

文章编号: 1000-0615(2018)05-0797-11

DOI: 10.11964/jfc.20170410809

## 天津市周边地区养殖凡纳滨对虾肠道菌株的 分离鉴定及耐药性分析

左志晗<sup>1\*</sup>, 李艳红<sup>1</sup>, 邵迎春<sup>1</sup>, 耿绪云<sup>2</sup>, 董学旺<sup>2</sup>, 孙金生<sup>1</sup>

(1. 天津师范大学生命科学学院, 天津市动植物抗性重点实验室, 天津 300387;

2. 天津市水生动物疫病预防控制中心, 天津 300221)

**摘要:** 随着抗生素在水产养殖业中的普遍应用, 细菌耐药性成为环境和食品安全的主要问题。本文旨在通过对天津地区养殖凡纳滨对虾体内细菌的耐药信息进行分析统计, 为凡纳滨对虾养殖业的疾病控制和提高水产品安全性提供理论指导。本研究对天津市津南区、汉沽区及西青区等对虾养殖基地取样的凡纳滨对虾进行肠道微生物的分离培养, 抗生素药敏实验以及抗生素抗性基因的检测。共获得菌株1 219株, 选取其中有代表性的215株菌株进行鉴定, 结果显示, 所鉴定菌株属于56种不同种属, 主要以芽孢杆菌、副溶血性弧菌、葡萄球菌、肺炎克雷伯菌、席罗弧菌、溶藻弧菌、格氏乳球菌、希瓦氏菌、霍氏肠杆菌、库特氏菌、施氏假单胞菌、荚膜红细菌、液化沙雷氏菌、不动杆菌、假单胞菌、假交替单胞菌及霍乱弧菌等为主。所鉴定菌株的抗生素药敏实验分析结果发现, 凡纳滨对虾肠道微生物普遍存在抗生素抗性, 其中 $\beta$ -内酰胺类的氨苄西林、糖肽类的杆菌肽、喹诺酮类的罗美沙星和磺胺类的磺胺抗药性最为明显。因此本文进一步对其中耐药种类较多且耐药性较强的82株细菌对四大类抗生素(链霉素类、磺胺类、四环素类和青霉素类)的抗性基因(*strA-strB*, *sulII*, *sulII*, *sulIII*, *tetA*, *tetC*, *tetG*, *bla<sub>XA-1</sub>*, *bla<sub>PSE-1</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*)以及整合子(*inT1*和*inT2*)携带情况进行检测。研究结果表明, 所检测耐药菌株均携带抗性基因, 其中磺胺类抗性基因的检出率最高, 可达63%, 其次是青霉素类抗性基因, 检出率为61.4%, 整合子基因平均检出率为42.1%, 四环素类相对较少为35.4%, 且四环素类只检测出*tetA*抗性基因, 其中67.1%的菌株存在多种耐药基因。

**关键词:** 凡纳滨对虾; 肠道微生物; 分离鉴定; 抗性基因

**中图分类号:** S 917.1

**文献标志码:** A

近年来, 高密度集约化对虾养殖业在世界范围内兴起, 细菌性疾病在密集型的养殖体系中发病率极高<sup>[1]</sup>, 严重制约了该产业的持续健康发展, 为解决该问题, 各种防治措施应运而生, 其中抗生素治疗成为防治病害的重要手段。而随着抗生素的滥用, 由此导致的养殖环境恶化、病原菌耐药性增强、养殖动物药物残留以及相关食品安全性等问题也日益为人们所关注<sup>[2]</sup>。

目前已有较多相关报道对不同养殖环境和水体中细菌的耐药性及其耐药基因携带情况进行了检测, 并对引起抗性基因的产生和抗性水平上升的原因做了相关研究, 发现抗生素的广泛应用导致的细菌耐药性及抗生素抗性基因污染比较普遍。Di Cesare等<sup>[3]</sup>在地中海附近的鱼类养殖场的鱼体内检测到了*tetM*、*tetO*、*tetL*、*tetK*等多种抗性基因。Reboucas等<sup>[4]</sup>在巴西的一个

收稿日期: 2017-04-21 修回日期: 2017-10-18

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划(2012AA092205, 2012AA10A401); 国家重点基础研究发展计划(2012CB114405); 天津市人才发展特殊支持计划高层次创新创业团队项目(06202-52K16001)

通信作者: 左志晗, E-mail: zhihanzuo@163.com

虾养殖场的养殖水体中发现了携带四环素抗性基因的弧菌(*Vibrio* spp.)。Graham等<sup>[5]</sup>对位于哈瓦那西部的一条河流水体中的13种抗性基因(antibiotic resistance genes, ARGs)进行检测,发现每种ARGs都有不同程度的检出。Chen等<sup>[6]</sup>对沿珠江流域至珠江河口水体中的四环素ARGs含量进行了检测,结果发现*tetG*的含量相对较高,其他类四环素也被检测到,含量较*tetG*稍低。Ling等<sup>[7]</sup>在中国地理差异较大的南、北方江河中均检测到磺胺类、四环素类ARGs,其中磺胺类ARGs中*suII*的含量较*suII*高,四环素类ARGs中,*tetG*的检出率最高,*tetC*的检出率相对较低。Jiang等<sup>[8]</sup>在黄浦江流域水体中检测到了一种内酰胺类ARGs,两种磺胺类ARGs,8种四环素类ARGs,并对多种基因进行定量分析。写腊月<sup>[9]</sup>研究发现,海水养殖源弧菌中整合子携带的耐药基因盒主要为:*dfpA12+orfF+aadA2*,其主要编码氨基糖苷类和磺胺类抗菌药物耐药基因。薛慧娟等<sup>[10]</sup>研究认为,水产耐药菌株对喹诺酮类药物耐药性决定区(QRDR)中*GyrA*基因的突变,可能是引起细菌对萘啶酸耐药的主要原因。王小亮等<sup>[11]</sup>研究发现,鱼源病原菌中喹诺酮类的耐药基因阳性检出率显著高于耐药表型阳性检出率。邹世春等<sup>[12]</sup>的实验结果显示,北江河水体中磺胺类药物的抗性水平与该地区水域中磺胺含量的分布有一定的相关性,这在一定程度上说明水体中低浓度的抗生素可能是引起抗性基因抗性水平上升的重要原因。

