化肥之水稻田土壤抗藥性生菌數較施灌新鮮豬糞尿之水稻田少；施灌豬糞尿水稻田土壤中抗四環素基因檢出數高於化肥組。綜合以上，養豬產業應避免使用四環素類抗生素，減少抗藥性細菌產生機會，以維護健康之環境。

關鍵詞：抗生素、四環素抗性基因、豬糞尿。

## 緒 言

畜牧業若使用過量抗生素則會造成藥品殘留於肉品與內臟中，又因畜禽肉為人類食物蛋白質主要來源且涉及人類健康，故此類研究已多所探討。近年來環保意識擡頭，特別注重生態環境的保育。若畜牧廢棄物殘留抗生素污染生態環境，則將影響環境中微生物的平衡狀態，進而可能危害人類的健康 (Arias and Murray, 2009)。一般而言，畜牧業常被認為是抗生素濫用之潛在禍源，這是因為動物之疫病往往造成業者相當大的損失，因此，部分業者將相當大量、多種且新一代的抗生素加入飼料中，以減少感染之發生。美國生產的抗生素至少 50% 用於農業 (Lipsitch *et al.*, 2002)。在歐盟大約 50% 抗菌劑用於動物，30% 用於促進生長 (FEDESA, 1998)。此舉可能造就出同時對許多抗生素產生抗藥性的微生物，這些微生物散佈至環境，污染食物及飲用水，並伺機感染人體。研究指出飼料添加四環素之豬場，環境中 77% 之大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 與 68% 之腸球菌 (enterococci) 具有抗藥性。抗藥性基因分布在 26 個菌屬，60 個菌種中，且單一抗藥基因在多種菌種中被發現，表示有基因重組的現象 (Stine *et al.*, 2007)。因此，歐盟已注意到這項問題的嚴重性，不僅嚴格管制畜牧業抗生素之使用，甚至研發出動物專用之抗生素，以便與人類之藥物區隔開來。瑞典自 1986 年禁止飼料添加抗生素，1997 年分析豬糞便中大腸桿菌對多種抗生素抗藥性，顯著低於未禁用的荷蘭 (Bogaard and Stobberingh, 2000)。當禁止四環素 (tetracycline, TC) 作為生長促進劑後，感染人類及動物之抗藥性沙門氏菌便逐漸減少 (Cherubin, 1984)。

飼料添加氯四環素 (chlorotetracycline, CTC) 豬場 (儲存糞尿 6 個月) 與僅治療使用氯四環素牛場 (儲存糞尿 12 個月) 施灌及非農業地，土壤中抗氯四環素菌數與菌種無顯著差異。但小豬場糞尿直接溢流至農地者，土壤中抗氯四環素菌數顯著較高 (Ghosh and LaPara, 2007)。在都市廢水處理場中，放流水中 *Acinetobacter* spp. 具多重抗藥性 (72.4%) 明顯較原廢水 (33.0%) 高，承受水體中下游 (56.5%) 明顯較上游 (28.6%) 高，表示廢水處理系統選擇性增加抗藥性細菌，並經基因重組而產生多重抗藥性 (Zhang *et al.*, 2009)。臺灣地區允許使用某些人畜共用的抗生素，根據

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2569 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所經營組。

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所遺傳育種組。

(4) 通訊作者，E-mail：liawrb@mail.tlri.gov.tw。

2 場畜牧場未處理之廢水 59 種抗生素含量調查，以林可黴素 (lincomycin) 56,760 ng/L、土黴素 (oxytetracycline, OTC) 8,318 ng/L、磺胺噻唑 (sulfathiazole) 4,844 ng/L、CTC 2,821 ng/L、TC 1,129 ng/L、泰黴素 (tylosin) 1,001 ng/L 含量較高；而在所調查的 6 類污染源中，畜牧業在磺胺劑 (sulfonamides)、TC、林可胺類 (lincosamides) 等 3 類抗生素所佔比例較高 (Lin *et al.*, 2008)。臺灣地區養豬場多採用固液分離、厭氧處理及好氧活性污泥處理之三段式廢水處理系統處理養豬廢水，再將放流水排放至水體；而豬糞則經由堆肥化後施用於農地。本研究比較使用與未使用抗生素做為生長促進劑之養豬場各處理階段之廢水、放流水及廢棄物中抗生素含量與四環素抗性基因之流布，以供政府相關單位對畜牧業使用抗生素種類規範訂定之參考。

## 材料與方法

### I. 採樣

本試驗選擇兩場養豬場，A 場飼養規模 6,000 頭，於哺乳豬、母豬與肥育豬前期等飼料添加抗生素，並詳細記錄用量 (表 1)。C 場飼養規模 800 頭，自 2008 年 7 月起，不在飼料中添加抗生素。兩場廢水處理設施屬三段式處理模式，並正常運作，分別於 2012 與 2013 年 5 月及 10 月共 4 次採集糞便 (固液分離後固形物)、堆肥 (發酵約 2 週、發酵溫度達 60°C 以上之樣品)、固液分離後原廢水、厭氧發酵後廢水、放流水及施用 A 場新鮮糞尿及 C 場堆肥之土壤樣品 (5 點土壤樣品混合)。A 場高床豬舍收集之糞尿 (新鮮未經處理) 部分施灌於水稻田試驗區，每期稻作施灌量約每公頃 120 kg 氮素，分別於 2012 年 2 月及 7 月份、2013 年 3 月及 7 月施灌，故於 2012 年 2 - 10 月與 2013 年 3 - 9 月連續採樣。水稻田施灌區兩重覆 (M1、M2)，並以施灌化學肥料區 (CF) 作為對照組，每試區各約 1 分地，採集試區 5 點土壤樣品後混合。

表 1. 養豬場 A 場飼料抗生素添加量與環境樣品殘留量

Table 1. Antibiotics residues in feed and environmental samples from pig farm A

Antibiotic <sup>a</sup>	Dosage (kg/month)		Feces (ppb)		Compost (ppb)		Soil (ppb)		Wastewater (ppb)		Anaerobic treated (ppb)		Effluent (ppb)	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
TIA	7.9	1,225	1,845	650	768	50	100	206	238	159	207	50	100	
TC	0	687	610	13	26	7.0	11	105	135	14	17	4.5	5.6	
OTC	12.5	2,450	759	126	137	54	94	795	581	180	118	44	44	
CTC	28.7	5,745	4,750	165	125	255	458	2,054	2,251	156	173	66	93	
Amoxicillin	9.9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Neomycin	2.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
SMM	10.2	498	622	1,492	491	1.9	2.3	242	201	3.0	2.3	1.9	3.0	

n = 4. SD: standard deviation (calculated by STDEV function of Microsoft Excel)

Minimum detection limit (MDL): TC 2.5 ppb; OTC 2.5 ppb; CTC 2.5 ppb; SMM 1 ppb.

<sup>a</sup> TIA: Tiamulin, TC: Tetracycline, OTC: Oxytetracycline, CTC: Chlortetracycline, SMM: Sulfamonomethanoxine.

