

• 环境生物技术 •

# 稻蛙共养系统中大肠杆菌耐药性及其传播风险

张亚茹<sup>1</sup>, 董琪琪<sup>2</sup>, 苘娜娜<sup>3</sup>, 钱敏<sup>1</sup>, 郭博海<sup>1</sup>, 何继玮<sup>1</sup>, 李宇行<sup>1</sup>, 韩剑众<sup>1</sup>, 曲道峰<sup>1\*</sup>

1 浙江工商大学 食品与生物工程学院, 浙江 杭州 310018

2 杭州市原种场, 浙江 杭州 311100

3 杭州市农业技术推广中心, 浙江 杭州 310016

张亚茹, 董琪琪, 苘娜娜, 钱敏, 郭博海, 何继玮, 李宇行, 韩剑众, 曲道峰. 稻蛙共养系统中大肠杆菌耐药性及其传播风险[J]. 生物工程学报, 2024, 40(10): 3750-3764.

ZHANG Yaru, DONG Qiqi, QING Nana, QIAN Min, GUO Bohai, HE Jiwei, LI Yuxing, HAN Jianzhong, QU Daofeng. Evaluation of antibiotics resistance and transmission risk of *Escherichia coli* in rice-frog coculture system[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(10): 3750-3764.

**摘要:** 为了解浙江地区稻蛙共养模式下大肠杆菌耐药情况及其传播风险, 本研究从浙江省 4 个不同地区的稻蛙共养基地采集分离泥土、田间水及蛙粪便中的大肠杆菌, 进行了 16S rRNA 测序鉴定, 纸片扩散法(Kirby-Bauer, K-B)测定耐药表型, PCR 法鉴定耐药基因型与整合子, 分析了大肠杆菌的耐药情况, 并通过接合转移评估耐药传播特性。结果显示, 分离得到的 82 株大肠杆菌对四环素、磺胺异噁唑、阿莫西林和红霉素表现出较高的耐药率, 大多数为多重耐药菌, 且富阳分离株的耐药率高于其他 3 个地区。PCR 鉴定结果表明, 耐药基因 *sul1* 检出率最高, 为 63.41%, 其次是 *bla*<sub>TEM</sub>、*tetA* 和 *tetB*。在检测的 16 种抗生素耐药基因(antibiotic resistance genes, ARGs)中, 富阳分离株有 9 种 ARGs 的检出率高于其他地区。整合酶基因 *int11* 的检出率最高, 整合酶阳性菌中共 14 株菌(34.15%)携带基因盒, 存在 4 种不同的基因盒组成方式, 以 *dfrA1-aadA1* 和 *dfrA17-aadA5* 最常见。接合转移结果显示, 14 株携带基因盒的供体菌中有 4 株接合转移成功, 接合转移频率在  $4.32 \times 10^{-5}$ – $7.13 \times 10^{-4}$  之间。研究表明, 4 个地区中富阳分离株的耐药情况较为严重为整合子介导大肠杆菌对多种抗生素耐药, 并且耐药基因盒可能通过整合子在不同细菌之间传播。本研究对浙江省稻蛙共养环境中大肠杆菌的耐药情况和传播特性进行分析, 为保障食品安全提供理论基础。

**关键词:** 稻蛙共养; 大肠杆菌; 耐药; 整合子; 传播

资助项目: 浙江省“三农九方”科技协作计划(2023SNJF051)

This work was supported by the Zhejiang Provincial “Three Rural Areas and Nine Parties” Scientific and Technological Cooperation Plan (2023SNJF051).

\*Corresponding author. E-mail: daofeng@mail.zjgsu.edu.cn

Received: 2023-10-26; Accepted: 2023-12-27; Published online: 2024-07-31

# Evaluation of antibiotics resistance and transmission risk of *Escherichia coli* in rice-frog coculture system

ZHANG Yaru<sup>1</sup>, DONG Qiqi<sup>2</sup>, QING Nana<sup>3</sup>, QIAN Min<sup>1</sup>, GUO Bohai<sup>1</sup>, HE Jiwei<sup>1</sup>,  
LI Yuxing<sup>1</sup>, HAN Jianzhong<sup>1</sup>, QU Daofeng<sup>1\*</sup>

1 School of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018, Zhejiang, China

2 Hangzhou Seed Farm, Hangzhou 311100, Zhejiang, China

3 Hangzhou Agricultural Technology Extension Center, Hangzhou 310016, Zhejiang, China

**Abstract:** In order to assess the antibiotic resistance of *Escherichia coli* and its transmission risk in a rice-frog coculture system in Zhejiang Province, this study collected *E. coli* from isolated soil, field water, and frog feces from the rice-frog coculture systems in four different areas of Zhejiang Province. The collected isolates were identified by 16S rRNA sequencing, while their antibiotic-resistant phenotypes were determined by Kirby-Bauer (K-B) method. PCR was used to identify the antibiotic-resistant genotypes and integrons, while conjugative transfer experiments were used to assess resistance transmission characteristics. The results showed a high prevalence of antibiotic resistance in the 82 strains of *E. coli* tested, primarily against tetracycline, sulfisoxazole, amoxicillin, and erythromycin. Most of these strains exhibited multidrug resistance, with the Fuyang area demonstrating the highest resistance rate compared to the other three areas. Further PCR analysis identified the *sull* gene as the most frequently detected resistance gene (63.41%), followed by *bla*<sub>TEM</sub>, *tetA*, and *tetB*. Among the 16 antibiotic resistance genes (ARGs) detected, the Fuyang isolates consistently exhibited higher detection rate of 9 ARGs in comparison to the other regions. Additionally, the integrase gene *intII* displayed the highest detection rate, with 14 strains (34.15%) of integrase-positive bacteria carrying gene cassettes. Four different gene cassette compositions were observed, with *dfrA1-aadA1* and *dfrA17-aadA5* being the most common combinations. Conjugative transfer experiments demonstrated successful transfer of gene cassettes in 4 out of 14 donor bacteria, with conjugation transfer frequencies ranging from  $4.32 \times 10^{-5}$  to  $7.13 \times 10^{-4}$ . These findings revealed the severity of resistance in the Fuyang area among the four regions. Integrons play a significant role in mediating the resistance to multiple antibiotics in *E. coli*, facilitating the potential spread of resistance gene cassettes between different bacteria. Overall, this study provides valuable insights into the resistance status and transmission characteristics of *E. coli* in the rice-frog coculture system in Zhejiang Province, providing a theoretical basis for ensuring the food safety of rice crops.

**Keywords:** rice-frog coculture system; *Escherichia coli*; antibiotic resistance; integrons; transmission

抗生素在农业生产中广泛应用,可在各种环境介质(如地表水、污水、污泥和农田土壤等)中较为持久地存在和富集<sup>[1-2]</sup>。农田环境中的微生物受到抗生素耐药性的选择性压力,逐渐导致抗生素抗性细菌(antibiotic resistance bacteria, ARB)和抗生素抗性基因(antibiotic resistance genes, ARGs)的出现。绝大多数 ARGs 位于可移动遗传元件(如质粒和整合子等)上,可通过水平基因转移在不同细菌种群间迁移,使耐药细菌迅速蔓延<sup>[3]</sup>,同时可能通过食物链进入人体,对人类生命健康产生巨大挑战。监测并了解细菌中抗生素耐药情况是维护食品安全和探索抗生素耐药性解决方案的重要任务。

大肠杆菌(*Escherichia coli*)是重要的人畜共患病的条件致病菌,具有广泛的宿主,并且可以通过水平转移获得耐药基因,常用于监测抗生素耐药性<sup>[4]</sup>。不同类型的农田环境由于其气候因素、理化性质<sup>[5]</sup>和人为干扰<sup>[6]</sup>的差异,可能会导致农田中耐药菌和耐药基因组组成的差异,从而影响耐药性的传播与扩散,造成许多公共安全问题。细菌通过水平基因转移的方式获得外源性耐药基因从而不断进化产生耐药性,水平基因转移主要由整合子、质粒和转座子等可移动元件介导。整合子能够将耐药基因整合到染色体或质粒中,并在相同或不同种属细菌间转移进而传播耐药基因,这也是大肠杆菌耐药性传播的一个重要原因<sup>[7]</sup>。

