

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*

黄志坚, 陈旭凌, 路晓峰, 钟立洪, 何建国
(中山大学海洋学院, 广东 广州 510275)

摘要: 抗生素抗性基因 (Antibiotic Resistance Genes, ARGs) 作为一种新型环境污染物, 极大地限制了我国水产养殖业的发展。采用改进的煮沸法, 设计快速提取 DNA 的方法, 鉴定 194 株水产养殖生物和养殖环境中革兰氏阴性菌和阳性菌。选取其中的 139 株细菌, 采用 PCR 方法研究氟氯霉素抗性基因 (*floR*)、2 种磺胺类抗性基因 (*sul1*、*sul2*)、链霉素抗性基因 (*str*) 及甲氧苄啶抗性基因 (*dfrA20*) 的存在情况。结果表明, 鉴定的 194 株菌株属于 62 种不同种属, 主要以赖氨酸芽孢杆菌、副溶血性弧菌、中间气单胞菌、嗜水气单胞菌、温和气单胞菌、蜡样芽孢杆菌、弗氏柠檬酸杆菌、金黄杆菌、假交替单胞菌、霍乱弧菌为主。139 株细菌中 *floR*、*sul1*、*sul2*、*str*、*dfrA20* 检测结果呈阳性的分别占 11.51%、20.86%、12.23%、10.07%、2.88%, 表明水产养殖生物和养殖环境中存在不同程度的抗生素污染。

关键词: 水产养殖生物; 养殖环境; 细菌鉴定; 抗生素抗性基因

中图分类号: Q493 文献标志码: A 文章编号: 0529-6579 (2012) 06-0092-05

Identification and Antibiotic Resistance Genes Detection of Bacteria in Aquaculture Organisms and Aquatic Environment

HUANG Zhijian, CHEN Xuling, LU Xiaofeng, ZHONG Lihong, HE Jianguo
(School of Marine Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Antibiotic resistance genes (ARGs) greatly limit the aquaculture development in China. In this study, 194 strains of bacteria were identified with an improved boiling method for DNA extraction. Polymerase chain reaction (PCR) assay was applied to detect the antibiotic resistance genes of florfenicol (*floR*), two sulfonamide (*sul1* and *sul2*), streptomycin (*str*), trimethoprim (*dfrA20*) in 139 bacterial strains. It showed that 194 strains were identified as 62 different species, mainly *Lysine Bacillus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Aeromonas media*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, *Bacillus cereus*, *Citrobacter freundii*, *Chryseobacterium ureilyticum*, *Pseudoalteromonas whanghaensis*, *Vibrio cholerae* and so on. ARGs of *floR*, *sul1*, *sul2*, *str* and *dfrA20* in 139 strains were detected with positive rate of 11.51%, 20.86%, 12.23%, 10.07% and 2.88%, respectively. The results showed that antibiotic resistance genes could be the potential emerging pollutants in aquaculture organisms and aquatic environment.

Key words: aquaculture organism; aquatic environment; bacteria identification; antibiotic resistance genes (ARGs)

* 收稿日期: 2012-06-20

基金项目: 国家海洋局海洋公益性行业科研专项资助项目 (201005022-2); 广东省科技计划资助项目 (2010B031900025); 广东省海洋与渔业局海洋渔业科技推广专项资助 (B 201001C12)

作者简介: 黄志坚 (1970 年生), 男, 博士; E-mail: lsshzhj@mail.sysu.edu.cn

抗生素是用于治疗各种细菌感染或抑制致病微生物感染的药物。长期以来, 抗生素在人类生活与生产中, 都起到了至关重要的作用, 但重复使用一种抗生素可能会使致病菌产生抗药性。ARGs 作为一种新型环境污染物被 Pruden 等^[1] 提取出来以后, 有关的研究报道就屡见不鲜。近年来, 抗生素的过度使用衍生出了“超级细菌”等危及到人类健康的问题, 细菌中抗性基因检出率不断增加^[2]。抗生素的使用与抗性基因的存在之间的相关性, 引起了人们的广泛关注^[3-5]。抗生素抗性基因 (ARGs) 已经成为了 21 世纪威胁人类健康的最大挑战之一^[6]。

