

文章编号: 1674-7054(2014)01-0008-07

湛江东海岛对虾育苗场水体细菌的抗生素耐药性

李 琴¹, 孙成波², 陈美领¹, 张瑜斌¹, 孙省利¹

(1. 广东海洋大学 海洋资源与环境监测中心, 广东 湛江 524088; 2. 广东海洋大学 水产学院, 广东 湛江 524088)

摘 要: 利用 K-B 纸片扩散法研究分离自湛江东海岛 6 个对虾育苗场(分别编号为 YF, JD, DC, HM, SD, XR) 水体中的 217 株细菌菌株对 12 种抗生素的耐药性。研究结果表明, 参试的 12 种抗生素之间的细菌耐药性差异显著(ANOVA, $P < 0.05$), 6 个育苗场内细菌对多粘菌素 B、左氧沙星和环丙沙星高度敏感, 对氨苄西林、甲氧苄啶、复方新诺明和四环素则高度耐药; 多重耐药菌株在每个育苗场中均有发现, 52.07% 的菌株呈现多重耐药性, 未发现对参试的 12 种抗生素 100% 耐药的菌株。统计分析结果显示, 尽管 HM 和 XR 育苗场的细菌耐药性比其他育苗场高, 但 6 个对虾育苗场之间水体细菌的抗生素耐药性无显著差异(ANOVA, $P > 0.05$)。

关键词: 对虾育苗场; 细菌; 抗生素耐药性; 东海岛

中图分类号: S 917.1

文献标志码: A

湛江是我国著名的对虾虾苗培育、养殖、加工及出口基地^[1], 而东海岛集中了湛江市约 400 家对虾种育苗场的三分之一, 是全国主要虾苗培育基地之一。为提高对虾育苗存活率而滥用抗生素的陋习, 增加了虾苗体内病原细菌耐药性及养殖水域中细菌耐药性的风险^[2]。20 世纪七八十年代, 水产养殖人员在水产养殖和苗种繁育中应用抗生素预防和控制细菌类疾病, 对降低水产养殖动物细菌性疾病的发病率起到积极的作用^[3]。但目前, 水产养殖过程中抗生素的滥用已导致了养殖水体的抗生素污染与疾病防治困难^[4-5]。近年来, 国外有关虾场抗生素残留及虾场养殖环境中细菌耐药性的研究也陆续有报道, 如 LE 等研究了红树林内虾池抗生素残留和对虾养殖水体和底泥中细菌的抗生素耐药性^[6-10], 国内的研究多侧重于关注虾池水体细菌的密度变化特征^[11]和对虾体内病原细菌耐药性的研究^[12]。国内对虾池中水体细菌耐药性相关的研究仅见张瑜斌等对东海岛虾池水体中弧菌的抗生素耐药性报道^[13], 但对虾育苗场的抗生素耐药性研究, 国内外仅见 VASEEHARAN 等^[14]和 LEE 等^[15]进行了报道, 而对虾育苗场水体环境细菌的抗生素耐药性研究尚未见报道。水生环境残留的抗生素对细菌耐药性的诱导产生、以及耐药基因的水平扩散和垂直传播^[16-17], 造成养殖水环境及动物体内细菌对抗生素的耐药性增强, 养殖动物抵抗疾病的能力降低, 药物在体内积聚而残留量增大^[16-17]。多项研究也证实了抗生素在水产动物内的残留能通过食物链传递到人, 加剧了对消费者身体健康威胁的潜在风险^[18-19], 因此, 从源头上杜绝抗生素的滥用是必要的。笔者研究了湛江东海岛对虾育苗场养殖水体中细菌的抗生素耐药性, 旨在指导对虾育苗生产过程中合理使用抗生素, 为实现绿色生态养殖以及对虾种苗生产的可持续发展提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 研究对虾育苗场概况 根据东海岛的地理位置选择了岛内不同分布区域的 6 个对虾育苗场作为调查取样对象(图 1), 其中 YF 育苗场(21°04.388'N, 110°19.498'E)、JD 育苗场(21°04.336'N, 110°19.965'E)

收稿日期: 2013-12-23

基金项目: 国家海洋公益性行业科研专项(201305021), 广东省教育厅科技创新项目(2013KJCX0095)

