

广西凡纳滨对虾源弧菌整合子相关基因检测

杨祖鹏¹, 谭雯予¹, 吴志刚¹, 魏 华¹, 张洪耀¹, 黄德生², 张振豪³, 梁静真^{1*}

¹广西大学动物科学技术学院, 广西水生动物病害诊断实验室, 水生生物健康养殖与营养调控重点实验室, 广西 南宁

²合浦县水产技术推广站, 广西 北海

³港口区渔业技术推广站, 广西 防城港

收稿日期: 2023年2月16日; 录用日期: 2023年3月8日; 发布日期: 2023年3月22日

摘 要

本实验通过PCR方法检测27株广西凡纳滨对虾源弧菌中整合子相关基因携带情况, 为凡纳滨对虾弧菌病的综合防控提供指导。共采集溶藻弧菌7株, 创伤弧菌10株, 副溶血弧菌10株。PCR检测结果, 27株弧菌中 $int1$ 、 $sul1$ 、 $qacEA1$ 、 $int2$ 和 $int3$ 基因的检出率依次为63.0%、40.7%、48.1%、0%和0%。受试菌株共包含5种整合子相关基因型, 即 $int1-sul1-qacEA1-int2-int3^-$ 、 $int1-sul1-qacEA1-int2-int3^-$ 、 $int1-sul1+qacEA1-int2-int3^-$ 、 $int1-sul1+qacEA1+int2-int3^-$ 和 $int1-sul1-qacEA1+int2-int3^-$, 其中优势基因型为 $int1-sul1-qacEA1-int2-int3^-$ 和 $int1-sul1+qacEA1+int2-int3^-$, 各占37.0% (10/27)。在溶藻弧菌、创伤弧菌和副溶血弧菌的检出率: $int1$ 基因分别为28.6% (2/7)、90.0% (9/10)和60.0% (6/10); $sul1$ 基因分别为0% (0/7)、90.0% (9/10)和20.0% (2/10); $qacEA1$ 基因分别为14.3% (1/7)、90.0% (9/10)和30.0% (3/10)。 $int1$ 、 $sul1$ 和 $qacEA1$ 基因在三种弧菌之间的检出率差异显著($P<0.05$), 在创伤弧菌中的检出率最高, 在溶藻弧菌中的检出率最低。

关键词

凡纳滨对虾, 弧菌, 整合子, 检测

Detection of Integron Related Genes in *Vibrios* from *Litopenaeus vannamei* in Guangxi

Zupeng Yang¹, Wenyu Tan¹, Zhigang Wu¹, Hua Wei¹, Hongyao Zhang¹, Desheng Huang², Zhenhao Zhang³, Jingzhen Liang^{1*}

¹Key Laboratory of Aquatic Healthy Breeding and Nutrition Regulation, Guangxi Aquatic Animal Disease Diagnostic Laboratory, Institute of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning Guangxi

*通讯作者。

文章引用: 杨祖鹏, 谭雯予, 吴志刚, 魏华, 张洪耀, 黄德生, 张振豪, 梁静真. 广西凡纳滨对虾源弧菌整合子相关基因检测[J]. 水产研究, 2023, 10(1): 13-22. DOI: 10.12677/ojfr.2023.101002

²Hepu Station of Aquaculture Technology Extension, Beihai Guangxi³Gangkou Station of Fishery Technology Extension, Fangchenggang GuangxiReceived: Feb. 16th, 2023; accepted: Mar. 8th, 2023; published: Mar. 22nd, 2023

Abstract

In this experiment, the carrying status of integron related genes in 27 isolates of *Vibrio* sp. from *Litopenaeus vannamei* of Guangxi was detected by PCR method, so as to provide direction for comprehensive prevention and control of *Vibrio* disease in *L. vannamei*. There were 7 isolates of *V. alginolyticus*, 10 isolates of *V. vulnificus* and *V. parahaemolyticus* samples. PCR detection results showed that among the 27 isolates of *Vibriosp*, the positive rates of *int1*, *sul1*, *qacEΔ1*, *int2* and *int3* genes were 63.0%, 40.7%, 48.1%, 0% and 0%, respectively. There were 5 kinds of integron related genotypes containing *int1-sul1-qacEΔ1-int2-int3-*, *int1+sul1-qacEΔ1-int2-int3-*, *int1+sul1+qacEΔ1-int2-int3-*, *int1+sul1+qacEΔ1+int2-int3-* and *int1+sul1-qacEΔ1+int2-int3-*, in which *int1-sul1-qacEΔ1-int2-int3-* and *int1+sul1+qacEΔ1+int2-int3-* are the dominant genotypes, each accounting for 37.0% (10/27). The positive rates in *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* and *V. parahaemolyticus* were 28.6% (2/7), 90.0% (9/10) and 60.0% (6/10) of *int1* gene, 0% (0/7), 90.0% (9/10) and 20.0% (2/10) of *sul1* gene, 14.3% (1/7), 90.0% (9/10) and 30.0% (3/10) of *qacEΔ1*. The positive rates of *int1*, *sul1* and *qacEΔ1* genes were significantly different among the three kinds of *Vibrio* sp. ($P < 0.05$). The highest positive rates were observed in *V. vulnificus* isolates and the lowest ones were in *V. alginolyticus* isolates.