水稻是我国主要的粮食作物之一,水稻生长的厌氧土壤条件更有利于抗生素、ARGs 的持久留存和积累。近年来,创新改进的各种稻田生态种养模式逐步得到推广应用,其中以稻蛙种养最为典型。将水稻和蛙养殖在同一稻田环境中,蛙的捕食和排泄等活动为水稻防止病虫害,既可提高资源利用率、增产增效,还可以改善土壤肥力、丰富养分和有机质。但关于稻蛙共养种

植环境中耐药菌和耐药基因的分布与传播尚不清楚,其耐药安全性还未可知,需要进一步研究与探索。

本研究从浙江省 4 个地区的稻蛙共养环境中分离了大肠杆菌,分析讨论了分离菌株的抗生素耐药性情况,接合转移实验探究其耐药性转移特点。研究结果可为改善稻蛙共养环境耐药菌污染现状、评估抗生素耐药性的生态风险提供科学依据,对控制稻蛙养殖抗生素耐药性水平、保障稻米和蛙安全品质具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

水解酪蛋白(MH)培养基、脑心浸液肉汤(brain-heart infusion broth, BHI)培养基、麦康凯培养基、缓冲蛋白胨水(buffered peptone water, BPW)和细菌琼脂粉均购自青岛高科技工业园海博生物技术有限公司;氯化钠购自上海试四赫维化工有限公司;药敏纸片购自杭州微生物试剂有限公司;细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒、16S rRNA 通用引物和 50×TAE 缓冲液均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;2×Taq PCR Master Mix、10 mg/mL 溴化乙锭(ethidium bromide, EB)、琼脂糖和 DL2000 DNA Marker 均购自 BBI 生命科学有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 样品采集

样品来源于浙江省 4 个不同地区的稻蛙共养种植基地,种植期间不施肥、不用药,其余管理措施按当地常规栽培方式进行。2022 年 11 月在 4 个区域分别采集泥土样品、污水样品和粪便样品共 240 份,样品置于无菌样品袋与采样管中。样品采集后均立刻置于低温(2-8 °C)样品箱中,待采样结束后运至实验室进行大肠杆菌分离。所有样品均在同一天采集。

### 1.2.2 大肠杆菌分离和鉴定

将采集到的样品接种至 BPW 中, 37 °C 条件下增菌 12 h 后, 使用接种环取菌液在麦康凯琼脂平板上划线, 于 37 °C 恒温培养箱内培养 18–24 h, 挑取可疑菌落进行纯化培养。所有分离株经革兰氏染色后镜检和 16S rRNA 测序技术分析鉴定<sup>[8]</sup>。分离株保存于装有含 30% 甘油的 BHI 肉汤中, -20 °C 保存备用。

### 1.2.3 药物敏感性测定

大肠杆菌药物敏感性通过纸片扩散法(Kirby-Bauer, K-B)进行测定, 选择 9 大类 16 种抗生素, 包括阿莫西林(amoxicillin, AMX)、美罗培南(meropenem, MEM)、亚胺培南(imipenem, IPM)、链霉素(streptomycin, S)、庆大霉素(gentamicin, GM)、卡那霉素(kanamycin, K)、环丙沙星(ciprofloxacin, CIP)、恩诺沙星(enrofloxacin, ENR)、磺胺异噁唑(sulfisoxazole, SIZ)、复方新诺明(trimethoprim-sulfamethoxazole, SXT)、氯霉素(chloramphenicol, C)、四环素(tetracycline, TE)、米诺环素(minocycline, MI)、多黏菌素 B (polymyxin B, PB)、磷霉素(fosfomicin, FOS)和红霉素(erythromycin, E)。挑取单个菌落至 MH 肉汤中于 37 °C、200 r/min 条件下培养至菌液  $OD_{600}=0.6$  左右, 取 100  $\mu$ L 菌液均匀涂布在 MH 琼脂平板上, 用无菌镊子将药敏纸片贴于 MH 平板。将贴好药敏纸片的平板于 37 °C 恒温培养箱内培养 16–18 h, 测量各抗菌药物抑菌圈直径大小, 参照美国临床实验室标准化委员会(Clinical Laboratory Standardization Committee, CLSI)标准进行结果判定和质量控制(表 1)。

### 1.2.4 耐药基因及整合子的 PCR 检测

采用煮沸裂解法制备大肠杆菌 DNA, 采用 PCR 方法检测 16 种耐药基因和 3 类整合酶基因, 并对整合酶阳性菌株进行整合子内部基因盒扩增与分析, 引物序列见表 2。按各自 PCR

表 1 药敏试验判定标准

Table 1 Criteria for drug susceptibility test

Antibiotics	Drug contents ( $\mu$ g)	Diameter of bacteriostatic circle (mm)		
		R	I	S
AMX	10	$\leq 13$	14–16	$\geq 17$
MEM	10	$\leq 13$	14–15	$\geq 16$
IPM	10	$\leq 19$	20–22	$\geq 23$
S	10	$\leq 11$	12–14	$\geq 15$
GM	10	$\leq 12$	13–14	$\geq 15$
K	30	$\leq 14$	15–16	$\geq 17$
CIP	5	$\leq 15$	16–20	$\geq 21$
ENR	10	$\leq 14$	15–19	$\geq 20$
SIZ	300	$\leq 12$	13–16	$\geq 17$
SXT	250	$\leq 10$	11–13	$\geq 14$
C	30	$\leq 12$	13–17	$\geq 18$
TE	30	$\leq 11$	12–14	$\geq 15$
MI	30	$\leq 10$	11–13	$\geq 14$
PB	300	$\leq 8$	9–10	$\geq 11$
FOS	200	$\leq 12$	13–15	$\geq 16$
E	15	$\leq 12$	13–23	$\geq 24$

R: Resistant; I: Intermediary; S: Sensitive.

扩增条件扩增后, 将成功扩增出条带的样品送至上海生工股份有限公司进行一代测序, 测序结果经 BLAST 比对后进行下一步分析。

扩增体系为:  $2\times Taq$  PCR Master Mix 25  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 19  $\mu$ L、上游引物(10  $\mu$ mol/L) 0.5  $\mu$ L、下游引物(10  $\mu$ mol/L) 0.5  $\mu$ L 和模板 DNA 5  $\mu$ L; 扩增程序为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 对应引物的退火温度 45–60 °C 40 s, 72 °C 延伸 40 s, 30 个循环; 72 °C 最终延伸 5 min。

### 1.2.5 大肠杆菌耐药性转移

为了评价耐药基因是否存在于可接合质粒上以及是否具有传播的能力, 选取携带整合子基因盒的大肠杆菌作为供体菌, *E. coli* EC600 作为受体菌, 对供受体菌进行抗性筛选, 将 14 株含有基因盒的供体菌和受体菌 *E. coli* EC600 分别划线于含有 100  $\mu$ g/mL 链霉素或 100  $\mu$ g/mL 利福平的 BHI 抗性平板, 筛选得到仅在链霉素