作者简介: 李琴(1991-), 女, 广东海洋大学海洋生物学 2012 级硕士研究生。

通信作者: 张瑜斌(1970-), 男, 教授, 硕士生导师。E-mail: zhangyb@gdou.edu.cn

E) 位于湛江东海岛东山镇文参村; DC 育苗场(20°55.771'N, 110°30.752'E)、HM 育苗场(20°55.628'N, 110°30.626'E) 位于湛江东海岛庵里村; SD 育苗场(20°57.531'N, 110°31.045'E)、XR 育苗场(20°57.789'N, 110°31.327'E) 位于湛江东海岛北寮村。上述育苗场均繁育凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) 虾苗, 水体盐度为 15~20。各育苗场样池的池龄、面积、孵化时间参数见表 1。

1.2 样品的采集 于 2012-03-25—06-03 分 6 批次采集上述苗场的水样, 所采水样均为育苗池原水, 内混有部分虾苗, 用育苗场专用透明袋充氧盛装, 个别情况下场主往袋内添加红虫作为饵料, 采样后立即返回实验室进行细菌菌株的平板分离。

表 1 对虾育苗场相关参数

Tab. 1 Parameters of the shrimp hatcheries

参数 Parameters	YF	JD	DC	HM	SD	XR
池龄 Pond age / year	7	20	5	7	6	10
面积 Area / m ²	10	25	15	32	10	20
孵化时间 Incubation time / d	20	20	20	30	5	3

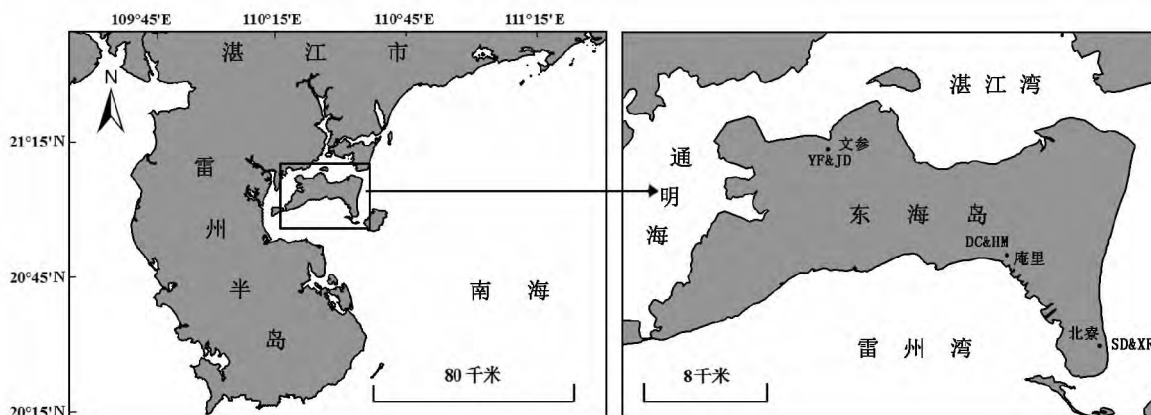


图 1 采样区域及采样点分布图

Fig. 1 Sampling area and location of sampling sites

1.3 菌株分离与纯化 细菌菌株的分离采用稀释涂布平板法。分离平板培养基为 2216 E 琼脂, 涂布的平板置于 28℃ 恒温培养箱中培养 24 h 后, 随机挑取有代表性的单菌落进行纯化, 已纯化的菌株接至 2216 E 斜面培养基上冷藏保存, 供药敏实验使用。

1.4 细菌的抗生素敏感性分析 细菌的抗生素敏感实验采用纸片扩散法(Kirby-Bauer 法, 简称 K-B 法)^[2], 挑取已纯化的菌株接种于 Mueller-Hinton(MH) 肉汤发酵培育合适的时间, 所得菌悬液与对应标准比浊管对比, 保持测试菌株菌悬液浓度大约为 $1.5 \times 10^8 \cdot \text{mL}^{-1}$, 用无菌棉签将该浓度的菌悬液均匀涂布于预先制备好的 MH 琼脂培养基上, 涂布好的 MH 琼脂平板于室温放置, 稍待菌液晾干, 用无菌镊子将药敏纸片分别贴于涂布的平板表面, 然后倒置于 $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ 培养箱中培养 24 h, 测量抑菌圈的直径大小。药敏实验遵照美国临床实验室标准化委员会(NCCLS) 标准, 并按药敏纸片中抗生素扩散产生的抑菌圈直径大小判断药敏实验结果, 实验结果耐药、中介和敏感分别标记为 R、I 和 S。实验开始前用标准菌株大肠希埃氏杆菌(*Escherichia coli*) ATCC25922 和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC29213 做质量控制。NCCLS 推荐使用的 MH 肉汤和琼脂培养基购于北京陆桥技术有限责任公司。