Keywords

Litopenaeus vannamei, *Vibrio*, Integron, Detection

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Open Access

1. 引言

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)具有耐高温、耐低盐、生长快、抗病力强、肉质鲜美、适合高密度养殖、对营养需求较低等优点, 经济和商业价值均较高, 其养殖业已成为广西水产养殖的支柱产业之一[1]。弧菌作为海水环境中最常见的条件致病菌, 对规模化对虾养殖的危害非常严重, 容易引起烂尾病、烂鳃病、红腿病、肠炎、肝胰腺坏死等疾病[2]。这些对虾弧菌病在世界范围内分布广泛[3], 无特定感染品种, 在对虾育苗、养成、越冬等阶段均会发生, 当水温为 25~32℃时为弧菌病发病高峰期[4]。近年, 弧菌病严重影响了广西凡纳滨对虾养殖业的健康发展。弧菌病常用治疗措施为使用抗生素或消毒剂[5], 而抗生素滥用可诱导细菌产生耐药[6]。细菌耐药会引起水产养殖的经济损失, 多重耐药菌株的出现更是使治疗面临巨大挑战, 目前已有不少关于广西凡纳滨对虾源弧菌多重耐药性的报道[7]。细菌多重耐药的产生与移动性遗传元件(如整合子、质粒、转座子等)密切相关[8]。整合子是一种能利用位点特异性重组系统在不同细菌中传播的可移动基因元件, 具有捕获、整合、表达外源耐药基因盒的功能, 有 507 种抗生素抗性基因可作为整合子基因盒被整合子所捕获[9] [10] [11]。根据整合酶的不同可分为 I、II 和 III 型

整合子, I 型整合子基因结构通常包含 5'端 I 型整合酶基因 *int1*、3'端可能含有季铵盐耐药基因 *qacEΔ1* 和磺胺类耐药基因 *sul1*; II 型整合子主要位于转座子 Tn7 及其衍生物上, II 型整合酶 *int2* 与 *int1* 有 46% 的同源性[12]; III 型整合子相关报道较少, III 型整合酶 *int3* 与 *int1* 有 60.9% 的同源性[12]。不同细菌的整合子基因含量在一定程度上反映当地的抗生素使用情况, 以及细菌的耐药状况, 目前广西虾源弧菌整合子相关基因检测主要集中于副溶血弧菌, 有关其他种类弧菌整合子的报道较少。本实验对 27 株广西凡纳滨对虾源弧菌(包括溶藻弧菌、创伤弧菌和副溶血弧菌)进行整合子相关基因 *int1*、*sul1*、*qacEΔ1*、*int2*、*int3* 的检测和分析, 其结果可为广西凡纳滨对虾弧菌病的综合防控提供指导、为多重耐药弧菌发生和传播的预防提供理论依据。

2. 实验材料与方法

2.1. 实验材料

试验菌株为本实验室于 2021 年从广西沿海患病凡纳滨对虾中分离的 27 株弧菌, 其中溶藻弧菌 7 株、创伤弧菌 10 株、副溶血弧菌 10 株, 菌株信息见表 1。在试验前均已再次进行 API 生理生化鉴定和 16S rRNA 分子生物学鉴定。细菌基因组 DNA 提取试剂盒和 PCR 反应酶 2× Taq MasterMix 均购自北京艾德莱生物科技有限公司。

Table 1. Information of 27 isolates of *Vibrio* species

表 1. 27 株弧菌菌株信息

弧菌种类	菌株数	菌株编号
溶藻弧菌	7	RZ01、RZ02、RZ03、RZ04、RZ05、RZ06、RZ07
创伤弧菌	10	CS01、CS02、CS03、CS04、CS05、CS06、CS07、CS08、CS09、CS10
副溶血弧菌	10	FR01、FR02、FR03、FR04、FR05、FR06、FR07、FR08、FR09、FR10