表2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Category	Gene name	Primer sequence (5'→3')	Product size (bp)
β-lactams	<i>bla<sub>TEM</sub></i>	F: CTCACCCAGAAACGCTGGTG R: ATCCGCCTCCATCCAGTCTA	569
	<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	F: ATGTGCAGTACCAGTAAAGT R: TGGGTRAAGTARGTCACCAGAA	593
	<i>bla<sub>NDM</sub></i>	F: GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC R: CGGAATGGCTCATCACGATC	621
	<i>bla<sub>IMP</sub></i>	F: GGAATAGAGTGGCTTAAAYTCTC R: AAAACAACCACC	232
	<i>bla<sub>OXA-23</sub></i>	F: GATCGGATTGGAGAACCAGA R: ATTTCTGACCGCATTTCAT	501
	Aminoglycosides	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	F: TTGGAAGCGGGGACGGAM R: ACACGGCTGGACCATA
<i>aphA6</i>		F: ATACAGAGACCACCATACAGT R: GGACAATCAATAATAGCAAT	235
Quinolones	<i>qnrA</i>	F: CAGCAAGAGGATTTCTCACG R: AATCCGGCAGCACTATTACTC	630
	<i>qnrB</i>	F: GGCTGTCAGTTCTATGATCG R: SAKCAACGATGCCTGGTAG	488
	<i>qnrS</i>	F: GCAAGTTCATTGAACAGGGT R: TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG	428
Sulfonamides	<i>sul1</i>	F: TCATCTGCCAAACTCGTCGTTA R: GTCAAAGAACGCCGCAATGT	105
	<i>sul2</i>	F: CAGCGCTATGCGCTCAAG R: ATCCCGCTGCGCTGAGT	129
Tetracyclines	<i>tetA</i>	F: GCTACATCCTGCTTGCCTTC R: CATAGATCGCCGTGAAGAGG	210
	<i>tetB</i>	F: TTGGTTAGGGGCAAGTTTTG R: GTAATGGGCCAATAACACCG	659
Amide alcohols	<i>cmlA</i>	F: TAGGAAGCATCGGAACGTTGAT R: CAGACCGAGCACGACTGTTG	665
	<i>floR</i>	F: ATTGTCTTCACGGTGTCCGTTA R: CCGCGATGTCGTGCAACT	962
Integron	<i>int11</i>	F: GGCTTCGTGATGCCTGCTT R: CATTCTGGCCGTGGTTCT	149
	<i>int12</i>	F: CACGGATATGCGACAAAAGGT R: GTAGCAAACGAGTGACGAAATG	789
	<i>int13</i>	F: GCCTCCGGCAGCGACTTTTCAG R: ACGGATCTGCCAAACCTGACT	980

抗性板上生长的供体菌和仅在利福平抗性板上生长的受体菌进行后续接合转移实验。在含有 100 μg/mL 链霉素和 100 μg/mL 利福平的双抗平板上筛选接合子，统计接合转移频率，并对其进行鉴定。为了确认接合前后耐药质粒和耐药

基因的转移，采用微量肉汤稀释法测定供体菌、受体菌和接合子的药物敏感性。

### 1.3 数据分析

运用 SPSS 22.0 对实验数据进行统计分析，并通过 Origin 8.0 进行可视化。

## 2 结果与分析

### 2.1 稻蛙共养环境中大肠杆菌的分离和鉴定

四个地区采集的 240 份样品经平板培养与 16S rRNA 鉴定后,共分离得到 82 株大肠杆菌,分离率为 34.17%,如表 3 所示。按地区来看,4 个地区大肠杆菌分离率从高到低依次为淳安(40.00%)、建德(38.33%)、临安(31.67%)和富阳(26.67%)。按样本类型来看,分离所得的大肠杆菌有超过 50%的菌株分离自粪便样品,4 个地区粪便样品分离率均高于泥土和田间水,其中建德粪便样本分离率达到 60.00%。4 个地区泥土样本分离率相差不大,处于 25.00%–40.00% 之间。仅有 12 株来自田间水样,其中富阳区稻蛙养殖基地田间水样品仅分离出 1 株大肠杆菌。

### 2.2 菌株耐药表型检测结果

根据 CLSI-2020 制定的关于纸片扩散法药敏试验的 R/I/S 判定折点规则,对 82 株大肠杆菌分离株的药敏试验结果进行判定(药敏试验示例见图 1)。如图 2 所示,可以看出 82 株分离株对 16 种抗生素呈现出不同的耐药情况。其中耐药率最高的是四环素,临安分离株的耐药率高达 94.74%,其次是淳安分离株(87.50%)、建德分离株(78.26%)和富阳分离株(68.75%)。除此之外,4 个地区的分离株均对磺胺异噁唑、阿莫西林和红霉素表现出高度耐药,大部分耐药率

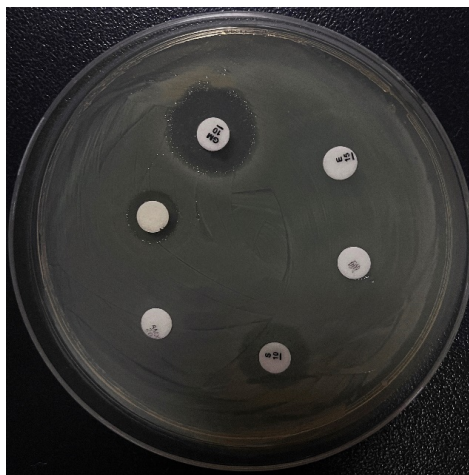


图 1 K-B 药敏试验结果示例

Figure 1 Example of K-B susceptibility test results.

在 60%以上,富阳分离株对阿莫西林的耐药率甚至达到了 100%。82 株大肠杆菌分离株对喹诺酮类抗生素的耐药表现较好,对环丙沙星的耐药率均为 0,且仅 1 株耐药菌表现为对恩诺沙星耐药。按地区来看,耐药情况最严重的是富阳分离株,其对阿莫西林、亚胺培南、链霉素、庆大霉素、卡那霉素、复方新诺明、多黏菌素 B、米诺环素和红霉素的耐药率均高于其他 3 个地区分离株,并且是唯一检出对恩诺沙星耐药的菌株。而情况最好的是建德分离株,除了对氯霉素的耐药率最高外,其余抗生素的耐药率均低于其他地区,并且对庆大霉素、卡那霉素、环丙沙星、恩诺沙星、多黏菌素 B 和米诺环素的耐药率均为 0。

进一步分析 4 个地区大肠杆菌分离株的多重耐药情况,所有菌株的耐药重数均在 1–11 R 之间。如图 3 所示,4 个地区稻蛙共养环境分离株的耐药重数主要集中在 3–7 R 之间,均达到 50%以上。淳安、富阳和建德地区分离株的多重耐药菌(3–11 R)比例分别达到了 75.00%、87.50% 和 65.12%。相对表现较好的临安分离株多重耐药药比例为 57.89%,未发现 8–11 R 的高度耐药

表 3 大肠杆菌分离情况

Table 3 Isolation of *Escherichia coli*

Region	Isolation rate			Total (%)
	Faeces (%)	Soil (%)	Water (%)	
Chun'an	55.00 (11/20)	40.00 (8/20)	25.00 (5/20)	40.00 (24/60)
Fuyang	45.00 (9/20)	30.00 (6/20)	5.00 (1/20)	26.67 (16/60)
Jiande	60.00 (12/20)	40.00 (8/20)	15.00 (3/20)	38.33 (23/60)
Lin'an	55.00 (11/20)	25.00 (5/20)	15.00 (3/20)	31.67 (19/60)
Total	53.75 (43/80)	33.75 (27/80)	15.00 (12/80)	34.17 (82/240)

