

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20201209002

http://www.yykyjz.cn/

杨泽禹, 万夕和, 史文军, 王李宝, 黎慧, 沈辉, 乔毅, 蒋葛, 成婕. 凡纳滨对虾不同生长阶段肠道可培养细菌耐药性研究. 渔业科学进展, 2022, 43(2): 175-184

YANG Z Y, WAN X H, SHI W J, WANG L B, LI H, SHEN H, QIAO Y, JIANG G, CHENG J. Study on bacterial resistance in *Litopenaeus vannamei* intestinal culturable bacteria at different growth stages. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(2): 175-184

## 凡纳滨对虾不同生长阶段肠道 可培养细菌耐药性研究\*

杨泽禹<sup>1,2</sup> 万夕和<sup>1①</sup> 史文军<sup>1</sup> 王李宝<sup>1</sup> 黎慧<sup>1</sup>  
沈辉<sup>1</sup> 乔毅<sup>1</sup> 蒋葛<sup>1</sup> 成婕<sup>1</sup>

(1. 江苏省海洋水产研究所 江苏 南通 226007; 2. 高邮市水产技术指导站 江苏 高邮 225600)

**摘要** 在凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)养殖过程中多使用微生态制剂来调节水质, 为避免破坏池塘菌群结构, 很少使用抗生素。为了解凡纳滨对虾肠道细菌耐药性与不同生长阶段的关系, 本研究选取江苏地区4种主要养殖模式凡纳滨对虾成虾和虾苗作为研究对象, 利用K-B纸片法和qRT-PCR技术, 研究对虾样本肠道可培养细菌对四环素等12种抗生素的耐药性和tetA等9种抗生素耐药基因(ARGs)的丰度。结果显示, 不同养殖模式中的凡纳滨对虾肠道可培养细菌优势属为弧菌属(*Vibrio*); 成虾肠道内可培养细菌种类和数量较虾苗显著上升( $P<0.05$ ), 耐药菌(antibiotics resistant bacteria, ARB)占比降低, ARGs丰度显著下降( $P<0.05$ ); 不同养殖模式之间规律不明显。研究表明, 各模式下成虾肠道细菌耐药性和ARGs丰度均低于虾苗, 提示, 养殖过程中通过施用微生态制剂来减少抗生素使用量的方法能降低凡纳滨对虾肠道可培养细菌的耐药性。

**关键词** 凡纳滨对虾; 细菌耐药性; 抗生素耐药基因(ARGs); qRT-PCR

**中图分类号** S945.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)02-0175-10

近年来, 对虾养殖已成为我国水产行业的重要组成部分(农业农村部渔业渔政管理局等, 2020)。经过多年的发展, 江苏沿海地区形成了多种凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)养殖模式, 包括池塘鱼虾混养、小型温棚养殖等, 经济效益显著。

随着对虾养殖业的迅猛发展, 各种病害频发(Lee *et al*, 2015)。为推进水产养殖绿色发展, 农业农村部大力开展用药减量行动, 益生菌(Chumpol *et al*, 2017;

刘文亮等, 2017)、中草药(朱璐丹等, 2019; Zhang *et al*, 2021)等新型无抗化防病技术不断被运用到生产实践中。目前, 国务院兽医行政管理部门批准的水产养殖用抗菌药有12种(农业农村部, 2020)。研究表明, 抗生素在水产养殖上使用后部分被养殖对象吸收, 不能吸收的部分则被排出体外(张骞月等, 2015), 残留在土壤、水源中(D'costa *et al*, 2006), 对动物体内以及环境中的细菌耐药性产生定向选择作用(Österblad

\* 江苏省第十六批“六大人才高峰”高层次人才项目(NY-106)和江苏省农业科技自主创新资金-农产品产业发展关键技术创新[CX(18)2010]共同资助 [This work was supported by 16th Batch of “Six Talent Peaks” High-Level Talents Project in Jiangsu Province (NY-106), and Independent Innovation Fund for Agricultural Science and Technology of Jiangsu Province-Key Technological Innovations in the Development of Agricultural Products Industry [CX(18)2010]]. 杨泽禹, E-mail: 779287258@qq.com

① 通讯作者: 万夕和, 研究员, E-mail: wxh1708@163.com

收稿日期: 2020-12-09, 收修改稿日期: 2021-01-27

et al, 2001), 诱导耐药基因(antibiotic resistance genes, ARGs)的产生(Fridman et al, 2014; Frimodt-Møller et al, 2019)与传递(Frost et al, 2005; Mazel, 2006), 改变环境和生物体内微生态结构, 最终威胁人类健康与安全。

本课题组前期调研发现, 江苏地区凡纳滨对虾养殖过程多使用微生态制剂来调节水质, 为避免破坏池塘菌群结构, 生产中很少施用抗生素。本研究选择 4 种不同养殖模式的凡纳滨对虾虾苗和成虾作为研究对象, 利用 K-B 纸片法研究其肠道可培养细菌对 6 大类 12 种抗生素(四环素、多西环素、氟苯尼考、氯霉素、磺胺异恶唑、复方新诺明、新霉素、庆大霉素、环丙沙星、诺氟沙星、头孢曲松和头孢噻肟)的耐药性, 并通过 qRT-PCR 技术检测肠道细菌总 DNA 中 5 大类 9 种 ARGs (*tetA*、*tetG*、*qnrA*、*qnrS*、*cmle3*、*floR*、*aadA*、*sul1*、*sul2*)的丰度, 探究江苏地区常见 4 种养殖模式下凡纳滨对虾不同生长阶段肠道耐药菌(antibiotics resistant bacteria, ARB)和 ARGs 污染的变化情况, 为