2.2. 细菌 DNA 的提取及整合子相关基因 PCR 检测

参照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书来提取细菌总 DNA。整合子相关基因 *int1*、*sul1*、*qacEΔ1*、*int2* 和 *int3* 的 PCR 扩增引物根据姚小娟[6]的方法进行设计并由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成(表 2)。25 μL 的 PCR 反应体系为: DNA 模板 1 μL, 上、下游引物各 1 μL, 2× Taq Master Mix 12.5 μL, 灭菌去离子水 9.5 μL。PCR 反应程序设置为 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 40 s, 退火 30 s(退火温度见表 2), 72℃ 延伸 90 s, 35 个循环; 72℃ 充分延伸 10 min。以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物, 在北京六一凝胶成像系统观察电泳结果。将符合预计片段长度的 PCR 产物送北京六合华大基因科技有限公司进行测序。

未扩增出预期片段大小的菌株, 退火温度以表 2 所示温度为中心温度, ±5℃ 再做梯度 PCR 并调试其他扩增条件, 反复试验仍无预期大小片段出现者视为该基因检测结果为阴性。

Table 2. Primer sequence, annealing temperature and target product length of PCR reaction

表 2. PCR 反应引物序列、退火温度及预计产物长度

基因	引物序列	退火温度	预计产物长度
<i>int1</i>	int1F: GTTCGGTCAAGTTCTGG int1R: CGTAGAGACGTCGGAATG	55℃	890 bp
<i>sul1</i>	sul1F: GTGACGGTGTTCGGCATTCT sul1R: TCCGAGAAGGTGATTGCGCT	66℃	779 bp

Continued

<i>qacEΔ1</i>	qacEΔ1F: ATCGCAATAGTTGGCGAAGT qacEΔ1R: CAAGCTTTTGCCCATGAAGC	57°C	226 bp
<i>int2</i>	int2F: 5'-CAAGCATCTCTAGGCGTA-3' int2R: 5'-AGTAGCATCAGTCAATCC-3'	55°C	1056 bp
<i>int3</i>	int3F: 5'-CAAGCATCTCTAGGCGTA-3' int3R: 5'-AGTAGCATCAGTCAATCC-3'	55°C	878 bp

2.3. 序列分析

以 DNASTar 的 Megalign 软件计算整合子相关基因序列的同源性。采用 ClustalX 进行序列完全比对分析后采用 Mega5 软件的邻接法构建进化树, Bootstrap 重复 1000 次检验其可信度。

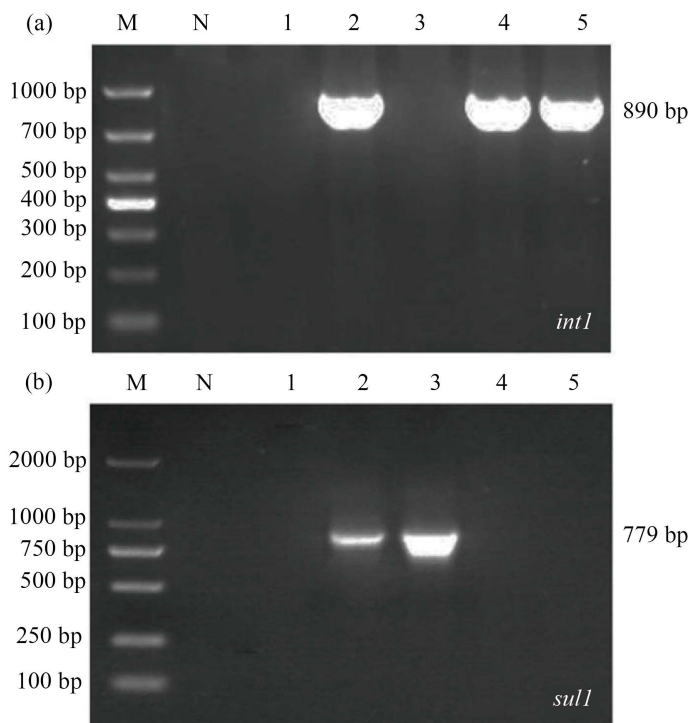
2.4. 统计分析

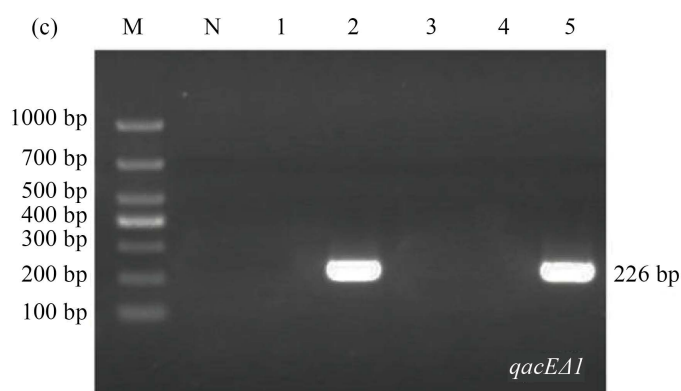
使用 SPSS18.0 软件的 χ^2 检验分析在溶藻弧菌、创伤弧菌和副溶血弧菌之间整合子相关基因检出率的差异性, 当 $P < 0.05$ 时表示差异显著。

