

## 美洲鳗鲡及其养殖水体分离耐药菌的多样性和耐药性分析

吴小梅<sup>1</sup>, 林 茂<sup>1,2\*</sup>, 鄢庆彬<sup>1</sup>, 江兴龙<sup>1,2</sup>, 张 娟<sup>3</sup>

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021;

2. 鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心, 福建 厦门 361021;

3. 中国科学院城市环境与健康重点实验室, 福建 厦门 361021)

**摘要:** 为了更有针对性地防控水产动物细菌性病害的发生和流行, 本实验对美洲鳗鲡及其养殖水体耐药细菌的种属特征及耐药情况开展了相关研究。首先采集美洲鳗鲡不同部位(表皮、鳃、肠道)及其养殖水体的样品, 经 5 种抗菌药物平板筛选耐药菌株, 然后采用 K-B 纸片扩散法检测细菌对抗菌药物的耐药性, 同时测定耐药菌株的 16S rDNA 序列, 进而分析耐药菌的种属分布和多重耐药性。结果显示, 经耐药平板筛选分离纯化得到 108 株细菌, 分别属于气单胞菌属、柠檬酸杆菌属、不动杆菌属等 20 个属; 其中, 93.5% 的菌株对 3 种(含)以上的抗菌药物具有耐药性, 86.1% 的菌株对 3 类(含)以上的药物具有抗性。对阿莫西林的耐药率高达 90.7%, 对四环素、利福平以及磺胺类和酰胺醇类药物类的耐药率为 60%~80%, 对头孢噻肟、新霉素以及喹诺酮类的耐药性弱(低于 20%)。美洲鳗鲡肠道(0.40)、表皮(0.41)、鳃部(0.42)及水样(0.47)菌群的多重耐药指数显示各生态样品耐药程度较为严重, 尤以水样为最。各菌属中, 柠檬酸杆菌属(0.58)和克雷伯菌属(0.61)的多重耐药指数最高, 而不动杆菌属(0.21)则相对较低。美洲鳗鲡及养殖水体普遍存在多重耐药菌株, 对此应引起足够的重视; 水产动物及养殖环境耐药细菌对某些水产用药如诺氟沙星、新霉素等耐药率低, 可将其做为水产动物细菌性疾病治疗的首选药物。

**关键词:** 美洲鳗鲡; 16S rDNA; 药敏试验; 多重耐药性

**中图分类号:** Q 935; S 941

**文献标志码:** A

细菌耐药性是全球关注的热门科研领域, 病原菌多重耐药性的发展对人类健康和畜牧业生产都构成了严重的威胁。目前在金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 等医院感染的重要病原菌中均出现了多重耐药菌株, 已引起了医学和微生物学者的忧虑和重视<sup>[1]</sup>。而近年来在水产动物方面的研究报道也表明, 水产动物源细菌的多重耐药性同样不容忽视。蔡俊鹏等<sup>[2]</sup>研究发现杂色鲍 (*Haliotis diversicolor*) 养殖水体及其肠道菌群中有较多菌

株对四环素 (Tetracycline)、卡那霉素 (Kanamycin)、青霉素 G (Penicillin G)、新霉素 (Neomycin) 和丁胺卡那霉素 (Amikacin) 等表现出多重耐药性。李绍戊等<sup>[3]</sup>分离到的 28 株鱼源嗜水气单胞菌对  $\beta$ -内酰胺类 ( $\beta$ -Lactams)、大环内酯类 (Macrolides)、氯霉素类 (Chloramphenicols) 和四环素类 (Tetracyclines) 药物的耐药率均超过 60%。Nguyen 等<sup>[4]</sup>从 15 个鲑鱼养殖场分离的 116 株运动型假单胞菌 (*Pseudomonas* spp.) 和 92 株气单胞菌 (*Aeromonas* spp.) 具有多重耐药性的比例分别为 96.6% 和 61.9%。动物源细菌的耐药性不仅削弱抗菌药物对动物细菌性疾病的控制效果, 而且

收稿日期: 2015-03-04 修回日期: 2015-04-30

资助项目: 公益性行业(农业)科研专项(201203085); 国家自然科学基金(31202030); 鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心开放基金(RE201507); 中国科学院城市环境与健康重点实验室开放课题(KLUEH201106)

通信作者: 林 茂, E-mail: linmao@jmu.edu.cn

还存在向人类致病菌传播抗药性的潜在风险<sup>[5]</sup>。因此,调查养殖动物及其环境菌群耐药性的变化趋势,据此分析可能带来的不利影响,具有非常重要的科研价值和现实意义。

2015年Cao等<sup>[6]</sup>在《Science》上的报道表明中国的水产养殖产量已超过了全球的60%,养殖鳗鲡(*Anguilla spp.*)是中国出口创汇的重要农产品之一<sup>[7]</sup>。随着养殖集约化程度的增加,鳗鲡疾病时有发生,其中细菌性疾病的危害最为严重,常造成巨大的经济损失<sup>[8]</sup>。据报道可引起鳗鲡疾病的致病菌有近20种<sup>[9]</sup>,报道中分离得到的病原菌存在不同程度的多重耐药性。郑芳艳等<sup>[10]</sup>由患溃烂病鳗鲡分离得到的创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)对去甲万古霉素(Norvancomycin)具有抗性。Lo等<sup>[11]</sup>从病鳗分离到的94株迟缓爱德华菌(*Edwardsiella tarda*)对多西环素(Doxycycline)和土霉素(Oxytetracycline)的耐药率均为21.3%。雷燕等<sup>[12]</sup>对养殖欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*)体表溃疡病病原嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)的药敏实验显示,该菌株对10种抗菌药存在耐药性。谭爱萍等<sup>[13]</sup>分离并鉴定的一株鳗源肺炎克雷伯菌,更是对17种药物具有耐药性。现代微生物学理论认为,细菌的耐药性除了源自基因突变和遗传,也可通过细菌间的水平传播获得,因此病原菌的多重耐药性在一定程度上受正常菌群和环境耐药细菌的影响。此外,水产动物病原细菌一般为条件致病菌,在健康动物和养殖水体中长期存在。为此本研究从美洲鳗鲡(*A. rostrata*)各个部位(肠道、鳃和表皮)及其养殖水体分离耐药细菌,并分析耐药细菌的组成及耐药的程度,从而为评估美洲鳗鲡养殖区的细菌耐药性风险,以及指导抗菌药物的合理使用提供必要的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

