

东海温州水域 4 类常见耐药基因的流行 情况研究*

金磊^{1,2} 周前进^{1,2①} 邵鑫斌³ 王瑶华³ 陈炯^{1,2①}
闫茂仓³ 苗亮² 唐标⁴ 张严峻⁵

(1. 宁波大学 农产品质量安全危害因子与风险防控国家重点实验室 宁波 315211; 2. 宁波大学海洋学院 宁波 315832;
3. 浙江省海洋水产养殖研究所 浙江省近岸水域生物资源开发与保护重点实验室 温州 325005; 4. 浙江省农业科学院
农产品质量标准研究所 杭州 310021; 5. 浙江省疾病预防控制中心 杭州 310051)

摘要 磺胺类、四环素、喹诺酮类和多粘菌素抗生素是医学与养殖业中的常用抗生素,其中多粘菌素在畜牧养殖业中常作为促生长剂添加。调查分析了这 4 类抗生素的常见耐药基因在东海温州近海水域的分布情况。利用抗性平板筛选温州近海水域对磺胺类、四环素类及喹诺酮类抗生素耐药的可培养细菌分离株,对耐药分离株通过 PCR 方法进行目标耐药基因检测;对目标耐药基因阳性的耐药分离株进行多粘菌素耐药基因 *MCR* 检测以及采用微量二倍稀释法测定对上述 4 类抗生素的耐药性。结果表明,利用抗性平板筛选获得可培养耐药分离株 1 605 株,从中筛选到目标耐药基因阳性的 51 株,检出率为 3.18%,包括含磺胺类耐药基因 35 株、含四环素耐药基因 36 株、含喹诺酮耐药基因 17 株、含多粘菌素耐药基因 2 株;51 株耐药菌归于 7 个菌属,其中气单胞菌属(*Aeromonas* sp.) 43 株,占比 84.31%,枸橼酸杆菌属(*Citrobacter* sp.)和希瓦氏菌属(*Shewanella* sp.)各 2 株,埃希氏菌属(*Escherichia* sp.)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus* sp.)、*Thalassobius* sp. 及 *Amphritea* sp. 各 1 株;上述 2 株非常见分离株不统计在内,常见的 49 株均对四环素耐药,41 株对多粘菌素耐药,对磺胺类和喹诺酮类耐药的分离株均为 34 株;同时,发现 23 株对 4 类抗生素均产生耐药,16 株对多达 3 种抗生素耐药,多重耐药现象普遍存在。同时,鉴定出 *MCR-3* 阳性的条件致病菌维氏气单胞菌和豚鼠气单胞菌各 1 株。综上,温州市近海水域中含有常见耐药基因的耐药分离株检出率较低,但同一耐药基因的细菌分布多样,对磺胺类、四环素类、喹诺酮类及多粘菌素类等 4 类抗生素表现出较强的耐药性,多重耐药现象明显。研究结果将为评估温州近海水域的细菌耐药性风险,规范抗生素的使用提供科学依据。

关键词 东海温州水域; 耐药基因; 多重耐药; *MCR-3*

中图分类号 X172; Q789; S931.3 **doi:** 10.11693/hyh20210200040

由于抗生素的常年使用,未代谢的抗生素在环境中积累和转化,对环境中的微生物进行持续不断的选择,造成耐药基因与耐药菌的流行,对公共卫生与生态环境造成了巨大的威胁(Arias *et al.*, 2009;

Kennedy, 2013; Willyard, 2017)。海洋作为地球上耐药基因与耐药菌的主要储存库之一,不但自身拥有丰富的耐药基因与耐药菌,其他来源的耐药菌与耐药基因还可能通过雨水冲刷、潮汐、污水排放等方式进

* 浙江省重点研发计划, 2021C02059 号; 农产品质量安全危害因子与风险防控国家重点实验室自主设计课题, 2010DS700124-ZZ2008 号; 农产品质量安全危害因子与风险防控国家重点实验室 2020 开放基金项目, KF20200105 号; 浙江省近岸水域生物资源开发与保护重点实验室开放基金, J2018004 号。金磊, E-mail: jinjinglei321@163.com

① 通信作者: 陈炯, 研究员, 博士生导师, E-mail: jchen1975@163.com, chenjiong@nbu.edu.cn; 周前进, 副教授, 硕士生导师, E-mail: mumu2325@163.com

收稿日期: 2021-02-06, 收修改稿日期: 2021-03-31

入海洋环境(Chen *et al.*, 2013; Hatosy *et al.*, 2015)。近海水域作为人类活动的主要区域之一,来自于畜牧与水产养殖、临床医疗、工业生产活动的抗生素残留、耐药菌、耐药基因等污染物可通过一系列方式传入其中,增加近海水域中耐药基因与耐药菌的种类与丰度,对海洋生态环境造成危害。此外,耐药基因还可能通过菌种之间的遗传物质传递从而传入海洋致病菌中,增加了海洋耐药病原菌病害发生与流行的可能性(Normark *et al.*, 2002)。

温州海域面积约 11 000 km², 海岸线长 355 km, 拥有 436 个岛屿, 是我国重要的海水养殖区, 做好温州近海水域耐药基因的监控与评估, 对温州海水养殖环境及公共卫生健康均有重要的意义。针对温州地区陆地环境中耐药基因的流行情况, 有学者进行过一定的调查分析。严春等(2016)从医院重症监护室中分离到携带有 *SHV*、*TEM*、*CTX-M-9* 等超广谱 β -内酰胺酶基因的肺炎克雷伯菌; Liao 等(2020)从病患体内分离的大肠杆菌中检测到多粘菌素耐药基因 *MCR-I*; Lu 等(2017)则通过荧光定量 PCR 方法从猪粪中检测到磺胺类、四环素类、喹诺酮类抗生素的耐药基因及多种 β -内酰胺酶基因。同时, 也有个别学者对温州海洋水体环境和海产品中耐药基因的分布情况做过调查。Chen 等(2017)调查发现温州海水养殖水域有着较高的磺胺类抗生素残留, 利用荧光定量 PCR 方法检测到较高丰度 *Sul2* 基因污染; 吴越等(2020)对

温州水产品上分离的哈维氏弧菌进行耐药分析, 从中检测到了磺胺类抗生素耐药基因 *Sul1* 和 *Sul2*, 四环素耐药基因 *Tet34*、*Tet35* 及 *Tet36*, 喹诺酮类耐药基因 *QnrD* 等, 且多数菌株出现多重耐药现象。本研究通过抗性平板法于温州近海水域海水中分别筛选了磺胺类、四环素类、喹诺酮类抗生素抗性的可培养耐药菌分离株, 通过 PCR 方法检测耐药菌对应的耐药基因携带情况, 在含有目标耐药基因的耐药菌分离株中进一步测试多粘菌素耐药基因的污染情况, 综合分析四类抗生素耐药基因在温州近海水域的分布; 利用 16S rDNA 测序, 鉴定耐药菌分离株的种属特性, 分析耐药基因在不同种属细菌中的分布; 同时, 通过微量二倍稀释法测定耐药菌对受试抗生素的最小抑菌浓度(Minimal Inhibit Concentration, MIC), 分析其多重耐药现象, 研究将为评估温州近海水域的细菌耐药性风险, 规范抗生素的使用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

于 2019—2020 年冬、春两季, 沿东海温州近海水域, 选择 25 个采样点进行海水样品的采集(表 1)。每个采样地点以采水器采集表层海水样品(采样深度: 水面下 15 cm) 1 500 mL 置于 2.5 L 的无菌聚乙烯扁方桶中。采集的海水样品在 16—20 °C 下运输并贮存, 用于后续的实验室分析。