3. 实验结果

3.1. 整合子相关基因的 PCR 检测结果

对 27 株弧菌进行整合子相关基因 *int1*、*sul1*、*qacEΔ1*、*int2* 和 *int3* 的 PCR 检测, 结果表明部分受试菌株可扩增出大小约为 890 bp 的 *int1* 基因片段、779 bp 的 *sul1* 基因片段和 226 bp 的 *qacEΔ1* 基因片段(图 1), 与预计片段长度一致。将阳性 PCR 产物送测序, 其测序结果经比对确认这些产物片段均为 *int1*、*sul1*、*qacEΔ1* 基因的序列片段。经反复 PCR 检测, 27 株弧菌均未扩增出 *int2* 和 *int3* 基因片段。





注：M 为 DL1000/2000 DNA Marker；N 为阴性对照；图 A 的 1~5 为部分菌株 *int1* 基因 PCR 扩增产物；图 B 的 1~5 为部分菌株的 *qacEA1* 基因 PCR 扩增产物；图 C 的 1~5 为部分菌株 *sul1* 基因 PCR 扩增产物。

Figure 1. PCR amplification results of *int1*, *sul1* and *qacEA1* gene

图 1. *int1*、*sul1* 和 *qacEA1* 基因 PCR 扩增结果

根据 PCR 检测结果，27 株弧菌菌株的整合子相关基因 *int1*、*sul1*、*qacEA1*、*int2* 和 *int3* 的检出率分别为 63.0% (17/27)、40.7% (11/27)、48.1% (13/27)、0% (0/27) 和 0% (0/27)。共包含 5 种整合子相关基因型，即 $int1^-sul1^-qacEA1^-int2^-int3^-$ 、 $int1^+sul1^-qacEA1^-int2^-int3^-$ 、 $int1^+sul1^+qacEA1^-int2^-int3^-$ 、 $int1^+sul1^+qacEA1^+int2^-int3^-$ 和 $int1^+sul1^-qacEA1^+int2^-int3^-$ ，分布率依次为 37.0% (10/27)、11.1% (3/27)、3.7% (1/27)、37.0% (10/27) 和 11.1% (3/27) (表 3)。

Table 3. Detection results of the integron related genes of *Vibrio* strains

表 3. 弧菌菌株整合子相关基因的检测结果

菌株	整合子相关基因					菌株	整合子相关基因				
	<i>int1</i>	<i>sul1</i>	<i>qacEA1</i>	<i>int2</i>	<i>int3</i>		<i>int1</i>	<i>sul1</i>	<i>qacEA1</i>	<i>int2</i>	<i>int3</i>
RZ01	-	-	-	-	-	CS08	+	+	+	-	-
RZ02	-	-	-	-	-	CS09	-	-	-	-	-
RZ03	+	-	+	-	-	CS10	+	+	+	-	-
RZ04	-	-	-	-	-	FR01	+	-	-	-	-
RZ05	+	-	-	-	-	FR02	+	-	+	-	-
RZ06	-	-	-	-	-	FR03	+	-	+	-	-
RZ07	-	-	-	-	-	FR04	+	+	-	-	-
CS01	+	+	+	-	-	FR05	+	+	+	-	-
CS02	+	+	+	-	-	FR06	+	-	-	-	-
CS03	+	+	+	-	-	FR07	-	-	-	-	-
CS04	+	+	+	-	-	FR08	-	-	-	-	-
CS05	+	+	+	-	-	FR09	-	-	-	-	-
CS06	+	+	+	-	-	FR10	-	-	-	-	-
CS07	+	+	+	-	-						

3.2. 整合子相关基因的序列分析

基于 890 bp 的 *int1* 基因构建的进化树如图 2 所示, 可见创伤弧菌 CS02、副溶血弧菌 FR04 和溶藻弧菌 RZ03 的 *int1* 基因序列与中国人源的霍氏肠杆菌(*Enterobacter hormaechei*) CP098781.1、大肠杆菌(*Escherichia coli*) CP101198.1、贝氏不动杆菌(*Acinetobacter baylyi*) JF731030.1、肠炎沙门氏菌(*Salmonella enterica*) CP100745.1 聚为一支, 在进化关系上比较近; 与日本人源绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*) LC685027.1、中国污水源葡萄牙柠檬酸杆菌(*Citrobacter portucalensis*) CP089439.1、美国人源肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*) CP098357.1 在进化关系上距离较远。基于 890 bp 的 *int1* 基因序列, 与 CP098781.1、CP101198.1、JF731030.1、CP100745.1、LC685027.1、CP089439.1、CP098357.1 的同源性: CS02 分别为 99.8%、99.8%、99.4%、99.6%、42.8%、39.2%、38.9%; FR04 分别为 97.5%、97.7%、97.8%、97.7%、43.4%、40.1%、39.9%; RZ03 分别为 67.3%、67.7%、67.8%、67.1%、39.1%、34.0%、34.0%。