LB培养基、MH培养基购自青岛海博生物技术有限公司;抗菌药物购自北京楚和霞光生物技术有限公司;药敏纸片购自杭州滨和微生物试剂有限公司。Taq酶、dNTP Mix、DNA ladder购自大连Takara公司;细菌基因组DNA提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;16S rDNA通用引物<sup>[14]</sup>(27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

和1492R:5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3')合成和DNA测序由南京金斯瑞生物公司完成;胶回收试剂盒购自美国Axygen公司。

### 1.2 样品采集与理化分析

分别自福建省5个养殖场采集美洲鳗鲡及其养殖水样。水样以HANA水质仪(HI9804)检测温度、pH、溶氧、NH<sub>3</sub>-N及NO<sub>2</sub>-N等理化指标,并利用Waters超高效液相系统(ACQUITY UPLC)-三重四极杆串联质谱(XEVO-TQ)联用仪检测抗菌药含量<sup>[15]</sup>。美洲鳗鲡以MS-222麻醉后,用酒精棉擦拭体表,解剖,分别取鳃、肠道和表皮,剪碎加入生理盐水,匀浆待用。

### 1.3 耐药菌株的筛选、分离与纯化

美洲鳗鲡各组织匀浆液和水样分别进行10倍梯度稀释后,分别涂布于含氨苄西林(Ampicillin, AMP, 100 mg/L)、链霉素(Streptomycin, STR, 100 mg/L)、甲氧苄啶(Trimethoprim, TMP, 50 mg/L)、四环素(TET, 100 mg/L)和氯霉素(Chloramphenicol, CHL, 30 mg/L)等抗菌药物的LB平板上<sup>[16]</sup>,30℃下培养16~18 h;并根据菌落的形态特征挑出不同菌株进行纯培养和保种。

### 1.4 细菌基因组DNA的提取和16S rDNA的PCR扩增

各耐药菌株使用试剂盒提取总DNA,以1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测DNA后进行PCR扩增。PCR反应体系:5 μL 10 × Taq DNA Buffer, dNTPs(10 mmol/L)、引物27F(10 μmol/L)和1492R(10 μmol/L)各1 μL, 0.25 μL Taq酶(5 U/μL), 0.5~1 μg DNA模板,补ddH<sub>2</sub>O至50 μL;反应条件:94℃预变性5 min, 94℃变性1 min, 55℃退火1 min, 72℃延伸1.5 min,共30个循环,72℃终延伸5 min。

### 1.5 16S rDNA的测序及系统发育树的构建

16S rDNA产物以1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测并纯化后进行测序,所得序列在GenBank中进行Blast分析。耐药菌群16S rDNA序列用MEGA 5.2软件进行比对和聚类分析,再用Mothur软件以阈值为97%进行OTU(operational taxonomic unit, 运算分类单元)分析,程序选出的代表菌株与GenBank中的参考菌株通过MEGA 5.2软件采用邻接法(neighbour-joining method)构建系统进化树,选用Kimura 2-parameter距离模

型,自举(bootstrap)数据集设为1 000次。

### 1.6 药敏实验和耐药性分析

各菌株的药敏实验以大肠杆菌 ATCC25922 作为质控菌株,采用标准的 K-B 纸片琼脂扩散法。将活化好的耐药菌株用生理盐水稀释菌液,使稀释菌液达到 0.5 麦氏比浊管的浊度。无菌棉拭子蘸取上述菌液,在管壁上挤压去掉多余菌液,均匀涂布于 MH 平板上。待平板上的水分被琼脂完全吸收后,用无菌镊子取药敏纸片贴在平板表面压紧,于 30 ℃ 生化培养箱中倒置培养 16 ~ 18 h 后取出测量抑菌圈直径。参照美国临床实验室标准化委员会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 标准<sup>[16]</sup>判断结果。

根据药敏实验获得的耐药情况,参考 Krumperman 等<sup>[17]</sup>的方法计算不同生态位菌群的多重耐药指数 $[ = \Sigma n / (D \times S) ]$ 。其中,“n”指某个菌株耐受抗菌药的数量,“ $\Sigma n$ ”即为该生态位所有菌株耐药的频数总和;“D”和“S”分别是实验所用的抗菌药物数量和菌株数量。

## 2 结果与分析

### 2.1 养殖水样抗菌药含量检测

在 5 份养殖水样中,均检测到痕量的氯霉素 (CHL) (7 ~ 22 ng/L) 和氟苯尼考 (Florfenicol, FFL) (3 ~ 1 704 ng/L),还有个别水样检测到甲氧苄啉 (TMP)、磺胺甲恶唑 (Sulfamethoxazole, SMZ) 和红霉素 (Erythromycin, ERY) (1 ~ 12 ng/L),而阿莫西林 (Amoxicillin, AMX)、头孢噻肟 (Cefotaxime, CTX)、链霉素 (STR)、卡那霉素 (KAN)、新霉素 (NEO)、四环素 (TET)、多西霉素 (DOX)、诺氟沙星 (Norfloxacin, NOR)、氧氟沙星 (Ofloxacin, OFL)、恩诺沙星 (Enrofloxacin, ENR)、利福平 (Rifampicin, RIF) 等均未检出 (检测限为 0.1 ~ 10 ng/L)。

### 2.2 耐药细菌的分离及 16S rDNA 的序列分析

养殖水样及美洲鳗鲡样品经 5 种抗菌药物 (AMP、STR、TMP、TET 和 CHL) 平板的筛选,分别获得 21、23、26、17 和 21 株耐药菌株,共计 108 株菌(后续检验未发现菌落特征、耐药谱和 16S rDNA 完全一致的重复菌株)。

以各菌株总 DNA 为模板,扩增获得 16S rDNA,经测序和同源性比对,美洲鳗鲡不同体位及其养殖水体所分离的耐药菌株形成 23 个 OTU

(表 1),归属于 4 纲 20 属(图 1)。其中, $\gamma$ -变形菌纲的气单胞菌属 (*Aeromonas*) (24.1%)、柠檬酸杆菌属 (*Citrobacter*) (17.6%) 和不动杆菌属 (*Acinetobacter*) (16.7%) 的出现频率最高。在各样品中,鳃部耐药菌群多样性最为丰富,分布于 13 属,又以气单胞菌属、柠檬酸杆菌属和不动杆菌属最为常见;其次,肠道分离耐药菌分属于 10 属,其中气单胞菌属、柠檬酸杆菌属、不动杆菌属和希瓦菌属 (*Shewanella*) 居多;表皮分离耐药菌主要归属于气单胞菌属;水体耐药细菌种类最少,仅占 7 属,主要分布于气单胞菌属、柠檬酸杆菌属和克雷伯菌属 (*Klebsiella*),在美洲鳗鲡样品中常见的不动杆菌属、希瓦菌属和变形杆菌属 (*Proteus*) 的耐药菌在水样中未见分离(图 2)。

