广州市售鱼、虾、蛤蚌中四环素耐药菌及四环素耐药基因的研究

余丽，熊丽娜，石磊，叶蕾

（华南理工大学轻工与食品学院，广东广州 510640）

摘要：本文以广州市大型超市的鱼、虾、蛤蚌为研究对象，研究其四环素耐药菌的分布及四环素耐药基因的携带情况。采用平板涂布法分离四环素耐药菌并统计菌落数，计数结果在 10^2~10^6 CFU/g 之间，其中鱼肠中四环素耐药菌的数量达 10^6 CFU/g。通过 PCR 对样本总 DNA 中四环素耐药基因的携带情况进行检测，发现每个样本均携带多个（3~7 个）四环素耐药基因。9 种四环素耐药基因中，*tet*(E)的检出率最高 6.3%，其次分别为 *tet*(S) (5.1%)，*tet*(M) (3.1%)，*tet*(C) (1.7%)和 *tet*(G) (0.9%)。Southern 杂交试验表明四环素抗性菌株 *Aeromonas* spp.和 *Escherichia coli* 携带的耐药基因 *tet*(E)存在于质粒上；在无四环素选择压力下对上述两种菌株进行连续传代，其耐药质粒仍稳定存在于菌株中。本研究表明广州市售鱼、虾、蛤蚌中分离得到的细菌对四环素耐药情况较为严重，应得到相关监管部门以及消费者的足够重视。

关键词：水产品；四环素耐药性；质粒

文章篇号：1673-9078(2016)10-239-245 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.10.036

Tetracycline-resistant Bacteria and Tetracycline-resistant Genes from Fish, Shrimp, and Clams in Guangzhou

YU Li, XIONG Li-na, SHI Lei, YE Lei

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Aquatic products (fish, shrimps, and clams) from markets in Guangzhou (Guangdong Province) were tested to determine the presence and distribution of tetracycline (Tet)-resistant (Tet^r) genes and bacterial species. The plate-spread method was employed to isolate Tet-resistant bacterial species, allowing detection of 10^2 CFU to 10^6 CFU/g Tet^r bacteria, with the highest number of Tet^r-bacteria counts (10^6 CFU/g) detected in fish intestines. Conventional polymerase chain reaction (PCR) was conducted on total DNA extracted from product tissues (muscles or intestines) to detect the presence of selected Tet^r genes. Results indicated that all host-related samples (tissue and tank water) expressed three to seven Tet^r genes. Among nine Tet^r genes in this study, *tet*(E) was found at the highest frequency (6.3%), followed by *tet*(S) (5.1%), *tet*(M) (3.1%), *tet*(C) (1.7%), and *tet*(G) (0.9%). Southern hybridization showed that *tet*(E) genes were integrated into the plasmid of Tet-resistant bacteria species *Aeromonas* spp. and *Escherichia coli*. Additionally, the Tet-resistant plasmids exhibited good stability, even in the absence of Tet-selective pressure. These results indicated that Tet-resistance was common and serious among bacteria isolated from fish, shrimp, and clams collected from markets in Guangzhou.

Key words: aquatic products; tetracycline-resistant genes; plasmid

中国是水产品的主要出口国，全球约 70%的水产品由中国供应（FAO，2007）。水产养殖业的主要威胁之一为细菌引起的传染性疾病，如由条件致病菌 *Aeromonas* spp.，*Vibrio* spp.，*Pseudomonas* spp.以及 *Flavobacterium* spp.等引起的细菌性疾病[1]；水产养殖业大范围地使用抗生素预防和治疗细菌性疾病可维持可观的产量，但抗生素的使用未得到国家和产业机构的严格管制，因而出现使用不当和滥用的现象。

随着抗生素的广泛使用，细菌耐药问题愈发严重。研究表明不同类型的水产养殖品普遍存在耐药菌，而养殖环境及水产品是耐药基因的主要来源之一[2]。耐药基因能在不同菌属间进行水平转移，Furushita M.等发现 *Photobacterium*，*Vibrio*，*Pseudomonas*，