我国是世界第一水产养殖大国, 细菌性病害在水产养殖中影响非常严重, 特别是在密集型养殖系统中, 发生更为频繁, 极大地限制了我国水产养殖业的发展^[7-8]。针对水产养殖业大量使用抗生素这一现状, 开展渔业环境抗生素抗性基因污染的研究, 建立水产养殖生物和养殖环境抗生素抗性菌株筛选和鉴定方法, 揭示抗生素抗性基因在渔业环境中的扩散和传播规律, 对于评价抗生素抗性基因的生态风险十分必要。不仅能确保我国水产养殖业的健康可持续发展, 而且对于我国的生态安全和经济发展具有重要的现实意义。

本文采用改进的煮沸法, 设计快速提取 DNA 的方法, 鉴定水产养殖生物和养殖环境中细菌的种属, 同时进行抗性基因携带情况的检测, 可针对水产养殖生物和养殖环境中的细菌设计有效抑制细菌的抗生素药物, 进行科学合理的运用, 有利于细菌耐药基因机制的研究, 开发非抗生素类抑菌化合物。

1 材料与方法

1.1 样品采集、处理及保存

细菌样品于 2010 年 3 月至 2012 年 4 月采集于湛江、珠海、湖南、海南等地的水产养殖生物和养殖环境。将初步处理的样品涂布于 2216E 或 LB 琼脂培养基, 进行分离纯化以形成单菌落。将分离纯化好的菌株编号, 加入终体积分数为 20% ~ 30% 的甘油, -80 °C 保存。

1.2 DNA 的提取

对煮沸法进行改进, 设计出一种快速提取 DNA 的方法^[9]。将纯化好的细菌接种于 2216E 或 LB 培养液中, 隔夜摇床培养。用吸管吸取 1 mL 的细菌培养液, 7 500 r/min 离心 5 min, 弃掉上清, 加入 0.4 mL 的无菌水, 振荡摇匀后, 沸水浴煮 10 min, 然后再 12 000 r/min 离心 10 min, 上清液即

可作为 DNA 模板, -20 °C 保存。

1.3 菌种的鉴定

1.3.1 菌种 16S rDNA 的扩增 取制备的样品 DNA 模板液, 选取上游引物 Eubac 27f: AGA GTT GAT CCT GGC TCA G, 下游引物 Eubac 1492r: GGT TAC CTT GTT ACG ACT T (引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成), 进行 16S rDNA 的 PCR 扩增。

PCR 反应体系为 50 μ L, 内含 2 \times PCR Reaction Mix 25 μ L、10 μ mol/L 的引物 27f 和引物 1492r 各 2 μ L、2.5 U 的 Taq 酶 0.5 μ L、含 50 ~ 150 ng 的 DNA 模板溶液 2 μ L、ddH₂O 18.5 μ L。

扩增条件为: 94 °C 预变性 5 min, 然后 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 共 30 个循环, 最后 72 °C 充分延伸 10 min。扩增产物用 $w = 1\%$ 的琼脂糖凝胶电泳检测其大小、纯度及亮度, 目的条带约为 1.5 kb。

1.3.2 序列的测定及比对 PCR 扩增产物, 直接委托公司进行双向测序, 测序引物为扩增引物 27f/1492r, 序列分析仪为 ABI 3730 型全自动 DNA 测序仪。测序结果与 GenBank 数据库中目的基因序列比对, 以确定菌株的种属。

1.4 抗生素抗性基因 (ARGs) 的定性分析

1.4.1 ARGs 的扩增与检测 取制备的样品 DNA 模板液, 参照文献^[5-7] 设计氟氯霉素抗性基因 (*floR*)、磺胺类抗性基因 (*sul1*、*sul2*)、链霉素抗性基因 (*str*) 及甲氧苄啶抗性基因 (*dhfrA20*) 抗生素抗性基因引物^[8]。扩增条件为: 92 °C 预变性 5 min, 然后 98 °C 变性 10 s, 52 ~ 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 ~ 60 s, 共 30 个循环, 最后在 72 °C 充分延伸 7 min。扩增产物用 $w = 1\%$ 的琼脂糖凝胶电泳检测其大小。

