

# 水产品中 6 类抗生素抗性基因和 I 类整合子的定量检测

王慧平<sup>1</sup>, 闫鹤<sup>1</sup>, 赵俊仁<sup>2</sup>, 石磊<sup>3</sup>

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640) (2. 广东石油化工学院环境与生物工程学院, 广东茂名 525000) (3. 暨南大学食品学院, 广东广州 510632)

**摘要:** 论文选取广州市天河区两家菜市场、一家海鲜市场和三家超市的 48 份水产品为研究对象, 提取了三种不同水产品: 虾、鱼和贝类的总 DNA, 采用实时荧光定量 PCR(Quantitative Real-time PCR)法, 对市售水产品中 6 类抗生素抗性基因(Antibiotic Resistance Genes, ARGs): *tetA*、*tetB*、*tetM*、*sullI*、*floR*、*aphA-1*、*aadA*、*ermB*、*cmlA* 和 I 类整合子 5' 端整合酶基因 *intI1*、3' 端磺胺耐药基因 *sull*、季铵盐化合物及溴化乙锭的耐药基因 *qacEAI* 进行定量。研究显示: 6 类 ARGs 及 I 类整合子基因在水产品中均有检出, 基因拷贝数大小从  $10^2 \sim 10^8$  跨越七个数量级, 最小值为  $1.86 \times 10^2$  copies/g, 最大值为  $8.98 \times 10^8$  copies/g。三种水产品虾、鱼、贝类中, 虾类的 ARGs 含量最高, 贝类最低; 三类采样地点中, 菜市场来源的水产品中 ARGs 含量最高, 海鲜市场来源的次之, 超市来源的最低。本研究为进一步探索 ARGs 和可移动耐药元件整合子介导的细菌耐药性传播而引起的食源性疾病机理奠定了基础。

**关键词:** 水产品微生物; 抗生素抗性基因; I 类整合子; 实时荧光定量 PCR; 丰度; 传播

文章编号: 1673-9078(2017)5-270-276

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.5.043

## Quantitative Detection of Six Classes of Antibiotic Resistance and Class I Integron Genes in Aquatic Products

WANG Hui-ping<sup>1</sup>, YAN He<sup>1</sup>, ZHAO Jun-ren<sup>2</sup>, SHI Lei<sup>3</sup>

(1. South China University of Technology, Institute of Food Science and Engineering, Guangzhou 510640, China)

(2. Guangdong University of Petrochemical Technology, Institute of Environmental and Biological Engineering, Maoming 525000, China) (3. Jinan University, Institute of food science and engineering, Guangzhou 510632, China)

**Abstract:** Forty-eight aquatic products from two farmers' markets, one seafood market, and three supermarkets in the Tianhe district of Guangzhou were used in this study, and the total DNA from three aquatic products-shrimps, fish, and shellfish-was extracted. Quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) was used to quantify six classes of antibiotic resistance genes (ARGs; *tetA*, *tetB*, *tetM*, *sullI*, *floR*, *aphA-1*, *aadA*, *ermB*, and *cmlA*), the *intI1* gene on the 5' end of class I integron, and the sulfanilamide resistance gene *sull* and quaternary ammonium salt compound and ethidium bromide resistance gene *qacEAI* on the 3' end of class I integron. The results revealed that all six classes of ARGs were detected in all aquatic products, and the abundance varied over seven orders of magnitude ( $10^2 \sim 10^8$ ); the minimum and the maximum values were  $1.86 \times 10^2$  copies/g and  $8.98 \times 10^8$  copies/g, respectively. Among the three kinds of aquatic products, ARGs were present at the highest concentration in shrimps and the lowest concentration in shellfish. Among the three sampling sites, farmers' markets had the highest concentration of ARGs, followed by the seafood market and the supermarkets. This study lays the foundation for further research on foodborne diseases caused by antibiotic resistant bacteria with ARGs and mobile integron resistance components.