抗生素可根据其化学结构和作用机理划分成不同的类型, 同一类型抗生素的不同种类药物的杀菌机理及其引起的细菌对抗生素的耐药机理相似^[16-17]。本实验使用的 8 大类 12 种抗生素药敏纸片购自杭州天和微生物试剂有限公司, 纸片直径为 6 mm, 抗生素种类及每片纸片的抗生素含量为: 氯霉素类的氯霉素(chloramphenicol, CHL) 30 $\mu\text{g} \cdot \text{片}$; 喹诺酮类的环丙沙星(ciprofloxacin, CIP) 5 $\mu\text{g} \cdot \text{片}$ 、左氧沙星(levofloxacin, LEV) 5 $\mu\text{g} \cdot \text{片}$ 、萘啶酸(nalidixic acid, NAL) 30 $\mu\text{g} \cdot \text{片}$; 四环素类的四环素(tetracycline, TET) 30

$\mu\text{g} \cdot \text{片}$; 多粘菌素类的多黏菌素 B (polymyxin-B, POL) $30 \mu\text{g} \cdot \text{片}$; 磺胺类的复方新诺明 (compound sino-mi, CPS) $1.25/23.75 \mu\text{g} \cdot \text{片}$ 、甲氧苄胺嘧啶 (trimethoprim, TMP) $5 \mu\text{g} \cdot \text{片}$; 氨基糖苷类的庆大霉素 (gentamycin, GEN) $10 \mu\text{g} \cdot \text{片}$; 大环内酯类的红霉素 (erythromycin, ERY) $15 \mu\text{g} \cdot \text{片}$; β -内酰胺类的氨苄青霉素 (ampicillin, AMP) $10 \mu\text{g} \cdot \text{片}$ 、先锋 V (cefazolin, CEF) $30 \mu\text{g} \cdot \text{片}$; 购置的药敏纸片于冷冻柜内 -20°C 储藏备用。

对菌株进行药敏分析的同时, 对其进行革兰氏染色以判断菌株革兰氏染色的属性。

1.5 数据统计 细菌多重耐药性 (Multiple-antibiotic-resistance, MAR), 是指菌株对 3 种或 3 种以上抗菌药物耐药^[2]。多重耐药率为 $n(n \geq 3)$ 重耐药的菌株数与总药敏实验的菌株数的百分比^[2]。6 个对虾育苗场之间细菌耐药性以及细菌对 12 种抗生素耐药性的水平差异显著性分析采用单因素方差分析 (ANOVA, Games-Howell), 使用 SPSS 17.0 软件进行数据统计分析。

2 结果与分析

2.1 对虾育苗场水体细菌对各种抗生素的耐药性 药敏实验共测试了 217 株菌株, 其中 45 株分离自 YF 场, 36 株分离自 JD 场, 35 株分离自 DC 场, 37 株分离自 HM 场, 30 株分离自 SD 场, 34 株分离自 XR 场。6 个对虾育苗场水体中的 217 株细菌对 12 种测试抗生素的结果 (表 2) 表明, 对虾育苗场水体中的细菌对氨苄西林的耐药性最高, 平均耐药率达 59.06%, 其中 YF 场、HM 场、XR 场和 DC 场的细菌对氨苄西林的耐药率依次为 55.56%, 77.14%, 82.35% 和 83.78%; 其次对虾育苗场水体细菌对 TMP 和复方新诺明的平均耐药率也超过 50%, 分别为 54.75% 和 51.77%。6 个育苗场水体细菌对四环素也有相当高的耐药性, 其中 HM 场达 97.14%, 这也是整个研究中出现的最大耐药值。6 个育苗场中有 3 个场的细菌对 12 种抗生素的最高耐药性表现在对 TMP 的耐药上, 这 3 个场分别是 JD 场 (69.44%)、SD 场 (66.67%) 和 XR 场 (91.18%)。6 个育苗场中的细菌对多粘菌素 B 最敏感, 除了 YF 场出现 2.22% 的耐药率外, 其余 5 样场对多粘菌素 B 均完全敏感; 测试菌株对左氟沙星、环丙沙星亦高度敏感, 平均耐药率均低于 2% (表 2)。