后续防控细菌耐药性产生以及水产养殖科学用药提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

本研究选取江苏地区 12 家养殖场凡纳滨对虾 4 种主要养殖模式苗种投放前和成虾上市前 2 个时间节点的对虾为研究对象, 苗种来源于省外不同虾苗生产企业, 每种模式苗种、成虾样品各 3 份, 共 8 组 24 个样品。4 种养殖模式分别为: 模式 1 [M1, 土塘养殖: 斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)主养, 凡纳滨对虾混养]、模式 2 (M2, 土塘养殖: 凡纳滨对虾主养, 斑点叉尾鲷混养)、模式 3 (M3, 小棚凡纳滨对虾精养)、模式 4 [M4, 大水面养殖: 凡纳滨对虾、鲢鱼(*Hypophthalmichthys molitrix*)、鳙鱼(*Hypophthalmichthys nobilis*)和鲫鱼(*Carasus anratus*)混养]。样品详细信息见表 1。

表 1 样品信息

Tab.1 Sample information (n=10; Mean±SD)

养殖阶段 Culture stage	组别 Group	样品编号 Sample ID	采样时间 Sampling time	对虾重量 Shrimp weight/g	养殖模式 Aquaculture model
苗种 Postlarvae	P-TTY	P-TTY-1	2019-05-30	0.023 0±0.002 7	M1
		P-TTY-2		0.018 0±0.005 8	
		P-TTY-3		0.028 0±0.011 0	
	P-TTX	P-TTX-1	2019-05-30	0.015 0±0.007 1	M2
		P-TTX-2		0.015 0±0.002 7	
		P-TTX-3		0.017 0±0.004 3	
	P-XP	P-XP-1	2019-08-13	0.012 0±0.006 7	M3
		P-XP-2		0.021 0±0.009 1	
		P-XP-3		0.013 0±0.001 1	
	P-DSM	P-DSM-1	2019-06-05	0.020 0±0.001 7	M4
		P-DSM-2		0.019 0±0.000 9	
		P-DSM-3		0.016 0±0.002 9	
成虾 Adult shrimp	C-TTY	C-TTY-1	2019-09-06	12.60±1.82	M1
		C-TTY-2		12.20±1.22	
		C-TTY-3		10.40±0.47	
	C-TTX	C-TTX-1	2019-09-06	13.20±1.31	M2
		C-TTX-2		11.50±1.66	
		C-TTX-3		12.60±2.03	
	C-XP	C-XP-1	2019-11-13	11.30±0.76	M3
		C-XP-2		12.00±0.33	
		C-XP-3		13.10±0.64	
	C-DSM	C-DSM-1	2019-09-16	15.30±2.07	M4
		C-DSM-2		14.70±1.34	
		C-DSM-3		14.70±2.84	

## 1.2 可培养细菌平板计数、分离、纯化及鉴定

对虾体表用 75%酒精擦拭消毒,并用灭菌生理盐水漂洗后再进行肠道细菌分离培养。每组成虾样品取 10 只成虾的肠道,混匀称重后,加入 1 mL 灭菌生理盐水充分研磨,取 100  $\mu$ L 适当稀释后的研磨液于 2216E 平板上均匀涂布,每个样品做 3 个重复,28 $^{\circ}$ C 培养过夜后进行计数。每组虾苗样品取 10 只虾苗重复上述操作。取均值作为各组凡纳滨对虾肠道可培养细菌含量。在平板上挑取形态不同的单菌落纯化培养 2 代后,利用细菌 *16S rDNA* 通用引物 27F 和 1492R 进行 PCR 扩增,产物经生工生物工程(上海)股份有限公司测序后,通过 Blast 检索系统对细菌序列同源性进行分析。

## 1.3 可培养细菌耐药性检测

以大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)标准菌株(ATCC 25922)为质控菌,利用 K-B 纸片法测定上述分离纯化的细菌对四环素类、氯霉素类、磺胺类、氨基糖苷类、喹诺酮类和  $\beta$ -内酰胺类 6 大类 12 种抗生素的耐药性,每株菌做 3 个重复。药物敏感性实验方法

及判读标准参考美国临床与实验室标准化研究所(CLSI)操作手册(Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017)和《全国临床检验操作规程》(尚红等, 2015)。药敏纸片和 MH 培养基购于杭州微生物试剂有限公司。耐药菌占比计算公式如下:

$$\text{虾苗(成虾)耐药菌占比(\%)} = \frac{\text{虾苗(成虾)肠道可培养细菌中耐药菌株数}}{\text{虾苗(成虾)肠道可培养细菌总株数}}$$

## 1.4 ARGs 丰度检测

**1.4.1 ARGs 标准质粒构建及标准曲线绘制** 利用 ARGs 引物(目的基因信息详见表 2),对本研究室储存的对虾源细菌 DNA 样品进行 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳法检测目的条带。挑选出强阳性样本,用 TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0 (TaKaRa)回收目的条带。用 pMD18-T Vector Cloning Kit (TaKaRa)对目的基因进行克隆。利用蓝白斑筛选、通用引物 M13 普通 PCR 扩增以及菌液测序的方法来验证克隆成功与否。用 TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver.4.0 (TaKaRa)提取克隆成