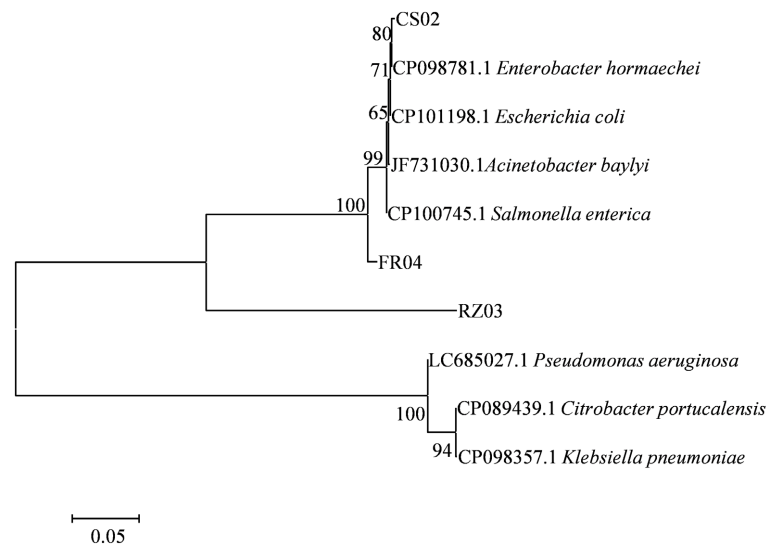


Figure 2. Phylogenetic tree based on nucleotide acid sequence of *int1* gene
图 2. 基于 *int1* 基因序列构建的进化树

基于 779 bp 的 *sull* 基因序列构建的进化树如图 3 所示, 可见副溶血弧菌 FR05 和创伤弧菌 CS02 的 *sull* 基因序列与新加坡人源大肠杆菌 CP102062.1、中国人源奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*) CP098444.1、韩国犬源肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*) CP098127.1、泰国犬源肺炎克雷伯菌 CP101878.1、中国虾源溶藻弧菌 OK067239.1 聚为一支, 在进化关系上比较近; 与日本人源绿脓杆菌 LC685027.1、日本人源霍氏肠杆菌 AP025852.1、英国人源宋内志贺氏菌(*Shigella sonnei*) CP102116.1 在进化关系上距离较远。基于 779 bp 的 *sull* 基因序列, 与大肠杆菌 CP102062.1、奇异变形杆菌 CP098444.1、肺炎克雷伯菌 CP098127.1、肺炎克雷伯菌 CP101878.1、溶藻弧菌 OK067239.1、绿脓杆菌 LC685027.1、霍氏肠杆菌 AP025852.1、宋内志贺氏菌 CP102116.1 的同源性: FR05 分别为 99.5%、99.3%、98.3%、98.4%、98.4%、45.6%、45.2%、44.5%; CS02 分别为 93.0%、92.9%、98.2%、98.4%、98.4%、45.2%、44.2%、44.2%。

基于 226 bp 的 *qacEAI* 基因构建的进化树如图 4 所示, 可见创伤弧菌 CS02、副溶血弧菌 FR03 和溶藻弧菌 RZ03 的 *qacEAI* 基因序列与瑞士牛源化脓隐秘杆菌(*Trueperella pyogenes*) CP097247.1、中国食源阪崎肠杆菌(*Cronobacter sakazakii*) CP080592.1、英国人源霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*) OW443151.1、中国人源肠炎沙门氏菌(*Salmonella enterica*) CP101341.1 聚为一支, 在进化关系上相对较近; 与西班牙污水源解

鸟氨酸拉乌尔菌(*Raoultella ornithinolytica*) CP104455.1、美国人源鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*) CP104351.1、中国人源肺炎克雷伯菌 CP104198.1 在进化关系上相对较远。基于 226 bp 的 *qacEΔ1* 基因序列, 与 CP097247.1、CP080592.1、OW443151.1、CP101341.1、CP104455.1、CP104351.1、CP104198.1 的同源性: FR03 分别为 100.0%、98.5%、100.0%、99.5%、46.4%、46.4%、46.4%; CS02 分别为 100.0%、100.0%、100.0%、99.5%、46.4%、46.4%、46.4%; RZ03 分别为 98.9%、98.9%、98.9%、97.3%、46.3%、46.3%、46.3%。