**Key words:** microorganisms in aquatic products; antibiotic resistance genes; class I integron; quantitative real-time polymerase chain reaction; abundance; spread

收稿日期: 2016-11-17

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(31201363); 广东省科技计划项目(2014A020214001、2016A020219001); 广东省自然科学基金项目(2016A030307027)

作者简介: 王慧平(1992-), 女, 在读研究生, 研究方向: 食源微生物食品安全

通信作者: 赵俊仁(1972-), 女, 副教授, 研究方向: 食品安全微生物

中国是水产品生产 and 出口大国。随着现代水产养殖业集约化的发展, 以生长促进及疾病预防为目的的长期低剂量使用的抗生素已对养殖业环境构成威胁<sup>[1-3]</sup>。研究表明抗生素可诱导抗生素抗性基因(Antibiotic Resistance Genes, ARGs)的产生<sup>[4]</sup>。ARGs 是细菌耐药性产生的关键因素之一, 在医疗废水<sup>[5]</sup>、猪场土壤<sup>[6]</sup>、河床污泥<sup>[7]</sup>和饮用水处理系统<sup>[8]</sup>等环境中

富集。其可通过可移动耐药元件进行基因水平转移,一旦携带 ARGs 的食源性病原菌进入食物链,将对人类健康造成威胁。

常见的可移动耐药元件中,整合子是一种基因捕获和整合系统,能够通过整合酶从外界环境中捕获和堆积 ARGs<sup>[9]</sup>。目前已发现的整合子共有 8 类<sup>[10]</sup>,其中 I、II 和 III 类的研究最为成熟,并已被证明与细菌的耐药性相关<sup>[11]</sup>。I 类整合子由 5' 保守末端(5' conserved segment, 5'CS)、可变耐药基因盒区(variable region)、3' 保守末端(3' conserved segment, 3'CS) 构成;5'CS 携带编码 I 类整合酶的基因 *intI1*, 3' 端携带磺胺耐药基因 *sulI*、季铵盐化合物及溴化乙锭耐药基因 *qacEΔ1*<sup>[12,13]</sup>。此外,整合子位于质粒、转座子等可移动耐药元件上,可以在同种或不同菌属间进行水平转移,这一机制是细菌,尤其是革兰氏阴性菌进化成为多重耐药菌的重要原因之一<sup>[9,14,15]</sup>。

近年来已有许多微生物 ARGs 及整合子的分布研究<sup>[16-18]</sup>,但是大多数微生物的不可培养性增大了相关研究的难度,那些占绝大多数的、不能培养或没有培养出的微生物的耐药性成为一个基本上未被发现的领域。因此越来越多的国内外学者在样本总 DNA 的基础上,更加全面的对 ARGs 及整合子进行分布及定量研究<sup>[18,19]</sup>。这些研究多集中于土壤等环境介质<sup>[6,20,21]</sup>,对食品中的 ARGs 及整合子的分布及定量还不全面。

因此,本文选取了广州市天河区两家菜市场、一家海鲜市场和三家超市,随机采集虾、贝类、鱼类共 48 份水产品,采用实时荧光定量 PCR(Quantitative Real-time PCR)法,在总 DNA 水平(不依赖培养的方法)上系统的探究 ARGs 及 I 类整合子在水产品中的分布和定量。本文选取 9 种 ARGs,其中 6 种主要针对水产养殖业使用较为广泛的磺胺类、四环素类、氨基糖苷类抗生素抗性基因<sup>[1,22]</sup>,包括: *tetA*、*tetB*、*tetM*、*sul II*、*floR*、*aphA-1*、*aadA*、*ermB* 和 *cmlA*。I 类整

合子基因包括: *intI1*、*sul I* 和 *qacEΔ1*。为了解水产品中抗生素抗性基因及 I 类整合子分布和含量、可移动耐药元件 I 类整合子介导的耐药传播及由此引起的食源性疾病提供了数据基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料

#### 1.1.1 实验所用菌株与质粒

*E.coli* BL21 (DE3) 菌株为本实验室保存,其质粒 R388 携带 *sul I*、*intI1* 及 *qacEΔ1* 基因; *Escherichia coli* DH5α 菌株为本实验保存,其重组质粒(本实验室构建)分别携带 *tetA*、*tetB*、*sul II*、*floR*、*aphA-1*、*tetM*、*ermB*、*aadA*、*cmlA* 基因<sup>[23]</sup>。

#### 1.1.2 实验试剂及耗材

LB 肉汤、脑心浸出液肉汤,广州环凯微生物科技有限公司; Baird-Parker 琼脂平板、小量质粒提取试剂盒、细菌 DNA 快速提取试剂盒,广州东盛创新有限公司; QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit, QIAGEN; SYBR® Premix Ex Taq II (TliRNaseHPlus) (2×), 日本 TaKaRa 公司。

### 1.2 仪器与设备

恒温培养箱,德国 Binder 公司; 恒温培养摇床,上海一恒科学仪器有限公司; GeneAmp PCR system 2700、Gel Doc EQ 凝胶成像系统、核酸电泳仪、梯度 IcyCycler Thermal Cycler PCR 仪、Bio-Rad CFX96 实时荧光定量 PCR 仪,美国 Applied Biosystems 公司; 高速离心机,美国 Thermo 公司; -80 °C 和 -20 °C 超低温冰箱,日本三洋公司。