表 2 目的基因信息  
Tab.2 Target gene information

类别 Category	基因 Gene	引物序列 Primer sequence (5'~3')	$T_m/^{\circ}\text{C}$	扩增长度 Amplicon length/bp	参考文献 Reference
四环素类 Tetracyclinas	<i>tetA</i>	F: GGTGGATGAGGAACGTCAGG	58	100	李壹等(2016)
		R: CGCATAGATCGCCGTGAAGA			
	<i>tetG</i>	F: GCACTCTATTCTGCCACC	58	95	李壹等(2016)
		R: GGTCTGCGTAGTATTGGCA			
喹诺酮类 Quinolones	<i>qnrA</i>	F: AGTGGCCAATGCCTGGAAAA	58	166	李壹等(2016)
		R: CCAGATCGGCAAAGGTTAGG			
	<i>qnrS</i>	F: AAAGGTGCCAACTTTTCCCG	57	113	李壹等(2016)
		R: ACCCTCTCCATATTGGCAT			
氯霉素类 Chloramphenicol	<i>cmle3</i>	F: ACGTTTATGCCAACCGTCCT	58	132	李壹等(2016)
		R: TGAATATCGCCTGC CATCCC			
	<i>floR</i>	F: TATCTCCCTGTCGTTCCAG	56	399	李壹等(2016)
		R: AGAACTCGCCGATCAATG			
氨基糖苷类 Aminoglycosides	<i>aadA</i>	F: TGATTTGCTGGTTACGGTGAC	56	284	王慧平等(2017)
磺胺类 Sulfonamides	<i>sul1</i>	F: CAC CGG AAA CAT CGC TGC A	58	158	He 等(2014)
		R: AAGTTCCGCCGCAAGGCT			
	<i>sul2</i>	F: TCCGGTGGAGCCGGTATCTGG	61	190	Pei 等(2006)
		R: CGGGAATGCCATCTGCCTTGAG			
内参基因 Reference genes	<i>16S rDNA</i>	F: GGTAGTCYAYGCMSTAAACG	62	265	Bach 等(2002)
		R: GACARCCATGCASCACCTG			

功菌液的质粒,并以此质粒为标准品模板,利用 Applied Biosystems Step One Plus Real-Time PCR System 进行 qRT-PCR 分析,绘制标准曲线。

目的基因 PCR 程序:95℃ 5 min;95℃ 30 s,  $T_m$  45 s,72℃ 1 min,35 个循环 72℃ 10 min。qRT-PCR 程序:95℃ 30 s;95℃ 5 s,60℃ 30 s,40 个循环。溶解曲线程序:95℃ 15 s,60℃ 15 s,95℃ 15 s。20 L 反应体系:10  $\mu$ L TB Green Premix Ex Taq (TaKaRa),上、下游引物各 0.4  $\mu$ L,ROX 0.4  $\mu$ L,模板 0.2  $\mu$ L。

**1.4.2 样品 DNA 提取及 qRT-PCR 检测 ARGs 丰度**

用 3S DNA Isolation Kit for Environment Samples (上海博彩生物)提取样品肠道细菌 DNA(每组成虾样品取 10 只成虾的肠道研磨混匀后提取,每组虾苗样品取 10 只虾苗研磨混匀后提取),1.0%琼脂糖凝胶电泳和 Thermo Nanodrop 2000 检验 DNA 质量,以合格的 DNA 为模板,进行 qRT-PCR 检测,条件与反应体系同 1.4.1。根据标准曲线计算各基因拷贝数的绝对含量,以 *16S rDNA* 为内参基因作归一化处理,计算各 ARGs 的相对含量,并以该相对含量进行下一步数据统计和分析。

## 1.5 数据统计方法

采用 Excel 2019 进行可培养细菌数量统计、药物敏感性分析、ARGs 标准曲线绘制以及 ARGs 样品  $C_t$  值归一化处理等。用 TBtools 对基因相对含量进行聚类热图分析(Chen *et al*, 2020)。

## 2 结果

### 2.1 可培养细菌平板计数及分类鉴定结果

苗种样品中可培养细菌总数最小值为 33 CFU/g,最大值为  $2.73 \times 10^4$  CFU/g;成虾样品可培养细菌总数最小值为  $6.33 \times 10^4$  CFU/g,最大值为  $1.12 \times 10^7$  CFU/g。按不同养殖模式分类,4 种养殖模式苗期至成虾期细菌总数分别上升 1832.1 (M1)、206.1 (M2)、610.0 (M3) 和 81.8 (M4)倍。各组对虾肠道可培养细菌含量对数值见图 1。

共分离纯化得到 17 种、49 株可培养细菌,来源于 8 个不同属,分别为弧菌属(*Vibrio*)、发光杆菌属(*Photobacterium*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)、西瓦氏菌属(*Shewanella*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、微小杆菌属(*Exiguobacterium*)、盐芽孢杆菌属(*Halobacillus*)、假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)(表 3)。其中,数量最多的为弧菌属,共计 30 株,占 61.2%。弧菌属主要种类为溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)和副溶血弧菌

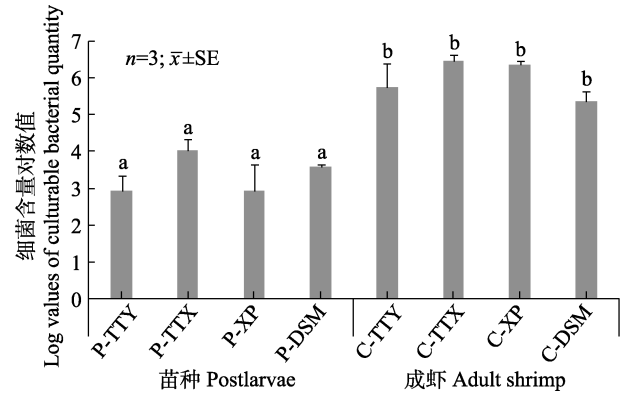


图 1 各组对虾肠道可培养细菌含量对数值  
Fig.1 Log values of culturable bacterial quantity in shrimp intestinal tract of different groups

柱形图上方不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

纵坐标为对应组别 3 个样品可培养细菌含量对数值均值。Different letters on the column indicate significant difference ( $P < 0.05$ ). The ordinate represents mean log values of three samples' culturable bacterial quantity in the corresponding group