### II. 抗生素含量分析

樣品中抗生素含量委託美和科技大學農水產品檢驗服務中心測定，樣品經萃取過程處理後，以液相層析串聯式質譜儀 (LC/MS/MS) 分析抗生素濃度，分析項目有泰妙菌素 (tiamulin, TIA)、TC、OTC、CTC、阿莫西林、新黴素 (neomycin)、磺胺一甲氧嘧啶 (sulfamonomethanoxine, SMM) 及磺胺二甲基嘧啶 (sulfamethazine)。堆肥化與廢水處理抗生物質去除率為 [(處理前一階段樣品中抗生素含量 - 處理後樣品中抗生素含量) / 處理前一階段樣品中抗生素含量] × 100%；例如，堆肥處理去除率為 [(糞便中抗生素含量 - 堆肥中抗生素含量) / 糞便中抗生素含量] × 100%。

### III. 四環素抗性基因之分析

採用 DNA 萃取套組 (PowerSoil® DNA Isolation Kit, Mobio Lab. Co., USA) 抽取糞便、土壤及水樣中之 DNA。操作步驟簡述如下：取適量樣品置入含陶瓷珠緩衝液之微量管，加入 60 μL C1 緩衝液 (含 SDS 之試劑，用以溶解細胞)，震盪混勻 5 sec。以組織均質機 (MagNA Lyser, Roche, USA) 在 5,500 rpm 條件下，作用 25 sec。在 10,000 × g 下離心 30 sec，吸取上清液至新的微量離心管。依序以不同的緩衝液 (C2 - C6：C2 含特定試劑以沉澱非 DNA 之有機與無機物質，C3 含特定試劑以沉澱額外的非 DNA 之有機與無機物質，C4 為高濃度鹽溶

液，C5 為含乙醇之溶液，C6 為洗提溶液) 與旋轉過濾管進行 DNA 純化步驟，最後可得 100  $\mu$ L DNA (廖等，2017)。聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 之引子序列與黏合溫度，如表 2。PCR 反應組成分為 20 – 50 ng 模板 DNA、0.25 mM dNTP、每個引子 0.5  $\mu$ M、1  $\times$  反應緩衝液及 0.5 U (單位) Taq 聚合酶 (TaKaRa Bio Inc., Japan)，反應總體積為 20  $\mu$ L。PCR 反應條件：第一步變性，94 $^{\circ}$ C、5 min；第二步循環增幅 35 次，94 $^{\circ}$ C、30 s，55 $^{\circ}$ C、45 s，72 $^{\circ}$ C、1 min；第三步延長，72 $^{\circ}$ C、10 min。取 5  $\mu$ L PCR 產物與 1  $\mu$ L 的載入染劑混合均勻後，進行 1.5% 瓊脂膠體電泳分析。電泳完成後，利用溴化乙錠染色，並在紫外線燈箱上顯像並照相記錄。

表 2. 本試驗四環素抗性基因檢測所使用之引子

Table 2. The primers for identifying tetracycline resistance genes used in this study

Primer	Sequences <sup>a</sup>	Target	Annealing ( $^{\circ}$ C)	Amplicon size (bp)	Resistance Mechanism
TetAF	GCTACATCCTGCTTGCCCTC	<i>tetA</i>	55	210	Efflux pump
TetAR	CATAGATCGCCGTGAAGAGG				
TetBF	TTGGTTAGGGGCAAGTTTTG	<i>tetB</i>	55	659	Efflux pump
TetBR	GTAATGGGCCAATAACACCG				
TetCF	CTTGAGAGCCTTCAACCCAG	<i>tetC</i>	55	418	Efflux pump
TetCR	ATGGTCGTCATCTACCTGCC				
TetDF	AAACCATTACGGCATTCTGC	<i>tetD</i>	55	787	Efflux pump
TetDR	GACCGGATACACCATCCATC				
TetEF	AAACCACATCCTCCATACGC	<i>tetE</i>	55	278	Efflux pump
TetER	AAATAGGCCACAACCGTCAG				
TetGF	GCTCGGTGGTATCTCTGCTC	<i>tetG</i>	55	468	Efflux pump
TetGR	AGCAACAGAATCGGGAACAC				
TetMF	GTGACAAAGGTACAACGAG	<i>tetM</i>	55	406	RPP <sup>b</sup>
TetMR	CGGTAAAGTTCGTCACACAC				
TetOF	AACTTAGGCATTCTGGCTCAC	<i>tetO</i>	55	515	RPP
TetOR	TCCACTGTTCCATATCGTCA				
TetSF	CATAGACAAGCCGTTGACC	<i>tetS</i>	55	667	RPP
TetSR	ATGTTTTTGGAACGCCAGAG				
TetQF	TTATACTTCCCTCCGGCATCG	<i>tetQ</i>	55	904	RPP
TetQR	ATCGGTTGAGAATGTCCAC				

<sup>a</sup> Auerbach *et al.*, 2007.

<sup>b</sup> RPP: Ribosomal protection protein.

#### IV. 抗藥性生菌數分析

液態樣品使用含 1% peptone 之無菌水做連續稀釋，取適當稀釋度樣品 0.1 mL 塗抹於培養皿上。固態樣品則取 10 g 加 100 mL 無菌水，100 rpm 下震盪 30 min，取溶液作連續稀釋與塗抹，每種稀釋度重複 3 個培養皿。培養基共 4 種：(i) Trypticase Soy Agar (TSA): enriched medium containing 1.5% trypticase peptone, 0.5% phytone peptones, 0.5% NaCl, 1.5% agar; (ii) TSA +20 mg/L CTC; (iii) Luria-Bertani agar (LA); (iv) LA + 20 mg/L CTC。前兩者在 25 $^{\circ}$ C 下培養 2 天，後兩者在 37 $^{\circ}$ C 下培養 2 天。

#### V. 抗藥性菌株鑑定

隨機挑選在 TSA-CTC 與 LA-CTC 培養基生長之抗藥性細菌，接種至相同培養基確認其抗藥性後，以 GFX Genomic Blood DNA Purification Kit (Amersham Biosciences, USA) 抽取 DNA。以細菌 16S rRNA 基因專一引子對 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', Edwards *et al.*, 1989) 和 1492R (5'-TACC TTGTTACGACTT-3', Wilson *et al.*, 1990) 增幅放大菌株之 16S rRNA 基因片段，並以套組 (clean/gel Extraction kit, Biokit Inc, ROC) 純化 PCR 產物。定序引子包括 27F、519F (5'-GTGCCSGCMGCCGCGGTAA-3')、519R (5'-GWATTACCGCGGCKGCTG-3') (Lane *et al.*, 1985) 及 1492R，以定序試劑 (BigDye Terminator 3.1, Applied Biosystems, USA) 進行定序反應，增幅後之產物經純化步驟，再以 ABI3730 DNA 自動定序儀 (Applied Biosystems, USA) 解序，各個片段以 Vector NTI Suite 11.0 (Invitrogen, USA) 套裝軟體中 Contig Express 程式組合，完成整段 16S rRNA 基因解析。將所得之 DNA 序列



上傳於 NCBI 網頁 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 上，以線上程式 BLAST (basic local alignment search tool) (Altschul *et al.*, 1997) 進行比對。