国内外关于抗菌药物耐药基因的研究较多<sup>[13-16]</sup>,而针对水产养殖生物体内抗性基因的研究相对较少,基于该研究现状,本实验对前期分离自不同养殖地区的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)肠道微生物进行分离鉴定,对鉴定出的各类微生物进行抗生素敏感性实验,并对抗性菌株的抗性基因进行检测,旨在揭示抗生素抗性基因在水产养殖生物体内的扩散和传播规律,进而对评价抗生素抗性基因的生态风险提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 培养基

高氏一号培养基、酵母浸出粉胨葡萄糖琼脂培养基(YPD)、乳酸细菌培养基(MRS)、乳杆菌选择性培养基(LBS)、牛肉膏蛋白胨培养基

(LB)均购于北京陆桥技术有限责任公司;2216E培养基、VNSS培养基配制参照Furniss等<sup>[17]</sup>的方法,芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)分离培养基配制参照生物工程实验技术手册<sup>[18]</sup>;药敏纸片购于杭州微生物试剂有限公司。

### 1.2 实验方法

**样品采集、处理及保存** 以天津市汉沽区、津南区、西青区等多个不同养殖场养殖的健康凡纳滨对虾为样品,采用7种培养基(2216E、MRS、LBS、VNSS、YPD、高氏一号、芽孢杆菌分离培养基)对其肠道微生物进行分离培养,共分离获得菌株1 219株。将初步分离到的菌株挑单克隆、多次划线纯化,于-80℃甘油管冻存备用。

**细菌基因组DNA的提取** 根据已有方法<sup>[19]</sup>,并略做改良,具体方法:将纯化好的各菌株接种于相应培养液中,摇床180 r/min培养24 h。取1 mL培养液,8 000 r/min离心3 min,弃上清液,加入0.1 mL无菌水,振荡摇匀后,沸水浴10 min,于12 000 r/min离心10 min,上清液即可作为DNA模板。

**菌种16S rDNA的PCR扩增** 以细菌基因组DNA为模板,上游引物27F: AGAGTTG-ATCCTGGCTCAG,下游引物1492R: GGT-TACCTTGTTACGACTT(引物由北京金唯智生物科技有限公司合成),进行16S rDNA的PCR扩增。扩增条件:94℃预变性4 min;94℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸90 s,35个循环;72℃终延伸10 min,4℃终止反应。

**序列的测定及比对** 经PCR扩增获得各菌株的16S rDNA,经电泳检测后委托北京金唯智生物科技有限公司进行双向测序,测序引物为扩增引物27F和1492R,测序结果在GenBank([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))中进行blast序列比对,确定菌株所属菌属。

**鉴定菌株的药敏性实验** 从鉴定出的菌种中选取具有代表性的152株进行18种常用抗生素的药敏实验,实验采用纸片琼脂扩散法<sup>[20-21]</sup>,培养结束后测量并记录抑菌圈直径,每种抗生素做3个平行。用标准敏感菌株大肠杆菌(*Escherichia coli*)(ATCC25922)作为质控菌(特别说明的除外),受试菌株对18种抗生素的药敏性参照美国临床和实验室标准协会(CLSI)的方法和标准。

ARGs的定性分析 用于扩增抗性基因的模板制备方法采用文中“细菌基因组DNA的提取”方法, 参照文献设计各类引物(表1), 四环素类抗性基因<sup>[22]</sup>(*tetA*、*tetC*、*tetG*)、磺胺类抗性基因<sup>[23]</sup>(*sulI*、*sulII*、*sulIII*)、链霉素类抗性基因<sup>[24]</sup>(*strA-strB*)、青霉素类抗性基因(*blaTEM*<sup>[25]</sup>、*bla<sub>OXA-1</sub>*<sup>[26]</sup>、*bla<sub>PSE-1</sub>*<sup>[27]</sup>)4类常见抗性基因以及整合子<sup>[25]</sup>(*inT1*、*inT2*)基因的引物。

表 1 不同基因的引物序列和扩增条件

Tab. 1 Sequences of primers and amplification procedures of different genes

类别 category	基因名称 gene name	引物序列5'→3' primer sequence 5'→3'	退火温度/°C annealing temperature	产物长度/bp product length
磺胺类 sulfas	<i>Sul I</i>	CGCACCGGAAACATCGTGAC	65	163
		TGAAGTTCCGCCGAAGGCTCG		
	<i>Sul II</i>	TCCGGTGGAGCCGGTATCTGG	58	191
		CGGGAATGCCATCTGCCTTGAG		
	<i>Sul III</i>	TCCGTTCAGCGAATTGGTGCAG	61	128
		TTCGTTCACGCCTTACACCAGC		
四环素类 tetracyclinas	<i>tet A</i>	GCTACATCTGCTTGCCCTTC	58	210
		CATAGATCGGCGTGAAGAGG		
	<i>tet C</i>	CTTGAGAGCCTTCAACCCAG	58	418
		ATGGTCGTCATCTACCTGCC		
	<i>tet G</i>	GCTCGGTGGTATCTCTGCTC	58	468
		AGCAACAGAATCGGGAACAC		
青霉素类 penicilinas	<i>bla<sub>OXA-1</sub></i>	AGCAGCGCCAGTGCATCA	55	708
		ATTCGACCCCAAGTTTCC		
	<i>bla<sub>PSE-1</sub></i>	CTCACCCAGAAACGCTGGTG	55	419
		ATCCGCCTCCATCCAGTCTA		
	<i>blaTEM</i>	CTCACCCAGAAACGCTGGTG	60	569
		ATCCGCCTCCATCCAGTCTA		
整合子 integron	<i>inT1</i>	CAGTGGACATAAGCCTGTTC	55	160
		CCCAGGCATAGACTGTA		
	<i>inT2</i>	GTTATTTTATTGCTGGGATTAGGC	55	166
		TTTTACGCTGCTGTATGGTGC		
链霉素类 streptomycins	<i>StrA-strB</i>	TATCTGCGATTGGACCCTCTG	60	538
		CATGTCTCATCTTGGATCGGCT		