1.4.2 序列的测定及比对 PCR 扩增产物, 直接委托华大基因进行测序, 测序结果与 GenBank 数据库中目的基因序列比对, 以确定为对应的抗性基因序列。

2 结果与分析

2.1 菌种的鉴定

共分离纯化 194 株细菌菌株, PCR 扩增菌株 16S rDNA 基因, 均能获得单一的目的 DNA 片段, 目的条带清晰, 明亮, 特异性扩增产物大小为 1.5 kb 左右 (见图 1)。经测序及与 GenBank 上同源序列比对, 同源性高, 分别属于 62 种不同种属, 主要以赖氨酸芽孢杆菌、副溶血性弧菌、中间气单胞

菌、嗜水气单胞菌、温和气单胞菌、蜡样芽孢杆菌、弗氏柠檬酸杆菌、金黄杆菌、假交替单胞菌、霍乱弧菌为主,这 10 种细菌共占了 56.2%。

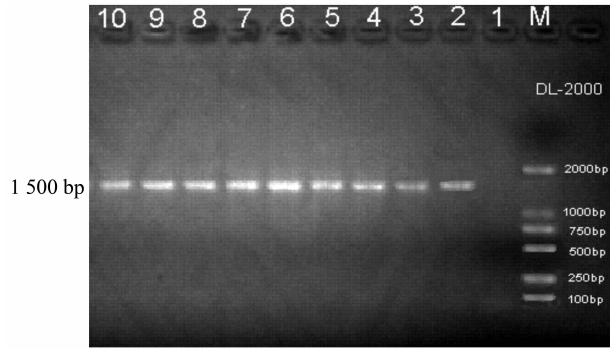


图 1 细菌 16S rDNA 基因的 PCR 扩增电泳图

Fig. 1 PCR amplification of bacteria 16S rDNA genes

1: 阴性对照; 2-9: 鉴定菌种; 10: 阳性对照;
M: DNA 相对分子质量标准 DL-2000

2.2 抗生素抗性基因 (ARGs) 的定性分析

选取其中的 139 株菌进行抗生素抗性基因检测,各抗性基因 PCR 扩增电泳图见图 2, PCR 定性结果为阳性, 片段大小正确, 初步证明样品中含有目的基因, 将 PCR 产物基因测序结果与基因库中目的基因序列比对, 进一步证实为目的基因。其中含有至少一种抗性基因的菌株有 43 株, 以副溶血性弧菌、中间气单胞菌、嗜水气单胞菌、弗氏柠檬酸杆菌、类产碱假单胞菌含抗性基因为主 (见表 1)。139 株细菌中, 16 株 *floR* 基因扩增结果呈阳性, 29 株 *sul1* 基因扩增结果呈阳性, 17 株 *sul2* 基因扩增结果呈阳性, 14 株 *str* 基因扩增结果呈阳性, 4 株 *dfrA20* 基因扩增结果呈阳性, 空白对照结果均为阴性。各抗性基因检出率如表 2 所示。

