

水产用微生态制剂耐药性评估及耐药相关遗传元件检测

陈招弟^{1,2,3}, 李 健^{1,2,3}, 翟倩倩^{2,3}, 常志强^{2,3}, 王佳佳^{2,3}, 葛倩倩^{2,3}

(1. 水产科学国家级实验教学示范中心(上海海洋大学), 上海 201306; 2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266071; 3. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071)

摘要: 以市场上购买的 9 种水产用微生态制剂为研究对象, 采用琼脂稀释法筛选其中的耐药菌株, 运用微量肉汤稀释法检测分离菌株对庆大霉素、恩诺沙星、诺氟沙星、氟苯尼考、磺胺嘧啶、磺胺甲基嘧啶、四环素、土霉素、万古霉素 9 种抗生素的耐药性, 结合聚合酶链式反应分析耐药菌株携带的耐药基因和可移动遗传元件(接合性质粒遗传标记、转座子、整合子和插入序列), 为微生态制剂的安全生产与监测提供参考。结果显示, 9 种微生态制剂中都存在耐药菌株, 100 株分离菌株对除恩诺沙星以外的 8 种抗生素都存在不同程度的耐药, 46% 的菌株同时携带氟喹诺酮类、酰胺醇类、磺胺类、四环素类、氨基糖苷类和糖肽类耐药基因, 且有 15 株菌同时携带整合子-基因盒、质粒、转座子和插入序列, 携带两种及两种以上可移动遗传元件的比例为 95%。微生态制剂产品可能存在一定的安全隐患, 应加强质量监测和市场监管。

关键词: 微生态制剂; 抗生素; 耐药基因; 可移动遗传元件

中图分类号: Q939.9

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2018)06-0132-09

DOI: 10.11759/hyxx20180408001

我国水产养殖业发展迅速, 从 1990 年到 2016 年水产品养殖年产量从 9.1×10^6 t 升至 5.1×10^7 t^[1,2], 成为最大的水产养殖大国。但高密度集约化养殖导致环境恶化、疾病频发, 严重制约了水产养殖业的可持续健康发展。使用抗菌类药物如抗生素等传统防治措施对治疗水产动物疾病具有一定的效果, 但是随着药物的大量使用以及滥用, 致使病原菌产生耐药性, 这不仅会降低抗菌药物的药效, 而且细菌耐药基因的传播, 也会给水产养殖业和人类健康造成威胁。

为缓解以上问题, 微生态制剂(Microbial ecological agent, MEA)作为抗生素的替代品被研制并应用于水产养殖。微生态制剂是具有维持养殖动物肠道健康、提高养殖动物免疫机能、抑制有害菌生长、提高养殖动物成活率等多种功能的活菌制剂^[3]。我国微生态制剂产业发展迅速, 据不完全统计, 2018 年微生态制剂的年使用量已达 20 万~30 万 t。在微生态制剂大面积应用的同时, 抗生素作为辅助防治手段也会少量应用于水产养殖中, 这就存在益生菌耐药的可能。现在我国微生态制剂厂家的生产技术良莠不齐, 在筛选益生菌菌种的过程中没有统一的质量标准和相应的管理机制, 致使微生态制剂的质量安全难以保证。国内外对细菌耐药性的报道大部分集中在致病菌株上, 而对益生菌耐药性的研究仅见零星报道。

本实验采用琼脂稀释法筛选市场上购买的 9 种微生态制剂中的耐药菌株, 微量肉汤稀释法检测菌株对万古霉素、庆大霉素、四环素、土霉素、恩诺沙星、诺氟沙星、氟苯尼考、磺胺嘧啶、磺胺甲基嘧啶 9 种水产养殖常用抗生素的耐药性, 同时检测耐药基因和可移动遗传元件, 为微生态制剂的安全生产和使用提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验菌株

选取市场上常见的三个厂家(简称 B、G、W)的

收稿日期: 2018-04-08; 修回日期: 2018-06-09

基金项目: 国家虾蟹产业技术体系(CARS-48); 山东省泰山产业领军人才工程项目(LNJY2015002); 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2016HY-ZD1203); 青岛市 2016 年海洋经济创新发展示范城市项目