## 2 结果

### 2.1 菌种的分离鉴定

以天津市津南区、汉沽区、西青区等不同养殖场的健康凡纳滨对虾为材料, 从凡纳滨对虾肠道内共分离纯化获得1 219株菌株, 选择215株不同形态菌株进行16S *rDNA*分子鉴定。首

先采用PCR技术扩增各菌株的16S *rDNA*, 结果均能克隆得到单一的目的条带, 扩增片段大小约为1.5 kb(图1); 扩增产物经测序及在GenBank中进行blast序列比对, 结果显示, 所分离菌种分别属于56个不同种属, 主要以芽孢杆菌、副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、葡萄球菌(*Staphylococcus*)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)、

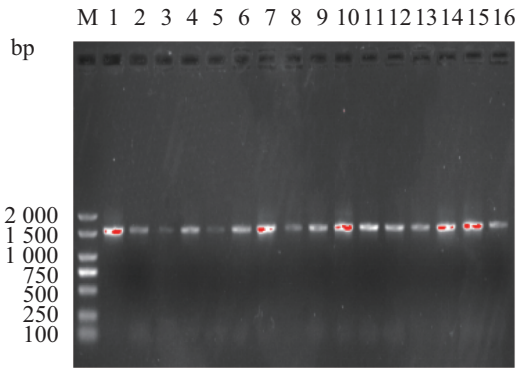


图1 菌株16s rDNA基因的PCR扩增

M. Marker 2000; 1~16. 检测菌株16s rDNA

Fig. 1 PCR amplification of bacteria 16S rDNA genes

M. Marker 2000; 1~16. 16s rDNA of strains

席罗弧菌(*V. xiluo*)、溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)、格氏乳球菌(*Lactococcus garvieae*)、希瓦氏菌(*Shewanella* sp.)、霍氏肠杆菌(*Enterobacter hormaechei*)、库特氏菌(*Kurthia* sp.)、施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)、荚膜红细菌(*Rhodobacter capsulatus*)、液化沙雷氏菌(*Serratia liquefaciens*)、不动杆菌(*Acinetobacter* sp.)、假单胞菌(*Pseudomonas*)、假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas whanghaensis*)、霍乱弧菌(*V. cholerae*)等为主, 这16种细菌共占全部菌种的88.35%(表2)。

2.2 细菌耐药率的检测

通过对选出不同种属的有代表性的152株菌株进行纸片法药敏实验分析, 结果发现, 其中

表2 细菌抗性基因检测结果

Tab. 2 The results of bacterial resistance genes detection

编号 number	菌种 strain	<i>suII</i>	<i>suIII</i>	<i>suIII</i>	<i>StrA-StrB</i>	<i>tetA</i>	<i>tetC</i>	<i>tetG</i>	<i>bla<sub>OXA-1</sub></i>	<i>inT1</i>	<i>inT2</i>	<i>bla<sub>PSE-1</sub></i>	<i>bla<sub>TEM</sub></i>
1	希瓦氏菌 <i>Shewanella</i> sp.	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
3	液化沙雷氏菌 <i>Serratia liquefaciens</i>	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+
4	不动杆菌 <i>Acinetobacter</i> sp.	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
5	芽孢杆菌 <i>Bacillus</i> sp.	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
6	蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
11	荚膜红细菌 <i>R. capsulatus</i>	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-
12	假单胞菌属 <i>P. oryzihabitans</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
13	假交替单胞菌 <i>Pseudoalteromonas</i> sp.	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-
17	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
19	乳酸菌 <i>Lactobacillus</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
20	格氏乳球菌 <i>L. garvieae</i>	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
23	苏云金芽孢杆菌 <i>B. thuringiensis</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
30	席罗弧菌 <i>V. Xiluo</i>	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
32	副溶血性弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
33	霍乱弧菌 <i>V. cholerae</i>	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+
39	溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
55	解淀粉芽孢杆菌 <i>B. amyloliquefaciens</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
57	短小芽孢杆菌 <i>B. pumilus</i>	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+
58	施氏假单胞菌 <i>Pseudomonas stutzeri</i>	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
59	多黏芽孢杆菌 <i>B. polymyxa</i>	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+

注:“+”: 阳性;“-”: 阴性; 菌株编号下同; 由于篇幅所限, 表中仅列出20株代表性菌株

Notes:“+”: positive;“-”: negative; strain number same below; because of the limit of length, only 20 strains are listed in the table

的103株菌株都具有不同程度的耐药性(表3), 其中副溶血性弧菌、席罗弧菌、溶藻弧菌、格式乳球菌、霍乱弧菌以及部分芽孢杆菌的耐药性较强。少部分如表中11号(荚膜红细菌)、17号(枯草芽孢杆菌)、19号(乳酸菌)、55号(解淀粉芽孢杆菌)、57号(短小芽孢杆菌)、59号(多黏芽孢杆

菌)对抗生素的敏感性较强。对152株菌株的耐药性进行统计, 其中具有头孢类、青霉素类和磺胺类抗生素的抗性菌株数量明显多于其余几种抗生素, 抗性菌株比例分别为66.45%, 63.82%和63.16%。四环素类抗性菌株最少, 抗性菌株比例为31.58%。