### 1.3 实验所用引物

表 1 6 类 ARGs 及 I 类整合子实时荧光定量 PCR 的引物

Table 1 Primers targeting six classes of ARGs and class I integron for real-time PCR

目标基因	引物	引物序列(5'-3')	退火温度/°C	产物长度/bp	参考文献
<i>16s</i>	338F	CCTACGGGAGGCAGCAG	55	194	[24]
	518R	ATTACCGCGGCTGCTGG			
<i>aadA</i>	<i>aadA</i> -F	TGATTGCTGGTTACGGTGAC	58	284	[25]
	<i>aadA</i> -R	CGCTATGTTCTCTTGCTTTTG			
<i>aphA-1</i>	<i>aphA-1</i> -F	ATGGGCTCGGATAATGTC	58	600	[25]
	<i>aphA-1</i> -R	CTCACCGAGGCAGTTCCAT			
<i>ermB</i>	<i>ermB</i> -F	AGTAACGGTACTTAAATGTTTAC	52	639	[25]
	<i>ermB</i> -R	GAAAAGGTACTCAACCAAATA			

转下页

接上页

<i>cmlA</i>	<i>cmlA</i> -F	CCGCCACGGTGTGTGTTGTTATC	58	698	[25]
	<i>cmlA</i> -R	CACCTTGCCTGCCATCATTAG			
<i>floR</i>	<i>floR</i> -F	TATCTCCCTGTCGTTCCAG	58	399	[25]
	<i>floR</i> -R	AGAACTCGCCGATCAATG			
<i>intI1</i>	<i>intI1</i> -F	GGCTTCGTGATGCCTGCTT	60	146	[20]
	<i>intI1</i> -R	CATTCCTGGCCGTGGTTCT			
<i>SulI</i>	<i>sulI</i> -F	CACCGGAAACATCGCTGCA	60	158	[26]
	<i>sulI</i> -R	AAGTTCCGCCGAAGGCT			
<i>qaceA1</i>	<i>qaceA1</i> -F	AGGCTGGCTTTTTCTGTTAT	60	328	[18]
	<i>qaceA1</i> -R	CCTCCGCAGCGACTTCCACGAT			
<i>SulII</i>	<i>sulII</i> -F	CGGCATCGTCAACATAACC	60	722	[27]
	<i>sulII</i> -R	GTGTGCGGATGAAGTCAG			
<i>tetA</i>	<i>tetA</i> -F	GCTACATCCTGCTTGCC TTC	55	210	[28]
	<i>tetA</i> -R	CATAGATCGCCGTGAAGAGG			
<i>tetB</i>	<i>tetB</i> -F	TTGGTTAGGGGCAAGTTTTG	55	659	[28]
	<i>tetB</i> -R	GTAATGGGCCAATAACACCG			
<i>tetM</i>	<i>tetM</i> -F	GTGGACAAAGGTACAACGAG	55	406	[29]
	<i>tetM</i> -R	CGGTAAAGTTCGTCACACAC			

## 1.4 试验方法

### 1.4.1 样品采集及前处理

2015年9月至10月,分别从广州市某区两家菜市场、一家海鲜市场和三家超市随机抽取虾、鱼、贝类样品48份,样品2h内运送至实验室于4℃保存待后续处理。

### 1.4.2 水产品样品总DNA的提取

采用磁珠破碎法提取水产品样品总DNA<sup>[30]</sup>,随后用1%的琼脂糖凝胶进行电泳验证。所提取的DNA用微量核酸蛋白质分析仪(Nanodrop ND1000, NanoDrop Technologies Inc)测定浓度及纯度。

### 1.4.3 实时荧光定量PCR标准曲线的建立

裂解细菌,使用小量快速提取试剂盒提取R388质粒及重组质粒,提取的质粒通过微量核酸蛋白分析仪检测浓度和纯度,用于稀释制备标准曲线。

基因拷贝数按以下公式计算:

$$\text{Copies}/\mu\text{L}=(6.02\times 10^{23})\times(\text{ng}/\mu\text{L}\times 10^{-9})/(\text{DNA length}\times 660)$$

其中阿伏伽德罗常数(每mol的微粒数)是 $6.02\times 10^{23}/\text{mol}$ ,  $\text{DNA length}=\text{pBackZero-T Vector}$ 长度+目的片段长度,每个碱基的平均分子量是330(每对碱基/bp是660),质粒原液 $X\text{ng}/\mu\text{L}$ <sup>[23]</sup>。如R388质粒总长33913bp,质粒原液 $X\text{ng}/\mu\text{L}$ ,则每 $\mu\text{L}$ 的绝对模板量是 $(6.02\times 10^{23})\times(X\text{ng}/\mu\text{L}\times 10^{-9})/(33913\text{bp}\times 660)$ ,从