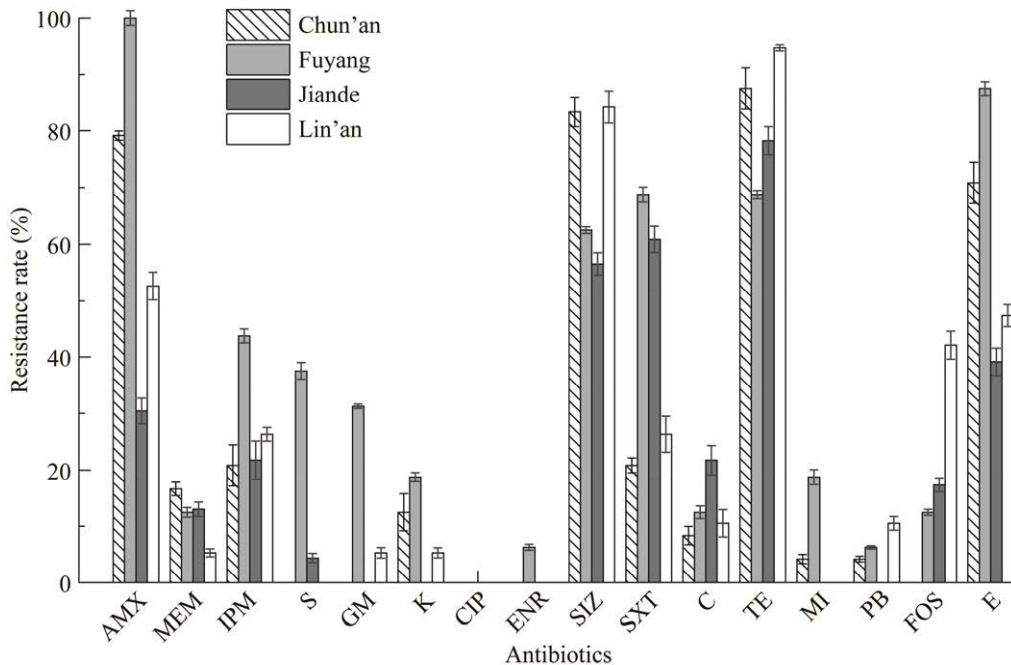


图2 大肠杆菌抗生素耐药率 AMX: 阿莫西林; MEM: 美罗培南; IPM: 亚胺培南; S: 链霉素; GM: 庆大霉素; K: 卡那霉素; CIP: 环丙沙星; ENR: 恩诺沙星; SIZ: 磺胺异噁唑; SXT: 复方新诺明; C: 氯霉素; TE: 四环素; MI: 米诺环素; PB: 多黏菌素 B; FOS: 磷霉素; E: 红霉素

Figure 2 Antibiotic resistance rate of *Escherichia coli*. AMX: Amoxicillin; MEM: Meropenem; IPM: Imipenem; S: Streptomycin; GM: Gentamicin; K: Kanamycin; CIP: Ciprofloxacin; ENR: Enrofloxacin; SIZ: Sulfaisoxazole; SXT: Trimethoprim-sulfamethoxazole; C: Chloramphenicol; TE: Tetracycline; MI: Minocycline; PB: Polymyxin B; FOS: Fosfomycin; E: Erythromycin.

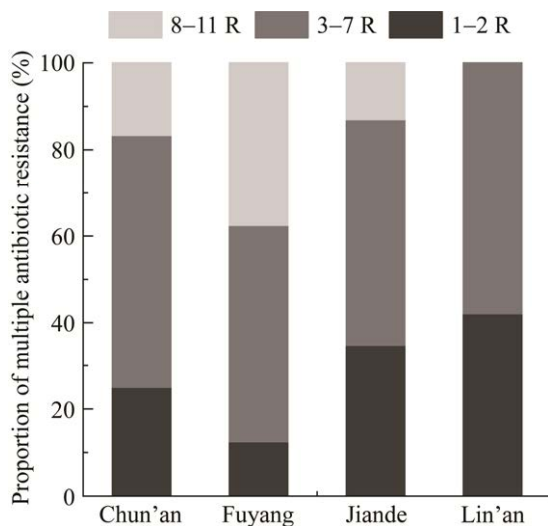


图3 四个地区大肠杆菌多重耐药性比较  
Figure 3 Comparison of multi-resistance of *Escherichia coli* in four regions.

菌株。而富阳分离株中有 35.70% 表现为较为严重的 8-11 R 耐药, 且仅有 2 株表现为耐药程度较轻的 1-2 R。

### 2.3 耐药基因型检测结果

4 个地区稻蛙共养环境分离得到的 82 株大肠杆菌中 16 种耐药基因的检出率如表 4 所示。实验研究了 5 种  $\beta$ -内酰胺类耐药基因, 其中检出率最高的是  $bla_{TEM}$ , 达到了 58.54%。其次是  $bla_{IMP}$ 、 $bla_{CTX-M}$  和  $bla_{NDM}$ , 检出率分别为 24.39%、19.51% 和 13.41%。而仅有 3 株大肠杆菌检出有  $bla_{OXA-23}$ 。氨基糖苷类耐药基因  $aac(6)-Ib-cr$  和  $aphA6$  的检出率分别为 23.17% 和 17.07%。喹诺酮类耐药基因中,  $qnrA$  的检出率明显高于  $qnrB$  和  $qnrS$ , 达到了 28.05%。磺

表 4 抗生素抗性基因检出率

Table 4 Detection rate of antibiotic resistance genes

Types of antibiotics	Resistance genes	Detection rate (%)
β-lactams	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	58.54 (48/82)
	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	19.51 (16/82)
	<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	13.41 (11/82)
	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	24.39 (20/82)
	<i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	3.66 (3/82)
Aminoglycosides	<i>aac</i> (6)-Ib-cr	23.17 (19/82)
	<i>aphA6</i>	17.07 (14/82)
Quinolones	<i>qnrA</i>	28.05 (23/82)
	<i>qnrB</i>	19.51 (16/82)
	<i>qnrS</i>	15.85 (13/82)
Sulfonamides	<i>sul1</i>	63.41 (52/82)
	<i>sul2</i>	12.20 (10/82)
Tetracyclines	<i>tetA</i>	39.02 (32/82)
	<i>tetB</i>	31.71 (26/82)
Amide alcohols	<i>cmlA</i>	12.20 (10/82)
	<i>floR</i>	28.05 (23/82)

胺类耐药基因 *sul1* 的检出率是 16 种耐药基因中最高的, 为 63.41%, 而与其同类的 *sul2* 仅在 10 株大肠杆菌中检出。所检验的两种四环素类耐药基因 *tetA* 和 *tetB* 检出率则处于同一水平, 分别为 39.02% 和 31.71%。酰氨醇类耐药基因的检出率整体较低, *cmlA* 和 *floR* 的检出率分别为 12.20% 和 28.05%。

进一步按区域比较耐药基因的检出率(图 4), 根据比较可知, β-内酰胺类耐药基因 *bla*<sub>TEM</sub> 和磺胺类耐药基因 *sul1* 在淳安、富阳和临安三地均有较高的检出率, 三地之间检出率相差不大, 都明显高于建德。*cmlA* 和 *bla*<sub>NDM</sub> 在淳安、建德和临安的检出率都处于较低的水平, 都明显低于富阳。*bla*<sub>OXA-23</sub> 仅在淳安和富阳两地检出。在检出的 16 种耐药基因中, 富阳分离株有 9 种耐药基因的检出率高于其他地区, 它们分别是 *bla*<sub>TEM</sub>、*bla*<sub>NDM</sub>、*bla*<sub>OXA-23</sub>、*qnrB*、*qnrS*、*sul1*、

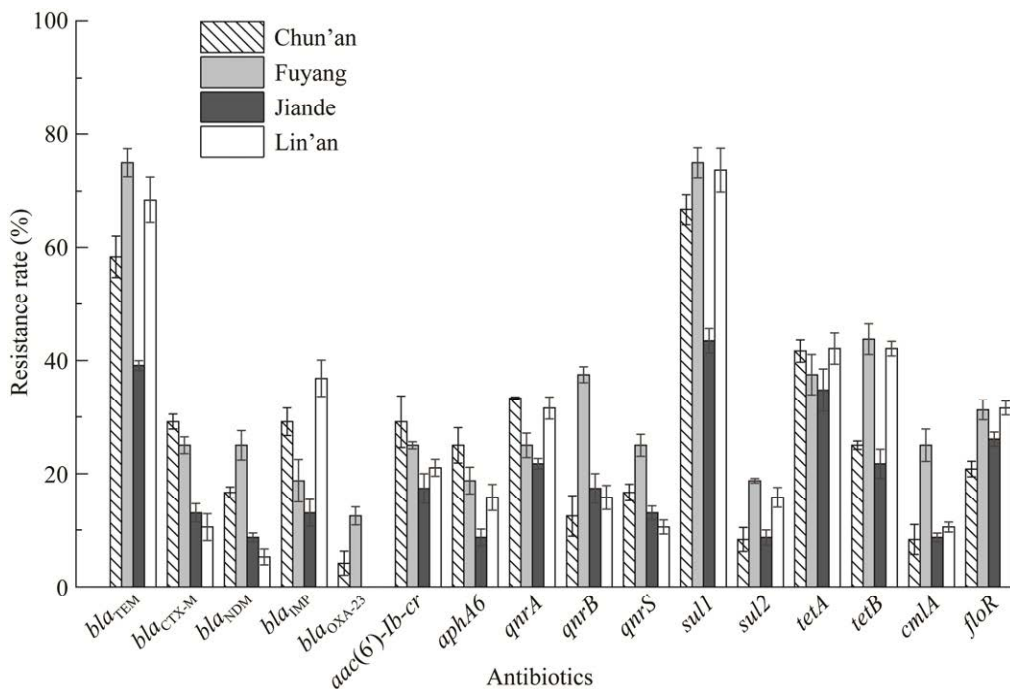


图 4 耐药基因区域性对比

Figure 4 Regional comparison of antibiotic resistance genes.