表3 菌株的药敏性实验结果

Tab. 3 The results of susceptibility tests of different strains

菌株 antibiotics	1	3	4	5	6	11	12	13	17	19	20	23	30	32	33	39	55	57	58	59
青霉素类 penicilinas	R	R	R	R	S	S	R	I	R	I	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S
青霉素 penicillin																				
美洛西林 mezlocillin	R	I	R	I	R	R	R	R	I	S	R	R	I	R	I	I	S	S	I	S
阿洛西林 azlocillin	I	R	I	S	R	I	I	R	S	S	R	I	R	I	R	R	I	S	R	S
β-内酰胺类 β-lactams	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	S	I	R	I
氨基糖苷类 aminoglycosides	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	S	I	R	I
庆大霉素 gentamicin	R	I	I	R	I	I	R	R	S	S	R	R	R	I	R	I	I	S	R	S
卡那霉素 kanamycin	R	R	R	I	R	S	R	I	I	S	I	R	I	R	I	R	S	R	I	I
大环内酯类 macrolideos	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	R	I	R	R	I	I	S	S	R	R
红霉素 erythromycin	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	R	I	R	R	I	I	S	S	R	R
麦迪霉素 midecamycin	I	R	I	S	I	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S
四环素类 tetracyclinas	R	I	R	R	R	S	I	I	S	I	I	I	I	R	I	R	I	I	I	S
四环素 tetracycline																				
喹诺酮类 fluoroquinolonas	R	R	R	S	R	S	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S
罗美沙星 lomefloxacin																				
其他 others	R	I	R	R	I	I	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	I	I	S	R
氯霉素 chloramphenicol																				
呋喃妥因 nitrofurantoin	I	R	S	S	I	S	R	R	R	S	R	I	S	R	S	I	R	S	R	I
利福平 rifampin	R	R	R	R	S	S	I	I	S	I	R	R	R	R	R	R	S	I	I	S
磺胺类 sulfas	R	R	R	R	R	I	R	R	R	S	R	R	R	I	R	R	I	S	R	S
磺胺 sulfa																				
链霉素类 streptomycins	R	R	R	I	R	S	R	R	R	I	R	R	I	R	R	R	S	I	R	S
链霉素 streptomycin																				

注: R. 耐药; I. 中度敏感; S. 敏感

Notes: R. resistant; I. intermediate; S. sensitive

### 2.3 抗生素抗性基因的定量分析

分离菌株的药敏性实验结果显示, 所分离菌株对多种常见抗生素具有不同程度的耐药性, 因此对其中耐药种类多、耐药性强的具有代表性的82株菌株进行进一步研究, 检测其抗生素抗性基因以及整合子携带情况。采用PCR技术对该82株耐药菌株分别检测四环素类抗性基

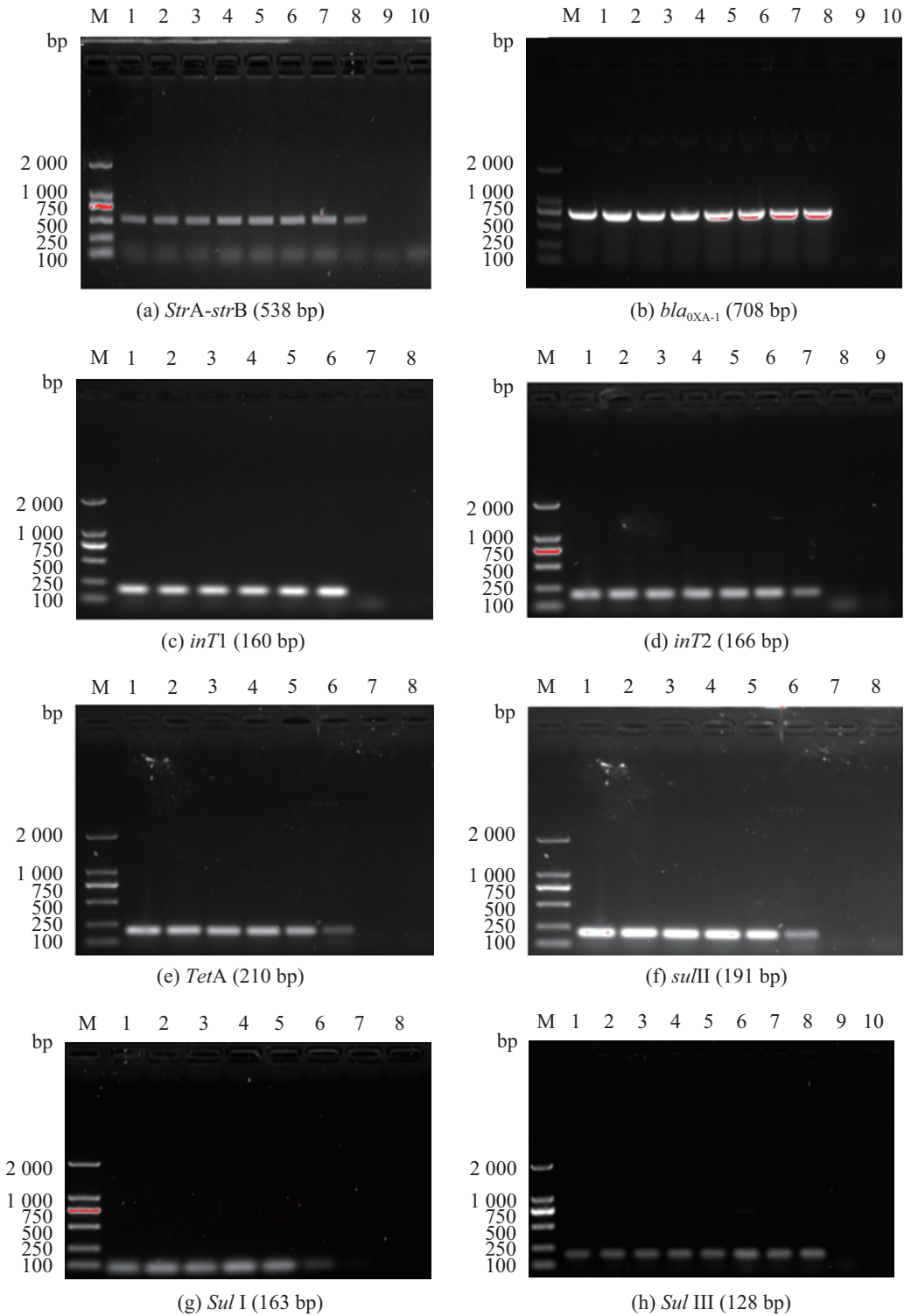
因<sup>[22]</sup>(*tetA*、*tetC*、*tetG*)、磺胺类抗性基因<sup>[23]</sup>(*suII*、*suIII*、*suIII*)、链霉素类抗性基因<sup>[24]</sup>(*strA*、*strB*)、青霉素类抗性基因(*bla*<sub>TEM</sub><sup>[25]</sup>、*bla*<sub>OXA-1</sub><sup>[26]</sup>、*bla*<sub>PSE-1</sub><sup>[27]</sup>)等4类常见抗生素抗性基因以及整合子(*int1*、*int2*)<sup>[25]</sup>的存在情况。PCR扩增结果显示, PCR所得片段大小与抗性基因理论大小一致, 初步证明样品中含有该抗生素的抗性基因(图2), 其中含有至少2种抗性基因的菌株共55株, 以副