(*V. parahaemolyticus*), 分别为 11 株和 9 株,占比为 36.7%和 30%。苗种样品中分离到 3 属,10 种,21 株细菌。其中,数量最多的为溶藻弧菌(9 株),占 42.9%。成虾样品中共分离到 8 属,12 种,28 株细菌,其中副溶血弧菌 8 株,占 30.8%。

### 2.2 可培养细菌耐药性检测结果

对虾肠道耐药菌占比结果见表 4。虾苗和成虾肠道耐药菌占比均较低,对氯霉素、庆大霉素、头孢曲松等药物的耐药菌占比都为 0,对四环素类和磺胺类抗生素耐药的菌株占比稍高,但最大也只有 19.05%。同时,成虾肠道耐药菌占比均低于虾苗。

### 2.3 ARGs 丰度检测结果

**2.3.1 ARGs 标准曲线** 以 ARGs 拷贝数对数值为横坐标,样品  $C_t$  值为纵坐标绘制标准曲线,结果见表 5。各 ARGs 标准曲线斜率( $a$ )介于  $-3.3886 \sim -3.1428$  之间,截距( $b$ )介于 40.647~46.469 之间,相关系数( $R^2$ )介于 0.9913~0.9985 之间,引物扩增效率( $E\%$ )介于 97.3~108.1 之间,溶解曲线无杂峰。结果表明,标准曲线线性良好,且引物扩增效率高,能够用于相对拷贝数的计算。

**2.3.2 ARGs 丰度及分布特征** 结果显示,所有耐药基因丰度在凡纳滨对虾肠道中表现较低,以样品 P-TTY-2 中 *cmle3* 丰度稍高,为 84.6; *tetA* 在 C-TTY-1 和 C-DSM-1 两份样品中未被检出; *qnrA* 在 C-TTX-1、C-XP-1、C-XP-2、C-XP-3、C-DSM-1、C-DSM-2 和 C-DSM-3 七份样品中未被检出。*sul2* 在

表 3 可培养细菌分类及数量  
Tab.3 Classification and quantity of culturable dominant bacteria

养殖阶段 Culture stage	属名 Genus	种名 Species	数量/株 Quantity/strains
虾苗 Postlarvae	发光杆菌属 <i>Photobacterium</i>	甘瓜发光杆菌 <i>P. ganghwense</i>	3
	西瓦氏菌属 <i>Shewanella</i>	海藻希瓦氏菌 <i>S. algae</i>	1
	弧菌属 <i>Vibrio</i>	溶藻弧菌、河流弧菌、解蛋白弧菌、副溶血弧菌、新喀里多尼亚弧菌、弗氏弧菌、创伤弧菌、需钠弧菌 <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. fluvialis</i> , <i>V. proteolyticus</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. neocaledonicus</i> , <i>V. furnissii</i> , <i>V. vulnificus</i> , <i>V. natriegens</i>	17
成虾 Adult shrimp	气单胞菌属 <i>Aeromonas</i>	维氏气单胞菌 <i>A. veronii</i>	1
	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	2
	微小杆菌属 <i>Exiguobacterium</i>	深海微小杆菌 <i>E. profundum</i>	2
	发光杆菌属 <i>Photobacterium</i>	甘瓜发光杆菌 <i>P. ganghwense</i>	2
	假交替单胞菌属 <i>Pseudoalteromonas</i>	拟互生单胞菌 <i>P. fenneropenaei</i>	1
	西瓦氏菌属 <i>Shewanella</i>	利托里氏沙瓦氏菌、亚马逊雪旺菌 <i>S. litorisediminis</i> , <i>S. amazonensis</i>	4
	弧菌属 <i>Vibrio</i>	溶藻弧菌、河流弧菌、副溶血弧菌、创伤弧菌 <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. fluvialis</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i>	13
	盐芽孢杆菌属 <i>Halobacillus</i>	达坂喜盐芽孢杆菌 <i>H. dabanensis</i>	1
无法归类的 Unclassified		2	

表 4 对虾肠道耐药菌占比  
Tab.4 Antibiotics resistant bacteria (ARB) proportion in shrimp intestinal tract

种类 Category	抗生素 Antibiotic	耐药菌占比 ARB proportion/%	
		虾苗 Postlarvae	成虾 Adult shrimp
四环素类 Tetraciclins	四环素 Tetracycline, TE	19.05	10.71
	强力霉素 Doxycycline, DO	19.05	7.14
氯霉素类 Chloramphenicol	氟苯尼考 Fluorobenicol, FFC	4.76	0
	氯霉素 Chloromycetin, C	0	0
磺胺类 Sulfonamides	磺胺异恶唑 Sulfamethoxazole, SF	14.29	7.14
	复方新诺明 Cotrimoxazole, SXT	14.29	7.14
氨基糖苷类 Aminoglycosides	新霉素 Neomycin, N	9.52	7.14
	庆大霉素 Gentamicin, CN	0	0
喹诺酮类 Quinolones	环丙沙星 Ciprofloxacin, CIP	4.76	0
	诺氟沙星 Norfloxacin, NOR	4.76	0
$\beta$ -内酰胺类 $\beta$ -lactams	头孢曲松 Ceftriaxone, CRO	0	0
	头孢噻肟 Cefotaxime, CTX	4.76	3.57

样品 C-DSM-1 中未被检出。样品中 9 种 ARGs 相对含量范围见表 6。

ARGs 丰度检测结果见图 2。由 ARGs 丰度聚类分析结果可见，苗种和成虾样品聚在不同的分支，养

成后的对虾中的 ARGs 丰度均较养殖前虾苗中低，表明经过 1 个养殖周期，ARGs 丰度降低。氯霉素类 (*cmle3*、*floR*)、四环素类(*tetG*)和磺胺类(*sul2*) 4 种 ARGs 在虾苗样品中出现。