表 1 温州近海水域海水样品的采样点
Tab.1 Location of seawater sampling sites off Wenzhou City

样品采集地点	温州市区		乐清市	平阳县	苍南县	小计
	龙湾区	洞头区				
采样点数量	1	5	12	2	5	25

1.2 耐药分离株培养

每份样品, 分别取 500 mL 海水样品, 经过 0.22 μ m 的无菌混合纤维素滤膜(生工生物工程(上海)股份有限公司, 中国)过滤以收集细菌。在无菌条件下将滤膜剪碎, 放置于 10 mL 的无菌磷酸缓冲盐溶液(Phosphate Buffer Saline, PBS)中, 经涡旋振荡器充分震荡后, 吸取 50 μ L 分别涂布于含有不同种类抗生素(磺胺类: 4 μ g/mL 甲氧苄啶; 四环素类: 16 μ g/mL 四环素; 喹诺酮类: 1 μ g/mL 环丙沙星)的 2216E 琼脂(青岛海博生物技术有限公司, 中国)平板上, 并置于 28 °C 下培养 16 h。根据菌落的形态、颜色、大小等形态学特征于每个平板上差异挑选一定数量的单菌

落分别接种至 2216E 液体培养基(青岛海博生物技术有限公司, 中国)中过夜培养。由于某些细菌生长较为缓慢, 此后每隔 12 h 进行菌株的补筛。耐药分离株使用终浓度 25%的甘油保存于-80 °C 用于后续实验。

1.3 目标耐药基因与 16S rDNA 的分子鉴定

针对上述 3 类抗生素, 我们分别选择了在海洋环境中较为普遍的耐药基因, 对收集到的耐药分离株进行耐药基因的鉴定(表 2), 然后对耐药基因阳性的耐药分离株进行其他两类抗生素耐药基因的鉴定。在前期实验中, 无法利用抗性平板从多粘菌素耐药的分离株鉴定到耐药基因 *MCR*, 而文献报道携带 *MCR* 基因的多重耐药质粒的水平传播是引起 *MCR* 基因流

表 2 本研究所用引物
Tab.2 Primers used in this study

引物名称	引物序列(5'—3')	靶标基因	产物长度(bp)	退火温度(°C)	耐药类型	参考文献
sul1-F	CGGCGTGGGCTACCTGAACG	Sul1	433			
sul1-R	GCCGATCGCGTGAAGTTCCG					
sul2-F	GCGCTCAAGGCAGATGGCATT	Sul2	293		磺胺类抗生素	Hoa <i>et al</i> , 2008
sul2-R	GCGTTTGATAACCGGCACCCGT					
sul3-F	TCAAAGCAAAATGATATGAGC	Sul3	787			
sul3-R	TTTCAAGGCATCTGATAAAGAC					
tet(A)-F	GCTACATCCTGCTTGCC TTC	TetA	210			
tet(A)-R	CATAGATCGCCGTGAAGAGG					
tet(B)-F	TTGGTTAGGGGCAAGTTTTG	TetB	659			
tet(B)-R	GTAATGGGCCAATAACACCG					
tet(C)-F	CTTGAGAGCCTTCAACCCAG	TetC	418	55		
tet(C)-R	ATGGTCGTCATCTACCTGCC					
tet(D)-F	AAACCATTACGGCATTCTGC	TetD	787			
tet(D)-R	GACCGGATACACCATCCATC					
tet(E)-F	AAACCACATCCTCCATACGC	TetE	278		四环素类抗生素	Aminov <i>et al</i> , 2001; Ng <i>et al</i> , 2001
tet(E)-R	AAATAGGCCACAACCGTCAG					
tet(G)-F	GCTCGGTGGTATCTCTGCTC	TetG	468			
tet(G)-R	AGCAACAGAATCGGGAACAC					
tet(L)-F	TCGTTAGCGTGCTGTCATTC	TetL	844			
tet(L)-R	GTATCCCACCAATGTAGCCG					
tet(M)a-F	GTGGACAAAGGTACAACGAG	TetMa	406			
tet(M)a-R	CGGTAAAGTTCGTCACACAC					
tet(W)-F	GAGAGCCTGCTATATGCCAGC	TetW	168	64		
tet(W)-R	GGGCGTATCCACAATGTTAAC					
qnrA-F	TGCCAACTGCTTTGGCATAGA	QnrA	153			
qnrA-R	TGGCCACTCAAGTTGGTATAGG					
qnrB-F	CTTCACACATTGCGATCTGAC	QnrB	100			
qnrB-R	CAACGATGCCTGGTAGTTGT					
qnrC-F	TGCAGACCTACGAGATGCTT	QnrC	95			
qnrC-R	CGCATTCTCTCAATTCAAGG					
qnrD-F	AAGTGCGAACTGTGGGAAA	QnrD	112	60	喹诺酮类抗生素	Park <i>et al</i> , 2006; Rutgersson <i>et al</i> , 2014
qnrD-R	CAGCCAAAGACCAATCAAAC					
qnrS-F	GATATCGAAGGCTGCCACTT	QnrS	115			
qnrS-R	CACGGAACCTCTATACCGTAGCA					
qnrVC-F	GCTCAAACCTCCGAGATACAC	QnrVC	99			
qnrVC-R	AAGCATCTCGAAGATCAGCAT					
aac(6')-Ib-cr-F	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	aac(6')-Ib-cr	482	55		
aac(6')-Ib-cr-R	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT					
MCR-1-F	AGTCCGTTTGTTCTTGTTGGC	MCR-1	320			
MCR-1-R	AGATCCTTGGTCTCGGCTTG					
MCR-2-F	CAAGTGTGTTGGTCGCAGTT	MCR-2	715	58	多粘菌素类抗生素	Borowiak <i>et al</i> , 2020; Rebelo <i>et al</i> , 2018
MCR-2-R	TCTAGCCCGACAAGCATACC					
MCR-3-F	AAATAAAAAATTGTTCCGCTTATG	MCR-3	929			
MCR-3-R	AATGGAGATCCCCGTTTTT					

续表

引物名称	引物序列(5'—3')	靶标基因	产物长度(bp)	退火温度(°C)	耐药类型	参考文献
MCR-4-F	TCACTTTCATCACTGCGTTG	MCR-4	1 116	55		
MCR-4-R	TTGGTCCATGACTACCAATG					
MCR-5-F	ATGCGGTTGTCTGCATTATC	MCR-5	1 644			
MCR-5-R	TCATTGTGGTTGTCCTTTTCTG					
MCR-6-F	AGCTATGTCAATCCCCTGAT	MCR-6	252			
MCR-6-R	ATTGGCTAGGTTGTCAATC					
MCR-7-F	GCCCTTCTTTTCGTTGTT	MCR-7	551			
MCR-7-R	GGTTGGTCTCTTTCTCGT					
MCR-8-F	TCAACAATTCTACAAAGCGTG	MCR-8	856			
MCR-8-R	AATGCTGCGCGAATGAAG					
MCR-9-F	TTCCCTTTGTTCTGGTTG	MCR-9	1 011			
MCR-9-R	GCAGGTAATAAGTCGGTC					
16S-27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	16S rDNA	约 1 400 bp	52		Lane, 1991
16S-1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT					

行的主要原因(Sun *et al*, 2018), 因此, 我们对磺胺类、四环素类和喹诺酮类耐药基因阳性的耐药分离株进行 *MCR* 基因的测定, 以期能够获得多粘菌素类抗生素耐药基因的流行情况。耐药基因阳性的耐药分离株通过 16S rDNA 序列测定进一步确定其种属, 引物信息见表 2。鉴定过程的操作简述如下: 将步骤 1.2 中冻存的耐药分离株复苏后, 使用煮沸法粗提细菌的基因组 DNA。利用 PCR 方法, 按照文献提供的方法克隆耐药分离株的对应耐药基因片段(Lane, 1991; Aminov *et al*, 2001; Ng *et al*, 2001; Park *et al*, 2006; Hoa *et al*, 2008; Rutgersson *et al*, 2014; Rebelo *et al*, 2018; Borowiak *et al*, 2020)。PCR 产物经过 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测后送至上海生工生物工程有限公司测序, 测序结果上传至 NCBI 的 BLAST 检索系统进行同源性对比分析。对含有目标耐药基因的耐药分离株, 按照文献方法扩增 16S rDNA 基因序列, PCR 产物经上述方法鉴定后送至上海生工生物工程有限公司进行测序, 结果同样上传至 NCBI 的 BLAST 检索系统进行同源性对比分析。