收稿日期：2015-08-09

基金项目：中央高校基本科研业务费专项资金资助项目（2015ZM063）；中国博士后科学基金项目（2015M580723）；国家自然科学基金项目（31571934）；广东省科技计划项目（2014A020214001）

作者简介：余丽（1991-），女，在读研究生，主要从事微生物食品安全研究

通讯作者：叶蕾（1983-），女，博士，助理研究员，主要从事食品微生物研究

Alteromonas，*Citrobacter* 以及 *Salmonella* spp.可将多耐药质粒转移给 *Escherichia coli*[3]。此外，Guglielmetti 等研究表明鱼肠道内细菌所携带的耐药基因有可能传播到人体的致病菌中，给人类健康和生态安全带来潜在威胁[4]。细菌耐药问题对人们健康所带来的危害日益严重，携带耐药基因的细菌进入人体将可能导致抗生素在治疗时失去疗效，对人类健康造成不良影响[5]。

四环素自 1940 年被发现以来已被成功应用于治疗一系列动物性传染疾病，四环素类抗生素是养殖业中应用最广泛的抗生素之一。据统计，2009 年美国养殖业使用的四环素类抗生素为 4611892 kg（FDA，2010）；四环素类抗生素在中国也已成为养殖业使用量最多的抗生素。有研究表明鱼虾中分离出的四环素耐药菌携带的四环素耐药基因主要包括 *tet*(B)，*tet*(M)，*tet*(L)，*tet*(S)，*tet*(D)，*tet*(H)，和 *tet*(A)[6,7]。

本研究针对我国广州市消费市场水产品（鱼、虾和蛤蚌）中四环素耐药菌的菌群类型及其耐药基因的携带情况进行分析，旨在揭示广州市水产品中四环素耐药菌及其耐药基因的分布规律，进而为市售水产品的安全评价体系提供有效参考。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2013 年 12 月从广州不同超市采集新鲜的鱼（3 份）、虾（2 份）和蛤蚌（2 份），以及各自养殖池中的养殖水（6 份）共（13 份）。所采集的水产品均为活的鱼、虾和蛤蚌，样品在 2 h 内运送至实验室进行后续操作。本实验采集的水产品类型主要为非洲鲫鱼、鲶鱼、对虾和蛤蚌。

1.2 主要试剂和仪器

1.2.1 主要试剂

蛋白胨，美国 Bacton Dickinson 公司；脑心血浸出培养基，美国 BactonDickinson 公司；四环素，放线菌酮均购自德国 Sigma 公司；琼脂糖，日本 TaKaRa 公司；DIG DNA Labeling and Detection kit，瑞士罗氏公司；扩增引物，华大基因公司；PCRMix，日本 TaKaRa 公司。

1.2.2 仪器设备

生物安全柜，美国 Baker 公司；恒温培养箱，德国 Binder 公司；高速冷冻台式离心机，美国 Thermo 公司；高压消毒柜，美国 AMSCO 公司；BioSpec Mini-BeadbeaterTM，美国 Bartlesville 公司；GeneAmp PCR system 2700，美国 Applied Biosystems 公司；Gel Doc EQ 凝胶成像系统，美国 BIO-RAD 公司；核酸电泳仪，美国 BIO-RAD 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 样品前处理

砧板、解剖刀、镊子等器具高压灭菌处理，样品解剖过程严格无菌操作。

鱼类样品的处理：解剖刀去掉鱼鳞，切下约 10 g 连皮鱼肉，放入一次性无菌食品封口袋。加入 10 倍体积 0.1%的蛋白胨水，拍打仪拍打 2 min 后收集上清液。解剖刀剖开鱼腹，无菌镊子取出鱼肠，放入一次性无菌食品封口袋。称重并加入 10 倍体积 0.1%的蛋白胨水，拍打仪拍打 2 min 后收集上清液。