测试的 12 种抗生素之间的细菌耐药性差异显著 (ANOVA, $P < 0.05$)。其中, 氨苄西林的细菌耐药性显著高于多粘菌素 B、左氟沙星、环丙沙星的细菌耐药性 (依次为 $P = 0.041, 0.044, 0.045$), 其他抗生素间的细菌耐药性无显著差异。同时, 统计结果显示, 尽管 HM 场和 XR 场的细菌耐药性比其他样场高, 但 6 个研究样场之间的细菌耐药性没有显著差异 (ANOVA, $P > 0.05$)。

表 2 对虾育苗场水体细菌对各种抗生素的耐药性

Tab. 2 Bacterial resistance to different antibiotics in shrimp hatcheries

对虾育苗场 Shrimp hatchery	AMP	POL	CPS	ERY	LEV	CIP	GEN	CHL	TET	CEF	NAL	TMP
YF	55.56	2.22	8.89	4.44	0.00	0.00	0.00	2.22	17.14	20.00	4.44	17.78
JD	22.22	0.00	63.89	36.11	2.78	5.56	5.56	19.44	44.44	41.67	8.83	69.44
DC	83.78	0.00	32.43	2.70	5.41	5.41	27.03	29.73	29.73	18.92	8.11	40.54
HM	77.14	0.00	77.14	20.00	0.00	0.00	14.29	71.43	97.14	17.14	25.71	42.86
SD	33.33	0.00	40.00	6.67	0.00	0.00	0.00	6.67	36.67	13.33	33.33	66.67
XR	82.35	0.00	88.24	2.94	0.00	0.00	0.00	20.59	76.47	14.71	8.82	91.18
平均值 Average	59.06	0.37	51.77	12.14	1.37	1.83	7.81	25.01	50.27	20.96	14.87	54.75

2.2 对虾育苗场水体细菌的多重耐药性 在实验过程中未出现对 10 种或 10 种以上抗生素同时耐药的菌株, 但出现对 12 种抗生素都敏感的菌株 (29 株), 占总菌株 (217 株) 的 13.36%。细菌多重耐药性 (MAR) 比率的峰值出现在四重耐药性上 (表 3), 在 XR 场的四重耐药性达最高值 (55.88%), 其次是 DC 场 (40.00%)。MAR 累计最高的是 XR 场, 达 88.23%; 最低的是 YF 场, MAR 累计只有 11.11%。最高耐药种类达 9 种, 只出现在 HM 场; 耐药种类最少的是 YF 场, YF 场最高耐药种类为四重耐药性。除了 HM

场,样场均存在三重耐药,四重耐药性普遍存在。除 YF 场外,其他样场普遍存在五重和六重耐药性。七重耐药性只在 JD 场和 HM 场中存在。八重耐药出现在 JD 场、DC 场和 HM 场中。九重耐药出现在 HM 场。测试菌株中有 2 株菌株呈现九重耐药性,这 2 株菌(HM-26、HM-57) 均对氨苄西林、复方新诺明、环丙沙星、庆大霉素、氯霉素、四环素、萘啶酸、TMP 8 种抗生素耐药,此外分别对左氟沙星或先锋 V 耐药。

表 3 对虾育苗场中细菌的多重耐药性
Tab. 3 Multiple-antibiotic-resistance (MAR) in bacteria isolated from shrimp hatcheries %

MAR	YF	JD	DC	HM	SD	XR
MAR(9)	0. 00	0. 00	0. 00	5. 41	0. 00	0. 00
MAR(8)	0. 00	2. 78	11. 43	2. 70	0. 00	0. 00
MAR(7)	0. 00	2. 78	0. 00	2. 70	0. 00	0. 00
MAR(6)	0. 00	8. 33	5. 71	13. 51	6. 67	14. 71
MAR(5)	0. 00	19. 44	22. 86	5. 41	3. 33	5. 88
MAR(4)	6. 67	16. 67	40. 00	0. 00	23. 33	55. 88
MAR(3)	4. 44	13. 89	2. 86	5. 41	10. 00	11. 76
MAR 累计 Total of MAR	11. 11	63. 89	82. 86	35. 14	43. 33	88. 23