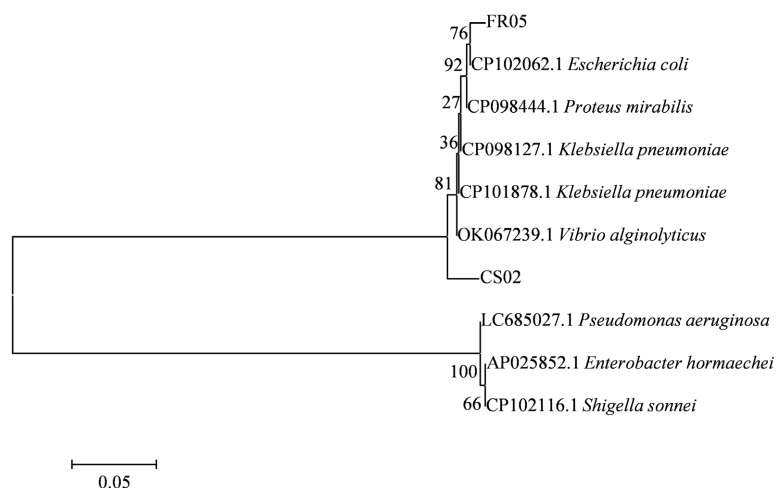


Figure 3. Phylogenetic tree based on nucleotide acid sequence of *sull* gene

图 3. 基于 *sull* 基因序列构建的进化树

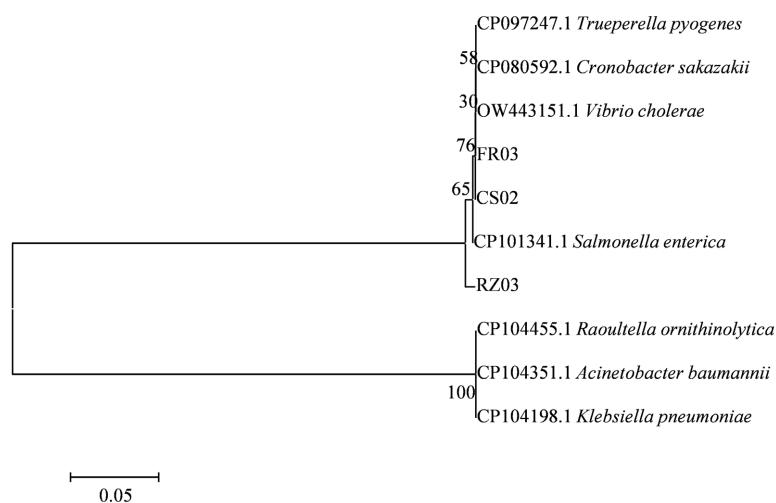


Figure 4. Phylogenetic tree based on nucleotide acid sequence of *qacEΔ1* gene

图 4. 基于 *qacEΔ1* 基因序列构建的进化树

3.3. 整合子相关基因在三种弧菌的检出率

在溶藻弧菌、创伤弧菌和副溶血弧菌的检出率: *int1* 基因分别为 28.6% (2/7)、90.0% (9/10)和 60.0% (6/10); *sull* 基因分别为 0% (0/7)、90.0% (9/10)和 20.0% (2/10); *qacEΔ1* 基因分别为 14.3% (1/7)、90.0% (9/10)和 30.0% (3/10)。 χ^2 检验分析结果, *int1*、*sull* 和 *qacEΔ1* 基因在三种弧菌之间的检出率差异显著($P < 0.05$),

在创伤弧菌中的检出率最高，在溶藻弧菌中的检出率最低(见表 4)。

Table 4. Comparison of the detection rates of integron related genes in three *Vibrio* species

表 4. 三种弧菌之间整合子相关基因检出率比较

基因	检出率%			P 值
	溶藻弧菌	创伤弧菌	副溶血弧菌	
<i>int1</i>	28.6% (2/7)	90.0% (9/10)	60.0% (6/10)	0.032
<i>sul1</i>	0% (0/7)	90.0% (9/10)	20.0% (2/10)	0.000
<i>qacEAI</i>	14.3% (1/7)	90.0% (9/10)	30.0% (3/10)	0.001