### 2.3 药敏实验结果

108 株耐药细菌对 9 类 17 种抗菌药物敏感性实验结果(图 3)显示,耐药菌株对阿莫西林 (AMX) 的耐药率高达 90.7%,对四环素 (TET)、磺胺甲恶唑 (SMZ)、甲氧苄啉 (TMP)、复方磺胺甲恶唑 (Sulfamethoxazole/Trimethoprim, SXT)、氯霉素 (CHL)、氟苯尼考 (FFL)、利福平 (RIF) 的耐药率也在 60% ~ 80% 之间。而对头孢噻肟 (CTX)、新霉素 (NEO) 和诺氟沙星 (NOR)、氧氟沙星 (OFL)、恩诺沙星 (ENR) 的耐药率较低,分别为 11.1%、3.7%、6.5%、7.4% 和 15.7%。此外,对链霉素 (STR)、卡那霉素 (KAN)、红霉素 (ERY) 以及多西环素 (DOX) 的耐药率则介于 20% ~ 40%。对具体的菌属而言,柠檬酸杆菌 (19 株) 对四环素类药物 TET、DOX 和磺胺及其增效药物 SMZ、TMP、SXT 的耐药率 (79% ~ 100%) 远高于总体耐药率,而不动杆菌 (18 株) 则恰恰相反,对上述 2 类药物的耐药率 (0% ~ 17%) 远低于总体耐药水平。

各菌株耐药谱统计结果(图 4)表明,93.5% (101/108) 的菌株对 3 种或 3 种以上的药物具有抗性,其中费氏不动杆菌 (*Citrobacter freundii*) T23 和肺炎克雷伯菌 C12 对 13 种抗菌药具有抗性,肺炎克雷伯菌 C11 和维氏气单胞菌 (*Aeromonas veronii*) C13 对 14 种抗菌药具有抗性。9 类抗菌药物分别以 AMX、CTX、TET、STR、ERY、ENR、RIF、SMZ 和 CHL 等药物为代表计算,则有 86.1% (93/108) 的耐药菌株对 3 类或 3 类以上的药物具有抗性,其中弗氏埃希菌

表 1 美洲鳗鲡及其养殖水体中耐药细菌 16S rDNA 同源性比对和 OTU 分析结果  
 Tab.1 16S rDNA homology alignment and OTU analysis of drug-resistant bacteria isolated  
 from *Anguilla rostrata* and the pond water

运算分 类单元 OTU	菌株名 strain	代表菌株(登录号) representative (accession No.)	同源性最高菌株 strain of the highest homology		
			学名 scientific name	同源性/% identity	登录号 accession No.
1	M23, A5, S2, A11, S1, M3, C13, S11, S19, C24, M14, M25, S18, C22, A22, S9, C23, M27, M28, T15, A21, A20, A18, A13, S7, A14	C23 (KM268975)	顶盖气单胞菌 <i>Aeromonas tecta</i>	100	NR_118043
2	T21, M12, M15, S20, S12, M20, T4, S21, T17, T16, S22, C20, C19, C18, T18, T12, C14, T23, M11	T21 (KM269019)	弗氏柠檬酸杆菌 <i>Citrobacter freundii</i>	100	NR_028894
3	A8, C2, A3, C6, S14, A9, A15, C7, C16, C15, A16, C4, C1, A7, A2, S15	C16 (KM268968)	医院不动杆菌 <i>Acinetobacter nosocomialis</i>	100	NR_117931
4	C5, C11, M2, T2, M1, C3, A1, T1, C12	C5 (KM268927)	肺炎克雷伯菌 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	99	NR_103936
5	M21, M24, S23, M26, M18, T20	M18 (KM268984)	新万景希瓦菌 <i>Shewanella seohaensis</i>	100	NR_025610
6	A17, M19, C21, A19, M22	C21 (KM268973)	普通变形菌 <i>Proteus vulgaris</i>	100	NR_115878
7	M17, C17, S17	S17 (KM269001)	木糖葡萄球菌 <i>Staphylococcus xylosus</i>	100	NR_036907
8	M5, M8, S4	M8 (KM268937)	透明福格斯氏菌 <i>Vogesella perlucida</i>	99	NR_044326
9	A12, M13, S13	M13 (KM268979)	类志贺邻单胞菌 <i>Plesiomonas shigelloides</i>	99	NR_044827
10	A4, T11	T11 (KM269009)	粘质沙雷氏菌 <i>Serratia marcescens</i>	99	NR_114043
11	M7, T19	M7 (KM268936)	成团泛菌 <i>Pantoea agglomerans</i>	99	NR_111998
12	A6, M4	A6 (KM268919)	苏云金芽孢杆菌 <i>Bacillus thuringiensis</i>	99	NR_102506
13	T3, T13	T3 (KM268949)	败血不动杆菌 <i>Acinetobacter septicus</i>	99	NR_116071
14	S8	S8 (KM268945)	解脲金黄杆菌 <i>Chryseobacterium ureilyticum</i>	99	NR_042503
15	S16	S16 (KM269000)	反硝化卓贝尔氏菌 <i>Zobellia denitrificans</i>	99	NR_043629
16	M6	M6 (KM268935)	迟缓爱德华菌 <i>Edwardsiella tarda</i>	99	NR_024770
17	M16	M16 (KM268982)	嗜麦芽寡养单胞菌 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99	NR_041577
18	S5	S5 (KM268942)	香味类香味菌 <i>Myroides odoratus</i>	99	NR_112976
19	S24	S24 (KM269008)	阿雅巴塔芽孢杆菌 <i>Bacillus aryabhatai</i>	100	NR_115953
20	T22	T22 (KM269020)	摩氏假单胞菌 <i>Pseudomonas mosselii</i>	100	NR_024924
21	T14	T14 (KM269012)	海藻希瓦菌 <i>Shewanella algae</i>	99	NR_117771
22	S3	S3 (KM268940)	弗格森埃希菌 <i>Escherichia fergusonii</i>	99	NR_027549
23	S6	S6 (KM268943)	双重氮植物杆菌 <i>Phytobacter diazotrophicus</i>	99	NR_115869