而计算出基因拷贝数。按10倍浓度梯度稀释,以标准品拷贝数(Copies)的对数值为横坐标,以测得的Ct值为纵坐标,构建实时荧光定量PCR标准曲线。通过标准曲线及样品的Ct值,计算出样品中相应基因的拷贝数。

### 1.4.4 实时荧光定量PCR反应体系

使用Bio-Bad CFX 96 Real-time PCR仪对目标基因进行实时荧光定量PCR反应,每个样品3个平行。反应体系25 $\mu\text{L}$ ,其中各试剂体积为:SYBR® Premix Ex Taq II 12.5 $\mu\text{L}$ ;上引物、下引物各1 $\mu\text{L}$ ;待测DNA模板2 $\mu\text{L}$ ;ddH<sub>2</sub>O 8.5 $\mu\text{L}$ 。每个样品进行3次技术重复试验,3次重复均扩增出来则认为是阳性。

反应过程为:95℃预变性1min;95℃变性15s,60℃退火1min,72℃延伸30s,40个循环;程序自动升温进行熔解曲线分析。

### 1.4.5 统计方法

采用SPSS 19.0 (SPSS, Inc. Chicago, IL)统计软件进行数据分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 基因标准曲线

通过实验获得水产品中6类抗生素抗性基因及I类整合子的标准曲线,结果如表2所示(以拷贝数为横坐标,Ct值为纵坐标绘制标准曲线)。

表2 目的基因标准曲线

Table 2 Standard curve of targeted genes

基因	线性方程	相关系数 R <sup>2</sup>	扩增效率 E/%
<i>intI1</i>	Y=-3.344X+41.086	0.994	99.2
<i>SulI</i>	Y=-3.292X+40.235	0.998	101.2
<i>qacE1</i>	Y=-3.448X+39.942	0.993	94.9
<i>16S-rRNA</i>	Y=-3.342X+43.150	0.999	99.2
<i>aadA</i>	Y=-3.305X+43.707	0.996	100.7
<i>aphA-1</i>	Y=-3.463X+49.188	0.999	94.5
<i>cmlA</i>	Y=-3.325X+44.206	0.990	99.9
<i>ermB</i>	Y=-3.401X+46.060	0.991	96.8
<i>floR</i>	Y=-3.388X+44.907	0.996	97.3
<i>SulII</i>	Y=-3.079X+42.666	0.993	111.3
<i>tetA</i>	Y=-3.211X+47.321	0.966	104.9
<i>tetB</i>	Y=-3.227X+43.672	0.993	104.1
<i>tetM</i>	Y=-3.318X+44.913	0.994	100.2

表2显示: Ct值与目的基因拷贝数之间的相关系数 R<sup>2</sup> 在 0.993~0.998 之间。扩增效率 E 在 94.9%~111.3%之间; 斜率在-3.448~3.079 之间。线性相关良好, 可用于计算各基因的拷贝数。

## 2.2 6类 ARGs 及I类整合子的定量检测

根据标准曲线可以计算得出各基因的拷贝数, 12种基因的拷贝数结果如图1所示。

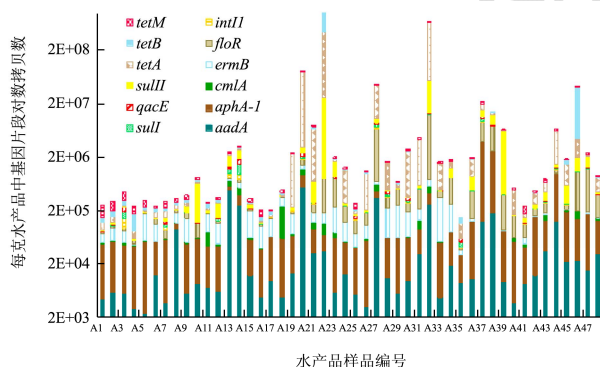


图1 水产品中12种基因拷贝数

Fig.1 Copy number of 12 genes in aquatic products

图1表明了6类抗生素抗性基因 *tetA*、*tetB*、*tetM*、*sul II*、*floR*、*aphA-1*、*aadA*、*ermB*、*cmlA* 和 I 类整合子 5'端整合酶基因 *intI1*、3'端磺胺耐药基因 *sul I*、3'端季铵盐化合物及溴化乙锭的耐药基因 *qacE1* 在水产品中的拷贝数。12种基因在48份水产品样品中均有检出, 基因拷贝数跨越七个数量级, 最小值为  $1.86 \times 10^2$  copies/g (*cmlA* 基因, 鱼类样品 A<sub>29</sub>), 最大值为  $8.98 \times 10^8$  copies/g (*tetB* 基因, 虾类样品 A<sub>22</sub>)。所检测的6类抗生素抗性基因及 I 类整合子基因中, 四环素抗性基因 (*tetA*、*tetB* 和 *tetM*) 在水产品中含量