虾类样品的处理：取 10 g 虾肉放入一次性无菌食品封口袋，加入 10 倍体积 0.1%的蛋白胨水，拍打仪拍打 2 min 后收集上清液。

贝类样品的处理：解剖刀取出贝肉，放入一次性无菌食品封口袋。称重并加入 10 倍体积 0.1%的蛋白胨水，拍打仪拍打 2 min 后收集上清液。

养殖水 8000 r/min 离心 15 min，弃上清，沉淀用 0.1%无菌蛋白胨水重悬。

1.3.2 细菌的分离与培养

均质化的组织样本和重悬的养殖水连续 10 倍梯度稀释。选取 4 个适宜的稀释度，取 0.1 mL 均匀涂布于 BHI 培养平板（100 μg/mL 放线菌酮）以及四环素 BHI 培养平板（16 μg/mL 四环素，100 μg/mL 放线菌酮），37 ℃培养 48 h。以本实验室保藏的突变链球菌 UA159（*Streptococcus mutans* UA159）作为阴性对照；每个样本设置 2 个重复，菌落计数结果取两次重复的均值。用无菌牙签从 BHI 四环素平板中随机挑选外观形态不同的 50~100 个单菌落分别接种入 BHI 四环素平板，置于 37 ℃恒温培养箱中培养 24~48 h。

1.3.3 DNA 提取

参照文献报道的磁珠破碎法进行样本总 DNA 的提取[8]。0.3 g 肉组织或肠组织放入含 0.3 g、0.1 mm 和 0.1 g、0.5 mm 玻璃珠的无菌离心管中，加入 1 mLDNA 裂解液(500 mM NaCl，50 mM Tris-HCl，pH 8.0、50 mM EDTA 和 4% sodium dodecyl sulfate (SDS))。将混合物放入 BioSpec Mini-BeadbeaterTM 中最大转速均质 3 min；均质物 70 ℃水浴 15 min，4 ℃、13000 r/min 离心 5 min。上清转入无菌离心管，加入 260 μL、10 M 醋酸铵，混合均匀后冰浴 5 min，4 ℃、13000 r/min 离心 15 min，收集上清。加入等体积的异丙醇并混匀，冰浴 30 min，4 ℃、13000 r/min 离心 15 min，丢弃上清。沉淀自然干燥，干燥后加入 100 μL 无菌 TE 缓冲

液即为提取的 DNA 样本，-20 ℃保存备用。

将保存的菌株接种于BHI四环素培养基上进行菌落扩增，收集的菌落加入 300 μL 无菌去离子水重悬。按 1:1 的比例加入 100 mg 无菌 0.1 mm 和 0.5 mm 玻璃珠，放入 BioSpec Mini-BeadbeaterTM 中最大转速均质 2 min，沸水浴 10~15 min；4 ℃、13000 r/min 离心 15 min，收集上清即为提取的 DNA 样本，-20 ℃保存备用。

1.3.4 聚合酶链式反应（PCR）检测四环素耐药基因

采用 PCR 检测样本组织及分离出的四环素耐药菌中四环素耐药基因的分布。特异性 PCR 引物见表 1，阳性扩增产物及 16S rRNA 的扩增片段送往上海美吉生物医药科技有限公司进行测序。测序结果利用 Chromas、DNAman 等软件分析，同时利用 GenBank 数据库（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/）进行比对以鉴定四环素耐药菌株的类型。