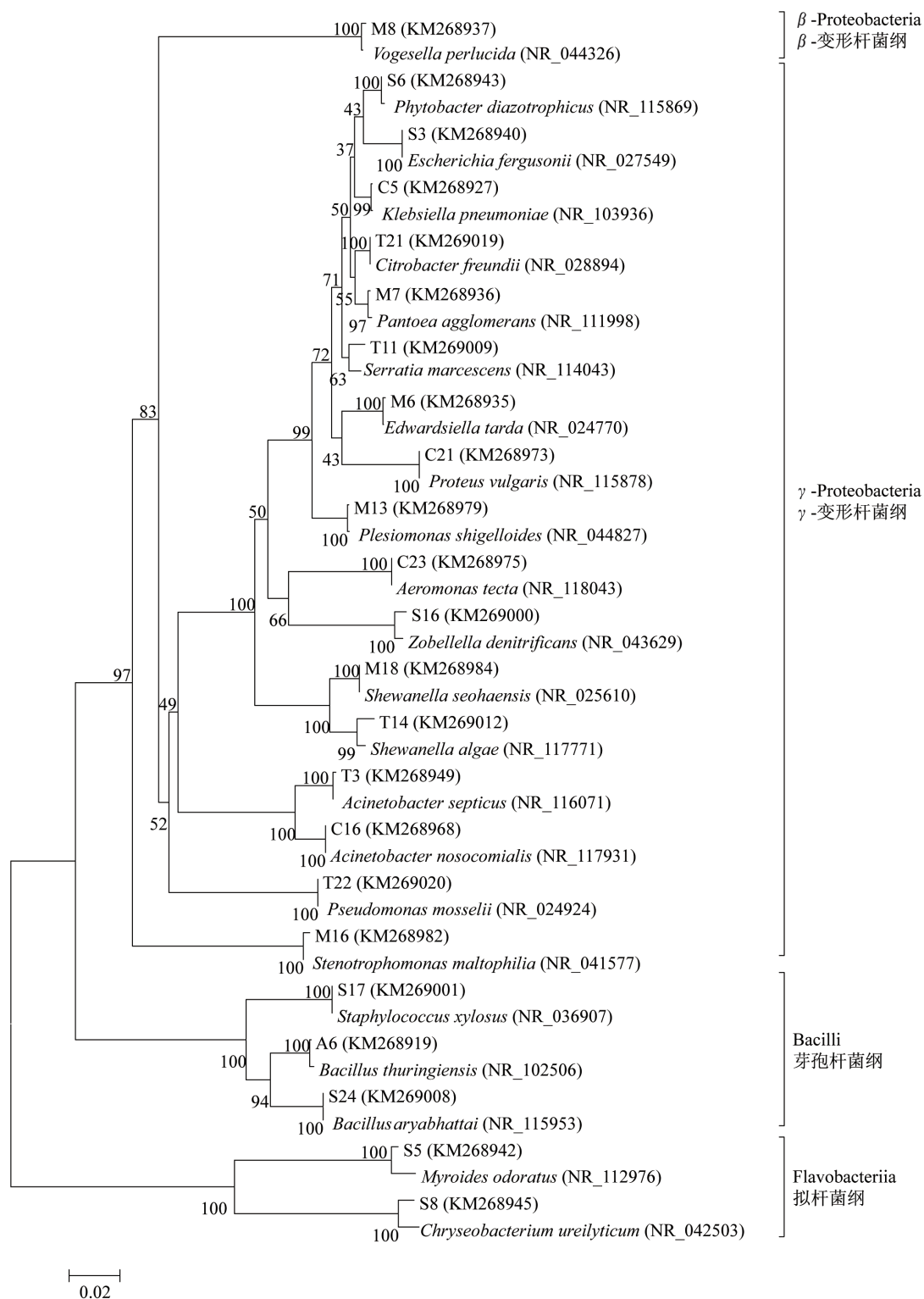


图1 美洲鳗鲡及其养殖水体中耐药细菌 16S rDNA 系统发育树  
 Fig. 1 Phylogenetic tree of 16S rDNA of drug-resistant bacteria isolated from *A. rostrata* and the pond water

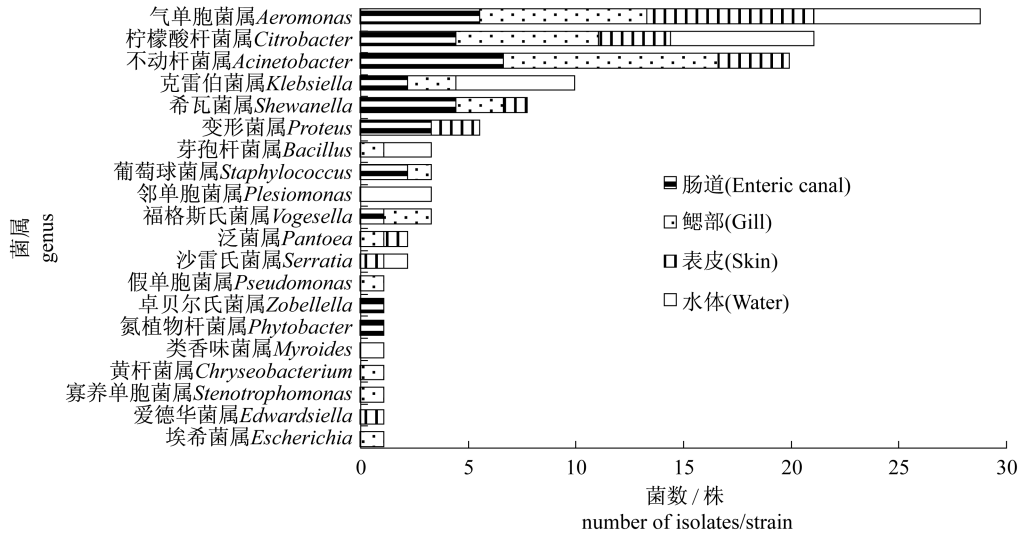


图 2 美洲鳗鲡的鳃、肠道、表皮及其养殖水体中耐药细菌菌属分布

Fig. 2 Distribution of bacteria isolated from the gill, enteric canal and skin of *A. rostrata* and the pond water