最高, 总拷贝数为  $2.11 \times 10^9$  copies/g, 三种所测四环素抗性基因中, *tetA* 在水产品中含量最高, 总拷贝数为  $1.17 \times 10^9$  copies/g。其次是磺胺类抗性基因 (*sul II*)、氟苯尼考抗性基因 (*floR*)、I 类整合子基因 (*intI1*、*sul I* 和 *qacE1*)、氨基糖苷类抗性基因 (*aphA-1*、*aadA*)、红霉素抗性基因 (*ermB*), 氯霉素抗性基因 (*cmlA*) 在水产品中含量最低, 总拷贝数为  $2.11 \times 10^6$  copies/g。

本文就水产品中携带的四环素抗性基因 (*tetA*、*tetB* 和 *tetM*)、磺胺类抗性基因 (*sul II*)、氟苯尼考抗性基因 (*floR*)、氨基糖苷类抗性基因 (*aphA-1* 和 *aadA*)、红霉素抗性基因 (*ermB*) 和氯霉素抗性基因 (*cmlA*)、I 类整合子基因 (5'端整合酶基因 *intI1*、3'端磺胺耐药基因 *sul I*、3'端季铵盐化合物及溴化乙锭的耐药基因 *qacE1*) 展开了定量研究, 结果显示在48份水产品中均有检出 (图1), 说明水产品是抗生素抗性基因及 I 类整合子的储存库, 为 ARGs 及 I 类整合子在食物链中的分布和转移提供了环境介质。其中, 四环素抗性基因及磺胺类抗性基因在水产品中含量高于其它几种抗生素抗性基因, 该现象可能与四环素、磺胺类抗生素广泛用于水产养殖业中有关, 进一步证实了抗生素可诱导相应抗生素抗性基因的产生<sup>[20]</sup>。Zihao Lu 等在2014年对辽河及大辽河进行研究, 发现所有水样中均检测到三种磺胺耐药基因及整合酶基因, 且 ARGs 平均含量分别为  $1.16 \times 10^5$  copies/mL 和  $3.13 \times 10^5$  copies/mL<sup>[20]</sup>; Windi I. Muziasari 等研究了波罗的海水体的耐药污染情况, 结果显示所测71种 ARGs 中, 所有海水样品均含有其中31种 ARGs<sup>[32]</sup>。本研究结果与这两个学者的研究结论相似, 说明水环境中 ARGs 污染较为严重, 大量的 ARGs 可通过基因

水平转移机制从水体传播到水产品中，进而威胁人类健康<sup>[33]</sup>。

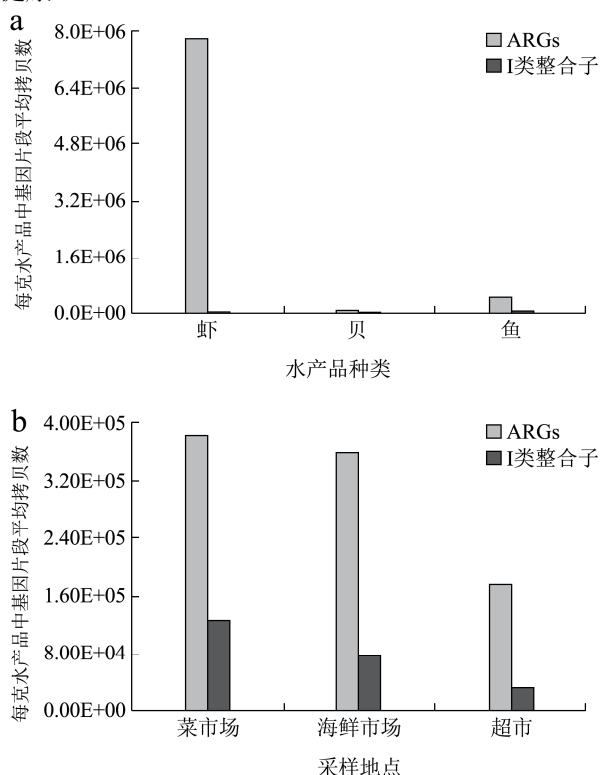


图2 不同种类和不同采样地点水产品中抗生素抗性绝对基因平均拷贝数

Fig.2 Copy number of antibiotic resistance absolute genes in aquatic products in different categories and from different sampling sites

