



斑节对虾(非洲群体)肠道细菌抗生素耐药性及耐药基因分布特征

王晓璐¹, 樊英^{1*}, 王友红¹, 许拉¹, 王淑娴¹, 于晓清¹, 盖春蕾¹, 刘吉丹², 叶海斌¹, 刘洪军¹, 刁菁¹, 郭萍萍¹, 吴松波³

- 1 山东省海洋科学研究院, 青岛市水产生物品质评价与利用工程研究中心, 山东省海水养殖病害防治重点实验室, 山东 青岛 266104
- 2 中国海洋大学, 山东 青岛 266100
- 3 山东省滨州市无棣县渔业技术推广站, 山东 滨州 251900

王晓璐, 樊英, 王友红, 许拉, 王淑娴, 于晓清, 盖春蕾, 刘吉丹, 叶海斌, 刘洪军, 刁菁, 郭萍萍, 吴松波. 斑节对虾(非洲群体)肠道细菌抗生素耐药性及耐药基因分布特征. 微生物学报, 2022, 62(9): 3399–3409.

Wang Xiaolu, Fan Ying, Wang Youhong, Xu La, Wang Shuxian, Yu Xiaqing, Gai Chunlei, Liu Jidan, Ye Haibin, Liu Hongjun, Diao Jing, Guo Pingping, Wu Songbo. Distribution characteristics of antibiotic-resistant bacteria and antimicrobial-resistant genes in the intestine of *Penaeus monodon* (African). *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(9): 3399–3409.

摘要:【目的】解析斑节对虾(*Penaeus monodon*)(非洲群体)(俗称“金刚虾”, 下同)携带耐药菌及耐药基因现状。【方法】本研究从山东滨州北海新区采集了金刚虾, 对其肠道细菌常用抗生素的耐药菌性质及数量、占比及种类进行检测, 通过荧光定量 PCR 技术分析肠道内容物样品中的 4 类抗生素的 4 种耐药性基因分布特征。【结果】肠道中可培养细菌总数约 1.45×10^5 – 2.13×10^6 CFU/g, 有四环素、萘啶酸、氟苯尼考、庆大霉素 4 种抗生素耐药菌的检出, 其中喹诺酮类萘啶酸耐药菌占比最高, 达到 35.00%, 氨基糖苷类庆大霉素占比最少。10 种抗生素药敏性质分析表明, 肠道可培养细菌对庆大霉素、氟苯尼考等 6 种抗生素高度敏感, 对四环素、卡那霉素中度敏感, 对萘啶酸、青霉素、阿莫西林耐药。从分离的耐药菌鉴定结果可以得出, 可培养的

基金项目: 山东省 2018 年度农业重大应用技术创新项目; 山东省虾蟹产业技术体系(SDAIT-13); 国家虾蟹产业技术体系(CARS-48); 优质高抗对虾突破性新品种选育(2019LZGC014)

Supported by the 2018 Shandong Agricultural Application Technology and Innovation Project, by the Shandong Province Modern Agricultural Technology Research, Innovation Team of Shrimps and Crabs (SDAIT-13), by the Chinese Modern Shrimp Industry Technology Research (CARS-48) and by the Agricultural Improved Variety Project in Shandong Province-Breeding of Breakthrough New Prawn Varieties with High Quality and Resistance (2019LZGC014)

*Corresponding author. E-mail: fy_fy123@126.com

Received: 4 January 2022; Revised: 1 March 2022; Published online: 22 April 2022

抗生素耐药菌主要集中在弧菌属, 基于属水平的不同抗生素耐药菌统计显示, 不同抗生素耐药菌种类存在明显差异, 且同一菌属有耐多种抗生素的情况。荧光定量 PCR 检测分析, 4 种耐药基因的丰度不同, *tetA* 基因相对拷贝数和四环素耐药菌比例、*floR* 基因和氟苯尼考耐药菌比例之间存在显著相关性($P<0.01$); *qnrA* 基因相对拷贝数和萘啶酮酸耐药菌比例、*aadA* 基因相对拷贝数和庆大霉素耐药菌比例之间均不存在显著相关性($P>0.01$)。【结论】本研究说明, 金刚虾肠道微生物中存在一定的耐药菌和耐药基因, 具有携带风险。

关键词: 斑节对虾(非洲群体); 肠道; 抗生素耐药菌; 耐药基因; 荧光定量 PCR

Distribution characteristics of antibiotic-resistant bacteria and antimicrobial-resistant genes in the intestine of *Penaeus monodon* (African)

WANG Xiaolu¹, FAN Ying^{1*}, WANG Youhong¹, XU La¹, WANG Shuxian¹, YU Xiaoqing¹, GAI Chunlei¹, LIU Jidan², YE Haibin¹, LIU Hongjun¹, DIAO Jing¹, GUO Pingping¹, WU Songbo³

¹ Key Laboratory of Disease Control in Mariculture, Municipal Engineering Research Center of Aquatic Biological Quality Evaluation and Application, Marine Science Research Institute of Shandong Province, Qingdao 266104, Shandong, China