表 5 抗生素 ARGs 标准曲线  
Tab.5 Standard curves of drug antibiotic resistance genes

基因 Gene	标准曲线 Standard curve	相关系数 R <sup>2</sup> Correlation coefficient	扩增效率 Amplification efficiency/%
<i>tetA</i>	y=-3.204 8x+44.127	0.991 3	105.1
<i>tetG</i>	y=-3.142 8x+42.512	0.997 1	108.1
<i>qnrA</i>	y=-3.288 5x+42.602	0.996 0	101.5
<i>qnrS</i>	y=-3.303 1x+41.402	0.998 5	100.8
<i>cmle3</i>	y=-3.239 8x+40.647	0.994 3	103.5
<i>floR</i>	y=-3.388 6x+45.541	0.995 4	97.3
<i>aadA</i>	y=-3.195 1x+43.851	0.996 1	98.6
<i>sul1</i>	y=-3.283 1x+43.174	0.996 5	101.6
<i>sul2</i>	y=-3.261 3x+41.066	0.997 1	102.6
<i>16S rDNA</i>	y=-3.278 9x+46.469	0.991 7	101.8

表 6 9 种 ARGs 相对含量范围  
Tab.6 Relative contents range of 9 antimicrobial resistant genes/(copies/16S rDNA)

基因 Gene	虾苗 Postlarvae		成虾 Adult shrimp	
	最小值 Minimum	最大值 Maximum	最小值 Minimum	最大值 Maximum
<i>tetA</i>	3.82×10 <sup>-5</sup>	1.29×10 <sup>-2</sup>	0	3.35×10 <sup>-4</sup>
<i>tetG</i>	6.15×10 <sup>-4</sup>	4.78×10 <sup>-2</sup>	4.62×10 <sup>-6</sup>	8.83×10 <sup>-5</sup>
<i>qnrA</i>	0	8.34×10 <sup>-4</sup>	0	3.68×10 <sup>-3</sup>
<i>qnrS</i>	1.10×10 <sup>-5</sup>	3.41×10 <sup>-3</sup>	3.33×10 <sup>-7</sup>	1.82×10 <sup>-4</sup>
<i>cmle3</i>	1.05×10 <sup>-2</sup>	8.46×10 <sup>-1</sup>	5.90×10 <sup>-5</sup>	4.61×10 <sup>-3</sup>
<i>floR</i>	3.87×10 <sup>-4</sup>	6.27×10 <sup>-2</sup>	5.51×10 <sup>-6</sup>	9.64×10 <sup>-5</sup>
<i>aadA</i>	1.37×10 <sup>-4</sup>	7.19×10 <sup>-3</sup>	2.72×10 <sup>-6</sup>	2.13×10 <sup>-3</sup>
<i>sul1</i>	1.57×10 <sup>-4</sup>	1.61×10 <sup>-3</sup>	3.53×10 <sup>-5</sup>	6.28×10 <sup>-4</sup>
<i>sul2</i>	6.98×10 <sup>-4</sup>	2.93×10 <sup>-2</sup>	0	6.12×10 <sup>-5</sup>

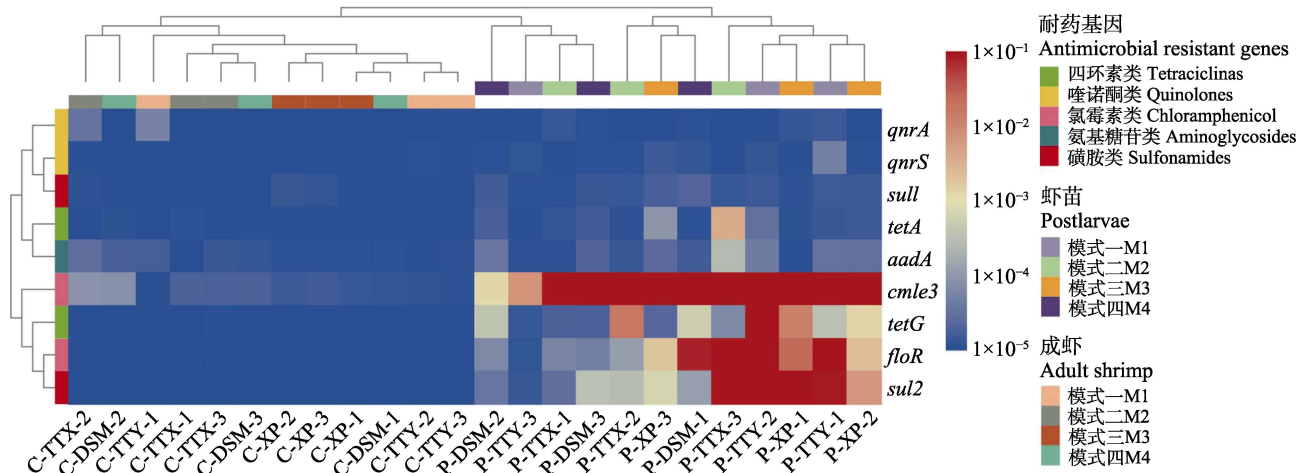


图 2 9 种 ARGs 的丰度热图  
Fig.2 Heat map of abundance of 9 antimicrobial resistant genes

### 3 讨论

#### 3.1 凡纳滨对虾肠道可培养细菌

张盛静等(2015)研究表明, 凡纳滨对虾在苗种阶段肠道内可培养的细菌属包括弧菌属、发光杆菌属、芽孢杆菌属和盐单胞菌属(*Halomonas*)等, 其中弧菌属占绝对优势, 养成阶段肠道内可培养的细菌属包括乳球菌属(*Lactococcus*)、弧菌属、芽孢杆菌属、发光杆菌属、希瓦氏菌属、节杆菌属(*Arthrobacter*)、微杆菌属(*Microbacterium*)等。本研究结果与其相似, 部分种属之间的差异可能与养殖过程中微生态制剂使用较多(吴定心, 2016)和抗生素使用较少有关。