注：a 表示不同种类水产品中抗性绝对基因平均拷贝数；

b 表示不同采样地点水产品中抗性绝对基因平均拷贝数。

对于3种不同类型的水产品（虾、贝和鱼），9种抗生素抗性基因在虾类样品中含量最高，平均拷贝数高达  $1.06 \times 10^7$  copies/g，在贝类样品中含量最低，平均拷贝数低至  $9.68 \times 10^4$  copies/g；I类整合子在鱼类样品中含量最高，平均拷贝数高达  $1.13 \times 10^5$  copies/g，在贝类样品中含量最低，平均拷贝数低至  $9.53 \times 10^3$  copies/g（图2a）。对于3种不同的采样地点（菜市场、海鲜市场和超市），9种抗生素抗性基因和I类整合子在水产品中含量均有所差异，其中ARGs和I类整合子均在菜市场水产品中含量最高，平均拷贝数分别为  $3.82 \times 10^5$  copies/g 和  $1.26 \times 10^5$  copies/g，超市水产品中含量最低，平均拷贝数分别为  $1.74 \times 10^5$  copies/g 和  $3.28 \times 10^4$  copies/g（图2b）。

由图2a可知，虾、贝和鱼类三种水产品中，虾样品ARGs污染程度最为严重，远高于其他两种产品；鱼样品中，I类整合子含量最为丰富，所得试验结果均与国外类似研究成果相似，Yutaka Y等曾在泰国水

产品市场虾分离得到的霍乱弧菌中检测到了大量的抗生素抗性基因<sup>[34]</sup>；澳大利亚学者在当地鱼类产品分离得到的迟钝爱德华氏菌中发现了四环素抗性基因的存在<sup>[2]</sup>。虾类、鱼类产品富含蛋白质，是人类食用频率最高的食物之一<sup>[22]</sup>，抗生素在虾类、鱼类等水产养殖业的滥用，将会导致水产品成为ARGs的直接载体，将ARGs带入人体内。图2b结果表明三种采样点中，菜市场ARGs及I类整合子污染最为严重。水产养殖业中抗生素的大量使用使得水产品源头上即受到ARGs污染；此外，水产品加工过程、流通环节卫生状况堪忧也可能对水产品造成ARGs污染<sup>[2]</sup>。相对于菜市场，超市水产品来源、加工及流通环境更加卫生，因此ARGs及I类整合子含量相对较低。

表3为Pearson相关性分析，结果表明水产品中 *sulI*、*qacEΔ1* 含量与整合酶I基因 *intI1* 显著相关。

表3 *sulI*、*qacEΔ1*及 *intI1* 相关度分析结果

Table 3 Correlation analysis of the relative expression of *sulI*, *qacEΔ1*, and *intI1* genes

基因	<i>sulI</i>	<i>qacEΔ1</i>
与 <i>intI1</i> 相关系数 P	0.799**	0.743**

注：\*\*在0.1水平（双侧）上显著相关。

Pearson相关性分析结果表明，水产品中 *sulI* 和 *qacEΔ1* 含量与 *intI1* 显著相关 ( $p > 0.5$ )，Hao-Chang Su等也曾对河流污泥样品进行检测，发现了相似现象<sup>[7]</sup>。原因可能与I类整合子的3'保守末端携带 *sulI*、*qacEΔ1* 基因有关<sup>[12]</sup>。整合子作为可移动元件的一种，其5'-3'结构及其对耐药基因盒的捕获机理，使其可以不断地通过整合酶从外界捕获和整合耐药基因盒，从而使细菌获得多重耐药性<sup>[9]</sup>。应进一步开展由整合子引起的细菌耐药基因传播现状的机理研究，以期在基因水平转移过程中遏制ARGs的传播。

### 3 结论

综上所述，水产品是抗生素抗性基因重要的储存库之一，为抗生素抗性基因进入人体提供了一个直接的来源；I类整合子作为可移动耐药元件的一种，在水产品中大量检出，可移动耐药元件介导的细菌耐药性传播而引起的食源性疾病应引起重视。虾、鱼作为人类日常最常食用的水产品，耐药污染较为严重，这为水产养殖的规范化敲响警钟；同时，菜市场水产品耐药污染状况较超市更为严重，从侧面说明了水产品的流通、运输及加工环节卫生与否，将会直接影响水产品ARGs污染的严重程度。因此，应加强对水产养殖环境及水产品流通、运输和加工环节管理，以期从源头上遏制细菌耐药性传播而引起的食源性疾病。