*sul2*、*tetB* 和 *cmlA*。可见富阳区稻蛙共养种植基地的耐药情况相比于其他三地严重。根据耐药基因检出率来看, 建德地区大肠杆菌分离株有 8 个耐药基因的检出率低于其他地区, 耐药情况相比于其他三地表现较好。

#### 2.4 整合子区域性分布差异

对 4 个地区分离得到的 82 株大肠杆菌的整合酶基因进行 PCR 扩增检测, 检测结果如图 5 所示。82 株大肠杆菌分离株中, I 类整合酶基因 *intI1* 和 II 类整合酶基因 *intI2* 的检出率分别为 37.80% (31/82) 和 12.20% (10/82)。*intI1* 在临安分离株中检出率最高, 达到 47.37%。其次是淳安、富阳和建德的 41.67%、37.50% 和 26.09%。相比而言, *intI2* 的检出率较低, 均不超过 20%, 淳安、富阳、建德和临安的检出率分别为 16.67%、12.50%、13.04% 和 5.26%。仅在建德和临安两地分别检出 1 株携带 III 类整合酶基因 *intI3* 的大肠杆菌。以上数据表明, 稻蛙共养环境中的整合子类型主要是 I 型整合子。值得注意的是, 除建德地区外, 其他 3 地均有部分耐药菌检出同时携带 I 型整合子整合酶基因 *intI1* 和 II 型整合子整合酶基因 *intI2*, 这表明耐药菌可能存在多种整合子结构。

对整合子整合酶阳性分离株进行可变区基因盒的 PCR 扩增, 并对扩增产物进行测序分析, 统计结果如表 5 所示。本实验整合子整合酶阳性菌中共 14 株菌(34.15%)携带基因盒, 其中 12 株检出 4 种 I 型整合子基因盒序列(*dfrA1-aadA1*、*aadB-aadA1-cmlA6*、*dfrA17-aadA5* 和 *aadA1-aadA22-aadA23*), 2 株检出 1 种 II 型整合子基因盒序列(*dfrA1-sat2-aadA1*), 分别介导对甲氧苄啶(*dfrA1* 和 *dfrA17*)、氨基糖苷类(*aadA1*、*aadB*、

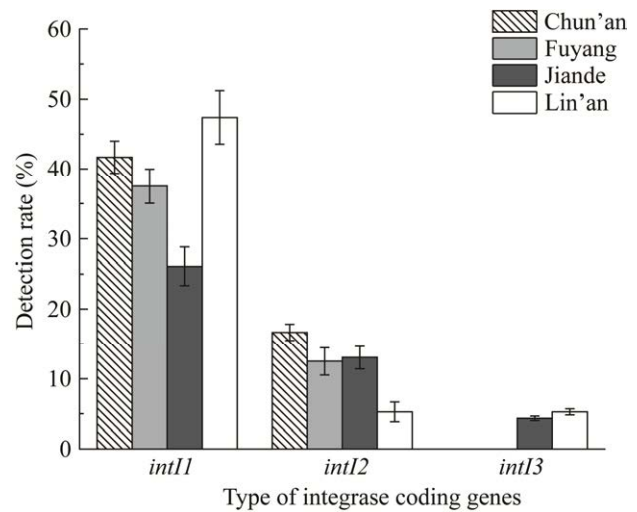


图 5 整合子区域性对比

Figure 5 Regional comparison of integrons.

表 5 大肠杆菌整合子基因盒的检出情况

Table 5 Detection of *Escherichia coli* integron gene cassettes

Gene cassettes	Type	Number of bacteria (%)	Origin of bacteria
Type I integron			
<i>dfrA1-aadA1</i>	Trimethoprim-aminoglycosides	4/14 (28.57)	Lin'an
<i>aadB-aadA1-cmlA6</i>	Aminoglycosides-chloramphenicols	3/14 (21.43)	Fuyang
<i>dfrA17-aadA5</i>	Trimethoprim-aminoglycosides	4/14 (28.57)	Jiande
<i>aadA1-aadA22-aadA23</i>	Aminoglycosides	1/14 (7.14)	Lin'an
Type II integron			
<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>	Trimethoprim-streptomycin-aminoglycosides	2/14 (14.29)	Chun'an
			Fuyang

*aadA22* 和 *aadA23*)、氯霉素(*cmlA6*)和链霉素(*sat2*)的耐药性,其中主要以甲氧苄啶和氨基糖苷类药物耐药性的 *dfrA* 和 *aadA* 类耐药基因为主。

## 2.5 大肠杆菌耐药性转移

抗性筛选结果表明,14株检出携带整合子基因盒的供体菌均能在链霉素抗性板上生长,在利福平抗性板上不生长;*E. coli* EC600在链霉素抗性板上不生长,在利福平抗性板上生长良好(图6)。对该14株供体菌进行整合子质粒接合转移实验,并通过PCR扩增接合子的整合酶

基因,结果如表6所示。14株供体菌中,有4株接合转移成功,接合成功率28.57%。接合转移频率最高的是富阳分离株FY23019,为 $7.13 \times 10^{-4}$ ,最低的是临安分离株LA23078的 $3.68 \times 10^{-5}$ 。4株接合子均仅检测到I型整合子整合酶基因 *intI1*,其中有3株接合子在检测到整合酶的同时还检测到基因盒 *dfrA1-aadA1* 和 *dfrA17-aadA5*,这说明这两种基因盒阵列发生了水平转移。

对接合转移前后进行了基因盒对应抗生素的药物敏感性检测,检测结果见表7。2株接合子的耐药表型与其携带的基因盒相符,也与供体菌对相应抗生素的耐药性表现一致。这说明基因盒从供体菌转入受体菌之后,显著增强了接合子对庆大霉素、甲氧苄啶和链霉素的耐药性。而经接合转移后, FY23019-EC600 仅对甲

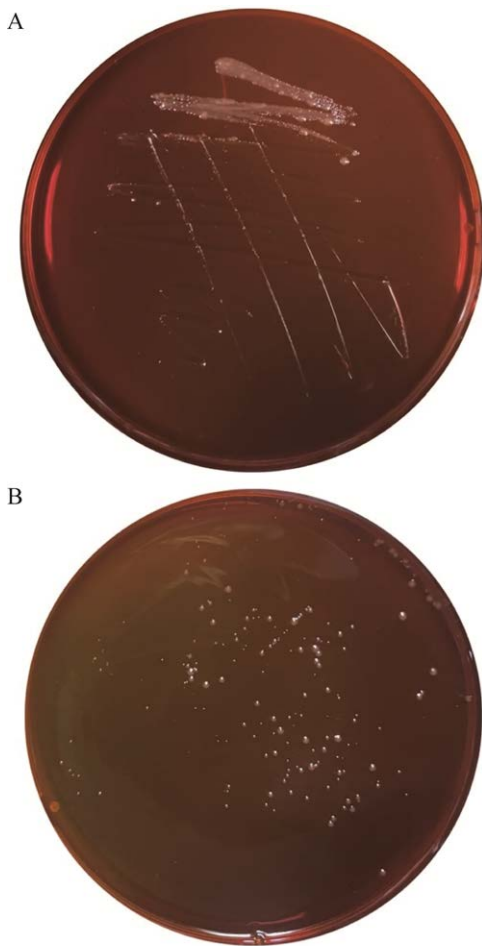


图6 受体菌株在利福平抗性平板上生长(A)并在双抗板上筛选接合子(B)

Figure 6 The recipient strain grow on the rifampicin-resistant plate (A) and the transconjugant is screened on the double antibiotic plate (B).