[Foundation: Modern Agro-industry Technology Research System, No. CARS-48; the Program of Shandong Leading Talent, No. LNJY2015002; the Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS, No. 2016HY-ZD1203; National Marine Economy Innovation and Development Demonstration City Project(Qingdao 2016)]

作者简介: 陈招弟(1993-), 女, 山东潍坊人, 硕士研究生, 主要从事微生态制剂耐药性研究, E-mail: zdchen821@163.com; 李健, 通信作者, 研究员, Email: lijian@ysfri.ac.cn

9 种微生态制剂产品, 分别为枯草芽孢杆菌(简称 BK)、地衣芽孢杆菌(简称 BD)、解淀粉芽孢杆菌(简称 GJ)、短小芽孢菌(简称 GD)、粪肠球菌 1(简称 GF)、200 亿枯草(简称 GK)、水产用枯草芽孢杆菌(简称 WK)、粪肠球菌 2(简称 WF)、乳杆菌(简称 WR)。

大肠杆菌 ATCC25922、金黄色葡萄球菌 ATCC29213、粪肠球菌 ATCC29212 三种标准质控菌株购自于北纳创联生物技术有限公司。

1.1.2 实验药品

9 种抗生素分别购自北京索莱宝科技有限公司(诺氟沙星(100%)、四环素($\geq 98\%$)、土霉素($\geq 99\%$)、庆大霉素($\geq 590 \mu\text{g}/\text{mg}$))、大连美仑生物技术有限公司(万古霉素($>90\%$))、上海阿拉丁生化科技股份有限公司(磺胺甲基嘧啶($>99\%$)、恩诺沙星(100%)、氟苯尼考($>98\%$)、磺胺嘧啶($>98\%$))。

1.2 实验方法

1.2.1 耐药菌株的分离、纯化

微生态制剂中耐药菌株的分离遵照 CALVA 等^[4]提供的方法, 筛选微生态制剂中对万古霉素、庆大霉素和四环素的抗性菌株, 将抗性平板上生长的菌株挑取单菌落于液体培养基中, 培养(37°C , $200 \text{ r}/\text{min}$)16~20 h 划线纯化后富集培养, 保存菌种备用。

1.2.2 DNA 和质粒提取

分别按细菌基因组 DNA 提取试剂盒和质粒小提试剂盒的说明书提取基因组 DNA 和质粒。

1.2.3 菌株鉴定

以基因组 DNA 为模板, 进行 16S rRNA 的 PCR 扩增, 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳 20 min 后用凝胶成像仪成像分析, 选取条带明亮的样品送样至青岛睿博兴科进行测序, 测序结果在 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)上进行同源比对, 结合生化鉴定确定其种类。所有引物序列及反应条件见表 1。

1.2.4 分离菌株耐药性检测

按照美国临床与实验室标准协会(CLSI)规定的微量肉汤稀释法的操作方法^[5], 以大肠杆菌 ATCC25922、金黄色葡萄球菌 ATCC29213 和粪肠球菌 ATCC29212 为标准菌株, 对分离菌株进行 9 种抗生素的药敏试验, 庆大霉素、万古霉素、四环素、土霉素、诺氟沙星、恩诺沙星、氟苯尼考、磺胺嘧啶和磺胺甲基嘧啶的最高浓度分别为 512、128、64、256、64、64、512、4096、4096 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。每组设置 3 个重复。结果跟据 CLSI2014 版中的判定标准进行统计, 对于缺乏敏感、中介、耐药范围的菌株参考其标准质控菌株。判定标准如表 2 所示。