## 結果與討論

### I. 養豬場環境樣品中抗生素含量

A 場糞便樣品中以 CTC、OTC 及 TIA 含量較高，分別為 5,745、2,450 及 1,225 ppb (表 1)。抗生素含量分析之標準偏差值 (standard deviation, SD) 偏高，顯示出 4 次採樣結果分析值差異大，此結果與養豬場大、小豬飼料配方及比例變異有關。堆肥樣品除 SMM 外，其他抗生物質含量較糞便低，堆肥處理對於四環素類去除率較高，達 94.9 – 98.1% (表 3)。原廢水 (wastewater) 中則以 CTC 與 OTC 含量較高，分別為 2,054 及 795 ppb。經厭氧處理後 (anaerobic treated wastewater) 含量降低，放流水 (effluent) 僅含微量抗生素，CTC 與 OTC 含量分別為 66 與 44 ppb (表 1)。豬糞尿廢水厭氧處理對四環素類去除率為 77.3 – 92.4%，對磺胺劑 SMM 去除率則高達 98.8%；好氧活性污泥處理對四環素類去除率為 57.7 – 75.8%，對 SMM 去除率則為 36.4% (表 3)。而豬糞固形物經堆肥化處理後，抗生素含量大幅減少，去除率為 46.9 – 98.1%；廢水經三段式處理後，抗生素含量亦大幅減少，去除率為 75.7 – 99.2%。C 場因未在飼料中添加抗生物質，各項樣品中抗生素大部分未檢出，僅 2012 年 10 月在糞便中檢出 OTC 13.1 ppb，推測為治療針劑抗生素殘留。

表 3. 堆肥化與廢水處理對 A 場抗生物質之去除率

Table 3. Removal rate of antibiotics after composting and wastewater treatment in pig farm A

Antibiotics <sup>a</sup>	Solid		Wastewater treatment	
	Composting	Anaerobic process	Aerobic process	Total
TIA	46.9	22.9	68.5	75.7
TC	98.1	86.2	68.7	95.7
OTC	94.9	77.3	75.8	94.5
CTC	97.1	92.4	57.7	96.8
SMM	—	98.8	36.4	99.2

<sup>a</sup> TIA: Tiamulin, TC: Tetracycline, OTC: Oxytetracycline, CTC: Chlortetracycline, SMM: Sulfamonomethanoxine.

Widyasari-Mehta *et al.* (2016) 調查肥育豬場與種豬場液態豬糞抗生素殘留量 (乾物重之濃度)，TC、CTC 及 OTC 濃度分別為 TC 1.5 – 300 vs. 1.5 – 227 mg/kg，CTC 濃度 1.7 – 46.3 vs. 15.8 – 55.1 mg/kg，OTC 0.6 – 221 vs. 未檢出 – 6.2 mg/kg，磺胺劑類抗生素最高者為磺胺二甲嘧啶 (sulfadimidine)，出現於種豬場，其餘磺胺嘧啶 (sulfadiazine)、磺胺 (sulfadoxine)、磺胺二甲氧嘧啶 (sulfadimethoxine) 在兩種豬場皆低於 1.0 mg/kg。TIA 在肥育豬場液態豬糞中未檢出，但在種豬場液態豬糞中最高可達 1.4 mg/kg。Liu *et al.* (2015) 指出豬糞經過堆肥化處理後，其中之可萃取磺胺類藥物會減少，堆肥 7 天後去除率達 91%，堆肥 14 天後去除率更可達 99%，沒有經過堆肥化處理的對照組，經過 7 天後，去除率則僅為 60 – 68%。當豬糞進行中度規模堆肥處理 7 天後，堆肥中 CTC、OTC 及 TC 去除率分別為 74、92 及 70% (Wu *et al.*, 2011)。在溫室內利用稻稈與豬糞混合進行堆肥化處理時，CTC 在 14 天內可被完全去除，OTC 與 TC 則可在 42 天內被完全去除，若在 15°C 的暗房內處理時，在 49 天後 OTC、TC 及 CTC 之去除率分別為 64.7、66.7 及 73.3% (Chai *et al.*, 2016)。Zhou *et al.* (2013) 研究兩個都市廢水處理場廢水中 11 類 50 種抗生素的含量與宿命，A 場處理方式為活性污泥與加氯，B 場則為氧化渠與 UV。在污泥中含量較高可達 5,800 ppm 的四環素類抗生素有 TC 與 OTC，水相中抗生素的去除率依不同種類、場別及月分別而有所不同，磺胺類與四環素類 (TC、CTC、OTC) 在 A 場 5 月分去除率分別達 83.3 – 94.8% vs. 88.9 – 100%，11 月分去除率則分別為 58.8 – 73.8 vs. 93.8 – 100%，B 場的去除率較差。另有學者指出，利用活性污泥法去除豬糞中之 OTC、CTC 及去氧羥四環素 (doxycycline, DC)，去除率分別為 71 – 76%、75 – 80% 及 95% (Montes *et al.*, 2015)。Yin *et al.* (2016) 指出厭氧消化可移除豬糞中 CTC 與 OTC，完全移除的臨界濃度分別為 60 mg/kg 與 40 mg/kg (總固形物)。整體而言，堆肥化、活性污泥法或厭氧消化等生物處理方法，對畜牧糞尿中的抗生素去除效果不一，最高效率可達 100%。

### II. 施灌豬糞尿之水稻田土壤中抗生素含量

由表 1 得知 A 場新鮮豬糞中含有抗生素 TIA、TC、OTC、CTC 及 SMM。將 A 場高床豬舍新鮮糞尿施灌於

水稻田 M1 與 M2 做為基肥，土壤樣品與糞便樣品中檢測出之抗生素一致，以 CTC 含量最高，均值为 255 ppb。在施灌後 15 天再次採樣，則未檢出各種抗生素殘留，施用化肥組 (CF) 之土壤樣品則皆未檢出抗生素殘留。Qiao *et al.* (2012) 調查中國大陸三個地區施用豬糞堆肥農地土壤中四環素類抗生素之含量 (乾物重)，發現最低濃度為 4.7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，最高濃度為 776.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，其中 TC、OTC 及 CTC 的最高濃度分別為 90.0、12.3 及 239.4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。另有學者指出，當施用液態肥至土壤中時，四環素類抗生素的殘留濃度依土壤不同深度而有所差異，TC 介於 86.2 – 198.7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，CTC 則介於 4.6 至 7.3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  之間 (Hamscher *et al.*, 2002)。有其他的試驗結果顯示，當施用豬糞尿有機肥料至農地後，土壤中將會造成抗生素殘留而使得其中之微生物群落改變或微生物間抗藥性基因轉移的問題 (Zhou *et al.*, 2016)。