² Ocean University of China, Qingdao 266100, Shandong, China

³ Fisheries Technology Extension Station, Binzhou 251900, Shandong, China

Abstract: [Objective] To analyze the antibiotic-resistant bacteria and antimicrobial-resistant genes in *Penaeus monodon* (African). [Methods] We collected *P. monodon* from Beihai New Area, Binzhou, Shandong, and then tested the number, proportion, and species of antibiotic-resistant bacteria in the intestine. Meanwhile, we analyzed the distribution of genes related to the resistance to four antibiotics by quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR). [Results] The total number of culturable bacteria in the intestine was about 1.45×10^5 – 2.13×10^6 CFU/g, and bacteria resistant to tetracycline, nalidixic acid, florfenicol, and gentamicin were all detected, among nalidixic acid-resistant bacteria (35.00%) and gentamicin-resistant bacteria took up the largest and smallest proportion, respectively. The sensitivity to 10 antibiotics was analyzed and the result showed that the intestinal bacteria were highly susceptible to six antibiotics such as gentamicin and florfenicol, moderately susceptible to tetracycline and kanamycin and resistant to nalidixic acid, penicillin, and amoxicillin. The culturable antibiotic-resistant bacteria mainly belonged to *Vibrio*, and the species of bacteria resistant to different antibiotics varied. Moreover, species of the same genus may be resistant to multiple antibiotics. The abundance of genes related to the resistance of the four antibiotics was different. Significant correlation between the relative copy number of *tetA* gene and the proportion of tetracycline-resistant bacteria and between the relative copy number of *floR* gene and the proportion of florfenicol-resistant bacteria was detected ($P<0.01$), but no significant correlation was observed between the relative copy number of *qnrA* gene and the proportion of nalidixic acid-resistant bacteria, and between the relative copy number

of *aadA* gene and the proportion of gentamicin-resistant bacteria ($P>0.01$). **[Conclusion]** The intestine of *P. monodon* (African) harbors antibiotic-resistant bacteria and antimicrobial-resistance genes.

Keywords: *Penaeus monodon* (African); intestine; antibiotic-resistant bacteria; antimicrobial-resistant genes; real-time quantitative PCR

斑节对虾(*Penaeus monodon*)(非洲群体)是对虾属中大型种, 俗称金刚虾、斑节王、草虾王, 原产于非洲莫桑比克等地, 隶属于节肢动物门、甲壳纲、十足目、对虾科、对虾属, 与南美白对虾比较表观特征为体色较深、头胸甲较为厚实、体长侧扁、略呈梭形等, 养殖适合水温为 25–32 °C, 适应盐度在 3%左右, 适宜环境为沙底质, 对饲料蛋白含量要求相对较低, 属于杂食性, 抗病能力强, 适宜工厂集约化、池塘等多种养殖模式^[1–2]。

水产养殖生产中大量抗生素的使用或滥用已经成为全球广泛关注的热点^[3–4]。随着产业的快速发展, 使用抗生素成为养殖者进行病害防控的重要手段之一, 然而, 食源性动物产品养殖过程中由于抗生素的使用造成残留问题, 抗生素富集作用也可能威胁到食物链的顶端, 进而威胁社会安全。据统计, 2020 年受疫情影响, 抗生素供给端偏紧, 价格市场上涨, 在限抗令及环保政策影响下, 整个刚性需求产业受到巨大冲击。抗生素的使用可以为实际生产带来选择性效益, 但也会产生一系列的负面影响, 如降低养殖动物自身机能, 引发抗生素耐药性在微生物中传播, 破坏健康养殖生态平衡, 加速多重耐药细菌和抗生素抗性基因(antibiotic resistance genes, ARGs)的出现, 破坏微生物之间的自然平衡, 危害食品安全和人类健康等等^[5–6]。目前, 国内外在畜禽方面对耐药菌或耐药基因的研究比较深入, Mu 等^[7]研究了不同饲养动物鸡、猪、牛粪便中 ARGs 浓度, 包括四环素、磺酰胺、喹诺酮、大环内酯等 21 个 ARGs 的总体趋势为鸡>猪>肉牛。

张昊等^[8]采用微生物培养方法调查了鸡粪、猪粪中耐药菌数量, 通过高通量测序技术及定量 PCR 解析其中耐药菌群落结构和耐药基因分布情况, 与未饲用抗生素的猪粪比较, 样品中耐药基因的总富集倍数达到 1.96×10^4 – 1.54×10^5 倍, 各类耐药基因的富集情况为: 四环素类> β -内酰胺类>MLS_B(大环内酯、林可酰胺和链阳性菌素 B 类)>氨基糖苷类>FCA(氟喹诺酮、喹诺酮、氟苯尼考、氯霉素和酰胺醇类)>磺胺类>万古霉素类。Brooks 等^[9]研究表明, 母猪和苗圃场含有更多的抗生素耐药性基因, 其中对四环素和红霉素抗药性最强, 且养殖废水不是甲氧西林抗药性基因的主要来源, 养殖场发现少量的抗药基因和基因多样性。闫倩倩等^[10]研究了山东烟台、威海、青岛 3 地主要养殖区刺参肠道内容物中耐药菌及耐药基因特征, 结果表明苗期刺参中存在一定的携带耐药菌和耐药基因的风险。

2006 年多宝鱼事件和 2016 年刺参抗生素问题都引起了广泛的关注。因此耐药菌研究是亟待解决的问题, 除了耐药菌株的关注之外, 耐药基因同样对养殖业和社会健康安全存在威胁, 耐药基因在细菌中或养殖动物体内是持久性存在的, 可通过质粒水平转移, 可能引起致病菌的顽固或拮抗^[11–12]。目前, 四环素、氟苯尼考、庆大霉素和萘啶酸等几种抗生素在对虾养殖过程中较为常用, 本研究选取金刚虾为研究对象, 解析肠道内容物中耐药菌数量、种类及耐药基因情况, 以期对金刚虾养殖过程中抗生素使用及耐药菌防控提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 样品采集