表 1 四环素耐药基因及 16S rRNA 特异性引物序列

Table 1 Tet^r genes and 16S rRNA-specific primers used in the present study

靶基因	引物	序列(5′-3′)	退火温度 T_m/℃	扩增片段/bp	参考文献
tet(B)	*tet*(B)FP	CCCAGTGCTGTTGTTGTCAT	50	723	[9]
	tet(B)RP	CCACCACCAGCCAATAAAAT			
tet(C)	*tet*(C)FP	TTG CGGGATATCGTCCATTC	50	1019	[9]
	tet(C)RP	CAT GCCAACCCG TTCCATGT			
tet(D)	*tet*(D)FP	CTGGGCAGATGGTCAGATAA	50	832	[9]
	tet(D)RP	TGACCAGCACACCCTGTAGT			
tet(E)	*tet*(E)FP	CGTCGCCCTGTATTGTTACT	50	814	[9]
	tet(E)RP	TGGTCAGCACCCCTTGTA AT			
tet(G)	*tet*(G)FP	AGCAGGTCGCTGGACACTAT	50	623	[9]
	tet(G)RP	CGCGGT GTTCCACTGAAA AC			
tet(K)	*tet*(K)FP	AGGATAGCCATGGCTACAAG	50	981	[10]
	tet(K)RP	ACAAGGAGTAGGATCTGCTG			
tet(L)	*tet*(L)FP	TTGGATCGATAGTAGCC	50	908	[10]
	tet(L)RP	GTAACCAGCCAACTAATGAC			
tet(M)	*tet*(M)FP	CGAACAAGAGGAAAGCATAAG	50	974	[10]
	tet(M)RP	CAATACAATAGGAGCAAGC			
tet(S)	*tet*(S)FP	GAACGCCAGAGAGGTATT	50	1050	[10]
	tet(S)RP	TACCTCCATTTGGACCTCAC			
16Sr RNA	16Sr RNA FP	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	55	1498	[10]
	16Sr RNA RP	TACCTTGTTACGACTT			

注：FP，正向引物；RP，反向引物。

1.3.5 质粒提取及地高辛标记 DNA 探针的制备

挑取耐药细菌，接种 BHI 抗性液体培养基（16 μg/mL），37 ℃过夜培养收集菌体。参照文献报道的方法[11]进行质粒提取，提取的质粒于-20 ℃保存备用。DNA 探针的制备：PCR 管中加入耐药菌株 DNA 模板 15 μL，沸水浴 10 min 使模板 DNA 变性后立即冰浴冷却；再加入 2 μL Hexanucleotide Mix、2 μL Dntp Labeling Mix、1 μL Klenow enzyme labeling grade，混合均匀于 37 ℃孵育过夜，65 ℃加热 10 min 终止标记反应。

1.3.6 Southern 杂交反应

操作流程参照 DIG DNA Labeling and Detection kit 试剂盒说明书进行。经琼脂糖凝胶电泳分离的质粒 DNA 浸入酸性变性液（0.2 M HCl）充分变性，随后浸入碱性缓冲液（0.4 M NaOH，1 M Nacl）待转膜。剪裁合适的尼龙膜，减去一角做方位标记，然后将膜在去离子水中浸泡 5 min，随后转入碱性缓冲液。将一洗净玻璃板放入磁盘中，倒入适量碱性缓冲液，在玻璃板上架两层长滤纸搭成盐桥。尼龙膜正面向下，紧贴于胶（防止产生气泡）；上压三张同样大小的转膜纸，在转膜纸上堆积吸水纸，再放一小玻璃板，板上加 500 g 左右的重物。转膜 16~20 h 后，取下尼龙膜，对胶进行染色，检查转膜效果。杂交及显影步骤参照

试剂盒说明书。

1.3.7 无四环素选择压力下耐药性的稳定性评价

耐药质粒稳定性试验参照文献报道的方法进行[10]。将携带四环素耐药质粒的菌株在不含四环素的BHI液体培养基中连续传代，每12 h传代接种一次，接种量为1:100，培养条件为37 ℃、180 r/min。至少传400代后，将传代的培养液连续10倍稀释，涂布在BHI平板。挑选合适的稀释度平板，随机挑取50个传代单菌落分别接种四环素 BHI 平板和不含四环素的BHI平板，37 ℃培养24 h。