2.3 测试细菌的革兰氏染色属性 从表 4 可见,测试菌株中革兰阴性菌占有绝对优势,比率最低的 SD 场革兰氏阴性菌也占 76. 67% ,DC 场和 HM 场更高达 100% 。

表 4 各对虾育苗场中细菌的革兰氏染色属性
Tab. 4 Gram staining of bacteria in the shrimp hatcheries

菌株数 Number of strain	YF	JD	DC	HM	SD	XR	总计 Total
革兰氏阴性菌/株 G ⁻ bacteria (strain)	44	31	35	37	23	31	201
革兰氏阳性菌/株 G ⁺ bacteria (strain)	1	5	0	0	7	3	16
革兰氏阴性菌比率/% Ratio of G ⁻ bacteria	97. 78	86. 11	100	100	76. 67	91. 18	73. 73

3 讨 论

3.1 水产养殖水域中大多数病原菌为革兰阴性菌 Chelossi 等的研究结果显示水产养殖水域中大多数病原菌为革兰阴性菌^[2],革兰氏染色结果(见表 4) 表明,73. 73% 细菌菌株为革兰氏阴性。由于分离菌株时是随机挑取形态不一的菌落,因此,可以认为对虾育苗场水体中的革兰阴性菌占优势,且实验结果显示革兰氏阴性菌比革兰氏阳性菌有更高耐药性。Iredell 和 Sintchenko 认为,相比于革兰氏阳性菌,革兰氏阴性菌具更多抗生素耐药基因,并具有迅速繁殖的特性,革兰氏阴性菌的耐药机制比阳性菌复杂^[23],加上绝大多数耐药基因位于质粒上,普通环境细菌与病原细菌菌株之间两者极易发生耐药基因的相互水平扩散(即交叉传递)^[16-17]。因此,本实验中革兰氏阴性菌占优势意味着利用抗生素防治对虾育苗场细菌病害的风险增加。建议对对虾育苗场抗生素药物的使用进行监测,加强对抗生素药物合理使用的教育和监管。

3.2 虾苗场水体细菌耐药性成因分析 本实验中虾苗场水体细菌对氨苄西林的耐药性最高,耐药率为 59. 06% ,这与 Matyar 等对海水、对虾体内和沉积物中细菌耐药性的研究结果一致^[24]。氨苄西林乃半合成青霉素,属 β -内酰胺类的抗生素,其作用机理是干扰细菌细胞壁代谢,而革兰阴性细菌的细胞壁较革兰阳性菌的薄,机械强度弱,因此,氨苄西林对革兰氏阴性菌的作用比阳性菌要大。但由于氨苄西林在细

菌产生的 β -内酰胺酶作用下不稳定,长期使用会引起产 β -内酰胺酶的菌株增多,氨苄西林被水解失效。江洁华等指出革兰氏阴性杆菌对常用抗菌药物的耐药性最高为氨苄西林,且大部分细菌呈多重耐药性,因为它们携带多种 β -内酰胺酶^[23]。

本实验中育苗样场水体中的细菌对多粘菌素 B、左氟沙星、环丙沙星均高度敏感(平均耐药性均低于 2%),这与细菌本身对它们敏感有关。多粘菌素 B 是一种常见的由多粘芽孢杆菌产生的一组抗革兰氏阴性杆菌的多肽类抗生素,其作用机理主要是与革兰氏阴性菌外膜的脂多糖相互作用,能够破坏细胞膜上磷脂分子的有序排列,诱发脂双层膜产生孔洞或缺陷,影响细胞膜的通透性,造成细胞内的重要成分外漏,从而能快速杀死细菌。但因多粘菌素 B 抗菌谱较窄,在生产上应用的较少,且多粘菌素 B 的杀菌过程不取决于细菌的代谢活性,导致细菌对其不易产生耐药性^[24]。

左氟沙星、环丙沙星均属第三代喹诺酮类抗敏感药,此类药物是通过改变菌株核酸代谢而杀死细菌。有研究表明细菌对氟喹诺酮类药物产生耐药性并非由于垂直传播,而是抗生素药物的选择压力造成的^[25],又因氟喹诺酮类药物在东海岛的使用历史较短,最小抑菌浓度小,所以,现阶段的细菌对此类药物较敏感,但据报道,在爱尔兰、加拿大和我国香港,细菌对氟喹诺酮类药物的耐药率不断上升^[26],这意味着抗生素的使用习惯、历史长短明显与细菌的耐药性相关,养殖者生产实践中须谨慎操作使用。