表6 接合子的PCR鉴定和接合转移频率

Table 6 PCR identification and conjugation transfer frequency of transconjugants

Bacteria	Integron	Gene cassettes	Conjugation transfer frequency
LA23078-EC600	<i>intI1</i>	<i>dfrA1-aadA1</i>	$3.68 \times 10^{-5}$
FY23046-EC600	<i>intI1</i>	<i>dfrA1-aadA1</i>	$5.09 \times 10^{-4}$
FY23019-EC600	<i>intI1</i>	<i>dfrA17-aadA5</i>	$7.13 \times 10^{-4}$
JD23072-EC600	<i>intI1</i>	—	$4.32 \times 10^{-5}$

表7 接合转移前后的药物敏感性

Table 7 Antibiotic sensitivity before and after conjugation transfer

Bacteria	MIC (mg/mL)/Antibiotic sensitivity		
	Gentamicin	Trimethoprim	Streptomycin
LA23078	$\geq 16/R$	$\geq 16/R$	$\geq 64/R$
LA23078-EC600	$\geq 16/R$	$\geq 16/R$	$\geq 64/R$
FY23046	$\geq 16/R$	$\geq 16/R$	$\geq 64/R$
FY23046-EC600	$\geq 16/R$	$\geq 16/R$	$\geq 64/R$
FY23019	$\geq 16/R$	$\geq 16/R$	$\geq 64/R$
FY23019-EC600	$\leq 1/S$	$\geq 16/R$	$\leq 1/S$
EC600	$\leq 1/S$	$\leq 1/S$	$\leq 2/S$

R: Resistant; S: Sensitive.

氧苄啶表现出耐药性,而对庆大霉素和链霉素敏感,这一现象需进一步研究和探讨。

### 3 讨论

近年来逐渐在农业环境中发现细菌耐药性问题,细菌在抗生素选择压力下诱导产生的抗性基因能持久存在,并能在各种环境介质中传播扩散。为研究稻蛙共养种植环境中的细菌耐药性问题,本研究从浙江省4个地区的稻蛙共养环境中采集泥土、污水和蛙的粪便样品,从中分离得到82株大肠杆菌,研究其对亚胺培南、卡那霉素和链霉素等16种抗生素的耐药情况,发现这82株菌对四环素类和磺胺类抗生素表现出较高的耐药率。Amato等<sup>[9]</sup>在切萨皮克湾流域家禽养殖附近的农田中分离得到的大肠杆菌对氨苄西林和四环素表现出相对较高的耐药率。有研究发现长期施用鸡粪的农田土壤中细菌耐药率最高的抗生素为磺胺二甲嘧啶、泰乐菌素和土霉素<sup>[10]</sup>。裴浩鹏<sup>[11]</sup>研究了不同土地利用类型的农田土壤抗生素和耐药基因的分布特征,发现抗生素残留量依次为四环素类>磺胺类>喹诺酮类> $\beta$ -内酰胺类>大环内酯类。这与本研究相符,表明农田环境中四环素类和磺胺类抗生素的耐药水平普遍较高。

在本研究中耐药基因 *sul1*、*bla*<sub>TEM</sub> 和 *tetA* 的总体检出率较高,与表型结果相一致。*sul1* 和 *sul2* 编码对磺胺类抗生素的抗性,常作为不同源大肠杆菌分离株中最常见的 ARGs, *sul* 基因一般可通过移动质粒、整合子和转座子进行转移及传播。本研究中 *sul1* 的检出率达到了63.41%,在各种环境样本中均有检出,这说明 *sul1* 的宿主菌对各种环境的耐受力较强,利于其在环境中的广泛传播与扩散。耐药基因 *bla*<sub>TEM</sub> 的高检出率也与在农业环境样本中发现大量 *bla*<sub>TEM</sub> 的研究一致<sup>[12-13]</sup>。*bla*<sub>TEM</sub> 可介导超

广谱  $\beta$ -内酰胺酶(extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, ESBL)的产生,且 TEM 型酶有115种,是目前数量最多的 ESBLs,由此对青霉素类、头孢菌素及单环酰胺类抗生素产生耐药性,给临床治疗带来了巨大威胁<sup>[14]</sup>。*bla*<sub>NDM</sub> 和 *bla*<sub>OXA-23</sub> 检出率较低,在建德和临安两个地区的稻蛙共养环境中未检出 *bla*<sub>OXA-23</sub>, *bla*<sub>CXT-M</sub> 和 *bla*<sub>NDM</sub> 在这两地的检出率也低于其他两地,这与两地菌株 ARGs 水平传播能力有关,环境污染也会对其产生一定的影响。多个研究表明 *tetA*、*tetB*、*tetG* 等基因在猪粪、土壤和废水样品中都被检出,说明四环素类耐药基因随着粪肥施用和废水灌溉等农业活动进入农田土壤,并在农田环境中富集<sup>[3,15-16]</sup>。本研究中四环素耐药率最高,4个区域中四环素耐药率最高可达94.74%,而四环素类耐药基因 *tetA* 和 *tetB* 检出率仅为39.02%和31.71%,这可能因为不同耐药基因相互作用共同导致了对四环素类抗生素的耐药情况,并且菌株可能还存在其他的耐药机制<sup>[17]</sup>。大肠杆菌对喹诺酮类耐药基因 *qnrA*、*qnrB* 和 *qnrS* 的检出率差别不大,均不超过30%,低于已有报道,可能与不同的药物使用有关<sup>[18-20]</sup>。大肠杆菌对氨基糖苷类产生耐药性主要是由修饰酶的出现造成的,其中以 *aac(6')-Ib/Ib-cr*、*aac(3)-II* 为主要流行型<sup>[21]</sup>,本研究中 *aac(6')-Ib-cr* 有23.17%的检出率。*aac(6')-Ib-cr* 同时具有氨基糖苷类与喹诺酮类耐药活性,增加了细菌在抗生素选择压力下的适应能力,提示要减少喹诺酮类药物的使用并且避免与氨基糖苷类药物的联用,防止高耐药水平细菌的出现和 *aac(6')-Ib-cr* 细菌的流行<sup>[22]</sup>。本研究中4个不同区域的稻蛙共养环境大肠杆菌分离株抗生素耐药情况不同,这可能与气候环境、理化性质、蛙的种类养殖密度和农业生产活动(如施药、种植制度)等因素有关<sup>[23-25]</sup>。Liu等<sup>[26]</sup>在农田土壤中分别重复施用了3种动物(猪、鸡和牛)粪便,

结果发现长期施用有机肥可以显著提高土壤耐药基因的丰度。Chen 等<sup>[27]</sup>研究表明废水灌溉的土壤中 *sul1*、*sul3*、*tet-A*、*tet-C*、*tet-E* 和 *tet-G* 的相对丰度显著高于非灌溉土壤。因此, 有机肥、土壤、空气和灌溉水可能都是农田耐药基因和耐药细菌的外部环境来源。