1.4 药物敏感性实验

对含有目标耐药基因的耐药分离株进行药物敏感性实验。药物敏感性实验采用微量二倍稀释法, 参照美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)的标准判断耐药分离株的药物敏感性, 以大肠杆菌(*Escherichia coli*) ATCC25922 作为质控菌株。在选择目标耐药基因所对应的抗生素时, 磺胺类抗生素选用甲氧苄啶, 四环素类抗生素选用四环素, 喹诺酮类抗生素选用环丙沙星, 多粘菌素

类抗生素选用多粘菌素 E。同时, 在 96 孔板上设置无药无菌的阴性对照与无药有菌的阳性对照。于每个孔中加入上述稀释至 1×10^4 cfu/mL 的菌液 5 μ L, 置于 28 $^{\circ}$ C 培养箱中静置 16—24 h 后, 取出 96 孔板置于酶标仪上测定 A_{600} 的吸光度值(optical density, OD)。在阳性对照生长良好, 阴性对照未有无污染时, 以 OD 值判断能够抑制细菌生长的最低药物浓度作为该菌株的最小抑菌浓度。同时根据文献对于多重耐药菌(multidrug-resistant organism, MDRO)的定义, 对含有目标耐药基因的耐药分离株进行多重耐药分析, 统计其多重耐药率(Magiorakos *et al*, 2012)。

2 实验结果

2.1 耐药分离株的分离鉴定

如表 3 所示, 从 25 个采样点的海水样品中共分离纯化获得耐药分离株 1 605 株, 通过分子鉴定, 共计 51 株耐药分离株检测出目标耐药基因, 占总耐药分离株数量的 3.18%。51 株耐药分离株中, 从平阳县邻近水域分离 29 株, 占该地区耐药分离株总数的 19.33%。其中 23 株检出 *Sul1*, 检出率为 15.33%; 21 株检出 *TetE*, 检出率为 14.00%; 1 株检出 *MCR-3*, 检出率为 0.67%; 4 株检出 *aac(6')-Ib-cr*, 6 株检出 *QnrS*, 检出率为 6.67%。苍南县邻近水域分离 20 株, 占该地区耐药分离株总数的 5.33%。其中 10 株检出 *Sul1*, 检出率为 2.6%; 15 株检出 *TetE*, 检出率为 4.00%; 1 株检出 *MCR-3*, 检出率为 0.27%; 7 株检出 *aac(6')-Ib-cr*, 检出率为 1.87%。乐清市邻近水域分离 2 株, 占该地区耐药分离株总数的 0.28%, 2 株均检测出 *Sul2*, 检出率为 0.28%。

表 3 不同来源样品耐药分离株的分离鉴定结果
Tab.3 Identification of antibiotic resistant bacterial isolates from 25 sampling sites

项目	温州市区		乐清市	平阳县	苍南县	总计
	龙湾区	洞头区				
合计	60	300	720	150	375	1 605
含有耐药基因的耐药分离株数目			2	29	20	51
占比(%)			0.28	19.33	5.33	3.18
磺胺类耐药基因			<i>Sul2</i> (2)	<i>Sul1</i> (23)	<i>Sul1</i> (10)	35
四环素类耐药基因				<i>TetE</i> (21)	<i>TetE</i> (15)	36
多粘菌素类耐药基因				<i>MCR-3</i> (1)	<i>MCR-3</i> (1)	2
喹诺酮类耐药基因				<i>aac(6')-Ib-cr</i> (4), <i>QnrS</i> (6)	<i>aac(6')-Ib-cr</i> (7)	17

2.2 目标耐药基因及目标耐药基因阳性耐药分离株的分子鉴定

利用平板法, 51 株含有目标耐药基因的耐药分离株中, 磺胺类耐药基因检测到 *Sul1* 和 *Sul2*, 其中 *Sul1* 检出 33 株, 占比 68.63%, *Sul2* 检出 2 株, 占比 3.92%;

四环素类耐药基因检测到 *TetE*, 共计 36 株, 占比 70.56%; 多粘菌素类耐药基因检测到 *MCR-3*, 共 2 株, 占比 3.92%; 喹诺酮类耐药基因检测出 *aac(6')-Ib-cr* 和 *QnrS*, 其中 *aac(6')-Ib-cr* 检出 10 株, 占比 19.61%, *QnrS* 检出 6 株, 占比 11.76%。具体如表 4 所示。

表 4 51 株含有目标耐药基因的耐药分离株的耐药基因鉴定结果
Tab.4 Molecular identification of resistant genes from 51 antibiotic resistant isolates

含有目标耐药基因的耐药分离株种类	分离株数目	磺胺类耐药基因		四环素类耐药基因		多粘菌素耐药基因		喹诺酮类耐药基因	
		株数	占比(%)	株数	占比(%)	株数	占比(%)	株数	占比(%)
维氏气单胞菌 (<i>Aeromonas veronii</i>)	1	<i>Sul1</i> (1)	1.96	<i>TetE</i> (1)	1.96	<i>MCR-3</i> (1)	1.96	<i>aac(6')-Ib-cr</i> (1)	1.96
豚鼠气单胞菌 (<i>Aeromonas caviae</i>)	9	<i>Sul1</i> (9)	17.65	<i>TetE</i> (6)	11.76	<i>MCR-3</i> (1)	1.96	<i>aac(6')-Ib-cr</i> (2)	3.92
嗜水气单胞菌 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	2	<i>Sul1</i> (2)	3.92					<i>aac(6')-Ib-cr</i> (1)	
中间气单胞菌 (<i>Aeromonas media</i>)	10	<i>Sul1</i> (7)	13.73	<i>TetE</i> (9)	17.65			<i>aac(6')-Ib-cr</i> (3), <i>QnrS</i> (1)	7.84
杀鲑气单胞菌 (<i>Aeromonas salmonicida</i>)	1	<i>Sul1</i> (1)	1.96	<i>TetE</i> (1)	1.96			<i>aac(6')-Ib-cr</i> (1)	1.96
不确定种气单胞菌属 (<i>Aeromonas</i> sp.)	20	<i>Sul1</i> (8)	15.69	<i>TetE</i> (16)	31.37			<i>aac(6')-Ib-cr</i> (3), <i>QnrS</i> (5)	15.69
大肠杆菌(<i>Escherichia coli</i>)	1	<i>Sul1</i> (1)	1.96						
希瓦氏菌属(<i>Shewanella</i> sp.)	2	<i>Sul1</i> (2)	3.92	<i>TetE</i> (2)	3.92				
弗氏柠檬酸杆菌 (<i>Citrobacter freundii</i>)	2	<i>Sul1</i> (2)	3.92						
<i>Thalassobius</i> sp.	1	<i>Sul2</i> (1)	1.96						
大西洋美女神菌 (<i>Amphritea atlantica</i>)	1	<i>Sul2</i> (1)	1.96						
类芽孢杆菌属 (<i>Paenibacillus</i> sp.)	1			<i>TetE</i> (1)	1.96				
总计	51	<i>Sul1</i> (33), <i>Sul2</i> (2)	68.63	<i>TetE</i> (36)	70.56	<i>MCR-3</i> (2)	3.92	<i>aac(6')-Ib-cr</i> (11), <i>QnrS</i> (6)	31.37