2 结果与讨论

2.1 四环素耐药菌的分离培养

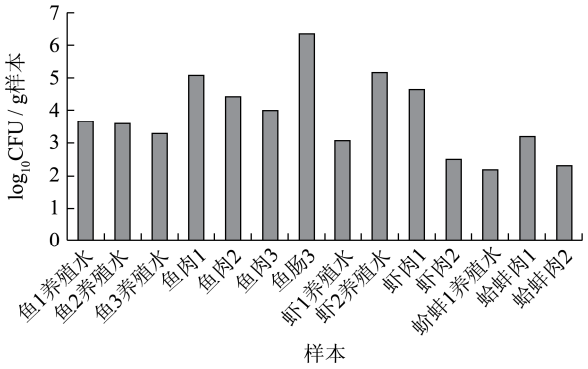


图1 水产品中四环素耐药菌的分布

Fig.1 Prevalence of Tet^r bacteria in aquatic products

从本次研究采集的鱼、虾和蛤蚌中均分离出四环素耐药菌，耐药菌计数结果见图1。由图1可知，耐药菌总数在10^2~10^6 CFU/g之间，鱼肠中四环素耐药菌的数量达10^6 CFU/g；除虾样本2外，其余样本的肉组织比各自的养殖水分离的四环素耐药菌多。以上结果显示超市采集的鱼、虾和蛤蚌样本携带有高水平的四环素耐药菌，人们食用的这些食品存在四环素耐药菌的污染。值得注意的是细菌的培养条件受到限制（如温度、营养条件以及含氧量等），本研究中检出的四环素耐药菌仅代表这些样本中所有四环素耐药菌中的一部分。

中国主要水产品养殖区位于长江中下游流域和珠江三角洲，该区域的大型水产市场为数百万本国居民和外国游客提供水产品[12]，而其中鱼、虾和蛤蚌等产品占很大比例。M.Guarddon等采用菌落平板计数法及实时荧光定量PCR法对10份鱼样本中四环素耐药菌进行分析，检出量为10^2~10^5 CFU/g[13]。本研究中不同水产品（鱼、虾和蛤蚌）四环素耐药菌的检出量为10^2~10^6 CFU/g，样品中四环素耐药菌的高分离率表明其受到四环素耐药菌的高度污染。

2.2 四环素耐药基因的分布

提取样品组织和养殖水中细菌的总 DNA，通过PCR检测四环素耐药基因的分布情况，结果如表2所示。从表中可得出，所检测的样本（组织和养殖水）均携带多个（3~7个）四环素耐药基因。*tet*(G)和*tet*(M)在所有样品中均被检出，*tet*(C)、*tet*(E)、*tet*(K)和*tet*(S)在多数样品中被检出；*tet*(B)、*tet*(D)、*tet*(L)的检出率较低，*tet*(B)只在鱼和虾的养殖水中检出，*tet*(D)在虾和蛤蚌养殖水中检出，而*tet*(L)只在虾肉中检出。

表2 PCR扩增检测样本总DNA中四环素耐药基因的分布

Table 2 PCR detection of Tet^r genes in total DNA extracted from host-related samples

		样本												
		鱼						虾				蛤蚌		
		1		2		3		1		2		1		2
		TW	M	TW	M	I	M	TW	M	TW	M	TW	M	M
四环素耐药基因	*tet*(B)	+								+				
	tet(C)	+	+	+	+	+		+				+	+	+
	tet(D)									+		+		
	tet(E)	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+
	tet(G)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	tet(K)	+				+	+			+	+	+		+
	tet(L)										+			
	tet(M)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	tet(S)	+	+	+				+	+		+	+	+	+

注：TW，养殖水；M，样本肉组织；I，样本肠组织。

四环素耐药基因 *tet*(M)通常存在于接合转座子 Tn1545/916 上，而 Tn1545/916 是广泛的宿主载体，至少能在 24 种不同的种属细菌间进行转移[14]。本研究中 *tet*(M)的高检出率（100%）表明水产食品受到 *tet*(M)耐药基因的高度污染。

