

# 氟苯尼考对水生细菌耐药性的影响研究

廖翠怡, 陶松若, 彭金菊, 丁月霞, 马驿\* (广东海洋大学滨海农业学院动物医学系, 广东湛江 524088)

**摘要** [目的]建立水体模型,探究氟苯尼考对水生细菌耐药性的影响。[方法]将水体样品分成I、II、III、IV、V组,每组3个重复,各组添加不同浓度的氟苯尼考。分离培养建模前以及建模后第14、28、56天水生细菌,利用微量肉汤二倍稀释法和KB药敏纸片法对分离的水生细菌分别进行氟苯尼考和17种抗菌药物的敏感性试验。[结果]第56天收集的V组水生细菌对氟苯尼考的耐药率最高,达到25.00%;分离的氟苯尼考敏感菌和耐药菌对阿莫西林、链霉素和多西环素等8种药物的敏感性差异极显著( $P < 0.01$ )。[结论]氟苯尼考在一定程度上增加了水生细菌的耐药性。

**关键词** 氟苯尼考;水生细菌;耐药性

中图分类号 S948 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2022)02-0099-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.02.026



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

## Effect of Florfenicol on the Drug Resistance of Aquatic Bacteria

LIAO Cui-yi, TAO Song-ruo, PENG Jin-ju et al (Department of Veterinary Medicine, College of Coastal Agricultural Sciences, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524088)

**Abstract** [Objective] To establish a water model and study the effects of florfenicol on the drug resistance of aquatic bacteria. [Method] The water samples were divided into groups I, II, III, IV and V with 3 replications in each group, and different concentrations of florfenicol were added. The sensitivity tests of florfenicol and 17 kinds of antibiotics were carried out on the aquatic bacteria isolated and cultured before modeling and on the 14<sup>th</sup>, 28<sup>th</sup> and 56<sup>th</sup> days after modeling by double dilution method of broth and KB disk method. [Result] On the 56<sup>th</sup> day, the resistance rate of aquatic bacteria in group V to florfenicol was the highest (25.00%). The sensitivity of florfenicol sensitive bacteria and drug-resistant bacteria to 8 kinds of drugs (amoxicillin, streptomycin, doxycycline, etc.) was extremely significantly different ( $P < 0.01$ ). [Conclusion] Florfenicol increased the drug resistance of aquatic bacteria to a certain extent.

**Key words** Florfenicol; Aquatic bacteria; Drug resistance

抗生素作为水产动物疾病防治和促进生长的药物被广泛用于水产养殖中。水产养殖中经常混饲给药,投入的抗生素药物仅有少量被水生动物吸收,大部分以原药的形式排到环境中,造成养殖区及废水排放水域抗生素残留,最终导致水生细菌耐药性不断增加<sup>[1]</sup>。

氟苯尼考是甲砒霉素的3位氟衍生物,最初用于防治产气单胞菌、弧菌等引起的水产动物疾病,现已被广泛用于预防与治疗食品性动物疾病,如猪黄痢、白痢,奶牛子宫内膜炎,鸡大肠杆菌病以及鱼类鳃霉爱德华氏病和赤鳍病等细菌性疾病<sup>[2-6]</sup>。氟苯尼考能够通过阻碍细菌肽链的延长,抑制细菌蛋白质的合成,对革兰氏阴性菌、阳性菌引起的疾病有显著疗效<sup>[7-8]</sup>。由于氟苯尼考的大量使用,病原菌和环境细菌对其产生了不同程度的耐药性。陈招弟<sup>[9]</sup>从凡纳滨对虾养殖生态制剂中分离出100个菌株,结果发现各菌株对除恩诺沙星以外的8种抗生素都有不同程度的耐药性,其中对氟苯尼考的耐药率达100%。笔者通过对模型中分离的水生细菌进行抗菌药敏感性试验,研究氟苯尼考对水生细菌耐药性的影响,旨在为水产养殖中合理使用抗生素提供科学资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 水体样品来源。**采集广东海洋大学园艺实习基地的