于 2021 年 5 月在山东省滨州北海新区采集体长约 3–4 cm 的健康活泼金刚虾, 实验过程选取 1 个采集点 4 个工厂化养殖车间室内养殖池, 其中每个车间各随机采集 100 尾活体对虾, 随即获取其肠道内容物, 混匀, 然后迅速置于液氮中带回实验室备用。样品分为两部分, 一部分用于细菌培养, 一部分用于 DNA 提取。

1.2 肠道内容物可培养细菌总量检测

各取 1 g 对虾肠道内容物样品加入 10 mL 无菌的生理盐水制成菌悬液, 10 倍梯度、振荡稀释后, 分别涂布于无菌无抗生素的大豆酪蛋白琼脂平板(tryptose soya agar, TSA), 28 °C 培养 24 h 后根据菌落数计算可培养细菌总量。

1.3 肠道可培养细菌的药敏性质分析

依据美国临床实验室标准化委员会(National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS)实验标准^[13], 通过 K-B 方法对肠道可培养细菌的药敏性质进行分析。不同肠道内容物接种于新鲜胰酪胨大豆肉汤(trypticase soy broth, TSB)培养基中, 28 °C 培养 24 h 制备成菌悬液。按照 1% 接种量转接于新鲜液体培养基中 28 °C 培养 18 h 后, 超净工作台内取待测菌液 200 μ L, 用玻璃涂布器均匀涂布于 TSA 培养基, 再将待测药敏纸片均匀贴于培养基上, 正向放置 30 min 后, 倒置于 28 °C 恒温培养, 48 h 后测量抑菌圈直径, 参考说明书判断药物敏感特性。

1.4 肠道微生物抗生素耐药菌的培养及所占比例测定

各取 1 g 肠道内容物样品加入 10 mL 无菌的生理盐水制成菌悬液, 10 倍梯度、振荡稀释后, 分别涂布于无菌的含单种不同抗生素的 TSA 培养基上, 设不含抗生素的平板作为对照。抗生素浓度设定参考畜禽及水产动物耐药菌筛选的终浓度和美国临床和实验室标准协会

(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) (2016) 标准^[14], 分别为庆大霉素(32 μ g/mL)、四环素(50 μ g/mL)、氟苯尼考(50 μ g/mL)、萘啶酸(50 μ g/mL)。平板放置入 28 °C 培养箱培养 24 h, 计算平板上菌落数确定耐药菌数量, 按照耐药细菌比例(%)=耐药细菌数/可培养细菌总数 \times 100%, 计算抗生素耐药菌占比。

1.5 抗生素耐药菌分离纯化及其鉴定

根据相应抗生素平板上菌落形态(包括大小、边缘形状、颜色、透明度等)及其气味对所筛选得到的耐药菌进行分类和优势度统计, 用接种环挑取优势菌在 TSA 培养基上进行 3 次纯化培养, 最后将单菌落进行扩增、保种。优势耐药菌的基因组 DNA 用细菌 DNA 提取试剂盒(TaKaRa)提取所分离纯化后进行扩增^[10]。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物合格后由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 美国国家生物技术信息中心 NCBI GenBank 数据库中进行 BLAST 比对测序结果, 鉴定优势耐药菌所属分类。

1.6 肠道微生物耐药基因检测

利用 E.Z.N.A.TMSoil DNA Kit (OMEGA) 进行对虾肠道内容物总 DNA 提取, 样品数量 150 mg, 操作步骤参照试剂盒说明书, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测提取 DNA 的完整性和纯度, 微量分光光度计(Thermo Nanodrop 2000)测定浓度, 检测合格的 DNA 用于荧光定量 PCR 检测。定量分析四环素类、氨基糖苷类、氯霉素类、喹诺酮类 4 类抗生素中 4 种常见耐药基因, PCR 退火温度及扩增引物信息见表 1。目的片段扩增、纯化后连接到 pMD18-T 载体(TaKaRa)后转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞进行克隆后, 提取质粒(质粒提取试剂盒 B518191 SanPrep, 生工生物工程(上海)股份有限公司), 质粒经测序鉴定无误后用微量分光光度计测定质粒 OD₂₆₀ 的值, 通过公式换算成拷贝数(copies/ μ L)。以所提取的

表 1 耐药基因及退火温度

Table 1 Primer pairs and annealing temperature of resistance genes

Category	Antibiotics	Genes	Sequences (5'→3')	Annealing temperature /°C
Internal reference gene		16S rDNA	F: ATGGCTGTCGTCAGCT R: ACGGGCGGTGTGTAC	56
Tetracyclinas	Tetracycline	<i>tetA</i>	F: GCGCTNTATGCGTTGATGCA R: ACAGCCCGTCAGGAAATT	58
Quinolones	Nalidixic acid	<i>qnrA</i>	F: AGTGGCCAATGCCTGGAAAA R: CCAGATCGGCAAAGGTTAGG	58
Aminoglycosides	Gentamicin	<i>aadA</i>	F: TGATTTGCTGGTTACGGTGAC R: CGCTATGTTCTCTTGCTTTTG	56
Fenicols	Florfenicol	<i>floR</i>	F: TATCTCCCTGTCGTTCCAG R: AGAACTCGCCGATCAATG	56