#### 3.2 可培养细菌抗生素耐药性

目前, 国内已批准的水产养殖用抗微生物药物有 12 种(农业农村部, 2020), 在鱼类细菌病的防控中起着重要作用。在我国部分养殖区(王志芳等, 2019; 李兆新等, 2018)的环境中能检出喹诺酮类、磺胺类、四环素类等抗生素残留, 且距离养殖区越近浓度越高, 呈现明显的时空分布特征(连璐璐, 2016)。持续性的低剂量抗生素胁迫, 会增强细菌耐受性和耐药性, 降低抗生素治疗效率。研究显示, 间歇性将 *E. coli* 群体暴露于氨苄青霉素(ampicillin)中, 其群体会对氨苄青霉素产生耐受性(Fridman *et al.*, 2014), 诱发菌株突变产生耐药性(Frimodt-Møller *et al.*, 2019)。给日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)长期投饲含安全剂量抗生素的日粮后, 会增加其体内细菌耐药性选择压力(Sun *et al.*, 2020)。因此, 必须重视细菌的耐药性。

本研究分离所得可培养细菌中对常见抗生素的耐药性均较低, 仅对四环素类和磺胺类抗生素存在一定的耐药性, 这与现实环境抗生素残留污染趋势类似(王志芳等, 2019; 李兆新等, 2018; 连璐璐, 2016), 提示, 这些细菌的耐药能力可能与自然环境中抗生素污染情况有关。另外, 成虾耐药菌占比较虾苗降低, 表明成虾肠道耐药菌污染程度较虾苗轻。

#### 3.3 ARGs 丰度差异

抗生素使用可增加 ARGs 丰度和多样性(Fridman *et al.*, 2014; Frimodt-Møller *et al.*, 2019)。已有文献报道在对虾体内、肠道及养殖环境中检测出多种抗生素 ARGs (Su *et al.*, 2017; 洪斌等, 2019), 整合子等一些移动基因原件(mobile genetic element, MGE)可促进 ARGs 在细菌间的传播(Mazel, 2006; Frost *et al.*, 2005)。天津地区水产养殖环境中, 磺胺类 ARGs *sul1* 和 *sul2* 丰度较高(Gao *et al.*, 2012); 对虾体内和养殖水

环境中优势 ARGs 分别为 *sul1*、*qnrD*、*cmlA*、*floR* (Su *et al.*, 2017)。本研究结果与前人研究结果类似, 其中, *floR* 和 *cmlE3* 丰度稍高, 可能与动物专用抗菌药氟苯尼考的使用有关, 而磺胺类和四环素类 ARGs 则可能来源于环境污染。另外, 研究还发现, 成虾样品的 ARGs 丰度均显著低于苗种样品( $P < 0.05$ ), 提示经过 1 个养殖周期, 对虾体内 ARGs 污染程度下降。

#### 3.4 细菌耐药性和 ARGs 关系分析

研究结果显示, 菌株对各大类抗生素的敏感性与其所对应的 ARGs 丰度并不能呈现完全一一对应的关系, 这与闫倩倩等(2020)、牛丽等(2019)和赵姝等(2019)等研究结果类似。如氟苯尼考和氯霉素的耐药菌占比都很低, 但 *floR* 和 *cmlE3* 丰度高。这可能是因为对虾肠道可培养细菌占肠道菌群的比例低, 且本研究仅针对肠道中可培养细菌展开耐药性研究, 因此二者结果存在差异。又如, 新霉素耐药菌占比较高, 但 *aadA* 丰度较低。这可能是因为细菌受到脂质层(Lambert, 2002)和抗渗屏障(McDonnell *et al.*, 1999)等因素的影响而表现出较强的耐药性, 或者该耐药能力由氨基糖苷类其他的 ARGs 所赋予。

研究发现, 多数细菌耐药性和 ARGs 丰度呈现出对应关系。如磺胺异恶唑、复方新诺明的耐药菌占比和 *sul2* 丰度表现相一致, 其来源可能与自然环境污染有关。环丙沙星、诺氟沙星耐药菌占比和 *qnrS*、*qnrA* 丰度都较低, 提示本地区凡纳滨对虾养殖业中, 这 2 类药物可能使用较少, 符合国家禁用这 2 种抗生素的规定, 也表明我国自 2017 年开展的水产养殖用药减量行动的效果逐步显现。

### 4 结论

本研究阐述了江苏地区 4 种养殖模式下, 凡纳滨对虾肠道细菌耐药性和 ARGs 丰度与不同生长阶段的关系。研究表明, 江苏地区 4 种养殖模式凡纳滨对虾肠道可培养细菌属为弧菌属; 成虾肠道可培养细菌种类和数量较虾苗显著上升( $P < 0.05$ ), 耐药菌占比降低, ARGs 丰度显著降低( $P < 0.05$ ); 各模式之间未见明显规律。研究结果显示, 各模式下成虾肠道细菌耐药性污染程度均小于虾苗, 提示, 科学、合理的养殖方法可能会降低凡纳滨对虾肠道可培养细菌的耐药性。

### 参 考 文 献

BACH H J, TOMANOVA J, SCHLOTTER M, *et al.* Enumeration of total bacteria and bacteria with genes for proteolytic