### III. 養豬場環境樣品中抗藥性生菌數

分別於 5 月與 10 月自 A 場與 C 場採集 6 種不同環境樣品，並以 2 種培養基分析抗 CTC 菌數占總生菌數的比例情形，發現當使用 TSA 培養基時，大部分環境樣品培養所得的生菌數與抗 CTC 菌數，較以 LA 培養基培養者多 (表 4)。在飼料中添加抗生素之 A 場的 6 種環境樣品中，TSA 培養基組的抗 CTC 菌數占總生菌數的比例，10 月份的數值均大於 5 月份者；在 LA 培養基組資料中，抗 CTC 菌數占總生菌數的比例 (除糞便樣品外)，10 月份的數值亦大於 5 月份者。在飼料中未添加抗生素之 C 場的 6 種環境樣品中，TSA 與 LA 培養基組的抗 CTC 菌數占總生菌數的比例，呈現 10 月份之數值大於 5 月份者的趨勢。此外，抗 CTC 菌數占總生菌數比例數值較高的樣品為以下：10 月採自 A 場的堆肥、土壤、厭氧處理水及放流水樣品；10 月採自 C 場的厭氧處理水與放流水樣品。文獻中亦指出飼料添加 CTC 的豬場 (儲存糞尿 6 個月) 與僅治療時使用 CTC 之牛場 (儲存糞尿 12 個月) 之糞尿施灌農地與非農業用地，其土壤中抗 CTC 菌數與菌種無顯著差異 (Ghosh and LaPara, 2007)。Alali *et al.* (2009) 亦指出只有在分娩母豬與小豬飼料中添加  $> 0.04 \text{ g}/\text{swine kg-month}$  CTC 時，糞便中抗藥性 *E. coli* 比例才顯著高於未添加者 (96.6 vs. 81.1%)，而在公豬、保育豬、肥育豬等則無顯著差異。

### IV. 施灌豬糞尿之水稻田土壤中抗藥性生菌數

2012 年 2 月及 7 月施灌新鮮豬糞尿之水稻田 (M1、M2) 與施用化肥 (CF) 之水稻田中，在不同月份採樣與以不同培養基培養條件下，抗 CTC 之菌數占總生菌數比例變化情形，除 M2 組於 2 至 7 月有逐步上升之趨勢外，最高可達 70% 以上，M1 組資料顯示於 7 月時抗藥性生菌數百分比最高，可達 50%。CF 對照組的抗藥性生菌數百分比，其數值均在 10% 以下 (圖 1)。以 TSA 與 TSA + CTC 培養基計數結果，M1 與 M2 組在 7 月份抗藥性生菌數百分比比較其他月份高；而以 LA 與 LA + CTC 培養基計數結果，同樣在 7 月抗藥性生菌數百分比比較其他月份高。無論以 TSA 或 LA 培養基與 TSA + CTC 或 LA + CTC 培養基計數結果，CF 組在 2、3、4、6 及 7 月的抗藥性生菌數百分比均較 M1 與 M2 組為低。因本試驗採樣地點位於臺中霧峰，故參考中央氣象局設於農業試驗所之氣象站 ([http://www.cwb.gov.tw/V7/climate/agri/agri\\_month.htm](http://www.cwb.gov.tw/V7/climate/agri/agri_month.htm)) 紀錄資料 (缺 2 月份資料)，2012 年 3、4、6 及 7 月的月均溫資料依序為 19.9、24.3、27.7、29.0 $^{\circ}\text{C}$ 。7 月份抗藥性生菌數百分比最高的可能原因，在 7 月時進行糞尿施灌於水稻田試驗區，且溫度較高而適合中溫菌 (mesophilic bacteria) 之生長。另外，Udikovic-Kolic *et al.* (2014) 指出施加糞肥的農地比施加化肥農地土壤樣品中含有較豐富的抗藥性細菌，因而施加糞肥的農地土壤含有較高的抗藥性生菌數百分比。

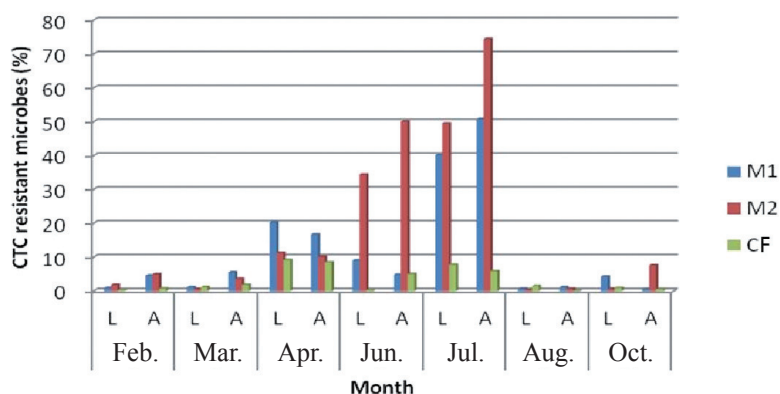


圖 1. 2012 年水稻田施加 A 場豬糞與化學肥料土壤中抗氯四環素菌數百分比。

Fig. 1. The percentage of CTC resistant bacteria in paddy soil fertilized with swine manure from A farm and chemical fertilizer in 2012.

M1, M2: Soil irrigated with swine manure; CF: Soil applied with chemical fertilizer. L: Luria-Bertani agar; A: Trypticase soy agar.

表 4. 養豬場環境樣品中生菌數與抗藥性菌數比較

Table 4. Comparison of total plate count and number of antibiotic resistant isolates in the environmental samples of pig farms