质粒为模板进行实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 扩增, 构建相应基因扩增的标准曲线, 计算各基因扩增的 C_t 值、扩增效率(E)及其相关系数(R^2)。采用 qRT-PCR 测定采样点样品中 4 种耐药基因和内参基因含量, 每个样品 3 个平行。qRT-PCR 反应体系如下: 2×SG Fast qPCR Master Mix (B639271, BBI, Roche) 5 μL, 上、下游引物 (10 μmol/L) 各 0.2 μL, DNA 模板 1 μL, ddH₂O 3.6 μL, 总体积为 10 μL。qRT-PCR 反应程序: 95 °C 3 min; 95 °C 5 s, 退火温度(表 1) 30 s, 72 °C 30 s, 45 个循环, 把加好样品的 96 孔板放在 LightCycler480 II (Roche, Rotkreuz) 中进行反应。

1.7 数据统计分析

利用 SPSS 19.0 软件线性回归分析四环素、庆大霉素、氟苯尼考、萘啶酸 4 种抗生素耐药菌所占比例以及 4 种耐药基因的相对拷贝数, 以 $P < 0.01$ 作为差异显著水平, 确定耐药菌所占比例和相关耐药基因的相对拷贝数的相关性。

2 结果与分析

2.1 可培养抗生素耐药菌的数量分析

滨州北海新区金刚虾肠道中可培养细菌与

耐药菌培养结果见表 2 和图 1。结果显示, 肠道内容物稀释液经涂布 TSA、28 °C、48 h 培养后, 肉眼观察可见不同形状、透明度或颜色的菌落(图 1)。4 种抗生素耐药菌中喹诺酮类萘啶酸耐药菌数量最高, 为 $(5.07 \times 10^4) - (1.07 \times 10^6)$ CFU/g, 其次为四环素类耐药菌数量为 $(1.20 \times 10^2) - (1.16 \times 10^3)$ CFU/g; 氯霉素类氟苯尼考耐药菌数量为 $(5.61 \times 10^1) - (2.81 \times 10^2)$ CFU/g; 氨基糖苷类庆大霉素耐药菌数量为 $(0.21 \times 10^1) - (1.04 \times 10^2)$ CFU/g。肠道中可培养细菌总数约 $(1.45 \times 10^5) - (2.13 \times 10^6)$ CFU/g。根据数量结果计算耐药菌在总可培养细菌中的比例得出(表 2), 萘啶酸 > 四环素 > 氟苯尼考 > 庆大霉素, 其中喹诺酮类萘啶酸耐药菌占比最高, 达到 35.00%, 氨基糖苷类庆大霉素占比最少, 不同抗生素耐药菌占比差异显著 ($P < 0.05$)。

2.2 肠道可培养细菌的药敏性质分析

滨州北海新区金刚虾肠道中可培养细菌对 10 种抗生素的敏感性分析如表 3 所示。肠道可培养细菌对庆大霉素、氟苯尼考、诺氟沙星、左氧氟沙星、链霉素高度敏感, 对四环素、卡那霉素中度敏感, 对萘啶酸、青霉素、阿莫西林耐药。

表 2 可培养细菌及耐药细菌数量(CFU/g)

Table 2 The number of total cultured bacteria and drug-resistant bacteria (CFU/g)

Antibiotics	Number of drug-resistant bacteria	Proportion of drug-resistant bacteria in culturable bacteria
Tetracycline	$(1.20 \pm 0.01) \times 10^2 - (1.16 \times 10^3)$	$(0.08 \pm 0.01) - (0.05 \pm 0.01)^a$
Nalidixic acid	$(5.07 \pm 0.08) \times 10^4 - (1.07 \times 10^6)$	$(35.00 \pm 0.62) - (50.23 \pm 1.00)^b$
Florfenicol	$(5.61 \pm 0.17) \times 10^1 - (2.81 \times 10^2)$	$(0.004 \pm 0.00) - (0.01 \pm 0.33)^a$
Gentamicin	$(0.21 \pm 0.01) \times 10^1 - (1.04 \times 10^2)$	$(0.0001 \pm 0.00) - (0.05 \pm 0.87)^a$

Values in the same line with different small letter superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

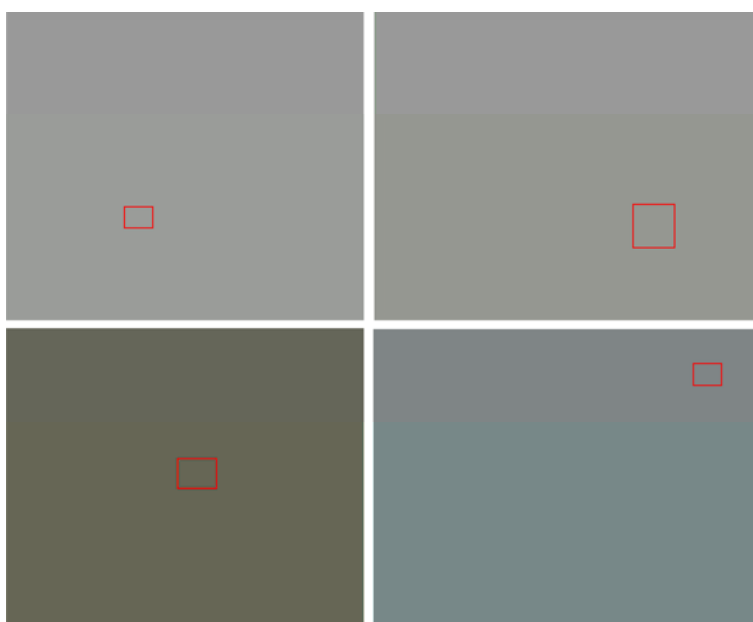


图 1 TSA 平板肠道细菌生长情况

Figure 1 Colonial morphology of bacteria on TSA solid media.