表 1 引物序列和反应条件

Tab.1 Sequences and reaction conditions of primers

引物	引物序列(5'-3')	长度/bp	反应条件
16S rRNA-F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1500	94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, (94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min)
16S rRNA-R	GGCTACCTTGTTACGACTT		35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min
16S-23S rRNA-F	CAAGGCATCCACCGT	300/400	94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, (94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 54 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min)
16S-23S rRNA-R	GTGAAGTCGTAACAAGG		35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min
tetA-F	GCTACATCCTGCTTGCTTC	211	94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, (94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s)
tetA-R	GCATAGATCGCCGTGAAGAG		35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min
tetB-F	TACGTGAATTTATTGCTTCGG	206	94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, (94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s)
tetB-R	ATACAGCATCCAAAGCGCAC		35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min
tetC-F	CTGCTCGCTTCGCTACTTG	897	94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, (94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min)
tetC-R	GCCTACAATCCATGCCAACC		35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min
tetD-F	TGTGCTGTGGATGTTGTATCTC	844	94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, (94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min)
tetD-R	CAGTGCCGTGCCAATCAG		35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min
tetE-F	ATGAACCGCACTGTGATGATG	744	94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, (94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min)
tetE-R	ACCGACCATTACGCCATCC		35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min
tetM-F	ACAGAAAGCTTATTATATAAC	171	94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, (94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s)
tetM-R	TGGCGTGTCTATGATGTTTAC		35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min
vanA-F	GCTATTACAGCTGTACTC	783	94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, (94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min)
vanA-R	CAGCGGCCATCATACGG		35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min

续表

引物	引物序列(5'-3')	长度/bp	反应条件
vanB-F	CATCGCCGTCCCCGAATTTCAAA	667	94℃ 5 min, (94℃ 45 s, 55℃ 35 s, 72℃ 1 min)
vanB-R	GATGCGGAAGATAACCGTGGCT		35 个循环, 72℃ 10 min
VanC1-F	GGTATCAAGGAAACCTC	822	94℃ 5 min, (94℃ 45 s, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min)
VanC1-R	CTTCCGCCATCATAGCT		35 个循环, 72℃ 10 min
qnrA-F	TTCAGCAAGAGGATTTCTCA	500	94℃ 5 min, (94℃ 45 s, 55℃ 35 s, 72℃ 1 min)
qnrA-R	GGCAGCACTATTACTCCCAA		35 个循环, 72℃ 10 min
qnrB-F	CCTGAGCGGCACTGAATTTAT	617	94℃ 5 min, (94℃ 45 s, 55℃ 35 s, 72℃ 1 min)
qnrB-R	GTTTGCTGCTCGCCAGTCGA		35 个循环, 72℃ 10 min
qnrS-F	ACATAAAGACTTAAGTGATC	619	94℃ 5 min, (94℃ 45 s, 55℃ 45 s, 72℃ 1 min)
qnrS-R	CAATTAGTCAGGATAAAC		35 个循环, 72℃ 10 min
qepA-F	CCAGCTCGGCAACTTGATAC	570	94℃ 5 min, (94℃ 45 s, 60℃ 45 s, 72℃ 1 min)
qep A-R	ATGCTCGCCTTCCAGAAAA		35 个循环, 72℃ 10 min
aac(6')-Ib-F	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	482	94℃ 5 min, (94℃ 45 s, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min)
aac(6')-Ib-R	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT		35 个循环, 72℃ 10 min
ant(3')-Ia(aadA)-F	ATCTGGCTATCTTGCTGACA	388	94℃ 5 min, (94℃ 45 s, 57℃ 1 min, 72℃ 1 min)
ant(3')-Ia(aadA)-R	TTGGTGATCTCGCCTTTC		35 个循环, 72℃ 10 min
aph(6')-Id(strB)-F	ATGTTTCATGCCGCCTGTTTTT	837	94℃ 5 min, (94℃ 45 s, 54℃ 1 min, 72℃ 1 min)
aph(6')-Id(strB)-R	CTAGTATGACGCTGTGCGC		35 个循环, 72℃ 10 min
floR-F	CTGCTGATGGCTCCTTTC	650	94℃ 5 min, (94℃ 45 s, 57℃ 1 min, 72℃ 1 min)
floR-R	GCCGTGGCGTAACAGAT		35 个循环, 72℃ 10 min
cfr-F	TGAAGTATAAAGCAGGTTGGGAGTCA	746	94℃ 5 min, (94℃ 45 s, 59℃ 1 min, 72℃ 1 min)
cfr-R	ACCATATAATTGACCACAAGCAGC		35 个循环, 72℃ 10 min
Sul1-F	GTGACGGTGTTTCGGCATTCT	800	94℃ 5 min, (94℃ 45 s, 58℃ 1 min, 72℃ 1 min)
Sul1-R	TCCGAGAAGGTGATTGCGCT		35 个循环, 72℃ 10 min
Sul2-F	CATCATTTTCGGCATCGTC	793	94℃ 5 min, (94℃ 45 s, 55℃ 45 s, 72℃ 1 min)
Sul2-R	TCTTGCGGTTTCTTTCAGC		35 个循环, 72℃ 10 min
Sul3-F	GCAACAGTTGGTGCTAAACGAGA	578	94℃ 5 min, (94℃ 45 s, 55℃ 45 s, 72℃ 1 min)
Sul3-R	AGCAGATGTGATTGATTGGGAG		35 个循环, 72℃ 10 min
int1-F	GTTTCGGTCAAGGTTCTGG	890	94℃ 5 min, (94℃ 45 s, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min)
int1-R	CGTAGAGACGTCGGAATG		35 个循环, 72℃ 10 min
int2-F	CAAGCATCTCTAGGCGTA	1100	94℃ 5 min, (94℃ 45 s, 53℃ 1 min, 72℃ 1 min)
int2-R	AGTAGCATCAGTCAATCC		35 个循环, 72℃ 10 min
int3-F	CATCAAGCTGCTCGATCA	900	94℃ 5 min, (94℃ 45 s, 53℃ 1 min, 72℃ 1 min)
int3-R	ACAACCTCTGCACCGTTC		35 个循环, 72℃ 10 min
SXT-F	CTGTGGCCAATCATCAACTC	1030	94℃ 5 min, (94℃ 45 s, 57℃ 1 min, 72℃ 1 min)
SXT-R	CGACCGAGATGGGCTAAGTG		35 个循环, 72℃ 10 min
qacEΔ1-F	ATCGCAATAGTTGGCGAAGT	200	94℃ 5 min, (94℃ 45 s, 55℃ 45 s, 72℃ 1 min)
qacEΔ1-R	CAAGCTTTTGCCCATGAAGC		35 个循环, 72℃ 10 min
Hep58	TCATGGCTTGTTATGACTGT	未知	94℃ 5 min, (94℃ 45 s, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min)
Hep59	GTAGGGCTTATTATGCACGC		35 个循环, 72℃ 10 min