Farm A	Feces			Compost			Soil			Wastewater			Anaerobic treated			Effluent										
	May	Oct.	May	Oct.	May	Oct.	May	Oct.	May	Oct.	May	Oct.	May	Oct.	May	Oct.	May	Oct.								
TSA <sup>a</sup>	7.4 ± 1.0E15 <sup>d</sup>	9.6 ± 1.7E14	8.6 ± 0.2E9	2.9 ± 0.3E6	4.5 ± 1.7E6	6.9 ± 0.7E5	6.3 ± 0.7E11	2.6 ± 0.2E9	3.5 ± 0.4E6	2.9 ± 0.3E5	5.3 ± 0.6E4	1.2 ± 0.2E4	TSA + CTC <sup>b</sup>	5.3 ± 1.0E10	1.3 ± 0.2E13	1.3 ± 0.2E8	2.2 ± 0.3E6	9.3 ± 1.3E4	4.6 ± 0.6E5	1.3 ± 0.09E9	2.9 ± 0.8E8	1.1 ± 0.7E5	2.5 ± 0.3E5	3.4 ± 1.5E2	1.2 ± 0.02E4	
<b>Rate (%)</b>	<b>0.00072</b>	<b>1.31</b>	<b>1.50</b>	<b>76.3</b>	<b>2.07</b>	<b>67.5</b>	<b>0.21</b>	<b>11.3</b>	<b>3.16</b>	<b>88.7</b>	<b>0.65</b>	<b>96.5</b>														
LA <sup>c</sup>	2.7 ± 1.1E10	6.4 ± 0.5E12	1.1 ± 0.1E9	2.0 ± 0.5E6	5.8 ± 1.2E6	4.0 ± 0.2E5	7.0 ± 0.4E10	3.3 ± 1.2E8	7.9 ± 3.2E5	7.2 ± 0.8E4	1.5 ± 0.05E4	2.4 ± 0.5E3	LA + CTC	1.3 ± 0.2E9	7.2 ± 1.8E10	1.2 ± 0.03E8	1.5 ± 0.5E6	4.8 ± 0.4E5	2.7 ± 0.2E5	1.4 ± 0.1E8	2.2 ± 0.8E8	3.1 ± 0.5E4	4.7 ± 1.3E4	2.6 ± 1.4E2	2.0 ± 0.7E3	
<b>Rate (%)</b>	<b>4.72</b>	<b>1.12</b>	<b>10.70</b>	<b>76.8</b>	<b>8.29</b>	<b>68.6</b>	<b>0.21</b>	<b>68.4</b>	<b>3.93</b>	<b>64.8</b>	<b>0.50</b>	<b>84.5</b>														
Farm C	Feces			Compost			Soil			Wastewater			Anaerobic treated			Effluent										
	May	Oct.	May	Oct.	May	Oct.	May	Oct.	May	Oct.	May	Oct.	May	Oct.	May	Oct.	May	Oct.								
TSA	4.2 ± 0.9E15	3.9 ± 0.5E14	3.6 ± 0.5E11	8.8 ± 0.1E10	8.7 ± 3.7E6	5.2 ± 1.4E5	6.3 ± 1.0E11	3.5 ± 0.6E10	3.7 ± 0.2E5	9.1 ± 1.1E4	2.8 ± 0.1E3	1.3 ± 0.2E4	TSA + CTC	4.6 ± 1.3E10	3.9 ± 1.7E10	4.6 ± 0.2E9	1.2 ± 0.2E8	4.2 ± 0.5E5	1.0 ± 0.04E5	5.9 ± 1.5E9	3.7 ± 0.6E9	4.2 ± 0.7E4	6.2 ± 1.2E4	1.9 ± 0.5E3	4.6 ± 0.1E3	
<b>Rate (%)</b>	<b>0.00110</b>	<b>0.01</b>	<b>1.28</b>	<b>0.14</b>	<b>4.85</b>	<b>19.3</b>	<b>0.93</b>	<b>10.6</b>	<b>11.34</b>	<b>68.0</b>	<b>67.96</b>	<b>35.6</b>														
LA	6.9 ± 0.7E10	2.3 ± 1.2E11	2.5 ± 0.2E11	4.2 ± 0.2E10	5.6 ± 0.6E6	5.1 ± 1.7E5	5.0 ± 0.8E11	2.6 ± 0.9E10	7.0 ± 0.6E4	6.3 ± 0.7E4	1.8 ± 0.3E3	1.4 ± 0.2E4	LA + CTC	9.8 ± 1.4E8	3.5 ± 0.8E9	1.3 ± 0.5E9	3.6 ± 0.4E7	2.1 ± 0.8E5	4.1 ± 0.5E4	7.0 ± 1.5E8	5.4 ± 1.8E8	4.7 ± 2.1E3	5.5 ± 0.4E4	4.5 ± 0.5E2	1.1 ± 0.07E4	
<b>Rate (%)</b>	<b>1.42</b>	<b>1.50</b>	<b>0.52</b>	<b>0.09</b>	<b>3.84</b>	<b>8.03</b>	<b>0.14</b>	<b>2.09</b>	<b>6.67</b>	<b>86.3</b>	<b>24.23</b>	<b>77.6</b>														

<sup>a</sup> TSA: Trypticase soy agar.<sup>b</sup> CTC: Chlorotetracycline.<sup>c</sup> LA: Luria-Bertani agar.<sup>d</sup> mean ± SD, E: Exponential. n = 3.

## V. 養豬場環境樣品中四環素抗性基因分析

不論 A 或 C 場糞便樣品萃取之 DNA 與所有測試之四環素抗性基因引子 (*TetA*、*TetB*、*TetC*、*TetD*、*TetE*、*TetG*、*TetM*、*TetO*、*TetS*、*TetQ*) 進行 PCR 反應，都能產生預期大小的 DNA 片段產物，表示糞便樣品中都含有此 10 種抗性基因 (表 5)。然而經 2 週發酵後的堆肥樣品則都無反應，但此與抗藥性生菌數測定結果不符 (表 4)。堆肥中抗藥性生菌數相當高，而以 PCR 反應測定呈負反應，推測為堆肥樣品 DNA 萃取時，亦萃取出干擾 PCR 反應之物質。因此，另進行 PCR 以分析堆肥樣品 DNA 之 16S rRNA 基因時，亦無預期之 DNA 片段產物，此結果證明堆肥抗藥性基因之負反應，應非無抗藥性基因存在。在原廢水與厭氧處理水中萃取之 DNA 對所有測試之抗四環素基因引子大都呈正反應 (表 5)。而在放流水中，A 場對所有測試之抗四環素基因引子都呈正反應，C 場則對 *tetE*、*tetS* 呈負反應。Chee-Sanford *et al.* (2001) 發現在處理豬糞尿的廢水塘中含有 *tetO*、*tetQ*、*tetW*、*tetM*、*tetB/P*、*tetS* 及 *tetT*。Xu *et al.* (2015) 調查生活污水處理廠水體樣品中含有的四環素抗性基因，發現 *tetA*、*tetB*、*tetE*、*tetM*、*tetZ* 及 *tetW* 的檢出率最高。在廢水處理場活性污泥樣品中，*tetA*、*tetC* 及 *tetG* 較其他 *tet* 基因常被檢測出 (Auerbach *et al.*, 2007; Zhang and Zhang, 2011)。

表 5. 養豬場樣品四環素抗性基因分析

Table 5. Tetracycline resistance genes detected in total DNA of environmental samples from pig farms

Sample	Farm	<i>tetA</i>	<i>tetB</i>	<i>tetC</i>	<i>tetD</i>	<i>tetE</i>	<i>tetG</i>	<i>tetM</i>	<i>tetO</i>	<i>tetS</i>	<i>tetQ</i>
Feces	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Compost	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Soil	A	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
	C	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
Wastewater	A	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
	C	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Anaerobic treated	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	C	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Effluent	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	C	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+