## 参考文献

- [1] 张文文.常用渔药有效含量、杀菌效果比较及抗生素耐药性初步研究[D].舟山:浙江海洋学院,2014  
ZHANG Wen-wen. An investigation of the effective content and bactericidal efficacy in common fishery drugs and the antibiotics resistance of common aquaculture pathogens [M]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2014
- [2] 娄阳,张昭寰,肖莉莉,等.食品源抗生素抗性基因的来源与分布状况研究进展[J].食品工业科技,2015,7(12):368-374  
LOU Yang, ZHANG Zhao-huan, XIAO Li-li, et al. Research progress of source and distribution of antibiotic resistance genes in food [J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 7(12): 368-374
- [3] 生春萍,张石猛,周显珍,等.对畜产品质量安全工作的思考[J].畜禽业,2015,2(9):40-41  
SHENG Chun-ping, ZHANG Shi-meng, ZHOU Xian-zhen, et al. Reflect on quality and safety of livestock [J]. Livestock and Poultry Industry, 2015, 2(9): 40-41
- [4] Kerry J, Coyne R, Gilroy D, et al. Spatial distribution of oxytetracycline and elevated frequencies of oxytetracycline resistance in sediments beneath a marine salmon farm following oxytetracycline therapy [J]. Aquaculture, 1996, 145(1-4): 31-39
- [5] Aydin S, Ince B, Ince O. Development of antibiotic resistance genes in microbial communities during long-term operation of anaerobic reactors in the treatment of pharmaceutical wastewater [J]. Water Research, 2015, 83(43): 337-344
- [6] Zhu Y, Johnson T A, Su J, et al. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013, 110(9): 3435-3440
- [7] Su H, Pan C, Ying G, et al. Contamination profiles of antibiotic resistance genes in the sediments at a catchment scale [J]. Science of the Total Environment, 2014, 490(78): 708-714
- [8] Cátia Faria a, Ivone Vaz-Moreira, et al. Antibiotic resistance in coagulase negative *Staphylococci* isolated from wastewater and drinking water [J]. Science of the Total Environment, 2014, 2(34): 112-119
- [9] 杨维青,石磊,尹晓琳,等.不同地区铜绿假单胞菌第一类整合子和整合子相关基因盒的分布[J].中国抗生素杂志,2006,31(1):15-18  
YANG Wei-qing, SHI Lei, YIN Xiao-lin, et al. Distribution and identification of class 1 integrons and integrated gene cassettes in clinical *Pseudomonas aeruginosa* in different geographic regions [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2006, 31(1): 15-18
- [10] 苏健裕,石磊,杨连生,等.大肠埃希菌中新的耐药基因盒 *aadA23* 的变异[J].中华传染病杂志,2005,23(5):310-313  
SU Jian-yu, SHI Lei, YANG Lian-sheng, et al. Detection of a new gene cassette *aadA23* in *Escherichia coli* [J]. Chinese Journal of Infectious Diseases, 2005, 23(5): 310-313
- [11] 李林桂.海水弧菌耐药性I类整合子分析与副溶血弧菌分子分型研究[D].雅安:四川农业大学,2013  
LI Lin-gui. Study on class I antibiotic resistance integrons of *Vibrios* and multilocus sequence typing of *Vibrio parahaemolyticus* [D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2013
- [12] 朱静媛.志贺菌属细菌整合子与多重耐药性研究[D].郑州:郑州大学,2010  
ZHU Jing-yuan. Study on the integrons and multiresistance in *Shigella spp* [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2010
- [13] 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[J].海洋渔业,2011,33(4):442-446  
XIE La-yue, HU Lin-lin, FANG Wen-hong, et al. Investigation and analysis of drug resistance of *Vibrios* from mariculture source [J]. Marine Fisheries, 2011, 33(4): 442-446
- [14] 写腊月.海水弧菌耐药性调查及整合子-基因盒系统检测[D].上海:上海海洋大学,2012  
XIE La-yue. Survey of antimicrobial resistance and detection of integron gene cassettes of *Vibrio* isolates from mariculture [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2012
- [15] Uyaguari M I, Scott G I, Norman R S. Abundance of class 1-3 integrons in south Carolina estuarine ecosystems under high and low levels of anthropogenic influence [J]. Marine Pollution Bulletin, 2013, 76(1-2): 77-84
- [16] Zhang X, Zhang T, Zhang M, et al. Characterization and quantification of class 1 integrons and associated gene cassettes in sewage treatment plants [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 82(6): 1169-1177
- [17] Noyes N R, Yang X, Linke L M, et al. Characterization of the resistome in manure, soil and wastewater from dairy and beef production systems [J]. Scientific Reports, 2016, 6(2): 46-53
- [18] Khan S A, Sung K, Nawaz M S. Detection of *aacA-aphD*, *qacE $\delta$ 1*, *marA*, *floR*, and *tetA* genes from multidrug-resistant bacteria: Comparative analysis of real-time multiplex PCR assays using EvaGreen® and SYBR® Green I dyes [J]. Molecular and Cellular Probes, 2011, 25(2-3): 78-86