续表

引物	引物序列(5'-3')	长度/bp	反应条件
ISCR-VF	CGAACACTGCGGCGGTCA	1400	94℃ 5 min, (94℃ 45 s, 60℃ 45 s, 72℃ 1 min)
ISCR-VR	TTCAGAATGCCGAACACC		35 个循环, 72℃ 10 min
intTn916/Tn1514-F	CATCAGACGCTAAAGAATGG	452	94℃ 5 min, (94℃ 45 s, 55℃ 45 s, 72℃ 45 s)
intTn916/Tn1514-R	GGCTTCTTCAACCATAGGAA		35 个循环, 72℃ 10 min
Tnp513-F	ATGTCGCTGGCAAGGAACGC	240	94℃ 5 min, (94℃ 45 s, 55℃ 45 s, 72℃ 45 s)
Tnp513-R	GGGTTTCGCTGCGAGGATTGT		35 个循环, 72℃ 10 min
ISab1-F	AATGATTGGTGACAATGAAG	372	94℃ 5 min, (94℃ 45 s, 55℃ 45 s, 72℃ 45 s)
ISab1-R	ATGCAGCGCTTCTTTGCAGG		35 个循环, 72℃ 10 min
IS26-F	ATGAACCCATTCAAAGGCCGGCAT	387	94℃ 5 min, (94℃ 45 s, 55℃ 45 s, 72℃ 45 s)
IS26-R	CCGTCGTAACAGCAAAGCTGCATA		35 个循环, 72℃ 10 min
TraA-F	AAGTGTTTCAGGTGCTTCTGCGC	272	94℃ 5 min, (94℃ 45 s, 55℃ 1 min, 72℃ 45 s)
TraA-R	GTCATGTACATGATGACCATT		35 个循环, 72℃ 10 min
TrbC-F	CGGYATWCCGSCSACRCTGCG	255	94℃ 5 min, (94℃ 45 s, 55℃ 1 min, 72℃ 45 s)
TrbC-R	GCCACCTGYSBGAGTCMCC		35 个循环, 72℃ 10 min