## VI. 施灌豬糞尿之水稻田土壤中四環素抗性基因

當進一步探討施灌豬糞尿之水稻田土壤中的四環素抗性基因分布時，發現 2012 與 2013 年施灌豬糞尿之水稻田土壤 M1 與 M2 組之四環素抗性基因檢出數分別為 33 vs. 31 次與 21 vs. 14 次，而對照化肥 CF 組則皆為 9 次 (表 6)，此結果表示施灌豬糞尿對土壤中抗藥性基因有影響，並與 CF 組抗藥性生菌數百分比皆較 M1 與 M2 組為低之結果相符 (表 4、圖 1)。以基因種類而言，2012 與 2013 年 M1 與 M2 組檢出 *tetA*、*tetB*、*tetC*、*tetD*、*tetE*、*tetG*、*tetM*、*tetO*、*tetQ*、*tetS* 的合計次數分別為 4 vs. 0、4 vs. 0、8 vs. 8、9 vs. 0、0 vs. 0、12 vs. 5、14 vs. 13、12 vs. 14、1 vs. 0、0 vs. 0 次，其中 *tetM* 與 *tetO* 的檢出率最高，平均達 96.4 與 92.9%。CF 組在 2012 與 2013 年於 10 個四環素抗性基因的檢出次數分別為 0 vs. 0、0 vs. 0、2 vs. 4、4 vs. 0、0 vs. 0、0 vs. 3、0 vs. 1、1 vs. 1、0 vs. 0、0 vs. 0 次。因此，比較 M1 和 M2 組與 CF 組四環素抗性基因兩年的檢出結果時，可得知 *tetM* 與 *tetO* 基因可當做土壤施灌豬糞尿與否之候選指標。由 A 養豬場糞尿樣品分離出 32 株抗藥性細菌中，90.6% 具有 *tetM* 基因 (表 7)，此結果亦可證實水稻田土壤中 *tetM* 基因來自養豬場糞尿中之抗藥性細菌。Chen *et al.* (2014) 分析以豬糞尿廢水灌溉的土壤，其中 *tetA*、*tetC*、*tetG*、*tetO* 及 *tetS* 檢出率較高，*tetB*、*tetD*、*tetQ* 則檢出率較低，且以 *tetG* 最為普遍。Wu *et al.* (2010) 研究確認 *tetM*、*tetO*、*tetQ* 及 *tetW* 的絕對數量與四環素殘留濃度有顯著相關性。Kang *et al.* (2015) 利用 PVC 管柱進行土壤和滅菌與否之豬糞添加 (施肥當量 20,000 kg/ha) 對四環素抗性基因的調查研究，剛開始時在 0 – 20 cm 耕作層發現 5 種抗性基因 *tetB*、*tetG*、*tetM*、*tetW* 及 *tetB/P*，但在 20 – 40 cm 與 40 – 60 cm 土層僅發現 *tetB* 與 *tetW*，但 30 天後在 20 – 40 cm 發現了另外三種抗性基因，且發現 *tetB/P* 在土壤中移動最快，接著為 *tetG* 與 *tetM*。Schmitt *et al.* (2006) 研究農地土壤中的四環素抗性基因，指出 *tetT*、*tetW* 及 *tetZ* 在土壤中分布很普遍，但 *tetY*、*tetS*、*tetC*、*tetQ* 及 *tetH* 則是因施肥而引入土壤中的。施用糞肥的來源與接受糞肥的土壤皆不同，故糞肥與土壤中四環素抗性基因種類不同，但糞肥中的抗性基因會轉移至土壤中。

表 6. 施灌豬糞尿水田土壤四環素抗性基因分布  
 Table 6. Distribution of tetracycline resistance genes in the soil irrigated with swine manure

	M1 <sup>a</sup>												M2												CF											
	Feb.	Mar.	Apr.	Jun.	Jul.	Aug.	Oct.	Feb.	Mar.	Apr.	Jun.	Jul.	Aug.	Oct.	Feb.	Mar.	Apr.	Jun.	Jul.	Aug.	Oct.	Feb.	Mar.	Apr.	Jun.	Jul.	Aug.	Oct.								
<i>tetA</i>	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-								
<i>tetB</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-							
<i>tetC</i>	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-							
<i>tetD</i>	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+							
<i>tetE</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-							
<i>tetG</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-							
<i>tetM</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
<i>tetO</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
<i>tetQ</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
<i>tetS</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
2013	M1												M2												CF											
<i>tetA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
<i>tetB</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
<i>tetC</i>	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-					
<i>tetD</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
<i>tetE</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
<i>tetG</i>	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-					
<i>tetM</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
<i>tetO</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
<i>tetQ</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
<i>tetS</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				

<sup>a</sup> M1, M2: Soil irrigated with pig manure; CF: Soil applied with chemical fertilizer.



表 7. 養豬場抗氯四環素菌株之四環素抗性基因 PCR 產物分析

Table 7. PCR products analysis of CTC resistant strains isolated from pig farms

Farm	Medium <sup>a</sup>	<i>tetA</i> <sup>b</sup>	<i>tetB</i>	<i>tetC</i>	<i>tetD</i>	<i>tetE</i>	<i>tetG</i>	<i>tetM</i>	<i>tetO</i>	<i>tetQ</i>	<i>tetS</i>
A	LA (n = 11)	0	9.1	0	9.1	27.3	18.2	90.1	9.1	0	36.4
	TSA (n = 21)	9.5	23.8	28.6	23.8	33.3	28.6	90.5	4.8	0	38.1
C	LA (n = 21)	19.0	4.8	23.8	28.6	4.8	9.5	95.2	14.3	9.5	9.5
	TSA (n = 24)	45.8	12.5	8.3	12.5	33.3	25.0	95.8	8.3	0	45.8

<sup>a</sup> Tetracycline resistant strains isolated from medium LA (Luria-Bertani agar) and TSA (Trypticase soy agar).

<sup>b</sup> Percentage of tetracycline resistant strains with PCR product of *tetA* gene.

n: Sample size.

## VII 養豬場樣品抗藥性菌株篩選與鑑定

針對自養豬場糞尿相關樣品中篩選所得之 77 株抗藥性微生物進行菌種鑑別與四環素抗性基因型檢測，結果顯示 A 場 32 株抗藥性分離株僅 3 株不含 *tetM* 基因，即 90.6% 分離株有 *tetM* 基因，C 場 45 株抗藥性分離株僅 2 株不含 *tetM* 基因，即 95.6% 分離株有 *tetM* 基因 (表 7)。進一步鑑定抗藥性分離株的身分，經篩除重複相同物種後，A 場有 10 種分離株，C 場則有 20 株，其中 A 與 C 場糞便中抗藥細菌皆有 *Corynebacterium* 屬的菌株 (表 8)。僅在 C 場堆肥樣品中鑑定出 *Microbacterium*、*Pseudomonas* 及 *Pseudoxanthomonas*，故無法與 A 場比較。在廢水處理系統中可以看出二場菌相之差異，C 場厭氧處理水與放流水樣品中，抗藥性細菌除以 *Bacillus* 屬為主以外，尚有 *Alcaligenes* 及 *E. coli*。在放流水樣品中，A 場抗藥性細菌有 *Comamonas*、*Rhodococcus*、*Providencia* 及 *Stenotrophomonas*。C 場放流水樣品中之菌相較一致，或可由其優勢菌種具抗藥性來說明其抗藥性生菌數所佔比例高之原因。Harnisz *et al.* (2015) 應用培養分離方式探討經處理廢水抗 OTC 與 doxycycline (DC) 的細菌種類，結果抗 OTC 菌株有 *Aeromonas* sp.、*Acinetobacter* sp.、*Shewanella putrefaciens*、*E. coli*、*Providencia* sp. 及 *Pseudomonas* sp.，抗 DC 菌株則有 *E. coli*、*Shewanella putrefaciens* 及 *Providencia* sp.，大多數菌株屬於 *Proteobacteria* 菌門。Chen *et al.* (2014) 利用 16S rRNA 基因序列鑑定抗磺胺嘧啶銀 (sulfadiazine) 與 TC 分離株，發現分離株屬於 *Pseudomonas* 與 *Bacillus*。另研究指出 *E. coli* 與 *Enterococcus* 為主要源自於糞便中的抗生素抗藥性細菌 (Walczak and Xu, 2011)。由上述之分離培養鑑定抗藥性菌株的方式，發現 *Pseudomonas*、*Bacillus*、*E. coli* 及 *Providencia* 等菌屬常見於豬糞尿樣品中。Huang *et al.* (2014) 利用次世代定序技術 (next generation sequencing, NGS) 與多源基因體學方式 (metagenomic approach) 分析經四環素處理之活性污泥中細菌群聚組成，結果發現有 9 個菌屬為抗四環素之細菌，包括 *Sulfuritalea*、*Armatimonas*、*Prostheco bacter*、*Hyphomicrobium*、*Azonexus*、*Longilinea*、*Paracoccus*、*Novosphingobium* 及 *Rhodobacter*，其中 6 個菌屬屬於 *Proteobacteria* 菌門，此種分析方式更為宏觀，亦可含括大多數未能以人為分離培養的菌株。綜合言之，因每個豬場運作方式之不同，包括場址環境、飼料配方、糞尿處理方式，且豬糞施肥的土壤與其中微生物群落亦有所差異。因此，抗藥性的細菌與基因組成隨之而異。