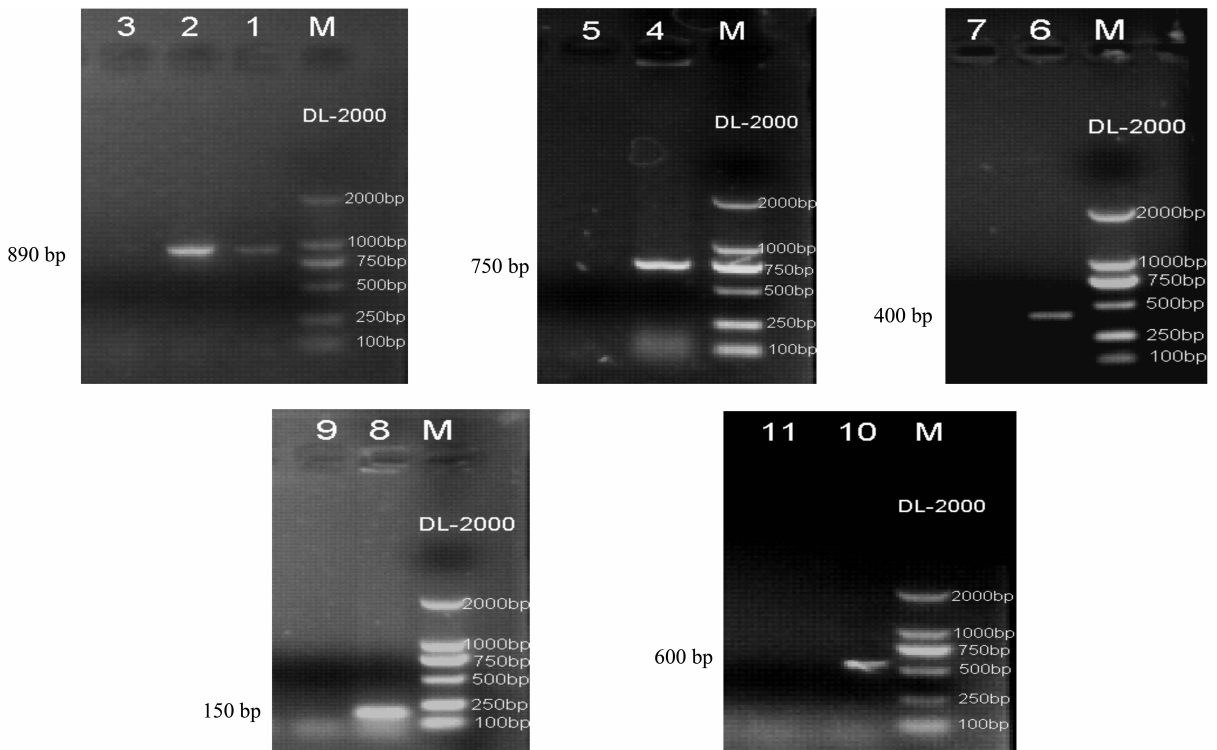


图 2 *floR*、*str*、*sul1*、*sul2* 和 *dfrA20* 基因的 PCR 扩增电泳图

Fig. 2 PCR amplification of *floR*、*str*、*sul1*、*sul2*、and *dfrA20* genes

1、2: *floR*; 3、5、7、9、11: 阴性对照; 4: *str*; 6: *sul1*; 8: *sul2*; 10: *dfrA20*; M: DNA 相对分子质量标准 DL-2000