表 2 抗菌药物敏感性实验判定标准($\mu\text{g/mL}$)

Tab.2 Decision criteria of antimicrobial susceptibility test($\mu\text{g/mL}$)

抗菌药物	敏感(S)	中介(I)	耐药(R)
庆大霉素	≤ 4	8	≥ 16
万古霉素	$\leq 4/\leq 2$	8~16/4~8	$\geq 32/\geq 16$
四环素	≤ 4	8	≥ 16
氟苯尼考	≤ 2	4	≥ 8
土霉素	≤ 4	8	≥ 16
恩诺沙星	≤ 4	8	≥ 16
诺氟沙星	≤ 4	8	≥ 16
磺胺嘧啶	≤ 256	-	≥ 512
磺胺甲基嘧啶	≤ 256	-	≥ 512

注: “-”代表 CLSI 上无相应的判定标准; “/”前代表肠球菌、乳杆菌、芽孢杆菌对万古霉素的敏感、中介和耐药值; “/”后代表其他菌株对万古霉素的敏感、中介和耐药值。

1.2.5 耐药基因检测

以提取的细菌基因组 DNA 为模板, 采用 PCR 方法对氨基糖苷类(ant(3')-Ia(aadA)、aph(6')-Id(strB))、氟喹诺酮类(qnrA、qnrB、qnrS、qepA、aac(6')-Ib-cr)、酰胺醇类(floR、cfr)、磺胺类(Sul1、Sul2、Sul3)、四环素类(tetA、tetB、tetC、tetD、tetE、tet M)和糖肽类(vanA、vanB、vanC1)耐药基因进行检测。

1.2.6 可转移原件检测

以质粒 DNA 为模板扩增接合性质粒遗传标记 traA 和 trbC 基因; 以提取的细菌基因组 DNA 为模板, 对转座子 intTn916/Tn1514、Tnp513 和插入序列 ISab1、IS26、ISCR 进行扩增, 同时检测 5'CS 保守区(5'-conserved segment, 5'-CS)的 1-4 类整合

子包含的整合酶基因: int1、int2、int3 和 SXT, 3'CS 保守区(3'-conserved segment, 3'-CS)的 Sul1 和 qacE Δ 1 基因, 以及 1 类整合子的可变区(引物为 Hep58、Hep59)。

2 结果

2.1 微生态制剂耐药菌株分离鉴定

实验发现大肠杆菌 ATCC25922、金黄色葡萄球菌 ATCC29213、粪肠球菌 ATCC29212 在庆大霉素、万古霉素和四环素抗性平板上不生长的最小浓度分别为 8、256、16 $\mu\text{g/mL}$; 2、1、0.5 $\mu\text{g/mL}$; 32、8、64 $\mu\text{g/mL}$ 。分别以上述浓度筛选乳杆菌、芽孢杆菌和

肠球菌对三种抗生素的耐药菌株, 共分离纯化出 100 株耐药菌(表 3), 16S rRNA PCR 均扩增到 1500 bp 左右的目的条带(图 1)。比对分析时发现有 12 株菌与粪肠

球菌(*Enterococcus faecalis*)和屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)同源性相同, 此时采用 16S-23S rRNA 间区序列多态性分析技术^[6]将其继续区分。