池塘水,采集水样于室温下静置24 h。

**1.1.2 主要试剂。**氟苯尼考(含量98%),购自山东国邦药业有限公司(批号701-2005101);17种药敏纸片,购自杭州驰成医药科技有限公司;LB固体培养基、LB液体培养基,均购自北京酷来搏科技有限公司。

**1.1.3 主要仪器。**手提式高压蒸汽灭菌器(DSX-18L-1),上海申安医疗器械厂;超净化工作台(SW-CJ-1D),江苏苏净集团安泰公司;电子分析天平(FA-TC系列),力辰实验仪器有限公司;生化培养箱(SPX-250),上海福絮实验室仪器设备厂。

### 1.2 方法

**1.2.1 水体模型的建立。**将水样分成I、II、III、IV、V组,分装于塑料桶(5 L/桶)内,每组3个重复。每组分别加入0、0.1、1.0、10.0、100.0 mg/L浓度梯度的氟苯尼考,于(25±3)℃室温下培养。

**1.2.2 水生细菌的分离与培养。**建模前以及建模后第14、28、56天分离、培养和保存水生细菌。分别用各组采集水样制备不同浓度的细菌悬液,涂布于LB固体培养基上,28℃下培养24~48 h。每组用接种环挑取60株淡黄色单个菌落接种到LB液体培养基中,28℃下培养24 h;加入30%甘油,-20℃下保存备用。

**1.2.3 水生细菌对氟苯尼考的敏感性试验。**利用微量肉汤二倍稀释法进行水生细菌对氟苯尼考的敏感性试验。复苏水生细菌,制备0.5麦氏浊度菌液。以96孔板第1行为例,第1孔加入菌液180 μL和氟苯尼考药液20 μL,其他孔只加入菌液100 μL。第1孔混合均匀后吸出100 μL到第2孔,

**基金项目** 广东省教育厅2019年广东省普通高校特色创新类项目(2019KTSX057);广东省教育厅2021年度普通高校重点领域专项(2021ZDZX4003)。

**作者简介** 廖翠怡(1996—),女,广东惠州人,硕士研究生,研究方向:动物生产学。\*通信作者,教授,博士,硕士生导师,从事兽医药理学与毒理学研究。

**收稿日期** 2021-05-31

依次倍比稀释至第 11 孔, 弃去 100  $\mu\text{L}$ , 第 12 孔作为空白对照, 12 个孔内菌液中氟苯尼考浓度分别为 256.00、128.00、64.00、32.00、16.00、8.00、4.00、2.00、1.00、0.50、0.25、0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 每个菌株重复 3 次。于 28  $^{\circ}\text{C}$  下培养 24 h, 观察并记录结果。以孔内肉汤清亮、无菌生长的最低浓度为最小抑菌浓度 (MIC)。

**1.2.4 水生细菌对其他抗菌药物的敏感性试验。**根据氟苯尼考敏感性试验结果, 筛选出 30 株建模前氟苯尼考敏感菌和 30 株建模后氟苯尼考耐药菌。参照美国临床检验标准委员会 (CLSI) 推荐的 KB 药敏纸片法进行水生细菌对 17 种抗菌药的敏感性试验, 每种药物重复 3 次。

采用 SPSS 21.0 统计软件对试验数据进行单因素方差分

析, 比较氟苯尼考敏感菌和耐药菌对同一种抗菌药的敏感性。

## 2 结果与分析

**2.1 水生细菌对氟苯尼考的敏感性试验** 随机挑取 10 株细菌, 采用 PCR 方法扩增 16S rDNA 基因。然后, 将 PCR 扩增产物送至北京六合华大基因科技有限公司进行测序, 测序结果在 NCBI 网站上进行基因序列比对。培养分离的水生细菌为假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 和芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 的细菌。

由表 1 可知, 氟苯尼考对建模前分离的水生细菌 60% 以上菌株的最小抑菌浓度 (MIC) 为 32.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 故  $\text{MIC} \leq 32.00 \mu\text{g}/\text{mL}$  和  $\text{MIC} \geq 256.00 \mu\text{g}/\text{mL}$  的菌株分别为氟苯尼考敏感菌和氟苯尼考耐药菌。