溶血性弧菌、芽孢杆菌、席罗弧菌、霍乱弧菌、假交替单胞菌含抗性基因为主(表3), 相同的种属所携带抗性基因相似, 表中只列举了不同种属携带抗性基因的情况。

82株菌株中, 39株*StrA-StrB*基因扩增结果呈阳性; 52株*suI*基因、47株*suIII*基因和56株

*suIII*基因扩增结果均呈阳性, 其中有31株细菌同时携带*suI*、*suII*、*suIII*3种磺胺类抗性基因, 以副溶血性弧菌、霍乱弧菌、席罗弧菌、格式乳球菌、假单胞菌、液化沙雷氏菌、枯草芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌为主; 29株*tetA*基因扩增结果呈阳性; 52株*bla<sub>OXA-1</sub>*基因、48株*blaTEM*基



(图2 Fig. 2)

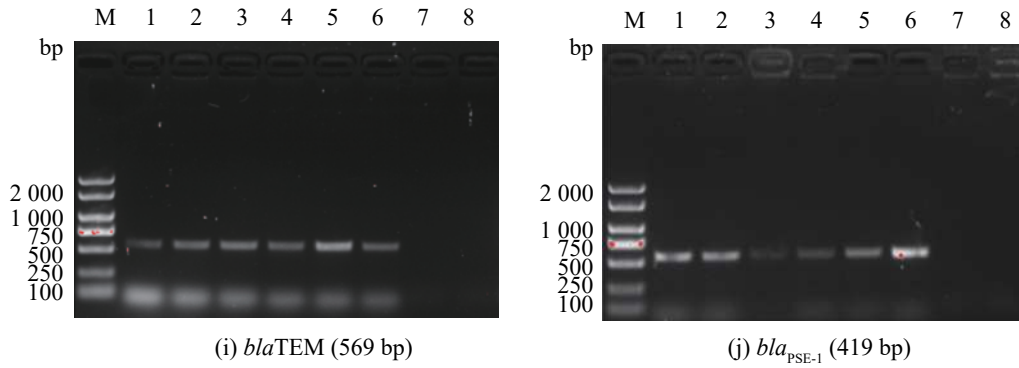


图 2 10种基因的PCR检测电泳图

M. 标准物质2000; 图(a), (b), (h): 1-9. 检测菌株基因组DNA; 10. 检测菌株用培养基空白对照; 图(c), (e), (f), (g), (i), (j): 1-7. 检测菌株基因组DNA; 8. 检测菌株用培养基空白对照; 图(d): 1-8. 检测菌株基因组DNA, 9. 检测菌株用培养基空白对照

Fig. 2 Occurrence of 10 genes by electrophoresis

M. Marker 2000; (a), (b), (h): 1-9. DNA of different strains; 10. medium of strains; (c), (e), (f), (g), (i), (j): 1-7: DNA of different strains; 8. medium of strains; (d): 1-8. DNA of different strains, 9. medium of strains

因和51株blaPSE-1基因扩增结果均呈阳性, 其中有33株菌株同时携带blaOXA-1、blaTEM、blaPSE-1 3种青霉素类基因, 以希瓦氏菌、席罗弧菌、液化沙雷氏菌、副溶血性弧菌、蜡样芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌和格式乳球菌为主; 35株inT1基因和34株inT2基因扩增结果均呈阳性, 未检测到tetC和tetG基因的存在, 以菌株对应未接种的培养基做空白对照, 检测结果均为阴性, 证明检测结果有效。

对上述结果进一步分析检出率(表4), 其中磺胺类抗性基因检出率最高, 平均可达63%, 其次是青霉素类抗性基因, 平均检出率为61.4%, inT基因也有检测出, 检出率为42.1%, 四环素类相对较少, 为35.4%, 且四环素类只检测出tetA, 种类单一。从结果中发现, 多数菌株内存在不止一种抗性基因, 该结果显示养殖凡纳滨对虾体内普遍存在抗生素抗性基因的污染。

### 3 讨论

本文对天津周边养殖场的凡纳滨对虾肠道内的微生物进行分离, 并对分离得到的菌株进行常见抗生素的耐药性统计, 其中头孢类、青霉素类和磺胺类抗生素的抗性菌株数量明显高于其余几种抗生素, 抗性菌株比例分别为66.45%, 63.82%和63.16%, 一方面因为这些抗生素使用历史较为悠久, 环境中存在的此类抗性菌株数量较大; 另一方面, 某些细菌如革兰氏阴性菌细胞壁除肽聚糖层外还具有较厚的外壁层, 对青

霉素本身并不敏感, 还有些自身天然携带青霉素抗性基因(如弧菌类)的细菌, 都是这类抗性菌株较多的重要原因。抗性菌株最少的为四环素类抗性菌株, 抗性菌株比例为31.58%, 与上个世纪七十年代初禁止四环素作为生长促进剂在养殖业中的应用有关, 该措施有效地缓解了养殖环境中四环素的耐药性选择压力, 在一定程度上减少了耐药细菌的数量。