表 3 肠道可培养细菌药敏分析

Table 3 Analysis of inhibitory zone about total cultured bacteria

Antibiotics	Criterion of inhibitory zone			Concent per disc/ ($\mu\text{g}/\text{disc}$)	Inhibitory zone/mm	Susceptibility
	Insensitivity	Moderately sensitive	High sensitivity			
Tetracycline	≤ 18	19–22	≥ 23	30	20	I
Gentamicin	≤ 12	13–14	≥ 15	13–17	18	S
Florfenicol	≤ 12	13–17	≥ 18	20	16	S
Nalidixic acid	≤ 13	14–18	≥ 19	30	3	R
Streptomycin	≤ 11	12–14	≥ 15	10	16	S
Kanamycin	≤ 13	14–17	≥ 18	10	14	I
Carbenicillin	≤ 19	20–27	≥ 28	100	12	R
Amoxicillin	≤ 13	14–17	≥ 18	20	2	R
Norfloxacin	≤ 12	13–16	≥ 17	10	28	S
Levofloxacin	≤ 13	14–16	≥ 17	5	31	S

S: high sensitivity; I: moderately sensitive; R: insensitivity.

2.3 金刚虾肠道中可培养耐药菌的分离及鉴定结果

依据筛选到的抗生素培养基上细菌菌落颜色、形状、透明度、形态等表观特征, 选取目标菌落分离纯化, 鉴定后进行菌种保藏。由表 4 可见, 四环素、萘啶酸、氟苯尼考、庆大霉素耐药菌株分别为 12、18、5、2 株。依据 16S rRNA 基因比对结果, 耐药菌株分别分布

到 2、4、2、2 个属中。耐药菌株中检出率最高的是弧菌属 (*Vibrio*)。同时, 依据高通量测序技术统计样品中耐药菌株种类的丰度分布, 结果显示耐药菌株中丰度最高的是弧菌属。而且, 发现同一菌株呈现耐多种抗生素的现象, 耐萘啶酸的耐药菌株多样性较高, 分布菌属数量多, 耐四环素的耐药菌株集中分布在 2 个菌属中。

表 4 不同抗生素培养基筛选得到的耐药菌株数及属水平的种类数

Table 4 Numbers of strains and genera of drug-resistant bacteria screened by antibiotic culture medium

Items	Antibiotics			
	Tetracycline	Nalidixic acid	Florfenicol	Gentamicin
Antibiotic-resistant strains number	12	18	5	2
Antibiotic-resistant genus number	2	4	2	2

2.4 不同耐药基因丰度分析

金刚虾肠道细菌中 4 种抗生素耐药基因 DNA 提取结果见图 2, 完全满足荧光定量 PCR 技术要求, 4 种抗生素耐药基因扩增曲线正常, 其 C_t 值及 R^2 值、相对含量如表 5 所示, *qnrA* 基因含量最高, 其次是 *tetA* 基因。

2.5 耐药菌比例与耐药基因丰度的相关性分析

线性回归分析 4 种抗生素作用下耐药菌比例与对应的 4 种耐药基因的相对拷贝数(基因绝对拷贝数与 16S rRNA 基因的比值), 结果见表 6。结果表明, 氟苯尼考耐药菌和 *floR* 基因比例、四环素耐药菌和 *tetA* 基因相对拷贝数比例之间存在显著相关性($P < 0.01$); *qnrA* 基因相对

拷贝数和萘啶酮酸耐药菌比例、*aadA* 基因相对拷贝数和庆大霉素耐药菌比例之间均不存在显著相关性($P > 0.01$)。

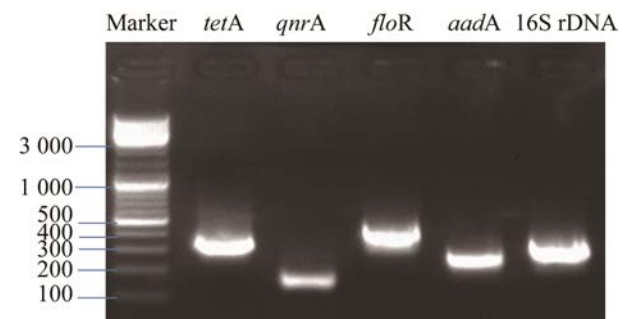


图 2 抗生素耐药基因 DNA 提取
Figure 2 DNA of antibiotic resistance genes.

表 5 不同抗生素耐药基因扩增结果

Table 5 The results of real time fluorescence quantitative PCR about antibiotic resistance genes

Antibiotic resistance genes	Items			
	C_t	ΔC_t	Abundance	R^2
<i>tetA</i>	21.35±0.42	13.64±0.42	66 847.62±18 399.00	0.998 1
<i>floR</i>	26.48±0.45	18.78±0.45	1 026.09±360.19	0.999 3
<i>qnrA</i>	19.57±0.21	11.87±0.21	692 839.80±85 182.58	0.999 4
<i>aadA</i>	31.80±0.19	24.10±0.19	36.02±5.70	0.998 4

表 6 耐药菌比例与耐药基因相对含量的相关性分析

Table 6 Analysis of correlation between the percentage of drug-resistant bacteria and the relative abundance of antibiotic resistance genes