表 1 建模前水生细菌对氟苯尼考的敏感性试验结果

Table 1 The drug sensitivity test results of aquatic bacteria to florfenicol before modeling

组别 Group	MIC// $\mu\text{g}/\text{mL}$													株
	>256.00	256.00	128.00	64.00	32.00	16.00	8.00	4.00	2.00	1.00	0.50	0.25	0	
I	0	0	2	5	39	10	3	1	0	0	0	0	0	0
II	0	0	2	5	44	7	1	0	1	0	0	0	0	0
III	0	1	2	6	42	6	2	1	0	0	0	0	0	0
IV	0	0	0	10	45	5	0	0	0	0	0	0	0	0
V	0	0	1	6	47	5	0	0	1	0	0	0	0	0

注: 各组菌株数均为 60

Note: The number of bacteria in each group was 60

从表 2 可以看出, 第 14~56 天, I 组耐药率为 5.00%~11.67%, II 组耐药率为 5.00%~11.67%, III 组耐药率为 6.67%~18.33%, IV 组耐药率为 5.00%~18.33%, V 组耐药率为

8.33%~25.00%, 说明随着时间的延长, 在相同氟苯尼考浓度下水生细菌的耐药率也逐渐升高。

表 2 建模后水生细菌对氟苯尼考耐药率的比较

Table 2 Comparison of the resistance rates of aquatic bacteria to florfenicol after modeling

组别 Group	14 d		28 d		56 d	
	耐药菌株数 Number of resistant strains//株	耐药率 Resistance rate//%	耐药菌株数 Number of resistant strains//株	耐药率 Resistance rate//%	耐药菌株数 Number of resistant strains//株	耐药率 Resistance rate//%
I	3	5.00	4	6.67	7	11.67
II	3	5.00	5	8.33	7	11.67
III	4	6.67	4	6.67	11	18.33
IV	3	5.00	10	16.67	11	18.33
V	5	8.33	13	21.67	15	25.00

注: 各组菌株数均为 60

Note: The number of bacteria in each group was 60

**2.2 水生细菌对其他抗菌药物的敏感性试验** 利用 KB 药敏纸片法测定 17 种抗菌药对建模前分离的 30 株氟苯尼考敏感菌和建模后分离的 30 株氟苯尼考耐药菌的抑菌圈直径, 结果见表 3。由表 3 可知, 在 17 种供试抗菌药中, 氟苯尼考敏感菌对阿莫西林、链霉素、多黏菌素 B、多西环素、氟苯尼考、利福平、头孢噻肟、丁胺卡那 8 种抗菌药的抑菌圈直径极显著大于氟苯尼考耐药菌 ( $P < 0.01$ ), 氟苯尼考敏感菌对红霉素、磷霉素和恩诺沙星的抑菌圈直径与氟苯尼考耐药菌差异显著 ( $P < 0.05$ ), 氟苯尼考敏感菌对头孢氨苄、环丙沙星、呋喃妥因和克拉霉素的抑菌圈直径与氟苯尼考耐药菌差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 而林可霉素和青霉素 G 对氟苯尼考敏感菌和耐药菌均无抑制作用 (抑菌圈直径为 0 mm)。

## 3 讨论

集约化的水产养殖中经常使用大量的抗生素用于预防和治疗细菌性疾病, 其中使用的抗生素有 70%~80% 通过各种途径被释放到环境中, 抗生素在环境中残留容易导致细菌产生耐药性<sup>[10-11]</sup>。韩千帆<sup>[12]</sup> 研究发现渤海养殖区养殖水体和自然水体中环丙沙星和恩诺沙星显示出高生态风险和耐药性风险。朱泽亮<sup>[13]</sup> 从灞河西安城区段水体筛选出的气单胞菌大多数对头孢噻肟、头孢吡肟、磺胺甲恶唑和美罗培南 4 种抗生素有较强的耐药性。孙永婵等<sup>[14]</sup> 研究发现福建省大部分皱纹盘鲍养殖水体异养菌对青霉素、卡那霉素、庆大霉素、利福平有耐药性, 耐药率高达 83.95%。Hernández 等<sup>[15]</sup> 研究发现残留在水产养殖环境中的喹诺酮类药物会导致水