注：括号内的数值为携带整合子相关基因的菌株数与受试菌株数之比。

4. 讨论

弧菌是海水养殖环境中最常见的一类条件致病菌，广泛分布于海洋环境以及海洋生物体表和肠道中[13]。随着海水养殖规模化和集约化的发展，水产养殖动物的弧菌病频繁发生[14]。由于大多数弧菌也是人类临床致病菌，水产养殖源弧菌不可避免地引起食品安全问题[15]。抗生素目前被认为是治疗水产养殖动物弧菌病的有效手段，但由于养殖户使用抗生素方法不科学或水体污染等原因，许多地区的弧菌存在耐药甚至多重耐药现象，如 2014 年~2018 年广西凡纳滨对虾分离的副溶血弧菌，超过 90.0% 以上的菌株为五重以上耐药菌株，2018 年八重和九重耐药菌株数量合计占当年菌株总数的 55.6% [7]。细菌耐药性和整合子的密切联系让人们不得不重视整合子相关基因检测，针对不同弧菌的整合子相关基因检测对于弧菌的耐药防控具有重要意义[16]。

int1 基因的进化树分析表明，创伤弧菌 CS02 和副溶血弧菌 FR04 的 *int1* 基因序列与中国人源霍氏肠杆菌 CP098781.1、大肠埃希氏菌 CP101198.1、贝氏不动杆菌 JF731030.1、肠炎沙门氏菌 CP100745.1 的 *int1* 基因相似性较高，同源性在 97.5%~99.8%，推测可能有共同的起源；溶藻弧菌 RZ03 与以上菌株的 *int1* 基因同源性约为 67.1%~67.8%，可能与其在传播过程中发生了较大变异有关。副溶血弧菌 FR05 和创伤弧菌 CS02 的 *sul1* 基因与新加坡人源大肠埃希氏菌 CP102062.1、中国人源奇异变形杆菌 CP098444.1、韩国犬源肺炎克雷伯菌 CP098127.1、泰国犬源肺炎克雷伯菌 CP101878.1、中国虾源溶藻弧菌 OK067239.1 的 *sul1* 基因可能有共同的起源，同源性在 92.9%~99.5%。创伤弧菌 CS02、副溶血弧菌 FR03 和溶藻弧菌 RZ03 的 *qacEAI* 基因与瑞士牛源化脓隐秘杆菌 CP097247.1、中国食源阪崎肠杆菌 CP080592.1、英国人源霍乱弧菌 OW443151.1、中国人源肠炎沙门氏菌 CP101341.1 的 *qacEAI* 基因也可能具有共同的起源，同源性在 97.3%~100.0%。本实验结果表明整合子相关基因 *int1*、*sul1* 和 *qacEAI* 基因可能具有在不同地区、不同宿主或不同种属菌株之间进行广泛传播的能力。凡纳滨对虾养殖水环境很容易被整合子阳性的细菌所污染，而且水环境又为细菌提供了一个良好的耐药基因交流环境。建议加强凡纳滨对虾源弧菌的整合子相关基因检测，预防耐药或多重耐药弧菌的产生[17]。

广西凡纳滨对虾源弧菌中 I 型整合子相关基因 *int1*、*sul1* 和 *qacEAI* 的总检出率分别为 63.0%、40.7%、48.1%，三种基因的检出率在溶藻弧菌、创伤弧菌和副溶血弧菌菌株之间的差异均显著($P < 0.05$)。与其它水产养殖源弧菌相比，本实验受试菌株的 *int1* 检出率与贺晓晨的凡纳滨对虾源副溶血弧菌[7] (64.4%)、闫爽的弧源大肠杆菌[18] (63.64%) 的检出率接近，*sul1* 检出率比孙起荣的猪源大肠杆菌[19] (24.08)、贺晓晨的凡纳滨对虾源副溶血弧菌[7] (25%)、刘旭的海水养殖弧菌[20] (12.2%) 的研究结果高，*qacEAI* 检出率比贺晓晨的凡纳滨对虾源副溶血弧菌[7] (27.9%) 的研究结果高。可见，不同来源的菌株之间 *sul1* 和 *qacEAI*

检出率差异性相对较大,造成该结果的原因可能与菌株所处的水环境中含 *qacEΔ1* 和 *sul1* 基因的浓度不同有关。本实验中创伤弧菌的整合子相关基因检出率显著差异高于另两种弧菌,推测可能与不同养殖区域中弧菌分布的差异以及整合子相关基因丰度的差异有关。目前,对虾养殖用水存在被含有整合子阳性的生活、医疗或畜禽养殖废水污染的可能性,为尽可能控制广西凡纳滨对虾源弧菌多重耐药状况的加剧,建议应继续对整合子相关基因进行监控,同时有效处理生活、医疗或畜禽养殖废水,减少整合子相关基因的水平传播。