2.3 四环素耐药菌株中四环素耐药基因的鉴定

从选择培养基上随机挑取形态特征不同的 350 个菌落进行分离纯化，提取纯化后菌株的基因组 DNA，通过 PCR 检测耐药菌株所携带的四环素耐药基因类型（表 3）。所检测的分离菌株中有 14.2%(50/350)的细菌携带一个或多个四环素耐药基因。检出的四环素耐药基因中，*tet*(E)和 *tet*(S)是最常见的，*tet*(E)分离率最高（6.3%），其次分别为 *tet*(S)(5.1%)，*tet*(M)(3.1%)，*tet*(C)(1.7%)和 *tet*(G)(0.9%)。经 16S rRNA 鉴定，携带 *tet*(E)基因的菌株为 *Aeromonas* spp.，*Escherichia coli* 和 *Lactococcus* sp.；而携带 *tet*(S)基因的菌株为 *Lactococcus raffinolactis*，*Enterococcus aerogenes.*，*Brochothrix thermosphacta*，*Lactococcus* sp. 和 *Lactococcus Lactis*。

表 3 样本组织中部分四环素耐药菌及所携带的耐药基因

Table 3 Tet^r genes and bacterial species identified from selected host-related samples

样本	耐药基因	16SrRNA 鉴定
鱼养殖水	*tet*(E)	*Aeromonas* spp., *Escherichia coli*
	tet(S)	*Lactococcus raffinolactis, Enterobacter aerogenes*
	ND	*Acinetobacter* sp., *Citrobacter sp., Lactococcus* sp., *Cronobacter sakazakii*
虾养殖水	*tet*(E)	*Aeromonas* spp.
	tet(S)	*Brochothrix thermosphacta*
	ND	*Chryseobacterium* sp.
鱼肉	*tet*(S)	*Lactococcus lactis*
	ND	*Citrobacter* sp.
蛤蚌肉	*tet*(E) /(S)	*Lactococcus* sp.
	tet(E)	*Aeromonas hydophila, Aeromonas media*
	ND	*Weissella paramesenteroides*

注：ND，未检测到四环素耐药基因。

本研究四环素耐药分离菌株中四环素耐药基因检出率最高的是*tet*(E)（6.3%），这和Nonaka L.等检测结果有所差别[15,16]。本研究从鱼养殖水、虾养殖水和蛤蚌肉中均分离培养得到*Aeromonas* spp.并均检出该菌属携带*tet*(E)耐药基因；Agerso et al.等（2007）研究发现鱼养殖场分离出的*Aeromonas* spp.中*tet*(E)耐药基因呈高检出率的趋势[17]，这与本次实验研究结果一致。此外，有研究表明鱼肠道中的乳酸乳球菌（*Lactococcus* sp.）可作为益生菌产生抗菌化合物抑制肠道内有害菌群的生长，对鱼的生长有潜在的保护作用[18]。但本研究从鱼样本和蛤蚌样本中分离出的*Lactococcus* sp.菌株携带有2种四环素耐药基因*tet*(S)和*tet*(E)，这表明益生菌类也能成为耐药基因的携带菌体。

2.4 质粒提取和 Southern 杂交结果分析

为确定本研究中耐药基因 *tet*(E)的存在位置（质粒或染色体上），对携带 *tet*(E)基因的抗性菌株 *Aeromonas* spp.，*Escherichia coli* 进行质粒提取；同时以无四环素抗性的 *E.coli* 和有四环素抗性但无耐药基因 *tet*(E)的 *Lactococcus lactis* 作为阴性对照。利用 *tet*(E)基因的 DNA 探针通过 Southern 杂交发现 *Aeromonas* spp.和 *Escherichia coli* 携带的耐药基因 *tet*(E)存在于质粒上；质粒电泳和 Southern 杂交实验结果如图 2 所示。

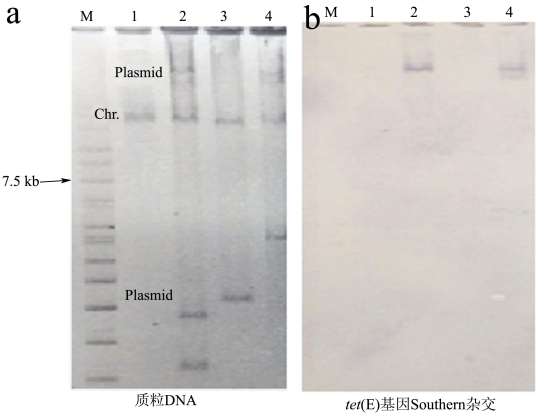


图 2 耐药菌株质粒电泳和相应的 Southern 杂交图谱

Fig.2 Electrophoresis of resistant bacterial plasmids and corresponding Southern blot results