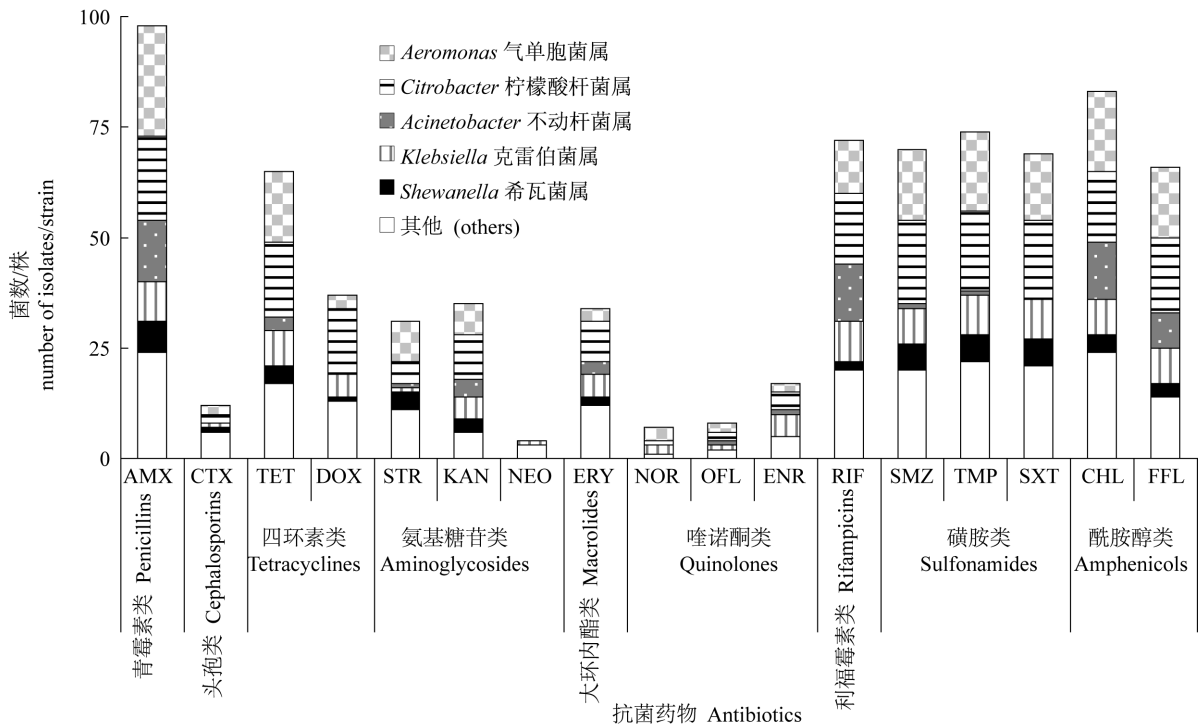


图 3 美洲鳗鲡及其养殖水体分离耐药菌株对 17 种抗菌药的耐药率

Fig. 3 Frequencies of resistance to 17 antimicrobials of drug-resistant bacteria strains isolated from *A. rostrata* and the pond water

(*Escherichia fergusonii*) S3、肺炎克雷伯菌 C11 和摩氏假单胞菌 (*Pseudomonas mosselii*) T22 对 8 类抗菌药物具有抗性。进一步计算美洲鳗鲡的肠道、表皮、鳃及水样分离菌株的多重耐药指数,其数值分别为 0.40、0.41、0.42 和 0.47,结果也表明其耐药程度较为严重,尤以水样为最。若以种属

分别计算,分离菌株数最多的气单胞菌属、柠檬酸杆菌属、不动杆菌属、克雷伯菌属和希瓦菌属的多重耐药指数分别是 0.38、0.58、0.21、0.61 和 0.41,显示柠檬酸杆菌属和克雷伯菌属的耐药水平最高,而不动杆菌属则相对较低。

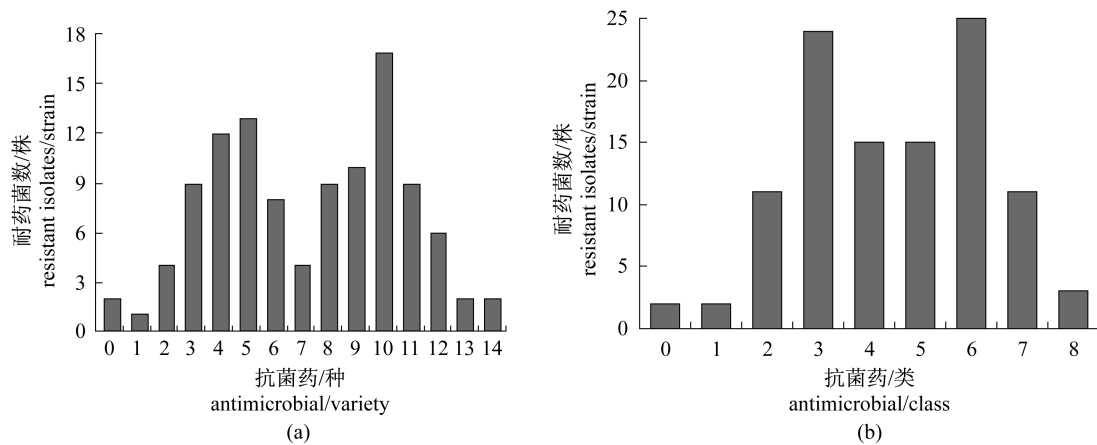


图4 108株细菌对17种(A)和9类(B)抗菌药的多重耐药性

Fig. 4 Multiple resistance to 17 varieties(A) and 9 classes(B) of antimicrobial for 108 bacteria strains