表 1 细菌抗性基因检测结果¹⁾

Table 1 The results of bacterial resistance genes detection

编号	菌种	<i>floR</i>	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>str</i>	<i>dfrA20</i>
1	弗氏柠檬酸杆菌 <i>Citrobacter freundii</i>	-	-	+	-	-
3	弗氏柠檬酸杆菌 <i>Citrobacter freundii</i>	-	+	+	+	-
10	副溶血性弧菌 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	-	-	-	+
13	病鳃假单胞菌 <i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	-	+	-	+	-
15	副溶血性弧菌 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	+	-	+	-
16	类产碱假单胞菌 <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	-	+	-	+	-
18	菠萝多源菌 <i>Pantoea ananatis</i>	-	+	-	-	-
22	海藻希瓦氏菌 <i>Shewanella algae</i>	-	+	-	+	-
26	类产碱假单胞菌 <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	-	+	-	+	-
29	假交替单胞菌 <i>Pseudoalteromonas whanghaensis</i>	-	+	-	+	-
35	球形赖氨酸芽孢杆菌 <i>Lysinibacillus sphaericus</i>	-	-	+	-	-
44	球形赖氨酸芽孢杆菌 <i>Lysinibacillus sphaericus</i>	-	-	+	-	-
66	荧光假单胞菌 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	+	-	-	-
67	嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	+	+	-	-	-
68	中间气单胞菌 <i>Aeromonas media</i>	-	+	-	+	-
69	嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	-	+	-	-	-
70	金黄杆菌 <i>Chryseobacterium ureilyticum</i>	-	-	+	-	-
71	蜂房哈夫尼菌 <i>Hafnia alvei</i>	+	-	-	-	-
80	霍乱弧菌 <i>Vibrio cholera</i>	-	+	-	-	-
81	醋酸钙不动杆菌 <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	-	+	-	-	-
82	维氏气单胞菌 <i>Aeromonas veronii</i>	-	+	-	-	-
86	中间气单胞菌 <i>Aeromonas media</i>	+	+	+	-	-
88	彭氏变形杆菌 <i>Proteus penneri</i>	+	+	+	-	-
97	金黄杆菌 <i>Chryseobacterium ureilyticum</i>	-	+	-	-	-
101	蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	+	-	+	+	-
105	苏云金杆菌 <i>Bacillus thuringiensis</i>	+	-	-	+	-
110	中间气单胞菌 <i>Aeromonas media</i>	+	-	-	-	-
115	中间气单胞菌 <i>Aeromonas media</i>	+	+	+	-	-
116	弗氏柠檬酸杆菌 <i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-	-	+
119	蜂房哈夫尼菌 <i>Hafnia alvei</i>	+	+	+	+	-
120	嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	-	-	-	-	+
127	维氏气单胞菌 <i>Aeromonas veronii</i>	+	+	-	-	-
128	温和气单胞菌 <i>Aeromonas sobria</i>	-	-	-	-	+
129	中间气单胞菌 <i>Aeromonas media</i>	+	+	-	-	-
130	中间气单胞菌 <i>Aeromonas media</i>	+	+	+	-	-
131	维氏气单胞菌 <i>Aeromonas veronii</i>	-	+	-	-	-
132	中间气单胞菌 <i>Aeromonas media</i>	+	+	+	-	-
133	摩氏摩根菌 <i>Morganella morganii</i>	-	+	-	-	-
145	中间气单胞菌 <i>Aeromonas media</i>	-	+	+	-	-
149	嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	-	+	+	+	-

1) +: 阳性; -: 阴性

表 2 各抗性基因检出率
Table 2 Detection rate of ARGs

基因名称	<i>floR</i>	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>str</i>	<i>dfrA20</i>
检出数	16	29	17	14	4
检出率/%	11.51	20.86	12.23	10.07	2.88

3 讨论

近年来, 抗生素在养殖业中的大量使用, 使水产养殖生物和养殖环境中的细菌可能含有一种或多种抗性基因, 从而导致耐药性的产生。研究发现

ARGs 能够由染色体、质粒、转座子、整合子和基因盒、插入序列共同区介导^[10], 在细菌之间传播, 进而在环境中扩散, 对公共健康和食品安全构成严重的威胁。

本研究中抗性基因的检出率相对比较高, 其中编码磺胺类的抗性基因的检出率 $sul1 > sul2$, 与 Hoa P T P 等^[11] 在越南北部的城市运河、养鱼池、养虾池也发现了编码磺胺类的抗性基因检出率 $sul1 > sul2$, 两者的趋势一致。黄金伟等^[12] 在对嗜麦芽窄食单胞菌中, 发现 $sul1$ 由 I 类整合子介导, 是 I 类整合子的一部分。Barbolla 等^[13] 研究 31 株细菌中 3 株表现为对复方磺胺甲噁唑高 MIC, 同时扩增出 I 类整合子基因和 $sul1$ 基因, 在敏感的细菌中均未检测到; Toleman M A 等^[14] 进一步研究发现 $sul2$ 在大的质粒上, 但少部分也可以由染色体介导, $sul2$ 与 ISCR 插入元件共同区 (insertion element common region, ISCR) 连锁, 该研究数据表明 I 类整合子以及 ISCR 元件与 $sul2$ 基因的连锁能够介导嗜麦芽窄食单胞菌对复方磺胺甲噁唑的耐药性, $sul1$ 、 $sul2$ 基因的存在与磺胺类药物耐药有直接关系, 并且整合子——ISCR 结构可以更容易地把几个耐药基因一起从一个质粒整合到另一个质粒或染色体上, 增加耐药性传播。