表 8. 應用 16S rRNA 基因序列鑑定抗 CTC 之分離株

Table 8. Identification of CTC resistant isolates using 16S rRNA sequences

Farm	Sample	Strain	Best match	Identity %
A	Feces	LA11	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	100
	Soil	LA31	<i>Ralstonia thomasi</i> RAL4, MC5	99
	Soil	LA33	<i>Bacillus thuringiensis</i> BC101	100
	Wastewater	LA45	<i>Rothia nasimurium</i> CCUG 35957	99
	Treated water	LA52	<i>Acinetobacter seohaensis</i> SA-A5-61	99
	Treated water	LA55	<i>Corynebacterium variabile</i> T133	99
	Effluent	LA61	<i>Comamonas denitrificans</i> 110	100
	Effluent	LA63	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> CG30(3)-4	98
	Effluent	LA64	<i>Providencia stuartii</i> REG203	99
	Effluent	LA65	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> s215	100
C	Feces	LC11	<i>Escherichia coli</i> O83:H1 str. NRG 857C	100
	Feces	LC12	<i>Corynebacterium</i> sp. T2-10	99
	Feces	LC13	<i>Corynebacterium testudinoris</i> CCUG 41823	100
	Compost	LC21	<i>Microbacterium barkeri</i> GBA753	99
	Compost	LC23	<i>Microbacterium xinjiangensis</i> YIM 90724	98
	Compost	LC24	<i>Pseudomonas thermotolerans</i> CM3	99
	Compost	LC26	<i>Pseudoxanthomonas taiwanensis</i> S22-49	100
	Soil	LC32	<i>Arthrobacter oryzae</i> Asd M5-8	99
	Soil	LC31	<i>Bacillus subtilis</i> NH.160	100
	Soil	LC33	<i>Bacillus altitudinis</i> H1	99
	Wastewater	LC41	<i>Wautersiella falsenii</i> NF 203	99
	Wastewater	LC42	<i>Sphingobacterium daejeonense</i>	93
	Wastewater	LC44	<i>Corynebacterium xerosis</i> CG30(1)-4	100
	Wastewater	LC46	<i>Staphylococcus gallinarum</i> BBAL-01d	99
	ATW <sup>a</sup>	LC51	<i>Alcaligenes faecalis</i> MUN1	100
	ATW	LC52	<i>Bacillus subtilis</i> GR011	99
	ATW	LC53	<i>Bacillus licheniformis</i> Y822	100
	ATW	LC55	<i>Escherichia coli</i> OSBH1	99
	Effluent	LC61	<i>Bacillus subtilis</i> P53	100
	Effluent	LC64	<i>Bacillus cereus</i> L26	100

<sup>a</sup> ATW: Anaerobic treated wastewater.

## 結 論

豬糞尿中之抗生素經過堆肥化處理、厭氧消化及好氧活性污泥處理，皆可降低抗生素之殘留量，去除率為 36.4 – 99.2%。以新鮮糞尿施灌於水稻田作為基肥後，15 天後即未檢出各種抗生素殘留，但土壤中四環素抗性基因檢出率高於化肥組。不論是否使用抗生素作為飼料添加物，養豬場環境樣品皆可檢出抗 CTC 菌株及抗四環素基因。因此，為維護健康之環境與降低多重抗藥性微生物出現機率，養豬產業應避免使用四環素類抗生素。

## 參考文獻

廖仁寶、陳若菁、吳明哲、李佳音。2017。乳牛瘤胃細菌多樣性分析與新穎脂解酵素基因篩選。畜產研究 50：124-

133。

- Alali, W. Q., H. M. Scott, K. L. Christian, V. R. Fajt, R. B. Harvey and D. B. Lawhorn. 2009. Relationship between level of antibiotic use and resistance among *Escherichia coli* isolates from integrated multi-site cohorts of humans and swine. *Prev. Vet. Med.* 90: 160-167.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Arias, C. A. and B. E. Murray. 2009. Antibiotic-resistant bugs in the 21st century: a clinical super-challenge. *New Engl. J. Med.* 360: 439-443.
- Auerbach, E. A., E. E. Seyfried and K. D. McMahon. 2007. Tetracycline resistance genes in activated sludge wastewater treatment plants. *Water Res.* 41: 1143-1151.
- Bogaard, A. E. and E. E. Stobberingh. 2000. Epidemiology of resistance to antibiotics links between animals and humans. *Int. J. Antimicrob. Agents* 14: 327-335.
- Chai, R., L. Huang, L. Li, G. Gielen, H. Wang and Y. Zhang. 2016. Degradation of tetracyclines in pig manure by composting with rice straw. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 13: 254.
- Chee-Sanford, J. C., R. I. Aminov, I. J. Krapac, N. Garrigues-Jeanjean and R. I. Mackie. 2001. Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1494-1502.
- Chen, C., J. Li, P. Chen, R. Ding, P. Zhang and X. Li. 2014. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistances in soils from wastewater irrigation areas in Beijing and Tianjin, China. *Environ. Pollut.* 193: 94-101.
- Cherubin, C. E. 1984. Epidemiological assessments of antibiotic resistance in *Salmonella*. In: Steel JH, en Beran GW, editors. *CRC Handbook Series in Zoonoses*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, pp: 173-200.
- Edwards, U., T. Rogall, H. Blocker, M. Emde and E. C. Bottger. 1989. Isolation and direct complete determination of entire genes. *Nucleic Acids Res.* 17: 7843-7853.
- European Federation of Animal Health (FEDESA). 1998. Survey of antimicrobial usage in animal health in the EU. Brussels: FEDESA.
- Ghosh, S. and T. M. LaPara. 2007. The effects of subtherapeutic antibiotic use in farm animals on the proliferation and persistence of antibiotic resistance among soil bacteria. *ISME J.* 1: 191-203.
- Hamscher, G., S. Sczesny, H. Höper and H. Nau. 2002. Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 74: 1509-1518.
- Harnisz, M., E. Korzeniewska, S. Ciesielski and I. Gołaś. 2015. *tet* genes as indicators of changes in the water environment: Relationships between culture-dependent and culture-independent approaches. *Sci. Total Environ.* 505: 704-711.
- Huang, K., J. Tang, X. X. Zhang, K. Xu and H. Ren. 2014. A comprehensive insight into tetracycline resistant bacteria and antibiotic resistance genes in activated sludge using next-generation sequencing. *Int. J. Mol. Sci.* 15: 10083-10100.
- Kang, Y., X. Gu, Y. Hao and J. Hu. 2015. Autoclave treatment of pig manure does not reduce the risk of transmission and transfer of tetracycline resistance genes in soil: successive determinations with soil column experiments. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 23: 4551-4560.
- Lane, D. J., B. Pace, G. J. Olsen, D. A. Stahl, M. L. Sogin and N. R. Pace. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 6955-6959.
- Lin, A. Y., T. Yu and C. Lin. 2008. Pharmaceutical contamination in residential, industrial, and agricultural waste streams: Risk to aqueous environments in Taiwan. *Chemosphere* 74: 131-141.
- Lipsitch, M., R. S. Singer and R. S. Levin. 2002. Antibiotics in agriculture: where is it time to close the barn door? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 5752-5754.
- Liu, B., Y. Li, X. Zhang, C. Feng, M. Gao and Q. Shen. 2015. Effects of composting process on the dissipation of extractable sulfonamides in swine manure. *Bioresour. Technol.* 175: 284-290.
- Montes, N., M. Otero, R. N. Coimbra, R. Méndez and J. Martín-Villacorta. 2015. Removal of tetracyclines from swine manure at fullscale activated sludge treatment plants. *Environ. Technol.* 36: 1966-1973.
- Qiao, M., W. Chen, J. Su, B. Zhang and C. Zhang. 2012. Fate of tetracyclines in swine manure of three selected swine farms in China. *J. Environ. Sci. (China)*. 24: 1047-1052.