整合子作为参与耐药传播的遗传元件之一, 存在于质粒和转座子等可移动元件中, 促进了耐药基因在细菌菌落中的传播<sup>[28]</sup>。同一整合子可以捕获一个或多个基因盒, 并通过水平转移机制在不同细菌物种之间进行转移。最常见的整合子类型是 I 类整合子, 其常存在于大肠杆菌和沙门氏菌等革兰氏阴性菌中<sup>[29]</sup>。本研究对 3 类整合子进行检测, 82 株大肠杆菌中 I 型整合酶的流行率最高, 达到 37.80%, 远高于 II 型整合子整合酶和 III 型整合子整合酶的 12.20% 和 2.44%。这与其他研究报道<sup>[30]</sup>的 I 型整合子在大肠杆菌中占优势相似。检出基因盒介导对磺胺类、氨基糖苷类、氯霉素和链霉素的耐药性。其中 *aadA1* 类型的基因盒所占的数量最多, 达 71.43% (10/14), 多数来自富阳分离株, 这与富阳大肠杆菌分离株对于氨基糖苷类抗生素卡那霉素、链霉素和庆大霉素的耐药性较强有关, 其与整合酶基因共同介导了大肠杆菌对该类抗生素的耐药表型。在所检出的基因盒中最流行的基因盒组成方式是 *dfrA1-aadA1* 和 *dfrA17-aadA5*。Kotlarska 等<sup>[31]</sup>在污水处理厂环境中分离得出的大肠杆菌中发现 *dfrA1-aadA1* 和 *dfrA17-aadA5* 是最普遍的基因盒阵列; 在中国宁夏回族自治区 4 区牛源大肠杆菌中检测出最常见的基因盒是 *dfrA1-aadA1*<sup>[32]</sup>, 上述结果与本实验结果相似。甲氧苄啶类耐药基因家族 *drf* 和氨基糖苷类耐药基因家族 *aadA* 与整合子关系最密切, 是整合子介导的最常见的耐药基因型<sup>[33]</sup>。本研究中的 82 株来自稻蛙共养环境的大肠杆菌对  $\beta$ -内酰胺

类和四环素类抗生素的耐药性也较高, 但未在整合子的基因盒中检测到相应种类的耐药基因, 这主要是因为可能还存在其他的耐药机制介导大肠杆菌对上述药物的耐药表型。

研究表明, 整合子基因大多位于接合性质粒上, 质粒的接合转移是细菌耐药性水平传播的主要方式之一<sup>[34]</sup>。本研究以 14 株携带基因盒的大肠杆菌为供体菌, EC600 为受体菌进行整合子质粒的接合转移, 仅筛选得到 4 株含有整合酶的接合子, 其中 3 株含有基因盒, 表明耐药基因具有水平转移的能力, 但不能将全部的耐药基因转移到受体菌中。对接合子进行基因盒对应的耐药谱的检测, MIC 结果表明受体菌在获得了供体菌的耐药基因盒后, 表现出了和供体菌基因盒一致的耐药性, 如接合子 LA23078-EC600 和 FY23046-EC600 在获得了供体菌的基因盒 *dfrA1-aadA1* 后, 对庆大霉素、甲氧苄啶和链霉素的耐药性从敏感转成耐药。而接合子 FY23019-EC600 携带基因盒 *dfrA17-aadA5*, 但只表现出对甲氧苄啶的耐药性, 未表现出对庆大霉素和链霉素的耐药性, 可能因为该菌株中 *aadA5* 编码的氨基糖苷腺苷酸转移酶未成功表达或表达不完全。在抗生素选择的压力下, 耐药基因盒可能通过整合子在不同细菌之间传播, 耐药大肠杆菌的数量随着时间的推移一直在逐步增加, 这表明这种耐药性的增加部分是由于整合子的获得、传播和维持<sup>[35]</sup>。

## 4 结论

本研究从浙江 4 个不同地区的稻蛙共养基地采集的 240 份环境样品中分离鉴定出 82 株大肠杆菌, 通过对耐药表型和基因型鉴定发现, 82 株大肠杆菌对四环素、磺胺异噁唑、阿莫西林和红霉素表现出较高的耐药率, 耐药基因检出率较高的是 *sul1*、*bla*<sub>TEM</sub>、*tetA* 和 *tetB*。相比

较而言,富阳分离株的耐药情况较为严重。质粒接合转移试验表明,耐药基因具有水平转移的能力,特别是整合子-基因盒结构的存在,使细菌耐药性得到广泛传播。接合子对整合酶和整合子的携带能力明显低于供体菌,表明整合子不能转移全部的耐药基因,还存在其他的耐药机制,如转座子或质粒所携带的耐药基因,这些耐药机制共同导致了细菌的多重耐药性。本研究为保障稻蛙安全及控制耐药性传播提供了理论基础。

## REFERENCES

- [1] ZHANG N, JUNEAU P, HUANG RL, HE ZL, SUN B, ZHOU JZ, LIANG YT. Coexistence between antibiotic resistance genes and metal resistance genes in manure-fertilized soils[J]. *Geoderma*, 2021, 382: 114760.
- [2] ZHANG KJ, LUO Z, ZHANG TQ, GAO NY, MA Y. Degradation effect of sulfa antibiotics by potassium ferrate combined with ultrasound (Fe(VI)-US)[J]. *BioMed Research International*, 2015, 2015: 169215.
- [3] 何燕, 朱冬, 王东, 刘燕, 彭超, 黄丽萍, 彭正松, 路璐. 四川省稻田土壤的抗生素抗性基因多样性研究[J]. *农业环境科学学报*, 2020, 39(6): 1249-1258.  
HE Y, ZHU D, WANG D, LIU Y, PENG C, HUANG LP, PENG ZS, LU L. Diversity of antibiotic resistance genes in paddy soils in Sichuan Province, China[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2020, 39(6): 1249-1258 (in Chinese).
- [4] JIANG H, CHENG H, LIANG Y, YU ST, YU T, FANG JH, ZHU C. Diverse mobile genetic elements and conjugal transferability of sulfonamide resistance genes (*sul1*, *sul2*, and *sul3*) in *Escherichia coli* isolates from *Penaeus vannamei* and pork from large markets in Zhejiang, China[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1787-1793.
- [5] PARK JY, HUWE B. Effect of pH and soil structure on transport of sulfonamide antibiotics in agricultural soils[J]. *Environmental Pollution*, 2016, 213: 561-570.
- [6] ZHANG Y, CHENG DM, ZHANG YT, XIE J, XIONG HY, WAN Y, ZHANG YQ, CHEN XP, SHI XJ. Soil type shapes the antibiotic resistome profiles of long-term manured soil[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 786: 147361.
- [7] 李豫, 杨小鹏, 张菊梅, 王涓, 吴清平. 整合子系统介导沙门菌耐药性的研究进展[J]. *微生物学报*, 2021, 61(12): 3918-3927.  
LI Y, YANG XJ, ZHANG JM, WANG J, WU QP. Research progress of integron-mediated antimicrobial resistance of *Salmonella*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(12): 3918-3927 (in Chinese).
- [8] KIM TW. Identification and distribution of *Bacillus* species in doenjang by whole-cell protein patterns and 16S rRNA gene sequence analysis[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 20(8): 1210-1214.
- [9] AMATO HK, WONG NM, PELC C, TAYLOR K, PRICE LB, ALTABET M, JORDAN TE, GRAHAM JP. Effects of concentrated poultry operations and cropland manure application on antibiotic resistant *Escherichia coli* and nutrient pollution in Chesapeake Bay watersheds[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 735: 139401.
- [10] 葛伟丽. 长期施用鸡粪农田土壤中典型抗生素耐药细菌及其抗性基因污染分析[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2014.  
GE WL. Typical antibiotic resistant bacteria and resistance gene in the farmland soil fertilized with chicken manure chronically[D]. Taian: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2014 (in Chinese).
- [11] 裴浩鹏. 不同土地利用类型土壤抗生素和耐药基因分布特征及影响因素研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学硕士学位论文, 2020.  
PEI HP. Study on distribution characteristics and influencing factors of antibiotics and antibiotics resistance genes in different land use types[D]. Shenyang: Master's Thesis of Shenyang Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [12] 苑晓萌, 赵效南, 李璐璐, 张庆, 胡明, 骆延波, 张印, 齐静, 刘玉庆. 山东地区乳房炎牛奶中大肠杆菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2021, 48(1): 312-323.  
YUAN XM, ZHAO XN, LI LL, ZHANG Q, HU M, LUO YB, ZHANG Y, QI J, LIU YQ. Isolation, identification and drug resistance analysis of *E. coli* from mastitis milk in Shandong Province[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2021, 48(1): 312-323 (in Chinese).
- [13] 赵莎. 大连付家庄海水浴场中大肠杆菌耐药性及质