Antibiotics	Antibiotic resistance genes			
	<i>tetA</i>	<i>qnrA</i>	<i>floR</i>	<i>aadA</i>
Tetracycline	1.000**	–	–	–
Nalidixic acid	–	0.415	–	–
Florfenicol	–	–	0.993**	–
Gentamicin	–	–	–	0.945

** : a significant difference. – : no relevance.

3 讨论

3.1 水产养殖抗生素问题及耐药现状分析

目前,我国对于规制抗生素滥用的相关法律法规较少,且法律的执行积极性低,执法效果差^[15],导致了抗生素问题日益加重。近年来,随着人们对药物副作用的深入了解及对抗生素污染、耐药菌产生等问题的关注,一些曾被广泛使用的抗生素已经被禁用,如氯霉素、硝基呋喃类抗生素等。抗生素在水产养殖使用过程中可能发生水解、光解或生物降解等一系列反应,极少部分经过机体代谢被吸收或排除,大部分以原形或活性代谢物形式存在环境中^[16],故这些用于治疗或预防病害而未被养殖动物吸收的抗生素可能发生积聚,细菌因此适应了一定浓度的抗生素,且在抗生素长时间存在的情况下因为药物选择压力而产生了耐药性^[17]。细菌耐药性可通过增殖动力学垂直传递给微生物后代,也通过水平基因转移(horizontal gene transfer, HGT)在细菌中传播,最终导致细菌成为各种抗生素抗性基因的天然储存库^[18]。

随着生物时代的快速发展,细菌耐药性研究逐渐从简单的分布状况上升到 ARGs 及其丰度检测方面^[15,19],以此评估耐药风险。而且,不同种类海洋动物的生活习性以及摄入的抗生

素的量各不相同,因而导致动物来源的细菌种类以及耐药性相差较大,不同区域同种动物细菌耐药性也有所差异^[20–21]。目前,水产养殖动物肠道内存在一定的耐药菌和耐药基因的携带风险,外源养殖水环境调控、饲料及渔药的投入、养殖者的管理及干预等均影响着耐药菌的产生;各种各样的病原菌和新型病原的出现,抗生素耐药菌比例的提高,均揭示了抗生素的大量使用,并预警了抗生素的大量使用已对致病性耐药菌或益生耐药菌的产生带来了相应的威胁。本研究针对金刚虾肠道细菌进行了抗生素耐药特征分析,肠道细菌对常用的 4 类抗生素均表现出了不同程度的耐药性,研究结果对后续研究及对虾健康养殖具有重要意义。

3.2 金刚虾肠道耐药菌数量及特征分析

研究报道,不同数量的抗生素耐药菌普遍存在,不管是在养殖动物机体内还是养殖环境中^[15,22–24]。动物肠道内蕴含着大量的微生物,在疾病预防或治疗过程中多种抗生素的泛滥使用,给养殖动物带来了不可忽视的压力,迫于外源压力肠道细菌极易产生耐药性,还可能产生多重耐药性。本研究结果表明,金刚虾肠道可培养细菌含量达到 2.13×10^6 CFU/g,检测出四环素、萘啶酸、氟苯尼考、庆大霉素 4 种抗生素耐药菌,且喹诺酮类萘啶酸耐药菌占比最高,可能是细菌 *qnr* 基因编码的 Qnr 蛋白与喹诺酮类抗生素竞争特异性靶点,减少了喹诺酮-拓扑异构酶-DNA 复合物的数量,从而产生了耐药性。但氨基糖苷类庆大霉素耐药菌占比最少,推测说明此类抗生素没有更多地改变细菌细胞壁的通透性和胞内转运功能,或没有产生过多的改变结构的钝化酶。这些结果呈现的不同抗生素产生耐药菌的耐药机制不同,但对养殖效益产生的影响需进一步探讨。对常用的 10 种抗生素药敏性质的分析可知,金刚虾肠道

可培养细菌呈现不同程度的抗生素敏感性, 可能与养殖动物肠道细菌结构、养殖环境及养殖条件、管理者的差异性相关, Neu 也论述说明了这一点^[25]。研究报道, 上海、江苏、海南等地海水养殖区域弧菌对喹诺酮类等数种抗生素均表现了不同程度的耐药, 新生霉素耐药率达到 64.7%, 且出现交叉耐药和多重耐药^[26]。茅尾海红树林区域虾虎鱼、马面鲀等海洋动物来源细菌对常用的磺胺二甲嘧啶的平均耐药率高达 54.3%, 且肠道中细菌耐药率较高^[27]。李壹等^[14]研究了环境中耐药菌的分布特征, 表明养殖动物肠道与环境中耐药菌存在相似性, 推测是养殖动物排泄及养殖环境水引入相互作用的结果。因此, 细菌的耐药性产生不是单一因素, 后续需继续深入探讨影响因素, 尤其是与环境、地域、管理等的相互作用关系, 解决耐药性机理等问题, 以便及时掌握疾病流行状况、了解病原分布特点及耐药规律、提供疾病预警及合理使用抗生物的依据等等。

本实验对金刚虾肠道微生物抗生素耐药菌进行属水平上的鉴定, 耐药菌检出率最高的是弧菌属, 也有研究报道, 海水养殖环境中最具有优势的耐药菌是弧菌属^[28]。然而, 弧菌属是对虾养殖中最主要的条件性致病菌, 为防控病害的发生, 大量抗生素被投入使用, 药物的长期使用会导致耐药细菌的产生, 正如研究报道, 细菌耐药性与抗生素的诱导相关^[29]。为减少抗生素类药物的使用, 各种弧菌抑制剂应运而生, 目的是为调控养殖环境或养殖动物肠道弧菌量, 从而达到防病治病的效果^[30]。