本研究的对虾育苗场水体细菌对复方新诺明和 TMP 耐药率高,6 个样场中 JD、SD、XR 3 个样场的细菌对 12 种抗生素中的最高耐药性表现在对 TMP 的耐药上,XR 场对 TMP 的耐药性高达 91.18%,这与 Le 等报道越南虾场细菌对两种药物都有较高的耐药性的结果一致^[8]。产生这种结果的原因可能与磺胺类药物在东海岛的使用历史有关。复方新诺明和 TMP 均属磺胺类抗生素,能通过阻碍细菌体内叶酸的合成而阻碍某些重要蛋白质的合成,以达到抑制细菌繁殖的目的,是较早应用的一类人工合成抗菌药物,由于抗菌谱广,价格低廉,在发展中国家的水产养殖中广泛应用。Gao 等提到泰国北部的养殖环境中,磺胺类抗生素是主要的残留抗生素,细菌反复接触磺胺药后均可获得耐药性^[27]。6 个样场对抗菌谱广的四环素也产生了较高的耐药性(HM 场达 97.14%),这也可能与四环素类药物(如土霉素)在苗场的广泛使用以及测试细菌携带了相关耐药基因有关^[28]。

3.3 抗生素耐药性之间的水平差异与虾苗场间细菌耐药性的水平差异分析 12 种抗生素之间的细菌耐药性水平差异显著性分析结果表明,12 种抗生素的细菌耐药性具有显著差异(ANOVA, $P < 0.05$)。其中,氨苄西林的细菌耐药性显著高于多粘菌素 B、左氟沙星、环丙沙星,其他抗生素间的细菌耐药性无显著差异,这可能与抗生素的化学结构及其使用历史和使用频率有关。笔者在各采样场进行实验的同时,也实地调查了东海岛部分水产用药经销商的抗生素类药物的销售情况,结果显示, β -内酰胺酶类抗生素最先应用于当地的养殖业,其次是磺胺类、四环素类等抗生素药物,而氟喹诺酮类、多肽类等为当前市场新兴的抗生素药物。尽管 HM 场和 XR 场的细菌耐药性比其他样场要高,但各研究样场之间的细菌耐药性没有显著差异(ANOVA, $P > 0.05$),这可能是由于这 6 个样场都处于东海岛,各育苗场所使用的抗生素种类和剂量具有趋同性,加上苗场水源地之间水流交换导致的细菌耐药性及其基因水平扩散^[16-17],使得各育苗场的细菌产生了相似的耐药性状况,从而导致了样场间的细菌耐药性差异不显著。

3.4 多重耐药性的成因分析 在 Matyar 等的研究中出现了 16 种抗生素的耐药菌株^[24],本研究中 52.07% 的菌株(113 株)具有多重耐药性,最高出现对 9 种抗生素耐药的菌株。细菌的多重耐药是在各种代谢酶调节下多机制共同参与形成的。细菌的多重耐药可由药物诱导产生,也可由细菌的基因转移产生^[29]。一种细菌可通过多种机制对抗菌药物产生耐药,整合子作为细菌捕获和表达基因的可移动遗传元件,能编码整合酶、负责基因重组、介导细菌遗传物质迁移的基因转位,为细菌提供了一种适应抗菌药物环境压力的机制^[30]。质粒的交换、转座子的转座作用、整合子及其他一些机制都有利于耐药基因在不同质粒或质粒与染色体间移动交换导致细菌单药耐药、多重耐药,垂直迁移、多菌种扩散,加快了耐药株的形成与蔓延^[31]。HM 场虽出现 9 重耐药,但其多重耐药率累计值却不是最高的,这可能与 HM 场作为省级良种苗场,抗菌药物的使用以及对虾苗场的管理都相对较规范有关。YF 场的多重耐药率是研究场地中最低的,根据采样时的实地调查,从虾苗养殖户口中得知,YF 场的池龄和池面积是几个研究对虾育苗场中相对较小的(表 1),与已有的研究结果一致,表明在养殖过程中使用抗生素的历史长短会直接影响细