### 3 讨论

#### 3.1 正常菌群与耐药菌群的种属分布

近年来,国内外学者对多种水产动物或其养殖水体的菌群组成进行了多方面研究。赵庆新<sup>[18]</sup>对鲤科鱼肠道菌群的分析表明,草鱼、白鲢、团头鲂和鲤鱼的肠道主要分布有哈夫尼亚菌属(*Hafnia*)、致病杆菌属(*Xenorhabdus*)、气单胞菌属、柠檬酸菌属、假单胞菌属、链球菌属(*Streptococcus*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)等菌属。Salgado-Miranda等<sup>[19]</sup>分析65个养殖场虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)不同部位菌群,共分离到371株菌,主要分布菌属有气单胞菌属、爱德华菌属(*Edwardsiella*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、埃希菌属(*Escherichia*)、克雷伯菌属、邻单胞菌属(*Plesiomonas*)、假单胞菌属和耶尔森菌属(*Yersinia*)。周金敏等<sup>[20]</sup>报道黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)肠道和养殖水体菌群主要为气单胞菌属、棒杆菌属(*Corynebacterium*)、微球菌属(*Micrococcus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、葡萄球菌属、不动杆菌属、莫拉氏菌属(*Moraxella*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、肠杆菌属和弧菌属(*Vibrio*)等。在这些水产动物及其养殖水体的菌群研究中,许多细菌种属在本研究所分离到的耐药细菌中也多有涉及。在美洲鳗鲡菌群研究方面,Joh等<sup>[21]</sup>分析了日本鳗鲡(*A. japonicus*)不同体位(脾、肾、肝和鳃)及其水样菌群的组成,发现气单胞菌属、柠檬酸杆菌属分离到的频率最高。

Ugur等<sup>[22]</sup>分离欧洲鳗鲡表皮细菌,发现其主要菌属是假单胞菌属、不动杆菌属和寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)。而本研究中经抗菌药平板筛选得到的108株耐药菌株也以气单胞菌属、柠檬酸杆菌属和不动杆菌属为主,并包括假单胞菌属和寡养单胞菌属等共20属,所得耐药菌株种属组成与正常菌群有极大相似之处,这表明耐药细菌的种属分布与正常菌群有较强的相关性。

#### 3.2 生态菌群的多重耐药性分析

多重耐药菌株在分析样品中所占的比例,也就是多重耐药率,常用于耐药水平的分析。目前有较多报道在分析多重耐药性时,常依据是否对3种(含)以上抗菌药耐药来计算。如写腊月等<sup>[23]</sup>研究的海水养殖源弧菌对3种(含)以上药物耐药的比例为80.44%;王瑞旋等<sup>[24]</sup>分离到的水产致病菌菌株该比例为68.5%;Nguyen等<sup>[4]</sup>报道的假单胞菌(96.6%)和气单胞菌(61.9%)的多重耐药性比例亦据此分析。但是,根据严格定义,多重耐药性应是指某株细菌对3类(而不是3种)或3类以上的抗菌药物同时耐药<sup>[25]</sup>,同一类化学构型的各种抗菌药存在交叉耐药的较大可能性,因此不应重复计算。Vincenti等<sup>[26]</sup>在研究医院分离菌株对9类14种抗菌药物的耐药性时,即以类为标准计算得到多重耐药率为38.9%。抗菌药中,青霉素类和头孢菌素类多数情况下被归并在 $\beta$ -内酰胺环类药物中,而实际上虽然它们都具有 $\beta$ -内酰胺结构,但头孢菌素类的母核是7-氨基头孢烷酸(7-ACA),而青霉素的母核则是6-

氨基青霉烷酸(6-APA),这一结构上的差异使头孢菌素能耐受青霉素酶,这使得它们在抗耐药菌的能力上表现迥异,本研究结果也验证了这一点。因此在计算多重耐药菌株数时,二者应作为两类药物进行判别。本研究中对3种或3种以上抗菌药物耐药的菌株有93.5%,而对3类或3类以上的抗菌药物的多重耐药率(86.1%)则要低得多。

多重耐药指数也可用于评估多重耐药性风险<sup>[27]</sup>,张博<sup>[28]</sup>利用多重耐药指数大小分析不同采样环境的耐药性分布规律;王瑞旋等<sup>[29]</sup>研究显示企鹅珍珠贝(*Pteria penguin*)肠道细菌的多重耐药指数较水体低;Ghosh等<sup>[30]</sup>研究发现鱼的鳃部耐药率明显高于肠道细菌;Nguyen等<sup>[4]</sup>的研究则表明鲎形目(Siluriformes)鱼类养殖场分离的假单胞菌的多重耐药指数(0.457)明显高于气单胞菌(0.293)。本研究多重耐药指数的计算结果显示,水体菌群(0.47)的耐药性水平高于美洲鳗鲡各组织(0.40~0.42),克雷伯菌属(0.61)和柠檬酸杆菌属(0.58)耐药水平高于希瓦菌属(0.41)、气单胞菌属(0.38)和不动杆菌属(0.21)。

许多学者认为耐药水平较高的细菌样品中受抗生素的污染可能较高,Krumpertan<sup>[17]</sup>在其研究中指出多重耐药指数小于或等于0.2时样品中抗菌药物很少或从不使用抗菌药物,而当其高于0.2则说明其是常用抗菌药物的高风险污染源。而本研究美洲鳗鲡养殖水样菌群的多重耐药指数(0.47)虽然较高,但在5份水样中,除了均检测到痕量的CHL(7~22 ng/L)和FFL(3~1704 ng/L),以及个别水样检测到TMP、SMZ和ERY(1~12 ng/L),另外11种药物均未检出。这表明,抗菌药污染高的样品中可能得到更多的耐药菌,但抗菌药浓度低的样品中菌群的耐药水平不一定低,二者之间没有必然的关系。

### 3.3 生态菌群对特定药物的耐药率

水产养殖生态样品中分离得到的细菌对各种抗菌药物的耐药性情况虽然不尽相同,但有很多共通之处。最重要的特征之一是水环境分离细菌多为革兰氏阴性( $G^-$ )细菌,这使得它们对某些主要针对革兰氏阳性( $G^+$ )细菌的抗菌药物具有较强的抗药性,如AMX的作用机制是针对 $G^+$ 细菌细胞壁的肽聚糖,而 $G^-$ 细菌细胞壁的肽聚糖含量很低,因此细胞壁不易受损。本研究分离得