表 3 耐药菌株分布

Tab.3 Distribution of drug-resistant strains

菌株种类		B	G	W	总计
芽孢杆菌属	蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	4	10	0	14
	地衣芽胞杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i>	4	4	2	10
	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	2	4	4	10
	甲基营养性芽孢杆菌 <i>Bacillus methylotrophicus</i>	1	1	1	3
	贝莱斯芽孢杆菌 <i>Bacillus velezensis</i>	8	8	0	16
	<i>Bacillus tequilensis</i>	1	2	1	4
肠球菌属	粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i>	3	0	2	5
	屎肠球菌 <i>Enterococcus faecium</i>	3	3	11	17
	鹌鸡肠球菌 <i>Enterococcus gallinarum</i>	0	0	1	1
乳杆菌属	鼠李糖乳杆菌 <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	0	0	3	3
	副干酪乳杆菌 <i>Lactobacillus paracasei</i>	0	0	2	2
葡萄球菌属	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	1	1	0	2
埃希氏菌属	弗格森埃希菌 <i>Escherichia fergusonii</i>	0	0	5	5
志贺菌属	福氏志贺菌 <i>Shigella flexneri</i>	0	7	0	7
不动菌属	抗辐射不动杆菌 <i>Acinetobacter radioresistens</i>	0	0	1	1
总计		27	40	33	100

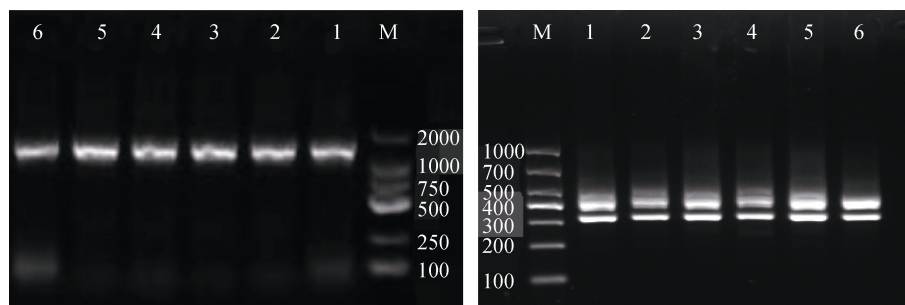


图 1 16S rRNA(左)和 16S-23S rRNA(右)基因扩增的产物
Fig.1 The PCR product of 16S rRNA(left) and 16S-23S rRNA(right)
M: Maker; 1-6: 部分菌株的 16S rRNA 和 16S-23S rRNA
M: Maker; 1-6: 16s rRNA and 16S-23S rRNA of some strains

2.2 微量肉汤稀释法检测菌株耐药性

100 株菌株对氟苯尼考(100%)、磺胺嘧啶(99%)、磺胺甲基嘧啶(99%)、土霉素(79%)、四环素(38%)、庆大霉素(38%)、万古霉素(18%)和诺氟沙星(15%)都存在不同程度的耐药; 但对恩诺沙星的耐药率为 0, 其中敏感菌株占 94%, 处于中介的菌株占 6%(表 4)。100 株耐药菌株中多重耐药菌株占 99%, 最低的为 3 重耐药, 最高的为 8 重耐药, 4 重以上耐药率达 86%(图 2)。

2.3 耐药基因检测

对 100 株分离菌株进行耐药基因扩增发现, *qepA*、*aac(6')*-Ib-cr、*cfr*、*sul1*、*tetA*、*tetC*、*tetM*、*ant(3')*-Ia(*aadA*)、*aph(6')*-Id(*strB*)、*vanC1* 的阳性率分别 9%、90%、98%、89%、81%、36%、98%、23%、68%、75%, 其他基因检测阴性。46%的株菌同时携带氟喹诺酮类、酰胺醇类、磺胺类、四环素类、氨基糖苷类和糖肽类耐药基因。

表 4 益生菌药敏试验结果

Tab.4 The results of probiotics drug sensitivity test

抗菌药物	敏感(S)		中介(I)		耐药(R)	
	菌株数量/株	比率/%	菌株数量/株	比率/%	菌株数量/株	比率/%
庆大霉素	20	20	42	42	38	38
万古霉素	81	81	1	1	18	18
四环素	58	58	4	4	38	38
诺氟沙星	81	81	4	4	15	15
氟苯尼考	0	0	0	0	100	100
土霉素	11	11	10	10	79	79
恩诺沙星	94	94	6	6	0	0
磺胺甲基嘧啶	1	1	0	0	99	99
磺胺嘧啶	1	1	0	0	99	99