菌对抗生素的耐药性水平的高低^[6]。XR场的多重耐药率累计是研究样场中最高的,累计为88.23%。虽然XR场的孵化时间只有3 d(表1),池龄也不是最长的,这种状况可能是虾苗场细菌从水源地已获得耐药性,其携带的耐药性基因垂直迁移与水平扩散,也可能源于该对虾育苗场长期使用某种或某几种抗生素,大量抗生素残留在池中所致。因为即使使用1种抗生素,经常暴露在这种抗生素下也会导致细菌对其他抗生素产生交叉耐药性,从而造成多重耐药性的形成^[51-52]。

参考文献:

- [1] 周洪, 庄捷生. 湛江对虾养殖业现状调查 [J]. 广东饲料, 2009, 18(5): 9-14.
- [2] SMITH P. Antimicrobial use in shrimp farming in Ecuador and emerging multi-resistance during the cholera epidemic of 1991: A re-examination of the data [J]. Aquaculture, 2007, 271(1/4): 1-7.
- [3] 张伟, 李天保, 杨秀生, 等. 抗生素的使用和耐药性浅析 [J]. 齐鲁渔业, 2008, 25(1): 37-38.
- [4] LALUMERA G M, CALAMAN D, GALLI P, et al. Preliminary investigation on the environmental occurrence and effects of antibiotics used in aquaculture in Italy [J]. Chemosphere, 2004, 54(5): 661-668.
- [5] 江为民, 肖光明. 湖南省水产养殖动物细菌性疾病流行病学研究 [J]. 水产科技情报, 2009, 36(2): 90-94.
- [6] KUSUDA R, SALATI F. Major bacterial diseases affecting mariculture in Japan [J]. Annual Review of Fish Diseases, 1993(3): 69-85.
- [7] REBOUCAS R H, DE SOUSA O V, LIMA A S, et al. Antimicrobial resistance profile of *Vibrio* species isolated from marine shrimp farming environments (*Litopenaeus vannamei*) at Ceará, Brazil [J]. Environmental Research. 2011, 111(1): 21-24.
- [8] 谢珍玉, 周永灿, 冯永勤. 对虾弧菌病的研究进展——回顾对虾弧菌病的病原种类、致病机制与条件、症状与组织病变及对虾的防御机制 [J]. 海南大学学报: 自然科学版, 2007, 25(1): 88-95.
- [9] LE T X, MUNEKAGE Y, KATO S. Antibiotic resistance in bacteria from shrimp farming in mangrove areas [J]. Science of the Total Environment, 2005, 349(1/3): 95-105.
- [10] LE T X, MUNEKAGE Y. Residues of selected antibiotics in water and mud from shrimp ponds in mangrove areas in Viet Nam [J]. Marine Pollution Bulletin, 2004, 49(11/12): 922-929.
- [11] 章洁香, 张瑜斌, 张才学, 等. 高位虾池水体细菌和弧菌的密度变化及影响因素 [J]. 集美大学学报: 自然科学版, 2010, 15(5): 12-17.
- [12] 陈健舜, 朱凝瑜, 孔蕾, 等. 凡纳滨对虾细菌性红体病病原的分子特征与耐药性 [J]. 水产学报, 2012, 36(12): 1891-1900.
- [13] 张瑜斌, 章红, 柯盛, 等. 不同养殖模式虾池弧菌对抗菌药物的耐药性与虾池水质评价 [J]. 广东海洋大学学报, 2007, 27(1): 42-47.
- [14] VASEEHARAN B, RAMASAMY P, MURUGAN T, et al. In vitro susceptibility of antibiotics against *Vibrio* spp. and *Aeromonas* spp. isolated from *Penaeus monodon* hatcheries and ponds [J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2005, 26(4): 285-291.
- [15] LEE S W, NAJIAH M, WENDY W, et al. Multiple antibiotic resistance and heavy metal resistance profile of bacteria isolated from giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) hatchery [J]. Agricultural Sciences in China, 2009, 8(6): 740-745.
- [16] KÜMMERER K. Antibiotics in the aquatic environment—A review—Part I [J]. Chemosphere, 2009, 75(4): 417-434.
- [17] KÜMMERER K. Antibiotics in the aquatic environment—A review—Part II [J]. Chemosphere, 2009, 75(4): 435-441.
- [18] SAPKOTA A, SAPKOTA A R, KUCHARSKI M, et al. Aquaculture practices and potential human health risks: Current knowledge and future priorities [J]. Environment International, 2008, 34(8): 1215-1226.
- [19] 戴梦红, 王玉莲, 袁宗辉. 抗菌促生长剂的耐药性与人类健康 [J]. 中国兽医学报, 2009, 29(3): 383-388.
- [20] TENDENCIA E A, DE LA PENA L D. Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds [J]. Aquaculture, 2001, 195(3/4): 193-204.
- [21] WEBSTER L F, THOMPSON B C, FULTON M H, et al. Identification of sources of *Escherichia coli* in South Carolina estuaries using antibiotic resistance analysis [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2004, 298(2): 179-195.
- [22] CHELOSSI E, VEZZULLI L, MILANO A, et al. Antibiotic resistance of benthic bacteria in fish-farm and control sediments