由于抗生素在养殖业中的大量使用, 造成的水体以及水产养殖动物的污染, 目前已演变

表 4 各抗性基因检出率

Tab. 4 Detection rate of ARGs

基因名称 gene name	检出数/个 detection number	检出率/% detection rate
<i>suI</i>	52	63.4
<i>suII</i>	47	57.3
<i>suIII</i>	56	68.3
<i>StrA-StrB</i>	39	47.6
<i>tetA</i>	29	35.4
<i>tetC</i>	0	0
<i>tetG</i>	0	0
<i>inT1</i>	35	42.7
<i>InT2</i>	34	41.5
<i>blaOXA-1</i>	52	63.4
<i>blaPSE-1</i>	51	62.2
<i>blaTEM</i>	48	58.5

为一种新型的污染物——抗生素抗性基因<sup>[28]</sup>。本研究在药敏实验结果的基础上,对4类常见抗生素的抗性基因以及整合子基因进行检测,结果显示,耐药性菌株的抗性基因检出率为100%,所有抗性菌株均有抗性基因的检出,其中磺胺类抗性基因检出率最高,可达63%,可能与养殖过程中频繁使用磺胺二甲嘧啶、磺胺对甲氧嘧啶、磺胺嘧啶3种水产养殖常用药物有关,其余抗性基因依次为青霉素、链霉素、整合子以及四环素等抗性基因。编码磺胺类的抗性基因检出率检出情况为 $suIII > suII > suI$ ,4种抗性基因中四环素类抗性基因检出率相对最低且种类单一。高盼盼等<sup>[29]</sup>研究了天津北辰区、西青区、东丽区和津南区等6个水产养殖场中的四环素类抗性基因和磺胺类抗性基因,研究发现磺胺类抗性基因的浓度高于四环素类抗性基因的浓度,且底泥中耐药抗生素抗性基因浓度远高于水体。Luo等<sup>[30]</sup>对海河流域范围内的水体及沉积物进行抗性基因的定性和定量检测发现,河流和沉积物中普遍存在着磺胺类和四环素类抗性基因。Ling<sup>[7]</sup>等对我国北江的抗性基因进行了调查分析,所采集的20份样品中磺胺类及四环素类抗性细菌检出率为85%和70%,且磺胺类抗性基因含量较高。Phuong Hoa等<sup>[31]</sup>在越南北部的城市运河、养鱼池、养虾池同样发现编码磺胺类抗生素的抗性基因检出率较高,且 $suII > suIII$ 。综上所述,磺胺类抗性基因在不同地区水产养殖水体及水产动物体内普遍存在,且比例均较高,其中 $suI$ 抗性基因更为普遍。

Dang等<sup>[32]</sup>从中国北方的一个养殖场的海参(*Holothuro idea*)中分离的氯霉素抗性菌株有65%含有氯霉素耐药基因 $cat II$ 和 $cat IV$ 基因,而从海胆(*Echinoidea*)分离的菌株中35%含有 $cat II$ 基因。Petersen等<sup>[33]</sup>从87%的抗红霉素肠球菌菌株中发现红霉素耐药 $erm(B)$ 基因。王瑞旋等<sup>[16]</sup>来自鱼、虾、贝的54株细菌中检测到磺胺耐药基因 $suII$ ,氯霉素耐药基因 $cat I$ 、 $cat II$ 、 $cat III$ 和 $cat IV$ ,卡那霉素耐药基因 $aadB$ ,喹诺酮类耐药基因 $gyrA$ 。由此可见,不同水产养殖品种由于细菌种群组成以及养殖过程用药差异,导致不同抗性基因的分布趋势不同。

不同的耐药菌株检测到的耐药基因其种类和数目各异,呈现出复杂性。近年来,关于环境中残留抗生素对生物的影响和ARGs在环境介

质污染的研究逐渐增多,关于ARGs对生物影响的研究也越来越多,其中在河流<sup>[34]</sup>、下水道<sup>[35]</sup>、屠宰场<sup>[36]</sup>等环境和鱼<sup>[37]</sup>、家禽<sup>[38]</sup>等体内均发现耐药性细菌及耐药基因的存在。

抗生素在畜禽养殖业大量使用的过程中,大部分抗生素未经吸收而直接排出动物体外,对环境微生物构成选择性压力,在环境中诱导产生抗性微生物,其余部分抗生素可直接诱导动物体内微生物(如肠道细菌)产生抗性,并随动物粪便进入环境,最终可能通过水和食物等途径,在细菌和环境以及动物之间形成抗生素耐药基因的生态传播链。抗生素抗性基因的检测对于分析细菌的耐药性,阐释细菌耐药机理,以及耐药因子的起源及传播扩散动态途径提供了有效的手段,进而对揭示抗生素抗性基因在水产养殖生物体内及水环境中的扩散和传播规律,评价抗生素抗性基因的生态风险提供理论依据。

#### 参考文献:

- [1] Crecchio C, Ruggiero P, Curci M, *et al.* Binding of DNA from *Bacillus subtilis* on montmorillonite-humic acids-aluminum or iron hydroxypolymers[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 2005, 69(3): 834-841.
- [2] Sambasivam S, Chandran R, Khan S A. Role of probiotics on the environment of shrimp pond[J]. *Journal of Environmental Biology*, 2003, 24(1): 103-106.
- [3] Di Cesare A, Vignaroli C, Luna G M, *et al.* Antibiotic-resistant Enterococci in seawater and sediments from a coastal fish farm[J]. *Microbial Drug Resistance*, 2012, 18(5): 502-509.
- [4] Rebouças R H, De Sousa O V, Lima A S, *et al.* Antimicrobial resistance profile of *Vibrio* species isolated from marine shrimp farming environments (*Litopenaeus vannamei*) at Ceará, Brazil[J]. *Environmental Research*, 2011, 111(1): 21-24.
- [5] Graham D W, Olivares-Rieumont S, Knapp C W, *et al.* Antibiotic resistance gene abundances associated with waste discharges to the Almendares river near Havana, Cuba[J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45(2): 418-424.
- [6] Chen B W, Liang X M, Huang X P, *et al.* Differentiating anthropogenic impacts on ARGs in the Pearl River Estuary by using suitable gene indicators[J]. *Water Research*, 2013, 47(8): 2811-2820.