51 株含有目标耐药基因的耐药分离株, 通过 16S rDNA 序列分析鉴定为 7 个不同属, 分别为气单胞菌属(*Aeromonas* sp.)、埃希氏菌属(*Escherichia* sp.)、希瓦氏菌属(*Shewanella* sp.)、枸橼酸杆菌属(*Citrobacter* sp.)、*Thalassobius* sp.、*Amphritea* sp.、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus* sp.)。其中, 气单胞菌属共计 43 株, 占比 84.32%, 包括维氏气单胞菌 1 株, 占比 1.96%, 豚鼠气单胞菌 9 株, 占比 17.65%, 嗜水气单胞菌 2 株, 占比 3.92%, 中间气单胞菌 10 株, 占比 19.61%, 杀鲑气单胞菌 1 株, 占比 1.96%, 不确定种的气单胞菌属细菌 20 株, 占比 39.22%; 希瓦氏菌属 2 株, 占比 3.92%; 埃希氏菌属 1 株, 为大肠杆菌, 占比 1.96%;

枸橼酸杆菌属 2 株, 为弗氏柠檬酸杆菌, 占比 3.92%; *Thalassobius* sp. 和类芽孢杆菌属各有 1 株, 占比为 3.92%; *Amphritea* sp. 属的大西洋美女神菌 1 株, 占比 1.96%。耐药基因主要分布于气单胞菌属细菌中(图 1, 表 4)。此外, 对 51 株耐药分离株进一步分析发现 2 株中间气单胞菌, 1 株杀鲑气单胞菌和 2 株其他不确定种的气单胞菌中同时检出 *Sul1*、*TetE* 与 *aac(6')-Ib-cr*, 1 株维氏气单胞菌和 1 株豚鼠气单胞菌中同时检出 *Sul1*、*TetE*、*MCR-3* 与 *aac(6')-Ib-cr* (图 1, 表 4)。具体如表 4 所示。从区域上归类, 可以发现上述 51 株耐药分离株中, 苍南县邻近水域 20 株, 平阳县邻近水域 29 株, 乐清市邻近水域 2 株, 温州其他县区邻近水域未检出目标耐药基因阳性的耐药分离株(表 5)。

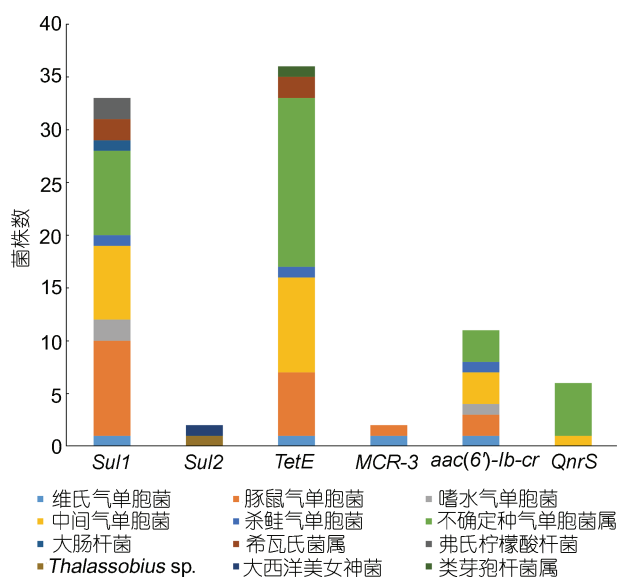


图 1 51 株耐药分离株耐药基因的分布

Fig.1 Distribution of target antibiotic resistance genes in 51 antibiotic resistant isolates

注: 横坐标代表不同种类的耐药基因, 纵坐标代表含有该耐药基因的耐药分离株数, 柱状图中不同颜色的色块表示不同种属的耐药分离株, 高度代表耐药分离株数目

2.3 药物敏感性测定结果

尽管在使用相应浓度的抗生素测试时, *Thalassobius* sp. 分离株和大西洋美女神菌仍旧表现出耐药性, 但是由于在 CLSI 的标准中没有这 2 株分离株的耐药标准, 故相关数据计算时, 未列入其中。49 株含有目标耐药基因的耐药分离株对 4 种抗生素的药物敏感性试验结果如图 2 和表 6 所示: 仅对 1 种抗生素耐药的分离株有 2 株, 占比 4.08%, 对 2 种抗生素耐药的分离株有 8 株, 占比 16.33%, 对 3 种抗生素耐药的分离株有 16 株, 占比 32.65%, 对 4 种抗生素耐药的分离

株有 23 株, 占比 46.94%。其中, 苍南县邻近水域有 10 株, 占本地区分离总数的 50.00%, 平阳县邻近水域有 13 株, 占本地区分离株总数的 48.82% (表 6)。49 株耐药分离株均对四环素耐药, 41 株耐药分离株对多粘菌素 E 耐药, 占比 83.67%; 34 株耐药分离株对环丙沙星耐药, 占比 69.39%; 34 株耐药分离株对甲氧苄啶耐药, 占比 69.39%。多数条件致病菌(如豚鼠气单胞菌、维氏气单胞菌、中间气单胞菌、杀鲑气单胞菌、嗜水气单胞菌、大肠杆菌等)对 3 类以上抗生素具有较高的 MIC 值(环丙沙星 MIC>1 $\mu\text{g/mL}$; 多粘菌素 E 的 MIC>8 $\mu\text{g/mL}$; 四环素 MIC>16 $\mu\text{g/mL}$; 甲氧苄啶 MIC>64 $\mu\text{g/mL}$) (图 3), 不同来源的耐药分离株在四种抗生素的 MIC 分布上未见显著差别(图 4)。

3 讨论

耐药基因和耐药菌能够经由多种途径进入近海水体, 扩散传播, 给海洋生态环境和公共卫生带来巨大威胁(Normark *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2013)。本文初步分析了东海温州近海水域可培养细菌中磺胺类、四环素类、喹诺酮类和多粘菌素类耐药基因的流行情况。研究通过抗性平板法筛选了耐药分离株 1605 株, 获得含目标耐药基因的 51 株, 分属于气单胞菌属等 7 个属, 分别携带有耐药基因 *Sul1*、*Sul2*、*TetE*、*MCR-3*、*aac(6')-Ib-cr* 以及 *QnrS* 等, 其中 39 株存在多重耐药现象; 此外, 研究还分离获得了携带多粘菌素耐药基因 *MCR-3* 的条件致病菌维氏气单胞菌和豚鼠气单胞菌各 1 株, 表明多粘菌素的耐药基因在海洋水体中有流行。

上述 51 株含目标耐药基因的耐药菌集中发现于平阳县和苍南县邻近水域(分别是 29、20 株), 乐清市邻近水域有少量发现(2 株), 表明尽管温州地区近海水域整体耐药基因流行水平低(含有目标耐药基因的耐药菌占比仅为 3.18%), 但相对于温州其他海域, 平阳县与苍南县邻近海域耐药基因流行情况要更为突出。据温州市统计局的资料, 平阳县海水养殖规模很小, 畜牧业不发达, 其近海水域与西湾风景区相邻, 景区较高的人流量与景区内部小而分散的社区医院可能是其耐药基因与耐药菌的重要来源; 苍南县是温州海水与畜牧养殖的主要县市之一, 本研究苍南邻近水域的采样点位于河口附近, 上游的养殖排放物容易在此沉积, 一定规模的养殖和特殊的地理环境可能是苍南县采样点耐药基因流行的重要原因。

表 5 含有目标耐药基因的耐药分离株的 16S rDNA 鉴定结果
Tab.5 16S rDNA sequencing of 51 antibiotic resistant isolates