生细菌产生喹诺酮耐药基因。该试验结果表明水生细菌对氟苯尼考的耐药率会随药物浓度的增大和作用时间的不断

延长而逐渐增加。环境细菌的耐药性能否传递给人源或动物源细菌,还需要进一步研究。

表 3 抗菌药对水生细菌的抑菌圈直径

Table 3 The inhibition zone diameter of antibacterial drugs on aquatic bacteria

mm

药物 Drugs	氟苯尼考敏感菌 Sensitive bacteria to florfenicol		氟苯尼考耐药菌 Drug resistant bacteria to florfenicol	
	变化范围 Variation range	$\bar{x}\pm SD$	变化范围 Variation range	$\bar{x}\pm SD$
阿莫西林 Amoxicillin	8~10	8.80±0.71	7~10	7.83±0.99**
头孢氨苄 Cephalexin	7~9	8.00±0.87	7~9	8.00±0.74
链霉素 Streptomycin	7~9	8.30±0.75	7~8	7.63±0.49**
多黏菌素 B Polymyxin B	17~20	18.03±1.13	13~16	14.43±1.14**
多西环素 Doxycycline	11~17	14.37±1.77	0~13	11.13±3.19**
氟苯尼考 Florfenicol	13~15	13.60±0.77	0~9	8.00±2.73**
红霉素 Ergomycin	7~10	8.30±0.75	7~9	7.73±0.91*
林可霉素 Lincomycin	0	0	0	0
磷霉素 Fosfomycin	30~45	40.87±3.34	30~42	40.00±2.41*
利福平 Rifampicin	8~15	12.60±1.63	8~14	10.87±1.41**
环丙沙星 Ciprofloxacin	34~42	39.13±1.28	33~40	38.87±1.33
恩诺沙星 Enrofloxacin	30~40	38.10±2.51	30~42	36.53±2.97*
呋喃妥因 Nitrofurantoin	7~12	9.27±1.14	7~10	8.43±1.19
青霉素 G Penicillin G	0	0	0	0
头孢噻肟 Cefotaxime	24~30	27.40±1.50	14~27	22.90±3.24**
丁胺卡那 Amikacin	24~32	27.87±1.87	13~29	23.23±3.76**
克拉霉素 Clarithromycin	15~17	15.83±0.83	0~16	14.87±2.86

注: \* 表示与氟苯尼考敏感菌差异显著 ( $P<0.05$ ); \*\* 表示氟苯尼考敏感菌差异极显著 ( $P<0.01$ )

Note: \* indicated significant difference with sensitive bacteria to florfenicol ( $P<0.05$ ); \*\* indicated extremely significant difference with sensitive bacteria to florfenicol ( $P<0.01$ )

由于抗生素的广泛使用,在药物的选择性压力下会导致多重耐药菌的产生<sup>[15]</sup>。例如,智利 4 个鲑鱼养殖场 71.8% 的菌株对多种抗生素表现出较高的耐药性<sup>[16]</sup>。李敏<sup>[17]</sup>研究发现从雨水径流中分离的 200 株可培养细菌中,有耐药性的细菌占 96.95%,其中有多重耐药性的细菌占 62.30%。王瑞旋等<sup>[18]</sup>研究发现广东阳江地区的香港牡蛎养殖水体细菌对氯霉素、恩诺沙星、环丙沙星的耐药率较低,对呋喃妥因的耐药率最高,对卡那霉素及青霉素的耐药率波动较大。吴小梅<sup>[19]</sup>研究了美洲鳗鲡及其养殖水体分离耐药细菌的耐药率,结果发现 108 株耐药菌株对阿莫西林的耐药率高达 90.7%,93.5% 的菌株对 3 种及以上的药物具有抗药性。该试验结果表明,在 17 种抗菌药中氟苯尼考敏感菌对其中 8 种药物的敏感性与氟苯尼考耐药菌差异极显著,对其中 3 种抗菌药的敏感性差异显著,说明氟苯尼考残留不仅会诱导水生细菌对其产生了耐药性,而且诱导耐药菌对其他抗生素产生耐药性。笔者通过对建模前后细菌进行抗菌药的敏感试验,为抗生素的规范化使用提供了理论依据,为加快推进养殖业绿色发展和保护水域生态环境提供了理论支撑。