5. 结论

27 株广西凡纳滨对虾源弧菌中, *int1*、*sul1*、*qacEΔ1*、*int2* 和 *int3* 基因的检出率依次为 63.0%、40.7%、48.1%、0% 和 0%; 共包含 5 种整合子相关基因型,优势基因型为 *int1⁻sul1⁻qacEΔ1⁻int2⁻int3⁻* 和 *int1⁺sul1⁺qacEΔ1⁺int2⁻int3⁻*。*int1*、*sul1* 和 *qacEΔ1* 基因在创伤弧菌中的检出率最高,在溶藻弧菌中的检出率最低。

基金项目

国家现代农业产业技术体系广西创新团队建设专项(nycytxgxcxtd-14-02)。

参考文献

- [1] 刘洋. 凡纳滨对虾工厂化循环水高效养殖工艺研究[D]: [硕士学位论文]. 大连: 大连海洋大学, 2022.
- [2] 邢贞皇. 浅谈对虾外塘养殖中的弧菌问题[J]. 科学养鱼, 2020(10): 52-53.
- [3] 李君怡, 吴秋平, 周疆, 等. 凡纳滨对虾弧菌病及其防治方法研究进展[J]. 水产科技情报, 2022, 49(2): 106-111.
- [4] 王青瑶. 对虾养殖系统中副溶血弧菌基因水平转移和表达特性研究[D]: [硕士学位论文]. 大连: 大连海洋大学, 2022.
- [5] 周英. 对虾弧菌病的分类与防治[J]. 热带农业工程, 2020, 44(2): 109-112.
- [6] 姚小娟. 海水养殖源弧菌耐药性检测与整合子分析[D]: [硕士学位论文]. 上海: 上海海洋大学, 2014.
- [7] 贺晓晨, 韩书煜, 黎姗梅, 等. 广西凡纳滨对虾源副溶血弧菌耐药性及其整合子——基因盒检测[J]. 西南农业学报, 2020, 33(4): 893-900.
- [8] Ramatla, T., Mileng, K., Ndou, R., *et al.* (2022) Molecular Detection of Integrons, Colistin and β -Lactamase Resistant Genes in *Salmonella enterica* Serovars Enteritidis and Typhimurium Isolated from Chickens and Rats Inhabiting Poultry Farms. *Microorganisms*, **10**, 313. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020313>
- [9] 安然. 整合子携带的高风险抗生素抗性基因的环境传播研究[D]: [硕士学位论文]. 上海: 华东师范大学, 2022.
- [10] 邱旭阳. 抗生素对污泥厌氧消化系统中抗生素抗性基因赋存特征的影响[D]: [硕士学位论文]. 无锡: 江南大学, 2022.
- [11] Nadella, R.K., Panda, S.K., Badireddy, M.R., *et al.* (2022) Multi-Drug Resistance, Integron and Transposon-Mediated Gene Transfer in Heterotrophic Bacteria from *Penaeus vannamei* and Its Culture Environment. *Environmental Science and Pollution Research (International)*, **29**, 37527-37542. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-18163-1>
- [12] 韩宁. 济南市周边废水环境中耐药大肠埃希菌的分离、分布及其整合子在耐药机制中的相关性研究[D]: [硕士学位论文]. 济南: 山东大学, 2012.
- [13] 刘文娟, 田云龙, 王文君, 等. 烟台地区水体及水产品中 5 种致病性弧菌的分布特征及其流行趋势[J]. 生命科学仪器, 2021, 19(5): 53-57.
- [14] Sheikh, H., John, A., Musa, N., *et al.* (2022) *Vibrio* spp. and Their Vibriocin as a Vibriosis Control Measure in Aquaculture. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **194**, 4477-4491. <https://doi.org/10.1007/s12010-022-03919-3>
- [15] 王超. 水产品中检出致病菌的风险评估分析[J]. 中国城乡企业卫生, 2022, 37(1): 77-78.
- [16] 蔡杨, 凌保东. 泛耐药鲍曼不动杆菌生物被膜相关基因及整合子与耐药性的关系[J]. 中国感染控制杂志, 2022, 21(7): 690-696.
- [17] 卢景辉. 超级细菌离我们还有多远[J]. 家庭医药. 快乐养生, 2022(6): 82.

- [18] 闫爽, 冯涛, 王东阳, 等. 东北地区狐源大肠杆菌耐药性、整合酶及整合子基因的检测与相关分析[J]. 中国预防兽医学报, 2022, 44(4): 439-444.
- [19] 孙起荣. 猪源 ExPEC 耐药性分析及耐药基因和 I 类整合子检测[D]: [硕士学位论文]. 合肥: 安徽农业大学, 2021.
- [20] 刘旭. 海水养殖源弧菌耐药性调查及 qnrVC 基因在弧菌中的流行情况研究[D]: [硕士学位论文]. 上海: 上海海洋大学, 2016.