含有目标耐药基因的耐药分离株种属	乐清市		平阳县		苍南县		小计	
	株数	占比(%)	株数	占比(%)	株数	占比(%)	株数	占比(%)
维氏气单胞菌(<i>Aeromonas veronii</i>)			1	3.45			1	1.96
豚鼠气单胞菌(<i>Aeromonas caviae</i>)			7	24.14	2	10.00	9	17.65
嗜水气单胞菌(<i>Aeromonas hydrophila</i>)			1	3.45	1	5.00	2	3.92
中间气单胞菌(<i>Aeromonas media</i>)			7	24.14	3	15.00	10	19.61
杀鲑气单胞菌(<i>Aeromonas salmonicida</i>)					1	5.00	1	1.96
不确定种气单胞菌属(<i>Aeromonas</i> sp.)			9	31.03	11	55.00	20	39.22
大肠杆菌(<i>Escherichia coli</i>)			1	3.45			1	1.96
希瓦氏菌属(<i>Shewanella</i> sp.)			1	3.45	1	5.00	2	3.92
弗氏柠檬酸杆菌(<i>Citrobacter freundii</i>)			2	6.90			2	3.92
<i>Thalassobius</i> sp.	1	50					1	1.96
大西洋美女神菌(<i>Amphritea atlantica</i>)	1	50					1	1.96
类芽孢杆菌属(<i>Paenibacillus</i> sp.)					1	5.00	1	1.96
合计	2	100.00	29	100.00	20	100.00	51	100.00

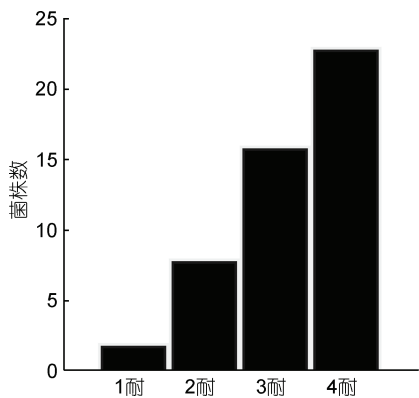


图 2 含有目标基因的耐药分离株的多重耐药分析结果
Fig.2 Analysis of multi-resistant of antibiotic resistant isolates containing target antibiotic resistance genes
注: 1 耐: 对一种抗生素有耐药性; 2 耐: 对两种抗生素有耐药性; 3 耐: 对三种抗生素有耐药性; 4 耐: 对四种抗生素有耐药性

已有研究发现, 海水环境中存在多种四环素类耐药基因(包括 *TetA*、*TetB*、*TetC*、*TetD*、*TetE*、*TetM* 等), 耐药基因的分布差异与地理环境及细菌耐药性的进化有关(Kim *et al*, 2004; Balassiano *et al*, 2007; Nikolakopoulou *et al*, 2008)。国内海水样品与水产品源细菌中检出的四环素耐药基因类型多为 *TetA*、*TetB* 等(赵敏等, 2014; 王钥等, 2015), 国外发现从食品中分离的气单胞菌和养殖海水与底泥中能大量检出 *TetE* (Balassiano *et al*, 2007; Tamminen *et al*, 2011)。本研究从其他 1605 株耐药分离株中检测出含有 *TetE* 的耐药分离株 36 株, 耐药基因检出率上低于国内已有报道(王钥等, 2015; 吴越等, 2020)。耐药基因 *Sul1*、*Sul2* 和 *Sul3* 是介导磺胺类抗生素耐药的主要原因之一(Hoa *et al*, 2008)其中, *Sul1* 与 *Sul2* 是国内养殖海水与水产品中主要流行的磺胺类耐药基因, *Sul1* 的流行

与耐药基因在细菌间的转移有关(马辰婕等, 2017; 汪涛等, 2017; 吴越等, 2020)。本研究中检测到的磺胺类耐药基因以 *Sul1* 为主(平阳县 23 株, 苍南县 10 株), 有少量的 *Sul2* (乐清市 2 株), 未检测到 *Sul3* 基因, 在耐药基因类型上与已有报道一致, 但是耐药基因的检出率低于已有报道(黄志坚等, 2012; 吴越等, 2020)。上述结果表明温州近海水域中磺胺类与四环素类耐药基因流行情况并不严重, 但集中出现在平阳和苍南两个近海区域。喹诺酮类抗生素的耐药情况在不同种属与不同来源的细菌中差异较大。本研究从平阳县临近水域检测到含有喹诺酮类耐药基因的耐药分离株 11 株, 苍南县临近水域 7 株, 低于已有报道, 可能与不同的药物使用策略有关(Zhao *et al*, 2012; 张舒婷等, 2019; 赵姝等, 2019)。喹诺酮类耐药基因 *QnrS* 与 *aac(6')-Ib-cr* 均能够介导较低水平的喹诺酮类药物耐药, 但是携带 *QnrS* 会提高细菌染色体自发突变的频率, 从而导致高水平的喹诺酮类耐药细菌的产生(Martínez *et al*, 1998), 而 *aac(6')-Ib-cr* 同时具有氨基糖苷类与喹诺酮类耐药活性, 增加了细菌在抗菌药物选择下的适应能力, 说明在药物使用策略上要减少喹诺酮类药物的使用并且避免与氨基糖苷类药物的联用, 防止高水平喹诺酮类药物耐药菌的出现和 *aac(6')-Ib-cr* 基因的流行。另外, 多重耐药质粒和携带多种耐药基因的整合子是导致细菌多重耐药的主要原因(马辰婕等, 2017; Sun *et al*, 2018)。本研究于平阳和苍南邻近水域筛选出至少含有 3 类耐药基因的多重耐药分离株 39 株(占比达 79.59%), 暗示该区域的多种耐药基因可能集中在整合子或质粒等载体上传播, 提升细菌对多种抗生素的耐药能力。

表 6 51 株含有目标耐药基因的耐药分离株对 4 种抗生素药物的 MIC 值
Tab.6 MIC value of 51 antibiotic resistant isolates containing target antibiotic resistance genes

编号	来源地	MIC ($\mu\text{g/mL}$)			
		环丙沙星	多粘菌素 E	四环素	甲氧苄啶
Y-1	苍南县	0.500	16.000	64.000	128.000
Y-2		0.500	16.000	128.000	128.000
Y-3		0.500	8.000	64.000	256.000
Y-4		4.000	8.000	128.000	128.000
Y-5		4.000	16.000	128.000	64.000
Y-6		0.500	16.000	128.000	128.000
Y-7		0.500	16.000	32.000	16.000
Y-8		1.000	8.000	64.000	<1.000
Y-9		0.250	4.000	128.000	64.000
Y-10		2.000	4.000	64.000	128.000
Y-11		8.000	64.000	64.000	64.000
Y-12		64.000	16.000	64.000	128.000
Y-13		16.000	16.000	64.000	256.000
Y-14		64.000	8.000	64.000	128.000
Y-15		8.000	16.000	128.000	256.000
Y-16		2.000	16.000	32.000	256.000
Y-17		4.000	16.000	128.000	128.000
Y-18		4.000	16.000	64.000	>512.000
Y-19		8.000	16.000	256.000	256.000
Y-20		2.000	8.000	128.000	128.000
Q-1	平阳县	<0.125	32.000	32.000	64.000
Q-2		1.000	16.000	128.000	128.000
Q-3		2.000	4.000	64.000	128.000
Q-4		64.000	4.000	32.000	64.000
Q-5		2.000	32.000	64.000	512.000
Q-6		1.000	8.000	32.000	64.000
Q-7		4.000	2.000	128.000	256.000
Q-8		2.000	2.000	32.000	<1.000
Q-9		0.250	16.000	128.000	128.000
Q-10		<0.125	8.000	128.000	64.000
Q-11		2.000	8.000	128.000	>512.000
Q-12		2.000	4.000	64.000	256.000
Q-13		32.000	8.000	64.000	256.000
Q-14		64.000	16.000	32.000	256.000
Q-15		1.000	2.000	32.000	64.000
Q-16		4.000	16.000	128.000	256.000
Q-17		16.000	16.000	128.000	128.000
Q-18		16.000	8.000	32.000	256.000
Q-19		>64.000	16.000	32.000	64.000