- activity in pure cultures and in environmental samples by quantitative PCR mediated amplification. *Journal of Microbiological Methods*, 2002, 49(3): 235–245
- Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China fishery statistical yearbook 2020. Beijing: China Agriculture Press, 2020, 21–27 [农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2020 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2020, 21–27]
- CHEN C, CHEN H, ZHANG Y, *et al.* TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Molecular Plant*, 2020, 13(8): 1194–1202
- CHUMPOL S, KANTACHOTE D, RATTANACHUAY P, *et al.* *In vitro* and *in vivo* selection of probiotic purple nonsulphur bacteria with an ability to inhibit shrimp pathogens: Acute hepatopancreatic necrosis disease-causing *Vibrio parahaemolyticus* and other vibrios. *Aquaculture Research*, 2017, 48(6): 3182–3197
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 2017, 20–36
- D’COSTA V M, MCGRANN K M, HUGHES D W, *et al.* Sampling the antibiotic resistome. *Science (New York, NY)*, 2006, 311(5759): 374–377
- FRIDMAN O, GOLDBERG A, RONIN I, *et al.* Optimization of lag time underlies antibiotic tolerance in evolved bacterial populations. *Nature*, 2014, 513(7518): 418–421
- FRIMODT-MØLLER J, LØBNER-OLESEN A. Efflux-pump upregulation: From tolerance to high-level antibiotic resistance? *Trends in Microbiology*, 2019, 27(4): 291–293
- FROST L S, LEPLAE R, SUMMERS A O, *et al.* Mobile genetic elements: The agents of open source evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(9): 722–732
- GAO P, MAO D, LUO Y, *et al.* Occurrence of sulfonamide and tetracycline-resistant bacteria and resistance genes in aquaculture environment. *Water Research*, 2012, 46(7): 2355–2364
- HE L Y, LIU Y S, SU H C, *et al.* Dissemination of antibiotic resistance genes in representative broiler feedlots environments: Identification of indicator ARGs and correlations with environmental variables. *Environmental Science and Technology*, 2014, 48(22): 13120–13129
- HE X L, XU Y B, CHEN J L, *et al.* Evolution of corresponding resistance genes in the water of fish tanks with multiple stresses of antibiotics and heavy metals. *Water Research*, 2017, 124: 39–48
- HONG B, NIU B, CHEN P, *et al.* Diversity of gut microbiota and antibiotic resistance genes in *Litopenaeus vannamei* and *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(5): 1347–1358 [洪斌, 牛犇, 陈萍, 等. 凡纳滨对虾和罗氏沼虾肠道微生物及抗生素抗性基因多样性分析. *水产学报*, 2019, 43(5): 1347–1358]
- LAMBERT P A. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, 92(S1): 46S–54S
- LEE C, CHEN I, YANG Y, *et al.* The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(34): 10798–10803
- LI Y, QU L Y, ZHU P F, *et al.* Distribution characteristics of antibiotic resistance bacteria and related resistance genes in mariculture area of Shandong. *Marine Environmental Science*, 2016, 35(1): 55–62 [李壹, 曲凌云, 朱鹏飞, 等. 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 Z X, DONG X, WU M M, *et al.* Quinolone residues in seawater of aquaculture area, Sanggou Bay, Yellow Sea, China. *Marine Environmental Science*, 2018, 37(2): 182–186, 192 [李兆新, 董晓, 吴蒙蒙, 等. 黄海桑沟湾养殖区海水中喹诺酮类抗生素的残留状况. *海洋环境科学*, 2018, 37(2): 182–186, 192]
- LIAN L L. Distribution of antibiotics in surface and core sediments from aquaculture areas. Master’s Thesis of Dalian University of Technology, 2016, 28–61 [连璐璐. 抗生素在滨海养殖区表层及柱状沉积物中的分布特征. 大连理工大学硕士研究生学位论文, 2016, 28–61]
- LIU W L, XU H, TANG Y, *et al.* The effect of diet with *Bacillus cereus* biofilm on the growth rate, disease resistance and intestinal microflora of *Litopenaeus vannamei*. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(4): 87–95 [刘文亮, 许华, 唐杨等. 饲料中补充蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)生物膜对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)生长、抗病力及其肠道微生物组成的影响. *渔业科学进展*, 2017, 38(4): 87–95]
- MAZEL D. Integrons: Agents of bacterial evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, 4(8): 608–620
- MCDONNELL G, RUSSELL A D. Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 1999, 12(1): 147–179
- Ministry of Agriculture and Rural Affairs. Guidance on aquaculture drug application, No.1, No.2, 2020. 2020, 3–4 [农业农村部. 水产养殖用药明白纸 2020 年 1、2 号. 2020, 3–4]
- NIU L, BA Y B, BAI F J, *et al.* Comparison of antimicrobial resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from different sources. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2019, 38(12): 9–16 [牛丽, 巴永兵, 白凤佳, 等. 不同来源副溶血性弧菌耐药情况比较. *食品与生物技术学报*, 2019, 38(12): 9–16]
- ÖSTERBLAD M, NORRDAHL K, KORPIMÄKI E, *et al.* How wild are wild mammals? *Nature*, 2001, 409: 37–38
- 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). *Water Research*, 2006, 40(12): 2427–2435
- SHANG H, WANG Y S, SHEN Z Y. National guide for clinical laboratory procedures. Beijing: People's Medical Publishing House, 2015, 21–33 [尚红, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程. 北京: 人民卫生出版社, 2015, 21–33]
- SU H C, LIU S, HU X J, *et al.* 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
- SUN S, KORHEINA D K A, FU H, *et al.* Chronic exposure to dietary antibiotics affects intestinal health and antibiotic resistance gene abundance in oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*), and provokes human health risk. *Science of the Total Environment*, 2020, 720: 137478
- WANG H P, YAN H, ZHAO J R, *et al.* Quantitative detection of six classes of antibiotic resistance and class I integrin genes in aquatic products. *Modern Food Science and Technology*, 2017, 33(5): 270–276 [王慧平, 闫鹤, 赵俊仁, 等. 水产品中 6 类抗生素抗性基因和 I 类整合子的定量检测. *现代食品科技*, 2017, 33(5): 270–276]
- WANG Z F, LEI Y, XIAO J, *et al.* Residue status of antibiotics in aquaculture ponds of main tilapia aquaculture areas in Guangxi. *Journal of Southern Agriculture*, 2019, 50(4): 891–897 [王志芳, 雷燕, 肖俊, 等. 广西罗非鱼主产区养殖池塘抗生素残留状况分析. *南方农业学报*, 2019, 50(4): 891–897]
- WU D X. Studies of effects on *Litopenaeus vannamei* bacterial ecology caused by probiotics application and mechanism of interactin between microalgae and probiotics. Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2016, 40–72 [吴定心. 微生物制剂对南美白对虾养殖体系微生态的影响及其与藻类关系的研究. 华中农业大学博士研究生学位论文, 2016, 40–72]
- YAN Q Q, LI B, LIAO M J, *et al.* 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 [闫倩倩, 李彬, 廖梅杰, 等. 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]
- ZHANG Q Y, ZHAO W W, WU W. Antibiotics resistance gene pollution and its research progress acheived in aquaculture environment. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2015, 17(6): 125–134 [张蹇月, 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 S J, ZHAO X J, SONG X L, *et al.* Analysis of the culturable bacteria's quantity and composition in the intestinal tract of cultivation shrimp. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2015, 24(2): 211–218 [张盛静, 赵小金, 宋晓玲, 等. 人工养殖对虾肠道内可培养细菌数量及组成分析. *上海海洋大学学报*, 2015, 24(2): 211–218]
- ZHANG Z, YANG Z Y, WANG Y G, *et al.* Effectiveness of garden burnet, *Sanguisorba officinalis* L., in controlling acute hepatopancreatic necrosis disease caused by infection of *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp farming. *Aquaculture*, 2021, 531: 735875
- ZHAO S, LI J, MA L C, *et al.* Analysis of phenotype and genotype in quinolone resistance in *Vibrio* from mairculture. *Marine Fisheries*, 2019, 41(4): 463–471 [赵姝, 李健, 马立才, 等. 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*, 2019, 41(4): 463–471]
- ZHU L D, CHEN K, XI B W, *et al.* *In vitro* antibacterial effect of fraxetin on pathogenic *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(5): 984–992 [朱璐丹, 陈凯, 习丙文, 等. 秦皮素的抑菌作用及其对嗜水气单胞菌毒力的影响. *中国水产科学*, 2019, 26(5): 984–992]