- of the Western Mediterranean [J]. Aquaculture, 2003, 219(1/4): 83–97.
- [23] IREDELL J R, SINTCHENKO V. Screening for antibiotic resistant Gram-negative bacteria [J]. The Lancet Infectious Diseases, 2006, 6(6): 316–317
- [24] MATYAR F, KAYA A, DINCER S. Antibacterial agents and heavy metal resistance in Gram-negative bacteria isolated from seawater, shrimp and sediment in Iskenderun Bay, Turkey [J]. Science of the Total Environment, 2008, 407(1): 279–285.
- [25] 江洁华, 廖伟娇, 徐军, 等. 多重耐药革兰阴性杆菌产 β -内酰胺酶的表型及基因型研究 [J]. 中华医院感染学杂志, 2007, 17(5): 492–495.
- [26] LI J, NATION R L, MILNE R W, et al. Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant gram-negative bacteria [J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2005, 25(1): 11–25.
- [27] 王辉, 陈民钧. 氟喹诺酮类抗生素的耐药机制及其耐药现状 [J]. 中华儿科杂志, 2002, 40(8): 476–477.
- [28] PALLARES R, FENOLL A, LIWARES J. The epidemiology of antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* and the clinical relevance of resistance to cephalosporins, macrolides and quinolones [J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2003, 22(1): 15–24.
- [29] GAO P P, MAO D Q, YI L, et al. Occurrence of sulfonamide and tetracycline-resistant bacteria and resistance genes in aquaculture environment [J]. Water Research, 2012, 46(7): 2355–2364.
- [30] 杨平满, 周建英. 常见多重耐药菌的耐药机制及防治对策 [J]. 中华医院感染学杂志, 2006, 16(12): 1434–1437.
- [31] 梁惜梅, 施震, 黄小平. 珠江口典型水产养殖区抗生素的污染特征 [J]. 生态环境学报, 2013, 22(2): 304–310.
- [32] 蔡敏泓, 黄永茂. 整合子与大肠埃希菌耐药基因水平转移关系的研究进展 [J]. 西南军医, 2011, 13(1): 124–126.

Antibiotic Resistance of Bacteria Isolated from Shrimp Hatcheries at Donghai Island, Zhanjiang

LI Qin¹, SUN Chengbo², CHEN Meiling¹, ZHANG Yubin¹, SUN Xingli¹

(1. Monitoring Center for Marine Resources and Environments, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

2. College of Fisheries, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: At Donghai Island, Zhanjiang, Guangdong, China were isolated 217 strains of bacteria from the water in 6 shrimp hatcheries, and their antibiotic resistance and susceptibility to 12 antibiotic agents was determined by using the Kirby-Bauer disc diffusion method for susceptibility testing. The results showed significant differences in bacterial resistance of the water to the 12 antibiotics (ANOVA, $P < 0.05$). Bacteria of the water in the 6 hatcheries showed high susceptibility to polymyxin-B, levofloxacin, and ciprofloxacin and gave high resistance to ampicillin, trimethoprim, compound sinomi and tetracycline. Bacterial strains with multiple antibiotic resistances (MAR) were found in the water from each hatchery, and about 52.07% of strains exhibited MAR, but none of the strains showed resistance to all 12 antibiotics. Statistical analysis indicated that no significant difference in antibiotic resistance of bacteria was observed in the water among the 6 hatcheries (ANOVA, $P = 0.273 > 0.05$) although antibiotic resistance of bacteria isolated from the water were higher in the hatcheries HM and XR than in the other hatcheries.

Key words: shrimp hatcheries; bacteria; antibiotic resistance; Donghai Island