续表

编号	来源地	MIC($\mu\text{g/mL}$)			
		环丙沙星	多粘菌素 E	四环素	甲氧苄啶
Q-20	乐清市	0.250	16.000	16.000	256.000
Q-21		4.000	16.000	128.000	256.000
Q-22		2.000	16.000	128.000	256.000
Q-23		16.000	16.000	128.000	128.000
Q-24		>64.000	16.000	128.000	256.000
Q-25		>64.000	32.000	128.000	64.000
Q-26		>64.000	16.000	128.000	256.000
Q-27		8.000	16.000	512.000	128.000
X-1		0.500	16.000	32.000	<1.000
X-2		2.000	32.000	64.000	16.000
100-10	乐清市	64.000	128.000	128.000	256.000
95-10		0.500	64.000	32.000	128.000
占比		69.39%	83.67%	100.00%	69.39%

注: 统计时, 排除了 1 株 *Thalassobius* 与 1 株大西洋美女神菌(*Amphritea atlantica*)

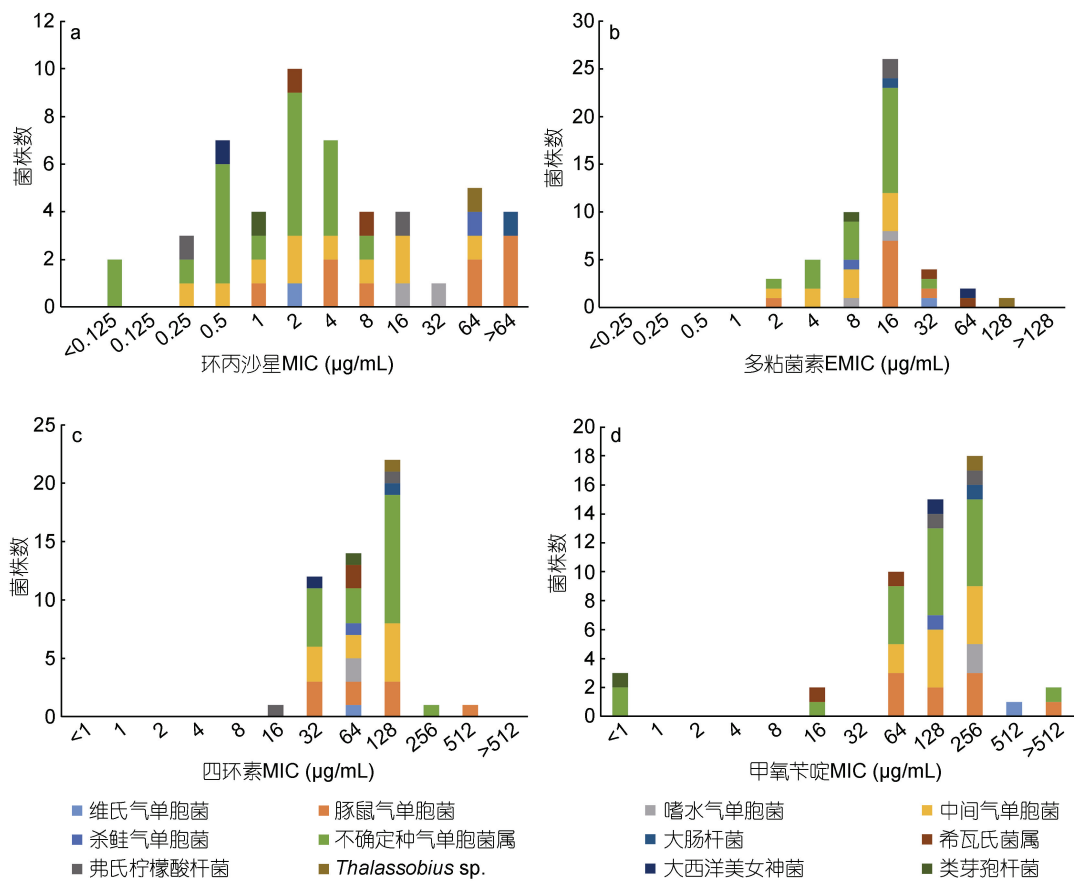


图 3 51 株耐药分离株的四种抗生素的 MIC 分布

Fig.3 MIC distribution of the 51 antibiotic resistant isolates

注: 51 株不同种属的耐药分离株对: 环丙沙星(a)、多粘菌素 E(b)、四环素(c)、甲氧苄啶(d)的 MIC 分布。横坐标代表耐药分离株对该种抗生素的 MIC 值, 纵坐标代表耐药分离株的数目, 柱状图中不同颜色的色块表示不同种属的耐药分离株, 其高度代表耐药分离株数目

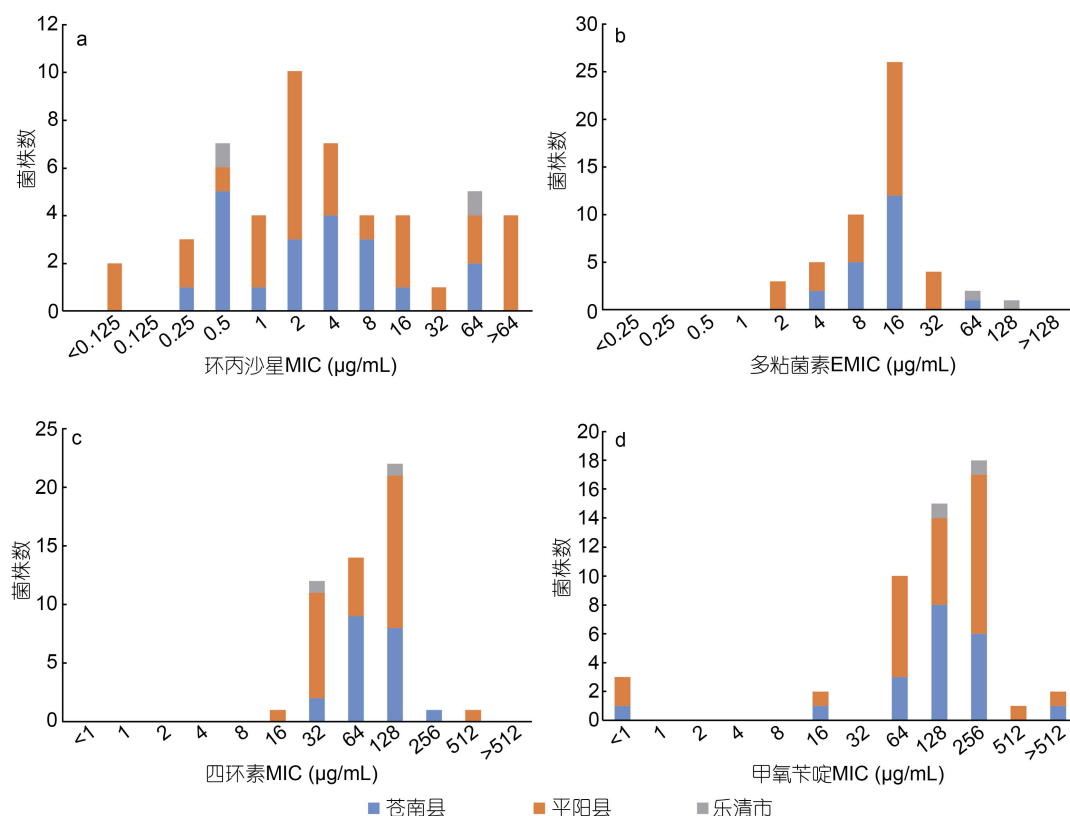


图 4 不同采样地点的耐药分离株的四种抗生素 MIC 分布差异分析

Fig.4 MIC distribution of the antibiotic resistant isolates isolated from different sampling locations