- Schmitt, H., K. Stoob, G. Hamscher, E. Smit and W. Seinen. 2006. Tetracyclines and tetracycline resistance in agricultural soils: microcosm and field studies. *Microb. Ecol.* 51: 267-276.
- Stine, O. C., J. A. Johnson, A. Keefer-Norris, K. L. Perry, J. Tigno, S. Qaiyumi, M. S. Stine and J. G. Morris Jr. 2007. Widespread distribution of tetracycline resistance genes in a confined animal feeding facility. *Int. J. Antimicrob. Agents* 29: 348-352.
- Udikovic-Kolic, N., F. Wichmann, N. A. Broderick and J. Handelsman. 2014. Bloom of resident antibiotic-resistant bacteria in soil following manure fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 111: 15202-15207.
- Walczak, J. J. and S. Xu. 2011. Manure as a source of antibiotic-resistant *Escherichia coli* and *Enterococci*: a case study of a Wisconsin, USA family dairy farm. *Water Air Soil Pollut.* 219: 579-589.
- Widyasari-Mehta, A., S. Hartung and R. Kreuzig. 2016. From the application of antibiotics to antibiotic residues in liquid manures and digestates: A screening study in one European center of conventional pig husbandry. *J. Environ. Manage.* 177: 129-137.
- Wilson, K. H., R. B. Blitchington and R. C. Green. 1990. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1942-1946.
- Wu, N., M. Qiao, B. Zhang, W. D. Cheng and Y. G. Zhu. 2010. Abundance and diversity of tetracycline resistance genes in soils adjacent to representative swine feedlots in China. *Environ. Sci. Technol.* 44: 6933-6939.
- Wu, X., Y. Wei, J. Zheng, X. Zhao and W. Zhong. 2011. The behavior of tetracyclines and their degradation products during swine manure composting. *Bioresour. Technol.* 102: 5924-5931.
- Xu, J., Y. Xu, H. Wang, C. Guo, H. Qiu, Y. He, Y. Zhang, X. Li and W. Meng. 2015. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a sewage treatment plant and its effluent-receiving river. *Chemosphere* 119: 1379-1385.
- Yin, F., H. Dong, C. Ji, X. Tao and Y. Chen. 2016. Effects of anaerobic digestion on chlortetracycline and oxytetracycline degradation efficiency for swine manure. *Waste Manage.* 56: 540-546.
- Zhang, Y., C. F. Marrs, C. Simon and C. Xi. 2009. Wastewater treatment contributes to selective increase of antibiotic resistance among *Acinetobacter* spp. *Sci. Total Environ.* 407: 3702-3706.
- Zhang, X. X. and T. Zhang. 2011. Occurrence, abundance, and diversity of tetracycline resistance genes in 15 sewage treatment plants across China and other global locations. *Environ. Sci. Technol.* 45: 2598-2604.
- Zhou, L. J., G. G. Ying, S. Liu, J. L. Zhao, B. Yang, Z. F. Chen and H. J. Lai. 2013. Occurrence and fate of eleven classes of antibiotics in two typical wastewater treatment plants in South China. *Sci. Total Environ.* 452-453: 365-376.
- Zhou, X., M. Qiao, F. H. Wang and Y. G. Zhu. 2017. Use of commercial organic fertilizer increases the abundance of antibiotic resistance genes and antibiotics in soil. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 24: 701-710.



# The fate and distribution of antibiotic residues and tetracycline resistance genes in pig manure and wastewater <sup>(1)</sup>

Mei-Ping Cheng <sup>(2)</sup> Ting-Hsun Hsiao <sup>(2)</sup> and Ren-Bao Liaw <sup>(3)(4)</sup>

Received: Jan. 13, 2017; Accepted: Jul. 26, 2017

The objective of this study was to reveal the impacts of the use of antibiotics in pig farm on the environment. The antibiotic residues and distribution of tetracycline resistance genes from the samples of feces, effluent, compost, and manure-amended soil were investigated. Two pig farms were selected; the feed of Farm A was supplemented with antibiotics, but no antibiotics were added in the feed of Farm C. All of the antibiotic residues in samples were measured by HPLC-MS/MS. The results showed the antibiotic residues in samples were significantly higher in Farm A than Farm C. The removal rates for tetracyclines with treatments of composting, anaerobic digestion, and activated sludge digestion were 94.9-98.1%, 77.3-92.4%, and 57.7-75.8%, respectively. For SMM, the removal rate with 98.8% under anaerobic digestion was higher than that with 36.4% under activated sludge treatment. After 15 days, the antibiotic residues in the paddy soil irrigated with fresh pig feces from Farm A could not be detected. By PCR with the primers of tetracycline resistance genes, most samples (91.3%) from two farms showed positive effects. It demonstrated that antibiotic resistant bacteria also resided in the farm with no antibiotics in feed. Besides, the number of antibiotic resistant bacteria and the detection rate for tetracycline resistance genes in the paddy soil with chemical fertilizer were less than those with fresh swine feces. In conclusion, pig industry should avoid using tetracycline to decrease the occurring frequency of multidrug resistance microorganisms and maintain healthy environments.

Key words: Antibiotics, Tetracycline resistance gene, Pig manure.

---

(1) Contribution No. 2569 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Division of Livestock Management, COA-LRI, Hsinhua, Tainan 71246, Taiwan, R.O.C.

(3) Division of Breeding and Genetics, COA-LRI, Hsinhua, Tainan 71246, Taiwan, R.O.C.

(4) Corresponding author, E-mail: liawrb@mail.tlri.gov.tw.