- [19] Patterson S K, Singer R S. Development of a polymerase chain reaction assay for the detection of antibiotic resistance genes in community DNA [J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2006, 18(2): 172-181
- [20] Lu Z, Na G, Gao H, et al. Fate of sulfonamide resistance genes in estuary environment and effect of anthropogenic activities [J]. Science of the Total Environment, 2015, 527(528): 429-438
- [21] Barkovskii A L, Green C, Hurley D. The occurrence, spatial and temporal distribution, and environmental routes of tetracycline resistance and integrase genes in *Crassostrea virginica* beds [J]. Marine Pollution Bulletin, 2010, 60(12): 2215-2224
- [22] 孙波.中国水产品质量安全管理体系研究[D].青岛:中国海洋大学,2012  
SUN Bo. The study for quality safety management system of China's aquatic products [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012
- [23] Liu Z B E A. Isolation and molecular characterization of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* strains from pork and environmental samples in Xiamen, China [J]. Journal of Food Protection, 2015, 1(78): 78-88
- [24] 陈慧斌,刘智禹,陈绍军,等.基于PCR-DGGE技术的冷藏牡蛎鳃部菌群分析[J].西南大学学报(自然版),2013,9(4):151-156  
CHEN Hui-bin, LIU Zhi-yu, CHEN Shao-jun, et al. Analysis of chilled oysters gills flora based on technique of PCR-DGGE [J]. Journal of Southwest University (Natural Science Edition), 2013, 9(4): 151-156
- [25] Van T T H, Chin J, Chapman T, et al. Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: An analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic resistance and virulence genes [J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 124(3): 217-223
- [26] Chen B, Liang X, Nie X, et al. The role of class I integrons in the dissemination of sulfonamide resistance genes in the pearl river and pearl river estuary, south China [J]. Journal of Hazardous Materials, 2015, 282(2): 61-67
- [27] Lin C, Hou R F, Shyu C, et al. *In vitro* activity of mastoparan-AF alone and in combination with clinically used antibiotics against multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolates from animals [J]. Peptides, 2012, 36(1): 114-120
- [28] Ng L K, Martin I, Alfa M, et al. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes [J]. Molecular and Cellular Probes, 2001, 15(4): 209-215
- [29] Jiang X, Shi L. Distribution of tetracycline and trimethoprim/sulfamethoxazole resistance genes in aerobic bacteria isolated from cooked meat products in Guangzhou, China [J]. Food Control, 2013, 30(1): 30-34
- [30] 叶蕾.广州市水产养殖中耐药共生菌分布及耐药基因传播机制的研究[D].广州:华南理工大学,2012  
YE Lei. Prevalence of antibiotic resistant commensal bacterial associated with aquaculture products and dissemination of antibiotic resistant gene from Guangzhou, China [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2012
- [31] Berglund B, Khan G A, Weisner S E B, et al. Efficient removal of antibiotics in surface-flow constructed wetlands, with no observed impact on antibiotic resistance genes [J]. Science of the Total Environment, 2014, 476(477): 29-37
- [32] W I Muziasari, KatariinaPärnänen, T A Johnson, et al. Aquaculture changes the profile of antibiotic resistance and mobile genetic element associatedgenes in Baltic sea sediments [J]. Fems Microbiology Ecology, 2016, 92(4): 52-60
- [33] 张骞月,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[J].中国农业科技导报,2015,13(6):125-134  
ZHANG Qian-yue, ZHAO Wan-wan, WU Wei. Antibiotic resistance gene pollution and its research progress achieved in aquaculture environment [J]. Journal of Agriculture Science and Technology, 2015, 13(6): 125-134
- [34] Yano Y H K S M. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio* species related to foodsafety isolated from shrimp cultured at inland ponds in Thailand [J]. Food Control, 2014, 38(4): 30-36