到数量最多的气单胞菌属(26株),在肠道、鳃、体表和水样中均匀分布,其对AMX高度耐药(耐药率大于90%),对TET和磺胺类(SMZ、TMP、SXT),以及酰胺醇类(CHL、FFL)药物较耐药(60%~80%),而对头孢类(CTX)、NEO以及氟喹诺酮类(NOR、OFL、ENR)药物耐药率低(小于20%)。Nguyen等<sup>[4]</sup>分离得到的92株气单胞菌对 $\beta$ -内酰胺类、氨基糖苷类、氟喹诺酮类和磺胺类等药物的耐药率与本研究结果相近,但其对TET(34.2%)和CHL(31.5%)的耐药率则要低得多。李绍戊等<sup>[3]</sup>对28株鱼源嗜水气单胞菌的耐药性分析结果也大体相似,但其对四环素类、氨基糖苷类、喹诺酮类药物的耐药率比本研究高出8.3%~26.7%,而对大环内酯类药物的耐药率(89.3%)更是高出77.6%。水产养殖生态样品所分离细菌对特定药物的耐药率大体趋同,主要是因为水体的常见菌属比较相似,如气单胞菌、假单胞菌、不动杆菌和肠杆菌等。而不同来源样品的耐药率差异则可能与地区水文、宿主物种、流行菌株和抗菌药物的使用等有关,因此研究特定养殖区域的耐药性情况,才能更全面地掌握该区域的耐药流行情况,提出更有针对性的用药指导。就本研究结果而言,取样区域的美洲鳗鲡及养殖水体普遍存在多重耐药菌株(其中气单胞菌C13菌株耐14种药物),各养殖场样品的多重耐药指数(0.27~0.58)偏高,对此应引起足够的重视;而养殖生态菌群对某些水产用药物如诺氟沙星、新霉素、多西环素等耐药率低,可将其作为水产动物细菌性疾病治疗的首选药物。

特别感谢浙江宁波出入境检验检疫局的湛嘉提供抗菌药含量检测方面的实验帮助。

### 参考文献:

- [1] Hu F P, Zhu D M, Wang F, et al. CHINET 2013 surveillance of bacterial resistance in China [J]. Chinese Journal of Infection Chemotherapy, 2014, 14 (5): 365-374. [胡付品,朱德妹,汪复,等. 2013年中国CHINET细菌耐药性监测. 中国感染与化疗杂志, 2014, 14(5): 365-374.]
- [2] Cai J P, Zhou Y P, Cai C H. Studies on antibiotic resistance of different groups of marine bacteria isolated from abalone (*Haliotis diversicolor*) farming waters and their digestion guts [J]. Microbiology



- China,2004,31(6):48-52. [蔡俊鹏,周毅频,蔡创华. 九孔鲍养殖水体及其肠道不同菌群抗药性研究. 微生物学通报,2004,31(6):48-52.]
- [3] Li S W, Wang D, Liu H B, *et al.* Molecular characterization of integron-gene cassettes in multi-drug resistant *Aeromonas hydrophila* from fish[J]. Journal of Fishery Sciences of China,2013,20(5):1015-1022. [李绍戊,王荻,刘红柏,等. 鱼源嗜水气单胞菌多重耐药菌株整合子的分子特征. 中国水产科学,2013,20(5):1015-1022.]
- [4] Nguyen H N K, Van T T H, Nguyen H T, *et al.* Molecular characterization of antibiotic resistance in *Pseudomonas* and *Aeromonas* isolates from catfish of the Mekong Delta, Vietnam [J]. Veterinary Microbiology,2014,171:397-405.
- [5] Marshall B M, Levy S B. Food animals and antimicrobials:Impacts on human health[J]. Clinical Microbiology Reviews,2011,24(4):718-733.
- [6] Cao L, Naylor R, Henriksson P, *et al.* China's aquaculture and the world's wild fisheries [J]. Science,2015,347(6218):133-135.
- [7] Qiu J X, Fang Z S, Xie J, *et al.* Research advances on artificial breeding of Japanese eel (*Anguilla japonica*) [J]. Journal of Anhui Agriculture Sciences,2013,41(34):13269-13272. [丘继新,方彰胜,谢骏,等. 日本鳗鲡人工繁殖的研究进展. 安徽农业科学,2013,41(34):13269-13272.]
- [8] Yang Q H, Isolation and identification of the pathogenic *Aeromonas* spp. from farmed eels [D]. Xiamen:Jimei University,2012. [杨求华. 养殖美洲鳗鲡致病性气单胞菌的分离与鉴定. 厦门:集美大学,2012.]
- [9] Wu L. Spot rapid diagnosis and medicine cure of pathogenic bacteria from the cultivated eels [D]. Xiamen:Jimei University,2007. [吴亮. 美洲鳗鲡病原菌的现场快速检测与药物防治. 厦门:集美大学,2007.]
- [10] Zheng F Y, Shi C B, Pan H J, *et al.* Isolation and identification of pathogen from diseased *Anguilla anguilla* [J]. Journal of Shanghai Fisheries University,2005,14(3):242-247. [郑芳艳,石存斌,潘厚军,等. 美洲鳗鲡溃烂病病原的分离与鉴定. 上海水产大学学报,2005,14(3):242-247.]
- [11] Lo D Y, Lee Y J, Wang J H, *et al.* Antimicrobial susceptibility and genetic characterisation of oxytetracycline-resistant *Edwardsiella tarda* isolated from diseased eels[J]. The Veterinary Record,2014,175(8):203-203.
- [12] Lei Y, Xiao Y. Identification and antibiotic sensitivity experiment of *Aeromonas hydrophila* isolated from skin ulcer of artificial breeding *Anguilla anguilla* [J]. Journal of Fujian Fisheries,2012,34(3):183-188. [雷燕,肖洋. 养殖欧洲鳗鲡体表溃疡病病原菌的分离、鉴定及药敏试验. 福建水产,2012,34(3):183-188.]
- [13] Tan A P, Deng Y T, Jiang L, *et al.* Isolation and identification and identificaton of a multiple-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* from *Anguilla marmorata*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica,2013,37(4):744-750. [谭爱萍,邓玉婷,姜兰,等. 一株多重耐药鳗源肺炎克雷伯菌的分离鉴定. 水生生物学报,2013,37(4):744-750.]
- [14] Bosshard P P, Santini Y, Grüter D, *et al.* Bacterial diversity and community composition in the chemocline of the meromictic alpine Lake Cadagno as revealed by 16S rDNA analysis [J]. FEMS Microbiology Ecology,2000,31(2):173-182.
- [15] Zhan J, Yu X, Zhong Y, *et al.* Generic and rapid determination of veterinary drug residues and other contaminants in raw milk by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography B,2012,906:48-57.
- [16] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). M100-S19 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Nineteenth informational supplement [S]. USA: Clinical and Laboratory Standards Institute,2009.
- [17] Krumperman P H. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1983, 46(1):165-170.
- [18] Zhao Q X. An analysis of intestinal microflora of Cyprinidae[J]. Microbiology,2001,21(2):18-20. [赵庆新. 鲤科(Cyprinidae)鱼肠道菌群分析. 微生物学杂志,2001,21(2):18-20.]
- [19] Salgado-Miranda C, Palomares E, Jurado M, *et al.* Isolation and distribution of bacterial flora in farmed rainbow trout from Mexico[J]. Journal of Aquatic Animal Health,2010,22(4):244-247.
- [20] Zhou J M, Wu Z X, Zeng L B, *et al.* Microflora in digestive tract of yellow catfish (*Pseudobagrus fulvidraco*) and in the water[J]. Journal of Huazhong Agricultural University,2010,29(5):613-617. [周金敏,吴志新,曾令兵,等. 黄颡鱼肠道及养殖水体中菌群的分析. 华中农业大学学报,2010,29(5):