注：1，*E.coli* 阴性对照；2，*Aeromonas* spp.；3，*Lactococcus lactis*；4，*Escherichia coli*；Maker：D15000；Chr，染色体基因。

目前食源性耐药菌的机理研究中，质粒传播造成的耐药基因在细菌中的转移和转化是引起耐药性广泛传播的主要原因；质粒的可移动性使其成为各种耐药基因的最佳载体。本研究发现四环素抗性菌株 *Aeromonas* spp.和 *Escherichia coli* 携带的四环素耐药基因 *tet*(E)存在于质粒上。Rhodes 等研究发现携带四环素耐药基因的质粒能在 *Aeromonas* spp. 和 *Escherichia coli* 间进行传播，同时也能在不同地理区域的水产养殖环境和人之间进行传播[19]。因此，位于可移动质粒上的耐药基因应引起人们的足够重视。

2.5 耐药性稳定性评价

携带 *tet*(E)基因的菌株 *Aeromonas* spp. 和 *Escherichia coli* 在不添加四环素选择压力的 BHI 液体培养基中连续传 400 代后，随机挑选各个菌株的 50 个单菌落均能在四环素 BHI 固体平板上正常生长，且质粒条带没有发生变化。实验结果表明，在没有添加四环素选择压力的情况下，耐药菌株中编码四环素抗性的耐药质粒仍具有高稳定性，并没有在不断传代中丢失。

3 结论

3.1 本研究所有样品中均分离出四环素耐药菌，耐药菌污染程度为 10^2~10^6 CFU/g，其中鱼肠中四环素耐药菌的数量达 10^6 CFU/g。通过 PCR 检测样本总 DNA 中四环素耐药基因分布情况，结果显示各个样本均携带多个(3~7 个)四环素耐药基因，其中 *tet*(G)和 *tet*(M)在所有样品中均被检出。四环素抗性分离株中四环素耐药基因检出率最高的是 *tet*(E)(6.3%)，其次分别为 *tet*(S)(5.1%)，*tet*(M)(3.1%)，*tet*(C)(1.7%)和 *tet*(G)(0.9%)；其中携带 *tet*(E)基因的菌株主要是 *Aeromonas* spp.，携带 *tet*(S)基因的菌株主要是 *Lactococcus* sp.。虽然目前市售鱼、虾和蛤蚌中分离出的细菌四环素耐药情况较为严重，但消费者如果在食用之前将其充分加热能够很好的杀灭其中的细菌，这样就可以减少耐药细菌及有害细菌对消费者身体健康带来的不良影响。

3.2 运用 Southern 杂交试验发现四环素抗性菌株 *Aeromonas* spp.和 *Escherichia coli* 携带的耐药基因 *tet*(E)存在于质粒上；在无四环素选择压力下连续传代，耐药质粒未丢失，具有较高的稳定性。质粒携带的耐药基因可随移动遗传元件（转座子、插入序列）在细菌间发生水平转移，促进耐药基因的扩散，这是细菌产生耐药性的主要威胁[20]。

3.3 本研究表明广州超市新鲜的鱼、虾、蛤蚌中分离得到的细菌普遍对四环素具有耐药性。尽管本研究中采集的水产品样品数量较少，但也从一定程度上反映了广州市售水产品的微生物安全状况不容乐观。为保障消费者的饮食安全，避免食源性疾病的发生，相关部门应加强对水产品市场卫生环境的监督检查。同时，应加强水产品养殖过程中抗生素使用的监管及耐药性分析的实施，严格监控食品安全问题，保障人们的饮食安全。

参考文献

[1] Akinbowale O L, H Peng, M D Barton. Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from aquaculture sources in Australia [J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 103(5): 2016-2025

[2] Nawaz M, Khan Ashraf A, Khan Saeed, et al. Molecular characterization of tetracycline-resistant genes and integrons from avirulent strains of escherichia coli isolated from catfish [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2009, 6(5): 553-559