3.3 金刚虾肠道内耐药基因特征分析

本研究结果显示抗生素抗性基因的存在, 进一步证明了相应耐药菌株的存在。研究报道, 不同区域不同采样点会因为不同基因在所处环境中的代谢速率和基因在传递过程中的质粒或

宿主局限而产生含量的差异^[11], 本研究的后续工作会在养殖过程中密切关注对虾肠道耐药细菌和肠道耐药基因的检测, 建立相应的抗生素使用监测和预警机制, 为科学选药提供依据。从不同耐药基因的含量分析可以看出, *qnrA* 绝对含量较高, 可能当前检测金刚虾肠道微生物萘啶酸耐药菌数量较多, 该类细菌可以在磺胺类抗生素含量较高的水平下有着生存优势, 耐受性更强, 而且由结果推断 C_t 值越小, 反应扩增到达平台期所需循环数越少, 目的基因起始含量越高。

细菌耐药性极其复杂, 不同耐药菌基因在不同细菌中的相对拷贝数和降解速率不同, 导致耐药表型与耐药基因不是完全对应的关系^[31]。从耐药基因相对含量与相应耐药菌占比的相关性分析可以看出, *tetA* 基因与四环素、*floR* 基因与氟苯尼考耐药菌占比极显著相关($P < 0.01$), 而 *qnrA* 基因与萘啶酸、*aadA* 基因与庆大霉素耐药菌占比不存在显著相关性($P > 0.01$)。随着抗生素种类的不断推陈出新, 可能会产生以前未被发现的针对某种抗生素的耐药基因, 已知的耐药基因也会出现突变从而产生新的耐药基因。这些新的耐药基因还需要进一步研究发现。综上所述, 本研究为合理使用抗生素和减少抗生素对海洋环境的污染提供理论依据, 也为研究和推广对虾健康养殖过程中降低耐药菌数量及耐药基因丰度的无害化处理过程提供科学参考。

参考文献

- [1] 杨纪忠, 谢林荣, 何家才, 倪庆胜, 朱丽艳. 南非斑节对虾低盐度养殖试验. 水产养殖, 2018, 39(5): 41–42.
Yang JZ, Xie LR, He JC, Ni QS, Zhu LY. Low salinity culture experiment of *Penaeus monodon*. *Journal of Aquaculture*, 2018, 39(5): 41–42. (in Chinese)
- [2] 王晓璐, 李乐, 王友红, 盖春蕾, 叶海斌, 刘洪军, 樊英, 郭萍萍, 穆川川, 马星坤. 南非斑节对虾肠道

- 组织结构及菌群特征、代谢活性研究. 广西科学院学报, 2019, 35(4): 325–331.
- Wang XL, Li L, Wang YH, Gai CL, Ye HB, Liu HJ, Fan Y, Guo PP, Mu CC, Ma XK. Research on organization structure, micro-flora characteristics and metabolic activity of *Penaeus monodon*. *Journal of Guangxi Academy of Sciences*, 2019, 35(4): 325–331. (in Chinese)
- [3] Bhullar K, Waglechner N, Pawlowski A, Koteva K, Banks ED, Johnston MD, Barton HA, Wright GD. Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS One*, 2012, 7(4): e34953.
- [4] Wright GD, Poinar H. Antibiotic resistance is ancient: implications for drug discovery. *Trends in Microbiology*, 2012, 20(4): 157–159.
- [5] 胡海燕, 刘慧敏, 孟璐, 董蕾, 兰图, 郑楠, 程建波, 王加启. 宏基因组学在微生物抗生素抗性基因检测中的应用. 微生物学通报, 2019, 46(11): 3110–3123. Hu HY, Liu HM, Meng L, Dong L, Lan T, Zheng N, Cheng JB, Wang JQ. Application of metagenomics in the detection of microbial antibiotic resistance genes. *Microbiology China*, 2019, 46(11): 3110–3123. (in Chinese)
- [6] Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 2010, 74(3): 417–433.
- [7] Mu QH, Li J, Sun YX, Mao DQ, Wang Q, Luo Y. Occurrence of sulfonamide-, tetracycline-, plasmid-mediated quinolone- and macrolide-resistance genes in livestock feedlots in northern China. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2015, 22(9): 6932–6940.
- [8] 张昊, 王盼亮, 杨清香, 俞宁. 畜禽粪便中多重耐药细菌及耐药基因的分布特征. 环境科学, 2018, 39(1): 460–466. Zhang H, Wang PL, Yang QX, Yu N. Distribution of multidrug-resistant bacteria and antibiotic-resistant genes in livestock manures. *Environmental Science*, 2018, 39(1): 460–466. (in Chinese)
- [9] Brooks JP, Adeli A, McLaughlin MR. Microbial ecology, bacterial pathogens, and antibiotic resistant genes in swine manure wastewater as influenced by three swine management systems. *Water Research*, 2014, 57: 96–103.
- [10] 闫倩倩, 李彬, 廖梅杰, 王印庚, 张正, 于永翔, 荣小军, 李德军. 山东主要刺参养殖区幼参肠道抗生素耐药菌及耐药基因分布特征. 渔业科学进展, 2020, 41(4): 134–143. Yan QQ, Li B, Liao MJ, Wang YG, Zhang Z, Yu YX, Rong XJ, Li DJ. Distribution characteristics of antibiotic resistant bacteria and antimicrobial resistant genes in the intestine of cultured sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) seedlings in Shandong province. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(4): 134–143. (in Chinese)
- [11] 张鸾月, 赵婉婉, 吴伟. 水产养殖环境中抗生素抗性基因污染及其研究进展. 中国农业科技导报, 2015, 17(6): 125–134. Zhang QY, Zhao WW, Wu W. Antibiotics resistance gene pollution and its research progress achieved in aquaculture environment. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2015, 17(6): 125–134. (in Chinese)
- [12] Tamminen M, Karkman A, Lohmus A, Muziasari WI, Virta M. Tetracycline resistance genes persist at aquaculture farms in the absence of selection pressure. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45(2): 386–391.
- [13] Institute CALS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical Laboratory Standards Institute, 2007.
- [14] 李壹, 曲凌云, 朱鹏飞, 田欣欣, 王琛. 山东地区海水养殖区常见抗生素耐药菌及耐药基因分布特征. 海洋环境科学, 2016, 35(1): 55–62. Li Y, Qu LY, Zhu PF, Tian XX, Wang C. Distribution characteristics of antibiotic resistance bacteria and related resistance genes in mariculture area of Shandong. *Marine Environmental Science*, 2016, 35(1): 55–62. (in Chinese)
- [15] 刘可心. 南美白对虾肠道细菌抗生素抗性基因的研究. 华南理工大学硕士学位论文, 2018.
- [16] Chee-Sanford JC, Aminov RI, Krapac IJ, Garrigues-Jeanjean N, Mackie RI. Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(4): 1494–1502.
- [17] 彭金菊, 马驿, 杨明, 安守文, 曾令军. 诺氟沙星诱导水生细菌产生耐药性的最低选择浓度的调查. 中国兽药杂志, 2009, 43(6): 12–14. Peng JJ, Ma Y, Yang M, An SW, Zeng LJ. Investigation of the minimal selective concentration of norfloxacin for inducing resistance in aquatic bacteria. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2009, 43(6): 12–14. (in Chinese)
- [18] Shao SC, Hu YY, Cheng JH, Chen YC. Research progress on distribution, migration, transformation of