注: 来自苍南县、平阳县及乐清市的耐药分离株对: 环丙沙星(a)、多粘菌素 E(b)、四环素(c)、甲氧苄啶(d)的 MIC 分布差异。横坐标代表耐药分离株对该种抗生素的 MIC 值, 纵坐标代表耐药分离株的数目, 柱状图中不同颜色的色块表示不同来源的耐药分离株, 其高度代表耐药分离株数目

水产养殖中通常很少使用多粘菌素类药物, 部分资料表明水产中通常只有弧菌具有较高的多粘菌素耐药性(刘开放等, 2017; 张西萌等, 2020)。质粒介导的可移动的多粘菌素耐药基因 *MCR-1* 至 *MCR-10* 等是目前认为介导多粘菌素耐药的主要因素之一, 使得多粘菌素的使用受到极大限制(Sun *et al*, 2018; Borowiak *et al*, 2020)。海洋水体中 *MCR* 系列基因的报道相对较少, *MCR-3* 与 *MCR-5* 在气单胞菌中有检测到(Eichhorn *et al*, 2018; Ma *et al*, 2018)。本研究在平阳邻近水域检出含有 *MCR-3* 的维氏气单胞菌, 在苍南邻近水域检出含有 *MCR-3* 的豚鼠气单胞菌, 尽管与国外水产动物分离的气单胞菌结论一致(Eichhorn *et al*, 2018), 整体检出率也较低, 但 *MCR-3* 的来源是值得关注的问题。有研究认为水体环境是 *MCR-3* 的主要传播途径, 气单胞菌属是其重要的储存库(Eichhorn *et al*, 2018)。因此, 本研究在温州近海水域的两种气单胞菌中检出 *MCR-3*, 可能是外源多粘菌素残留导致的定向选择结果。

我国近海海域或者水产养殖动物中分离的耐药菌一般以弧菌属与气单胞菌属为主(黄志坚等, 2012; Ye *et al*, 2013; Dong *et al*, 2019)。本研究发现温州近海水域分离的耐药菌以气单胞菌为主, 占比达到 84.31%, 未发现弧菌属细菌, 表明气单胞菌属细菌可能具有高效的耐药基因转移方式, 成为该地区耐药基因传播的重要途径。在气单胞菌属细菌中, 海洋水体和水产养殖中常以维氏气单胞菌和嗜水气单胞菌为主, 畜禽养殖中多为豚鼠气单胞菌(黄志坚等, 2012; 邓玉婷等, 2019; 刘小芳等, 2021)。本研究鉴定的 23 株条件致病性气单胞菌属细菌中, 包括中间气单胞菌 10 株、豚鼠气单胞菌 9 株、嗜水气单胞菌 2 株、杀鲑气单胞菌和维氏气单胞菌各 1 株。其中, 豚鼠气单胞菌检出的数量较多, 与先前的报道有所差异(黄志坚等, 2012; 邓玉婷等, 2019), 可能是外源性细菌输入的结果。气单胞菌普遍存在于近海水域和水生动物体内, 可以作为温州近海水域耐药基因流行情况监测的指标微生物, 为该地区抗生素的合理使用提供科学参考。

4 结论

本研究调查分析了 2019—2020 年期间东海温州近海水域磺胺类、四环素类、喹诺酮类以及多粘菌素类耐药基因和耐药菌的分布情况。对筛选获得的 51 株耐药基因阳性的耐药分离株分析发现, 对四类抗生素产生耐药的比例较高, 其中对四环素类抗生素的耐药比例最高, 达 100%。同时, 尽管含耐药基因的耐药分离株检出率较低, 但同一耐药基因的细菌种类丰富, 但又以气单胞菌属细菌为主, 占比 84.31%。多重耐药现象严重, 含 3 种及以上耐药基因的耐药菌占比 76.47%。另外, 获得了多粘菌素耐药基因 *MCR-3* 阳性的条件致病菌维氏气单胞菌和豚鼠气单胞菌各 1 株。上述系列研究结果将为评估温州近海水域的细菌耐药性风险, 规范抗生素的使用提供科学依据。

参 考 文 献

- 马辰婕, 吴小梅, 林 茂等, 2017. 水产养殖环境耐药细菌中复合 1 型整合子的流行特征. 微生物学通报, 44(9): 2089—2095
- 王 玥, 苏 洁, 明红霞等, 2015. 浴场海水中大肠杆菌耐药性及其耐药基因研究. 海洋学报, 37(12): 123—128
- 邓玉婷, 谭爱萍, 张瑞泉等, 2019. 广东主要水产养殖地区气单胞菌耐药状况的调查分析. 南方农业学报, 50(11): 2375—2383
- 刘小芳, 任 燕, 张德锋等, 2021. 鱼源气单胞菌的毒力基因检测、分型及致病力. 水产学报, 45(3): 462—471
- 刘开放, 步 君, 章 翔等, 2017. 华南地区海水养殖水域中哈维氏弧菌的抗药性分析. 海南大学学报自然科学版, 35(2): 131—139
- 严 春, 张 颖, 何 卫等, 2016. NICU 患儿肺炎克雷伯菌耐药基因携带和同源性分析. 中国卫生检验杂志, 26(18): 2637—2640, 2645
- 汪 涛, 杨再福, 陈勇航等, 2017. 磺胺类抗性基因的产生及演变研究进展. 环境污染与防治, 39(11): 1251—1255
- 吴 越, 郑伊诺, 陆荣茂等, 2020. 温州地区水产品中哈维氏弧菌的耐药分析. 水产科学, 39(6): 837—843
- 张西萌, 付溥博, 魏海燕等, 2020. 北京进出口水产品中 259 株霍乱弧菌分离株的耐药性研究. 食品安全质量检测学报, 11(14): 4901—4906
- 张舒婷, 陈赛赛, 2019. 青岛海水浴场多重耐药菌的分布特征研究. 生物技术通报, 35(4): 57—63
- 赵 姝, 李 健, 马立才等, 2019. 海水养殖动物源弧菌喹诺酮类药物耐药表型与基因型分析. 海洋渔业, 41(4): 463—471
- 赵 敏, 汪开毓, 王 均等, 2014. 斑点叉尾鲷源维氏气单胞菌对四环素类抗生素的耐药性及耐药基因的检测. 水生生物学报, 38(2): 386—392
- 黄志坚, 陈旭凌, 路晓峰等, 2012. 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. 中山大学学报(自然科学版), 51(6): 92—96
- Aminov R I, Garrigues-Jeanjean N, Mackie R I, 2001. Molecular

- ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. Applied and Environmental Microbiology, 67(1): 22—32
- Arias C A, Murray B E, 2009. Antibiotic-resistant bugs in the 21st century—a clinical super-challenge. The New England Journal of Medicine, 360(5): 439—443
- Balassiano I T, De Freire Bastos M D C, Madureira D J *et al*, 2007. The involvement of *tetA* and *tetE* tetracycline resistance genes in plasmid and chromosomal resistance of *Aeromonas* in Brazilian strains. Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz, 102(7): 861—866
- Borowiak M, Baumann B, Fischer J *et al*, 2020. Development of a novel *mcr-6* to *mcr-9* Multiplex PCR and Assessment of *mcr-1* to *mcr-9* Occurrence in Colistin-Resistant *Salmonella enterica* Isolates from Environment, Feed, Animals and Food (2011—2018) in Germany. Frontiers in Microbiology, 11: 80
- Chen B W, Yang Y, Liang X M *et al*, 2013. Metagenomic profiles of antibiotic resistance genes (ARGs) between human impacted estuary and deep ocean sediments. Environmental Science & Technology, 47(22): 12753—12760
- Chen C Q, Zheng L, Zhou J L *et al*, 2017. Persistence and risk of antibiotic residues and antibiotic resistance genes in major mariculture sites in Southeast China. Science of the Total Environment, 580: 1175—1184
- Dong P Y, Cui Q J, Fang T T *et al*, 2019. Occurrence of antibiotic resistance genes and bacterial pathogens in water and sediment in urban recreational water. Journal of Environmental Sciences, 77: 65—74
- Eichhorn I, Feudi C, Wang Y *et al*, 2018. Identification of novel variants of the colistin resistance gene *mcr-3* in *Aeromonas* spp. from the national resistance monitoring programme GERM-Vet and from diagnostic submissions. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 73(5): 1217—1221
- Hatosy S M, Martiny A C, 2015. The ocean as a global reservoir of antibiotic resistance genes. Applied and Environmental Microbiology, 81(21): 7593—7599
- Hoa P T P, Nonaka L, Viet P H *et al*, 2008. Detection of the *sul1*, *sul2*, and *sul3* genes in sulfonamide-resistant bacteria from wastewater and shrimp ponds of north Vietnam. Science of the Total Environment, 405(1/3): 377—384
- Kennedy D, 2013. Time to deal with antibiotics. Science, 342(6160): 777
- Kim S R, Nonaka L, Suzuki S, 2004. Occurrence of tetracycline resistance genes *tet(M)* and *tet(S)* in bacteria from marine aquaculture sites. FEMS Microbiology Letters, 237(1): 147—156
- Lane D J, 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M eds. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. New York, USA: Wiley, 115—147
- Liao W, Lin J, Jia H *et al*, 2020. Resistance and heteroresistance to colistin in *Escherichia coli* isolates from Wenzhou, China. Infection and Drug Resistance, 13: 3551—3561
- Lu X M, Li W F, Li C B, 2017. Characterization and quantification of antibiotic resistance genes in manure of

- piglets and adult pigs fed on different diets. *Environmental Pollution*, 229: 102—110
- Ma S Z, Sun C T, Hulth A *et al*, 2018. Mobile colistin resistance gene *mcr-5* in porcine *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(7): 1777—1780
- Magiorakos A P, Srinivasan A, Carey R B *et al*, 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3): 268—281
- Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby G A, 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *The Lancet*, 351(9105): 797—799
- Ng L K, Martin I, Alfa M *et al*, 2001. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Molecular and Cellular Probes*, 15(4): 209—215
- Nikolakopoulou T L, Giannoutsou E P, Karabatsou A A *et al*, 2008. Prevalence of tetracycline resistance genes in Greek seawater habitats. *The Journal of Microbiology*, 46(6): 633—640
- Normark B H, Normark S, 2002. Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine*, 252(2): 91—106
- Park C H, Robicsek A, Jacoby G A *et al*, 2006. Prevalence in the United States of *aac(6')-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(11): 3953—3955
- Rebelo A R, Bortolaia V, Kjeldgaard J S *et al*, 2018. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. *Eurosurveillance*, 23(6): 17-00672
- Rutgersson C, Fick J, Marathe N *et al*, 2014. Fluoroquinolones and *qnr* genes in sediment, water, soil, and human fecal flora in an environment polluted by manufacturing discharges. *Environmental Science & Technology*, 48(14): 7825—7832
- Sun J, Zhang H M, Liu Y H *et al*, 2018. Towards understanding MCR-like colistin resistance. *Trends in Microbiology*, 26(9): 794—808
- Tamminen M, Karkman A, Löhmus A *et al*, 2011. Tetracycline resistance genes persist at aquaculture farms in the absence of selection pressure. *Environmental Science & Technology*, 45(2): 386—391
- Willyard C, 2017. The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats. *Nature*, 543(7643): 15
- Ye L, Lu Z, Li X H *et al*, 2013. Antibiotic-resistant bacteria associated with retail aquaculture products from Guangzhou, China. *Journal of Food Protection*, 76(2): 295—301
- Zhao J Y, Dang H Y, 2012. Coastal seawater bacteria harbor a large reservoir of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in Jiaozhou Bay, China. *Microbial Ecology*, 64(1): 187—199

INVESTIGATION ON RESISTANCE GENES AGAINST FOUR TYPES OF COMMON ANTIBIOTICS IN WENZHOU WATERS OF THE EAST CHINA SEA

JIN Jing-Lei^{1,2}, ZHOU Qian-Jin^{1,2}, SHAO Xin-Bin³, WANG Yao-Hua³, CHEN Jiong^{1,2},
YAN Mao-Cang³, MIAO Liang², TANG Biao⁴, ZHANG Yan-Jun⁵

(1. State Key Laboratory for Managing Biotic and Chemical Threats to the Quality and Safety of Agro-products, Ningbo University, Ningbo 315211, China; 2. School of Marine Science, Ningbo University, Ningbo 315832, China; 3. Zhejiang Key Laboratory of Exploitation and Preservation of Coastal Bio-resource, Zhejiang Mariculture Research Institute, Wenzhou 325005, China; 4. Institute of Quality and Standard for Agro-Products, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China; 5. Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310051, China)

Abstract Sulfonamide, tetracyclines, quinolone, and polymyxin are antibiotics commonly used in medicine and animal breeding, of which polymyxin is often used as additive to promote animal growth. The prevalence of the common resistance genes against the four types of antibiotics in coastal water of Wenzhou, Zhejiang, East China was investigated. Firstly, culturable bacterial strains resistant to sulfonamides, tetracyclines, and quinolones were isolated from the coastal waters of Wenzhou using the resistance plate method, in which the common resistance genes against sulfonamides, tetracyclines, and quinolones were identified using polymerase chain reaction. Secondly, polymyxin resistance-associated *MCR* genes were detected from the bacterial isolates carrying the resistance genes against sulfonamides, tetracyclines, and quinolones. Finally, the antimicrobial resistance of all the isolates carrying the four types of the resistance gene were determined using microdilution broth method. The results show that 1 605 culturable bacterial isolates were resistant to sulfonamides, tetracyclines, and quinolones, of which 51 were proven to carry different resistance genes against sulfonamides (35 bacterial isolates), tetracyclines (36 bacterial isolates), quinolones (17 bacterial isolates), and polymyxin (2 bacterial isolates), with a detection rate of 3.18%. These bacterial isolates could be classified into 7 genera, i.e., *Aeromonas* sp. (43 isolates, 84.31%), *Citrobacter* sp., *Shewanella* sp., *Escherichia* sp., *Paenibacillus* sp., *Thalassobius* sp., and *Amphritea* sp. Except for *Thalassobius* sp. and *Amphritea* sp., the remaining 49 isolates were all resistant to sulfonamides, of which 41 were resistant to tetracyclines, 34 to quinolones and polymyxin, 23 to all the four antibiotics, and 16 to three antibiotics, indicating a ubiquitous multi-drug resistance in the coastal waters in Wenzhou. In addition, 2 bacterial isolates carrying resistance gene *MCR-3* were identified, i.e., *Aeromonas veronica* and *Aeromonas caviae*. Therefore, a small amount of antibiotic resistant isolates carrying common resistant genes against sulfonamides, tetracyclines, quinolones, and polymyxin were identified in the coastal waters, which characterized a diverse multi-drug resistance and strong resistance tolerance. These findings provide a reference for evaluating the risk of bacterial resistance and standardizing the use of antibiotics in Wenzhou coastal waters.

Key words Wenzhou waters of the East China Sea; resistance genes; multi-drug resistance; *MCR-3*