- [7] Ling Z H, Yang Y, Huang Y L, *et al.* A preliminary investigation on the occurrence and distribution of antibiotic resistance genes in the Beijiang River, South China[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2013, 25(8): 1656-1661.
- [8] Jiang L, Hu X L, Xu T, *et al.* Prevalence of antibiotic resistance genes and their relationship with antibiotics in the Huangpu River and the drinking water sources, Shanghai, China[J]. *Science of the Total Environment*, 2013, 458-460: 267-272.
- [9] 写腊月. 海水弧菌耐药性调查及整合子-基因盒系统检测[D]. 上海: 上海海洋大学, 2012  
Xie L Y. Survey of antimicrobial resistance and detection of integron gene cassettes of *Vibrio* isolates from mariculture[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2012(in Chinese)
- [10] 薛慧娟, 邓玉婷, 姜兰, 等. 水产动物源嗜水气单胞菌药物敏感性及其QRDR基因突变分析[J]. *广东农业科学*, 2012, 39(23): 149-153.  
Xue H J, Deng Y T, Jiang L, *et al.* Antimicrobial susceptibility and mutations of QRDR in *Aeromonas hydrophila* isolated from aquatic animals[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2012, 39(23): 149-153(in Chinese).
- [11] 王小亮, 徐立蒲, 曹欢, 等. 鱼源病原菌对氟喹诺酮类药物的耐药性分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2013, 40(3): 195-199.  
Wang X L, Xu L P, Cao H, *et al.* Analysis of the fluoroquinolone resistance of pathogens isolated from fish[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2013, 40(3): 195-199(in Chinese).
- [12] 邹世春, 朱春敬, 贺竹梅, 等. 北江河水中抗生素抗性基因污染初步研究[J]. *生态毒理学报*, 2009, 4(5): 655-660.  
Zou S C, Zhu C J, He Z M, *et al.* Preliminary studies on the pollution levels of antibiotic resistance genes in the water of Beijiang River, South China[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2009, 4(5): 655-660(in Chinese).
- [13] Antunes P, Machado J, Sousa J C, *et al.* Dissemination of sulfonamide resistance genes (*sul1*, *sul2*, and *sul3*) in Portuguese *Salmonella enterica* strains and relation with integrons[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005, 49(2): 836-839.
- [14] Enne V I, King A, Livermore D M, *et al.* Sulfonamide resistance in *Haemophilus influenzae* mediated by acquisition of *sul2* or a short insertion in chromosomal *folP*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2002, 46(6): 1934-1939.
- [15] 高晶晶, 邢丽丹, 吴元健, 等. 多重耐药鲍曼不动杆菌相关耐药基因的分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2015, 36(2): 187-188.  
Gao J J, Xing L D, Wu Y J, *et al.* Analysis of resistant genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. *International Journal of Laboratory Medicine*, 2015, 36(2): 187-188(in Chinese).
- [16] 王瑞旋, 耿玉静, 王江勇, 等. 水产致病菌耐药基因的研究[J]. *海洋环境科学*, 2012, 31(3): 321-328.  
Wang R X, Geng Y J, Wang J Y, *et al.* Antibiotic resistant genes in aquacultural bacteria[J]. *Marine Environmental Science*, 2012, 31(3): 321-328(in Chinese).
- [17] Furniss A L, Lee J V, Donovan T J. The vibrios[M]// Howells C H L, Path F R C, Meers P D, *et al.* Public Health Laboratory Service. London: Her Majesty's Stationery Office, 1978: 4-5
- [18] 栾雨时, 包永明. 生物工程实验技术手册[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005  
Luan S Y, Bao Y M. Biological engineering experiment handbook[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005(in Chinese)
- [19] 黄志坚, 陈旭凌, 路晓峰, 等. 水产养殖生物和养殖环境细菌鉴定及抗生素抗性基因检测[J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 2012, 51(6): 92-96.  
Huang Z J, Chen X L, Lu X F, *et al.* Identification and antibiotic resistance genes detection of bacteria in aquaculture organisms and aquatic environment[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2012, 51(6): 92-96(in Chinese).
- [20] 李长生, 曹静, 赵连山, 等. 呼吸内科老年患者感染病原菌分布及耐药性分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2013, 23(16): 4055-4057.  
Li C S, Cao J, Zhao L S, *et al.* Distribution and drug resistance of pathogens causing infections in elderly patients of respiratory medicine department[J]. *Chinese Journal of Nosocomiology*, 2013, 23(16): 4055-4057(in Chinese).
- [21] 蔡旭镇, 黄丽娜, 张泽伟, 等. 8431株病原菌的分布及耐药性分析[J]. *今日药学*, 2013, 23(11): 767-770.  
Cai X Z, Huang L N, Zhang Z W, *et al.* Distribution and drug resistance of 8431 pathogen strains[J]. *Pharmacy*