- antibiotics and antibiotic resistance genes (ARGs) in aquatic environment. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2018, 38(8): 1195–1208.
- [19] Sun YP, Clarke B, Clarke J, Li X. Predicting antibiotic resistance gene abundance in activated sludge using shotgun metagenomics and machine learning. *Water Research*, 2021, 202: 117384.
- [20] 吴甘林. 喹诺酮类耐药菌及耐药基因在罗非鱼和杂交鳊养殖中的分布特征. 上海海洋大学硕士学位论文, 2020.
- [21] Xiong WG, Wang YL, Sun YX, Ma LP, Zeng QL, Jiang XT, Li AD, Zeng ZL, Zhang T. Antibiotic-mediated changes in the fecal microbiome of broiler chickens define the incidence of antibiotic resistance genes. *Microbiome*, 2018, 6(1): 34.
- [22] Rajić A, McFall ME, Deckert AE, Reid-Smith R, Manninen K, Poppe C, Dewey CE, McEwen SA. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from finishing swine and the environment of 60 Alberta swine farms. *Veterinary Microbiology*, 2004, 104(3/4): 189–196.
- [23] Huang L, Xu YB, Xu JX, Ling JY, Chen JL, Zhou JL, Zheng L, Du QP. Antibiotic resistance genes (ARGs) in duck and fish production ponds with integrated or non-integrated mode. *Chemosphere*, 2017, 168: 1107–1114.
- [24] Su HC, Liu S, Hu XJ, Xu XR, Xu WJ, Xu Y, Li ZJ, Wen GL, Liu YS, Cao YC. Occurrence and temporal variation of antibiotic resistance genes (ARGs) in shrimp aquaculture: ARGs dissemination from farming source to reared organisms. *Science of the Total Environment*, 2017, 607/608: 357–366.
- [25] Neu HC. The crisis in antibiotic resistance. *Science*, 1992, 257(5073): 1064–1073.
- [26] 写腊月, 胡琳琳, 房文红, 周俊芳. 海水养殖源弧菌耐药性调查与分析. 海洋渔业, 2011, 33(4): 442–446. Xie LY, Hu LL, Fang WH, Zhou JF. Investigation and analysis of drug resistance of *Vibrios* from mariculture source. *Marine Fisheries*, 2011, 33(4): 442–446. (in Chinese)
- [27] 董晓文. 茅尾海红树林海洋动物来源细菌多样性和耐药性研究. 广西民族大学硕士学位论文, 2019.
- [28] Dang H, Zhang X, Song L, Chang Y, Yang G. Molecular determination of oxytetracycline-resistant bacteria and their resistance genes from mariculture environments of China. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 103(6): 2580–2592.
- [29] 李研东. 蜡样芽孢杆菌的药敏特性及对氟喹诺酮类药物耐药机制的初步研究. 吉林大学硕士学位论文, 2006.
- [30] Pandiyan P, Balaraman D, Thirunavukkarasu R, George EGJ, Subaramaniyan K, Manikkam S, Sadayappan B. Probiotics in aquaculture. *Drug Invention Today*, 2013, 5(1): 55–59.
- [31] 魏文娟. 养殖源弧菌耐药性及 *qnrVC* 基因介导喹诺酮类药物耐药机制研究. 上海海洋大学硕士学位论文, 2020.