(编辑 马瑾艳)

## Study on Bacterial Resistance in *Litopenaeus vannamei* Intestinal Culturable Bacteria at Different Growth Stages

YANG Zeyu<sup>1,2</sup>, WAN Xihe<sup>1</sup>①, SHI Wenjun<sup>1</sup>, WANG Libao<sup>1</sup>, LI Hui<sup>1</sup>,  
SHEN Hui<sup>1</sup>, QIAO Yi<sup>1</sup>, JIANG Ge<sup>1</sup>, CHENG Jie<sup>1</sup>

(1. Jiangsu Institute of Marine Fisheries, Nantong, Jiangsu 226007, China;  
2. Aquatic Product Technology Extension Station of Gaoyou, Gaoyou, Jiangsu 225600, China)

**Abstract** *Litopenaeus vannamei* culturing industry is an important part of the rural economy in coastal areas. With the development of the shrimp farming industry, diseases breakout frequently. Antibiotic overuse can lead to bacterial antibiotic resistance and antibiotic resistance genes (ARGs). These then threatens human health and safety. Therefore, the evaluation of bacterial antibiotic resistance phenotypes and antibiotic ARG abundance can help to understand antibiotic pollution in specific areas. According to our preliminary investigation, more probiotics were used during *L. vannamei* culturing in Jiangsu Province. In order to avoid damaging the microbial community structure in ponds, less antibiotics were used during shrimp farming. To understand the relationship between bacterial resistance in *L. vannamei* intestinal culturable bacteria and different growth stages, four main culture models of *L. vannamei* in Jiangsu Province were selected as research objects. This study investigated the bacterial resistance to 12 antibiotics (tetracycline, doxycycline, florobenicol, chloramphenicol, sulfamethoxazole, cotrimoxazole, neomycin, gentamicin, ciprofloxacin, norfloxacin, ceftriaxone, and cefotaxime) and the abundance of nine ARGs (*tetA*, *tetG*, *qnrA*, *qnrS*, *cmlE3*, *floR*, *aadA*, *sul1*, and *sul2*) of the intestinal culturable bacteria in samples using the K-B disc diffusion method and qRT-PCR technology. The results showed that *Vibrio* was the dominant bacterial genus among the shrimp intestinal culturable bacteria in different aquaculture models. The species and quantity of culturable bacteria in adult shrimp intestines increased significantly compared to those in post-larvae intestines ( $P < 0.05$ ). The proportion of antibiotic resistant bacteria decreased. The abundance of ARGs declined significantly ( $P < 0.05$ ). No obvious regularity was observed among the different aquaculture models. The antimicrobial resistance and abundance of ARGs in the intestinal bacteria of adult shrimp were lower than those in juvenile shrimp under different aquaculture patterns, indicating that reducing the use of antibiotics by administering probiotics may reduce the resistance of culturable bacteria in the intestinal tract of *L. vannamei*. In future research, the differences in the bacterial antibiotic resistance and ARG abundance in the intestinal tract of *L. vannamei* under different aquaculture models can be further explored by combining the methods of metagenomics.

**Key words** *Litopenaeus vannamei*; Bacterial antibiotic resistance; Antibiotic resistance genes (ARGs); qRT-PCR

① Corresponding author: WAN Xihe, E-mail: wxh1708@163.com