[3] Furushita M, Shiba T, Maeda T, et al. Similarity of tetracycline resistance genes isolated from fish farm bacteria to those from clinical isolates [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(9): 5336-5342

[4] Guglielmetti E, Korhonen Jenni M, Heikkinen Jouni, et al. Transfer of plasmid-mediated resistance to tetracycline in pathogenic bacteria from fish and aquaculture environments [J]. FEMS Microbiology Letters, 2009 ,293(1): 28-34

[5] Gevers D, Danielsen M, Huys G, et al. Molecular characterization of tet (M) genes in *Lactobacillus* isolates from different types of fermented dry sausage [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2003, 69(2): 1270-5

[6] Harnisz M, Korzeniewska Ewa, Ciesielski Slawomir, et al. Tet genes as indicators of changes in the water environment: Relationships between culture-dependent and culture-independent approaches [J]. Science of the Total Environment, 2015, 505: 704-711

[7] Tusevljak N, Dutil L, Rajic A, et al. Antimicrobial use and resistance in aquaculture: findings of a globally administered survey of aquaculture-allied professionals [J]. Zoonoses And Public Health, 2013, 60(6): 426-436

[8] Wang H H, Manuzon M, Lehman M, et al. Food commensal microbes as a potentially important avenue in transmitting antibiotic resistance genes [J]. FEMS Microbiology Letters, 2006 ,255(2): 328-328

[9] Chen S, Zhao S H, White D G, et al. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella serovars* isolated from retail meats [J]. Applied and Environmental

Microbiology, 2004, 70(1): 1-7

[10] Li X, H H Wang, Tetracycline resistance associated with commensal bacteria from representative ready-to-consume deli and restaurant foods [J]. Journal of Food Protection, 2010, 73(10): 1841-1848

[11] Anderson D G, L L McKay. Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1983, 46(3): 549-52

[12] 蒋逸民,慕永通.中国海水产品产量与结构变动趋势研究[J]. 沈阳农业大学学报:社会科学版,2012,14(1):41-44
JIANG Yi-min, MU Yong-tong. Marine products production and structure change trend research of china [J]. Journal of Shenyang Agricultural University (Social Sciences Edition), 2012, 14(1): 41-44

[13] Guarddon M, Miranda J M, Rodriguez J A, et al. Real-time polymerase chain reaction for the quantitative detection of tetA and tetB bacterial tetracycline resistance genes in food [J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 146(3): 284-289

[14] Clewell D B, S E Flannagan, D D Jaworski. Unconstrained bacterial promiscuity: the Tn916-Tn1545 family of conjugative transposons [J]. Trends in Microbiology, 1995, 3(6): 229-36

[15] Nonaka L, Maruyama Fumito, Onishi Yuki, et al. Various pAQU plasmids possibly contribute to disseminate tetracycline resistance gene tet (M) among marine bacterial community [J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5(6): 152-152

[16] Nonaka L, K Ikeno, S Suzuki. Distribution of tetracycline resistance gene, tet (M), in Gram-positive and Gram-negative bacteria isolated from sediment and seawater at a coastal aquaculture site in Japan [J]. Microbes and Environments, 2007, 22(4): 355-364

[17] Agerso Y, Bruun Morten Sichlau, Dalsgaard Inger, et al. The tetracycline resistance gene tet (E) is frequently occurring and present on large horizontally transferable plasmids in *Aeromonas* spp. from fish farms [J]. Aquaculture, 2007, 266(1-4): 47-52

[18] Lazado C C, C M A Caipang. Mucosal immunity and probiotics in fish [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 39(1): 78-89

[19] Rhodes G, Huys G, Swings J, et al. Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between aeromonads in hospital and aquaculture environments: implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant tet A [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2000, 66(9): 3883-90

[20] Thomas C M, K M Nielsen. Mechanisms of and barriers to horizontal gene transfer between bacteria [J]. Nature Reviews Microbiology, 2005, 3(9): 711-721

现代食品科技