#### 参考文献

[1] 陈清华.水产养殖业中抗生素使用的风险及其控制[J].水产科技情报,2009,36(2):67-72.  
 [2] 席进华,杨金海.药物治疗猪传染性胸膜肺炎的临床试验[J].郑州牧业工程高等专科学校学报,2005,25(3):193.  
 [3] 张丽云,李继连.氟苯尼考混悬剂对奶牛子宫内膜炎的疗效试验[J].中国奶牛,2008(2):29-31.  
 [4] 蔡玉梅,陈文政,吴绍强.氟苯尼考可溶性粉对鸡大肠杆菌病的疗效试

验[J].中国兽药杂志,2002,36(6):34-35.  
 [5] 孙雷,张骊,徐倩,等.氟苯尼考的毒性及残留检测方法研究进展[J].中国兽药杂志,2009,43(6):49-52.  
 [6] 李世宏,刘希望,杨亚军,等.氟苯尼考的应用与残留研究进展[J].安徽农业科学,2019,47(2):15-17.  
 [7] 孙继超,陈晨,张东辉,等.氟苯尼考的研究进展[J].江苏农业科学,2020,48(20):31-36.  
 [8] 张春辉,邢广旭,胡晓飞,等.动物专用药物氟苯尼考的研究进展[J].中兽医医药杂志,2019,38(5):95-98.  
 [9] 陈招弟.凡纳滨对虾养殖微生态制剂耐药性的研究[D].上海:上海海洋大学,2019.  
 [10] 朱柏珍,张艳玲,方容.常见革兰氏阳性球菌接种浓度对替考拉宁纸片扩散法药敏结果分析[J].中国现代医药杂志,2017,19(11):94-96.  
 [11] SAMUELSEN O B, TORSVIK V, ERVIK A. Long-range changes in oxytetracycline concentration and bacterial resistance towards oxytetracycline in a fish farm sediment after medication [J]. Science of the total environment, 1992, 114: 25-36.  
 [12] 韩千帆.山东半岛海水养殖场中抗生素的分布、复合污染和风险评估[D].济南:山东大学,2020.  
 [13] 朱泽亮.濰河气单胞菌(Aeromonas)抗生素耐药性和重金属抗性研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2020.  
 [14] 孙永婵,王瑞旋,赵曼曼,等.鲍消化道及其养殖水体异养菌的耐药性研究[J].南方水产科学,2017,13(3):58-65.  
 [15] HERNÁNDEZ A, SÁNCHEZ M B, MARTÍNEZ J L. Quinolone resistance: Much more than predicted [J]. Frontiers in microbiology, 2011, 2: 1-6.  
 [16] MIRANDA C D, ZEMELMAN R. Antimicrobial multiresistance in bacteria isolated from freshwater Chilean salmon farms [J]. Science of the total environment, 2002, 293(1/2/3): 207-218.  
 [17] 李敏.雨水径流中多重耐药性细菌在石英砂表面的粘附特性研究[D].北京:北京交通大学,2017.  
 [18] 王瑞旋,李炳,林华剑,等.牡蛎体内及其养殖水体中细菌耐药性研究[J].海洋科学,2020,44(6):56-63.  
 [19] 吴小梅.美洲鳗鲡与其养殖水体细菌的耐药性、抗性基因及整合子的研究[D].厦门:集美大学,2016.