- Today, 2013, 23(11): 767-770(in Chinese).
- [22] Ng L K, Martin I, Alfa M, *et al.* Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2001, 15(4): 209-215.
- [23] Pei R T, Kim S C, Carlson K H, *et al.* Effect of river landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG)[J]. *Water Research*, 2006, 40(12): 2427-2435.
- [24] 窦秋燕. 猪粪中抗锌肠细菌及抗锌基因、抗生素抗性基因和毒力基因研究[D]. 昆明: 云南大学, 2010
- Dou Q Y. Research of zinc-resistant enteric bacteria and zinc-resistant genes, antibiotic resistant genes and virulence genes in piggeries[D]. Kunming: Yunnan University, 2010(in Chinese)
- [25] Colomer-lluch M, Jofre J, Muniesa M. Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples[J]. *PLoS One*, 2011, 6(3): e17549.
- [26] Arlet G, Philippon A. Construction by polymerase chain reaction and intragenic DNA probes for three main types of transferable  $\beta$ -lactamases (TEM, SHV, CARB)[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1991, 82(1): 19-25.
- [27] Sandvang D, Aarestrup F M, Jensen L B. Characterisation of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1998, 160(1): 37-41.
- [28] 罗义, 周启星. 抗生素抗性基因(ARGs)--一种新型环境污染物的[J]. *环境科学学报*, 2008, 28(8): 1499-1505.
- Luo Y, Zhou Q X. Antibiotic resistance genes (ARGs) as emerging pollutants[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2008, 28(8): 1499-1505(in Chinese).
- [29] 高盼盼, 罗义, 毛大庆. 天津水产业磺胺类耐药细菌及其分布[J]. *生态毒理学报*, 2011, 6(1): 74-79.
- Gao P P, Luo Y, Mao D Q. Sulfonamide resistant bacteria in Tianjin's aquaculture and their distribution[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2011, 6(1): 74-79(in Chinese).
- [30] Luo Y, Mao D Q, Rysz M, *et al.* Trends in antibiotic resistance genes occurrence in the Haihe River, China[J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44(19): 7220-7225.
- [31] Phuong Hoa P T, Nonaka L, Hung viet P, *et al.* Detection of the *sul1*, *sul2*, and *sul3* genes in sulfonamide-resistant *bacteria* from wastewater and shrimp ponds of north Vietnam[J]. *Science of The Total Environment*, 2008, 405(1-3): 377-384.
- [32] Dang H Y, Song L S, Chen M N, *et al.* Concurrence of *cat* and *tet* genes in multiple antibiotic-resistant bacteria isolated from a sea cucumber and sea urchin mariculture farm in China[J]. *Microbial Ecology*, 2006, 52(4): 634-643.
- [33] Petersen A, Dalsgaard A. Species composition and antimicrobial resistance genes of *Enterococcus* spp., isolated from integrated and traditional fish farms in Thailand[J]. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(5): 395-402.
- [34] Ash R J, Mauck B, Morgan M. Antibiotic resistance of gram-negative *bacteria* in rivers, United states[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2002, 8(7): 713-716.
- [35] Iversen A, Kühn I, Franklin A, *et al.* High prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Swedish sewage[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(6): 2838-2842.
- [36] Carramiñana J J, Rota C, Agustín I, *et al.* High prevalence of multiple resistance to antibiotics in *Salmonella* serovars isolated from a poultry slaughterhouse in Spain[J]. *Microbiology*, 2004, 104(1-2): 133-139.
- [37] Miranda C D, Zemelman R. Antibiotic resistant bacteria in fish from the Concepción Bay, Chile[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2001, 42(11): 1096-1102.
- [38] 隋倩雯, 张俊亚, 魏源送, 等. 畜禽养殖过程抗生素使用与耐药病原菌及其抗性基因赋存的研究进展[J]. *生态毒理学报*, 2015, 10(5): 20-34.
- Sui Q W, Zhang J Y, Wei Y S, *et al.* Veterinary antibiotics use, occurrence of antibiotic resistance pathogen and its antibiotic resistance genes in animal production: an overview[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2015, 10(5): 20-34(in Chinese).

## Isolation, identification and antibiotic resistance analysis of intestinal strains of aquaculture *Litopenaeus vannamei* in surrounding areas of Tianjin

ZUO Zhihan<sup>1\*</sup>, LI Yanhong<sup>1</sup>, SHAO Yingchun<sup>1</sup>,  
GENG Xuyun<sup>2</sup>, DONG Xuewang<sup>2</sup>, SUN Jinsheng<sup>1</sup>

(1. Tianjin Key Laboratory of Animal and Plant Resistance, College of Life Science,  
Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China;

2. Tianjin Center for Control and Prevention of Aquatic Animal Infectious Disease, Tianjin 300221, China)

**Abstract:** With the widespread use of antibiotics in aquaculture, the bacterial antibiotic resistance has become a main problem in environment and food safety. This paper aims to analyze the statistical information of shrimp intestine bacterial drug resistance in Tianjin area, and to provide theoretical guidance for the shrimp disease control and improving the safety of aquatic products. Shrimp intestine organisms were isolated and cultured, then the bacterial antibiotic resistance and the antibiotic resistance genes (ARGs) of cultured *Litopenaeus vannamei* were determined in the breeding base of Jinnan, Hangu and Xiqing districts of Tianjin city. Among the total isolated 1 219 strains, 215 strains were identified, and were classified into 56 different species, mainly *Bacillus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus*, *Klebsiella pneumoniae*, *V. Xiluo*, *V. alginolyticus*, *Shewanella* sp., *Enterobacter hormaechei*, *Kurthia* sp., *Pseudomonas stutzeri*, *Rhodobacter capsulatus*, *Serratia liquefaciens*, *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas whanghaensis*, *V. cholerae*. 215 strains were selected to analyze the antibiotics sensitivity. The experiment results showed that the antibiotic resistance of the intestinal bacterias was universal, especially to the beta lactam ampicillin, bacitracin glycopeptide, quinolones of lomefloxacin and sulfonamides resistance. Therefore, four main kinds of antibiotic resistance gene (streptomycin: *strA-strB*, sulfonamides *SuII*, *SuIII*, *SuIII*, tetracyclines: *TetA*, *TetC*, *TetG*, penicillin: *blaXA-1*, *blaPSE-1*, *blaTEM*) and integron (*inT1* and *inT2*) of 82 strains with crossed antibiotic resistance were further determined. The results showed that all of the drug-resistant strains were detected with antibiotic resistance genes positive. The positive rate of resistance genes of sulfonamides, penicillin and tetracycline was 63%, 61.4% and 35.4%, respectively. And only *tetA* was detected in tetracycline resistance genes. The positive rate of integron gene was 42.1%. Among them, 67.1% of the strains had multiple resistance genes.

**Key words:** *Litopenaeus vannamei*; intestine microorganism; isolation and identification; antibiotic resistance genes (ARGs)

**Corresponding author:** ZUO Zhihan. E-mail: zhihanzuo@163.com

**Funding projects:** National High Technology Research and Development Program of China (2012AA092205, 2012AA10A401); National Basic Research Program of China (2012CB114405); Tianjin Development Program for Innovation and Entrepreneurship(06202-52K16001)