抗生素抗性基因的检出可以证明细菌的耐药性, 阐释细菌耐药机理, 更可以检查耐药因子的起源及传播扩散途径和动态, 为耐药细菌, 尤其是耐药病原菌的追踪监测提供其它方法无法取代的最佳手段。利用现代分子生物学技术测定耐药基因的核酸序列还可用来检测耐药基因的变异, 用来追踪某一耐药基因的系统发生和进化演化, 并通过计算机分子结构建模而预测该耐药基因表达产物耐药谱的演化。本研究将在检测抗性基因的基础上进一步开展耐药机制的研究。

参考文献:

- [1] PRUDEN A, PEI R, STORTEBOOM H, et al. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants; Studies in Northern Colorado [J]. Environ Sci Technol, 2006, 40: 7445 - 7450.
- [2] KARTHIKEYAN K K, MARK A T, TIMOTHY R W, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study [J]. Lancet Infect Dis, 2010, 10: 597 - 602.
- [3] SMITH M S, YANG R K, KNAPP C W, et al. Quantification of tetracycline resistance genes in feedlot lagoons by real-time PCR [J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70 (12): 7372 - 7377.
- [4] PEI R, 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 Res, 2006, 40: 2427 - 2435.
- [5] PEAK N, KNAPP C W, YANG R K. Abundance of six tetracycline resistance genes in wastewater lagoons at cattle feedlots with different antibiotic use strategies [J]. Environ Microbiol, 2007, 9 (1): 143 - 149.
- [6] 罗义, 周启星. 抗生素抗性基因 (ARGs)——一种新型环境污染物 [J]. 环境科学学报, 2008, 28 (8): 1499 - 1505.
- [7] CRECCHIO C, RUGGIERO P, CURCI M, et al. Binding of DNA from *Bacillus subtilis* on montmorillonite-humic acids-aluminum or iron hydroxypolymers; Effects on transformation and protection against DNase [J]. Soil Sci Soc Am J, 2005, 69 (3): 834 - 841.
- [8] 高盼盼, 罗义, 周启星, 等. 水产养殖环境中抗生素抗性基因 (ARGs) 的研究及进展 [J]. 生态毒理学报, 2009, 4 (6): 770 - 779.
- [9] 黄志坚, 陈旭凌, 何建国. 一种水产养殖环境中抗生素抗性菌株的鉴定方法: 中国, 201210004542. 7 [P]. 2012 - 01 - 09.
- [10] TOLEMAN M A, PETER M B, TIMOTHY R W. ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2006, 70: 296 - 316.
- [11] HOA P T P, NONAKA L, VIET P H, et al. Detection of the $sul1$, $sul2$, and $sul3$ genes in sulfonamide-resistant bacteria from wastewater and shrimp ponds of north Vietnam [J]. Sci Total Environ, 2008, 405 (1/3): 377 - 384.
- [12] 黄金伟, 黄建胜, 陈苏伟, 等. 嗜麦芽窄食单胞菌 $sul1$ 、 $sul2$ 基因与复方磺胺甲噁唑耐药关系 [C]. 2008 年浙江省检验医学学术年会论文汇编, 2008.
- [13] BARBOLLA R, MARIANA C, BETINA E O, et al. Class I integrons increase trimethoprim-sulfamethoxazole MICs against epidemiologically unrelated *Stenotrophomonas maltophilia* isolates [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48 (2): 666 - 669.
- [14] TOLEMAN M A, BENNETT P M, BENNETT D M, et al. Global emergence of trimethoprim-sulfamethoxazole resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* mediated by acquisition of sul genes [J]. Emerg Infect Dis, 2007, 13 (4): 559 - 565.