- 粒介导的耐药性传递研究[D]. 大连: 大连海洋大学硕士学位论文, 2017.
- ZHAO S. Study on Drug-resistance and plasmid-mediated transfer resistance of *Escherichia coli* in Dalian Fujiazhuang bathing beach[D]. Dalian: Master's Thesis of Dalian Ocean University, 2017 (in Chinese).
- [14] SMILINE A, VIJAYASHREE JP, PARAMASIVAM A. Molecular characterization of plasmid-encoded *bla*TEM, *bla*SHV and *bla*CTX-M among extended spectrum  $\beta$ -lactamases [ESBLs] sproducing *Acinetobacter baumannii*[J]. British Journal of Biomedical Science, 2018, 75(4): 200-202.
- [15] 苗荪, 陈磊, 左剑恶. 环境中抗生素抗性基因丰度与抗生素和重金属含量的相关性分析: 基于 Web of Science 数据库检索[J]. 环境科学, 2021, 42(10): 4925-4932.
- MIAO S, CHEN L, ZUO JE. Correlation analysis among environmental antibiotic resistance genes abundance, antibiotics concentrations, and heavy metals concentrations based on web of science searches[J]. Environmental Science, 2021, 42(10): 4925-4932 (in Chinese).
- [16] LIU MM, ZHANG Y, YANG M, TIAN Z, REN LR, ZHANG SJ. Abundance and distribution of tetracycline resistance genes and mobile elements in an oxytetracycline production wastewater treatment system[J]. Environmental Science & Technology, 2012, 46(14): 7551-7557.
- [17] 冯涛. 狐源大肠杆菌耐药性及耐药基因的研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学硕士学位论文, 2021.
- FENG T. Study on drug resistance and drug resistance genes of *Escherichia coli* from fox[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Forestry University, 2021 (in Chinese).
- [18] 朱泽亮. 灞河气单胞菌(*Aeromonas*)抗生素耐药性和重金属抗性研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2020.
- ZHU ZL. Study on antibiotic resistance and heavy metal resistance of *Aeromonas* in Bahe River[D]. Xianyang: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2020 (in Chinese).
- [19] 赵姝, 李健, 马立才, 刘旭, 王元, 房文红. 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[J]. 海洋渔业, 2019, 41(4): 463-471.
- ZHAO S, LI J, MA LC, LIU X, WANG Y, FANG WH. Analysis of phenotype and genotype in quinolone resistance in *Vibrio* from mairculture[J]. Marine Fisheries, 2019, 41(4): 463-471 (in Chinese).
- [20] VARELA AR, NUNES OC, MANAIA CM. Quinolone resistant *Aeromonas* spp. as carriers and potential tracers of acquired antibiotic resistance in hospital and municipal wastewater[J]. Science of the Total Environment, 2016, 542: 665-671.
- [21] 韩天飞, 刘娜, 张青青, 赵建梅, 李月华, 黄秀梅, 王琳, 王娟, 赵格, 刘俊辉, 王君玮, 曲志娜, 祁克宗. 七类常见抗菌药耐药机制及耐药基因国内流行现状[J]. 中国动物检疫, 2019, 36(11): 53-58.
- HAN TF, LIU N, ZHANG QQ, ZHAO JM, LI YH, HUANG XM, WANG L, WANG J, ZHAO G, LIU JH, WANG JW, QU ZN, QI KZ. Resistance mechanism of animal-derived bacteria to seven antibiotics and prevalence status of drug-resistant genes in China[J]. China Animal Health Inspection, 2019, 36(11): 53-58 (in Chinese).
- [22] 金晶磊. 浙江省近海水域四类常见抗生素耐药基因与耐药菌的调查与分析[D]. 宁波: 宁波大学硕士学位论文, 2021.
- JIN JL. Investigation and analysis of four kinds of common antibiotic resistance genes and bacteria in Zhejiang offshore waters[D]. Ningbo: Master's Thesis of Ningbo University 2021 (in Chinese).
- [23] QIAO M, YING GG, SINGER AC, ZHU YG. Review of antibiotic resistance in China and its environment[J]. Environment International, 2018, 110: 160-172.
- [24] TYRRELL C, BURGESS CM, BRENNAN FP, WALSH F. Antibiotic resistance in grass and soil[J]. Biochemical Society Transactions, 2019, 47(1): 477-486.
- [25] POOLE K. At the nexus of antibiotics and metals: the impact of Cu and Zn on antibiotic activity and resistance[J]. Trends in Microbiology, 2017, 25(10): 820-832.
- [26] LIU WB, LING N, GUO JJ, RUAN Y, WANG M, SHEN QR, GUO SW. Dynamics of the antibiotic resistome in agricultural soils amended with different sources of animal manures over three consecutive years[J]. Journal of Hazardous Materials, 2021, 401: 123399.
- [27] CHEN CQ, LI J, CHEN PP, DING R, ZHANG PF, LI XQ. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistances in soils from wastewater irrigation areas in Beijing and Tianjin, China[J]. Environmental Pollution, 2014, 193: 94-101.
- [28] CERQUEIRA F, MATAMOROS V, BAYONA J, PINA B. Antibiotic resistance genes distribution in microbiomes from the soil-plant-fruit continuum in

- commercial *Lycopersicon esculentum* fields under different agricultural practices[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 652: 660-670.
- [29] SU HC, YING GG, TAO R, ZHANG RQ, ZHAO JL, LIU YS. Class 1 and 2 integrons, *sul* resistance genes and antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolated from Dongjiang River, south China[J]. *Environmental Pollution*, 2012, 169: 42-49.
- [30] 梁圆, 张丹丹, 程景, 李博, 靳光, 王栋才, 张元庆. 犊牛源大肠杆菌的分离鉴定与耐药性分析[J]. *中国兽医杂志*, 2022, 58(5): 52-57, 63.  
LIANG Y, ZHANG DD, CHENG J, LI B, JIN G, WANG DC, ZHANG YQ. Isolation, identification and antimicrobial resistance analysis of *Escherichia coli* from calves[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2022, 58(5): 52-57, 63 (in Chinese).
- [31] KOTLARSKA E, LUCZKIEWICZ A, PISOWACKA M, BURZYŃSKI A. Antibiotic resistance and prevalence of class 1 and 2 integrons in *Escherichia coli* isolated from two wastewater treatment plants, and their receiving waters (Gulf of Gdansk, Baltic Sea, Poland)[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2015, 22(3): 2018-2030.
- [32] 李晓娜, 杨慧君, 余婷, 王桂琴. 牛源大肠杆菌耐药表型与I型整合子-基因盒的关系[J]. *中国兽医学报*, 2017, 37(3): 438-442.
- LI XN, YANG HJ, YU T, WANG GQ. Correlation between antimicrobial resistance and class I integron-gene cassette of *Escherichia coli* isolated from cow[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2017, 37(3): 438-442 (in Chinese).
- [33] KAUSHIK M, KHARE N, KUMAR S, GULATI P. High prevalence of antibiotic resistance and integrons in *Escherichia coli* isolated from urban river water, India[J]. *Microbial Drug Resistance*, 2019, 25(3): 359-370.
- [34] 江礼捷. tet(X4)介导的高水平替加环素耐药性的适应性代价研究[D]. 扬州: 扬州大学博士学位论文, 2022.  
JIANG LJ. Study on the adaptive cost of tet(X4)-mediated high-level tigecycline resistance[D]. Yangzhou: Doctoral Dissertation of Yangzhou University, 2022 (in Chinese).
- [35] 李晓娜, 张金宝, 王桂琴. 整合子-基因盒介导细菌耐药基因水平传播的研究进展[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2015(1): 47-49.  
LI XN, ZHANG JB, WANG GQ. Research progress on horizontal transmission of the bacterial drug-resistance gene mediated by integron/gene cassette[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2015(1): 47-49 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)