- 613 – 617. ]
- [21] Joh S J, Ahn E H, Lee H J, *et al.* Bacterial pathogens and flora isolated from farm-cultured eels (*Anguilla japonica*) and their environmental waters in Korean eel farms [ J ]. *Veterinary Microbiology*, 2013, 163 (1) :190 – 195.
- [22] Ugur A, Yilmaz F, Sahin N, *et al.* Microflora on the skin of European eel (*Anguilla Anguilla L.*, 1758) sampled from Creek Yuvarlakçay, Turkey [ J ]. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 2002, 54 (2) :89 – 94.
- [23] Xie L Y, Hu L L, Fang W H, *et al.* Investigation and analysis of drug resistance of *Vibrios* from mariculture source [ J ]. *Marine Fisheries*, 2012, 33 (4) :442 – 446. [ 写腊月, 胡琳琳, 房文红, 等. 海水养殖源弧菌耐药性调查与分析. *海洋渔业*, 2012, 33 (4) :442 – 446. ]
- [24] Wang R X, Geng Y J, Wang J Y, *et al.* Antibiotic resistant genes in aquacultural bacteria [ J ]. *Marine Environmental Science*, 2012, 21 (3) :323 – 328. [ 王瑞旋, 耿玉静, 王江勇, 等. 水产致病菌耐药基因的研究. *海洋环境科学*, 2012, 21 (3) :323 – 328. ]
- [25] Magiorakos A P, Srinivasan A, Carey R B, *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance [ J ]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2012, 18 (3) :268 – 281.
- [26] Vincenti S, Quaranta G, De Meo C, *et al.* Non-fermentative gram-negative bacteria in hospital tap water and water used for haemodialysis and bronchoscope flushing: Prevalence and distribution of antibiotic resistant strains [ J ]. *Science of the Total Environment*, 2014, 499 :47 – 54.
- [27] Riaz S, Faisal M, Hasnain S. Antibiotic susceptibility pattern and multiple antibiotic resistances (MAR) calculation of extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species in Pakistan [ J ]. *African Journal of Biotechnology*, 2013, 10 (33) :6325 – 6331.
- [28] Zhang B. Detection of antibiotic resistance and various resistance genes in *Enterobacteriaceae* isolated from the urban sewage [ D ]. Harbin: Northeast Agriculture University, 2013. [ 张博. 城市污水中肠杆菌的抗生素耐药性和多种耐药基因的检测. 哈尔滨: 东北农业大学, 2013. ]
- [29] Wang R X, Lin Y S, Guo Z X, *et al.* Study on antibiotic-resistance of heterotrophic bacteria from farming water and intestine of Pearl oyster (*Pteria penguin*) in Lingshui [ J ]. *Journal of Tropical Oceanography*, 2013, 32 (6) :96 – 100. [ 王瑞旋, 林韵懿, 郭志勋, 等. 海南陵水企鹅珍珠贝肠道及其养殖水体中异养细菌耐药性研究. *热带海洋学报*, 2013, 32 (6) :96 – 100. ]
- [30] Ghosh K, Mandal S. Antibiotic resistant bacteria in consumable fishes from Digha coast, West Bengal, India [ J ]. *Proceedings of the Zoological Society*, 2010, 63 (1) :13 – 20.

## Diversity and antimicrobial susceptibility of drug-resistant bacteria isolated from *Anguilla rostrata* and the farming water

WU Xiaomei<sup>1</sup>, LIN Mao<sup>1,2\*</sup>, YAN Qingpi<sup>1</sup>, JIANG Xinglong<sup>1,2</sup>, ZHANG Xian<sup>3</sup>

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Engineering Research Center of the Modern Technology for Eel Industry, Ministry of Education, Xiamen 361021, China;

3. Key Laboratory of Urban Environment and Health, Institute of Urban Environment, Chinese Academy of Sciences, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** To provide information for controlling bacterial disease of aquatic animals, this study reveals the diversity and resistance of the drug-resistant bacteria around *Anguilla rostrata* and the farming ponds. Drug-resistant bacteria in the samples from intestine, epidermis, gill of *A. rostrata* and the pond water were screened by five antimicrobials. Their antibiotic resistance was determined by the Kirby-Bauer disc diffusion method and taxonomic status was identified by phylogenetic analysis of 16S rDNA sequences. The results showed that 108 resistant strains were isolated and classified into 20 genera, such as *Aeromonas*, *Citrobacter*, and *Acinetobacter*. The percentage of multiple resistance to three or more varieties of antibiotics was 93.5%, while the rate judged by three or more classes of antibiotics was 86.1%. The frequency of resistance to amoxicillin (90.7%) was high, and so with tetracycline, rifampicin, sulfonamides, and amphenicols (60% – 80%). On the contrary, resistance to cefotaxime, neomycin and quinolones (less than 20%) was unfrequent. The multiple antibiotic resistance (MAR) indexes of isolates from intestine, epidermis, gill, and water were 0.40, 0.41, 0.42 and 0.47 respectively, which showed the high risk of MAR in every ecological sample, especially in the water sample. Among genera, MAR indexes of *Citrobacter* (0.58) and *Klebsiella* (0.61) were high, while that of *Acinetobacter* (0.21) was low relatively. Multi-drug resistant bacteria turned out to be ubiquitous in *A. rostrata* and the farming water, to which enough attention should be paid. Resistant bacteria from *A. rostrata* and water environments were mostly sensitive to some fishery drugs such as norfloxacin and neomycin. So they could be preferential drugs to treat the bacterial disease in aquaculture.

**Key words:** *Anguilla rostrata*; 16S rDNA; antimicrobial susceptibility testing; multi-drug resistance

**Corresponding author:** LIN Mao. E-mail: linmao@jmu.edu.cn