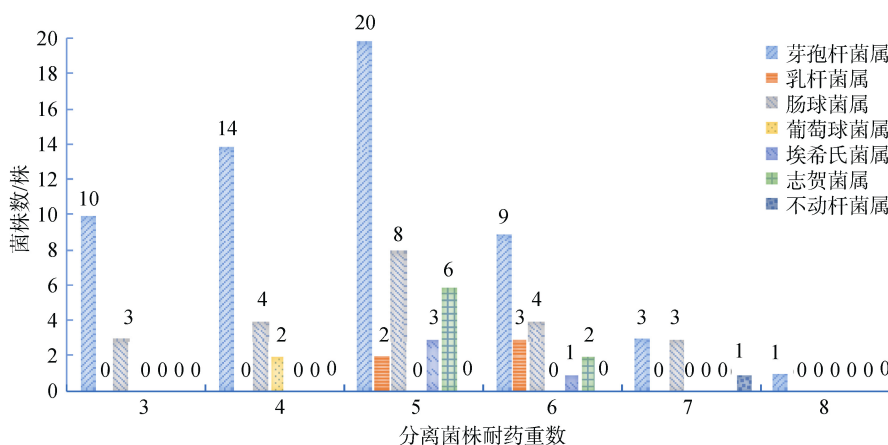


图 2 不同种类菌株的耐药重数

Fig.2 The multi-drug resistance of different bacterial species

2.4 可转移原件检测

100 株菌中整合子 *int1* 的阳性率为 91%，未检测到 *int2*、*int3* 和 *SXT* 等整合子，有 83 株菌同携带 *int1*、*qacEΔ1* 和 *Sul1* 基因，具有完整的整合子保守区 (表 5)。具有完整整合子的菌株中有 78 株携带二氢叶酸还原酶(*dihydrofolate reductase*, *dfrA15*)和/或氨基糖苷类-3'-磷酸转移酶(*aminoglycoside-3'-adenylyltransferase*, *aadA1*)耐药基因盒，分别介导甲氧苄啶

和氨基糖苷类耐药。

此外研究发现细菌接合性质粒遗传标记基因 *traA* 的阳性率为 23%，未检测到 *trbC* 基因；转座子 *intTn916/Tn1514* 的阳性率为 100%，插入序列 *ISabA1* 的阳性率为 78%，*Tnp513*、*IS26* 和 *ISCR* 基因全部为阴性。分离菌株中有 15 株菌同时携带整合子-基因盒、质粒、转座子和插入序列，携带两种及两种以上可移动遗传原件的比例为 95%。

表 5 整合子保守区扩增结果

Tab.5 The results of integration conserved region amplification

	<i>int1</i>	<i>int2</i>	<i>int3</i>	<i>qacEΔ1</i>	<i>Sul1</i>	<i>SXT</i>
数量	91	0	0	100	89	0
阳性率/%	91	0	0	100	89	0

3 讨论

3.1 微生态制耐药菌株分离鉴定

以标准质控菌株在抗生素抗性平板上不生长的

最小浓度，作为微生态制剂抗性菌株的筛选浓度，用该方法筛选得到的菌株是疑似耐药的菌株，经过后续的药敏试验和耐药基因检测进一步确定耐药性。实验从 3 个微生态制剂厂家的 9 种微生态制剂

产品中都分离到了耐药菌株。耐药菌中芽孢杆菌所占比例最大为 57%，其次为肠球菌，占 23%。值得注意的是 100 株分离菌中益生菌有 85 株，而在我国农业部 2013 年规定的饲用微生物菌种名单^[7]之内的仅有 44 株，不足分离株的 50%，此外还分离到 15 株致病菌株，分别为金黄色葡萄球菌、弗格森埃希菌、福氏志贺菌和抗辐射不动杆菌，致病菌所占的比例为 15%。金黄色葡萄球菌可引起人和动物的化脓感染，美国食品药品监督管理局对进口水产品中的金黄色葡萄球菌有一定的限量指标，欧盟(EC)466-2001 指令更是要求水产品中禁止检出金黄色葡萄球菌^[8]；弗格森埃希菌可引起人畜共患菌血症、腹泻、伤口及尿道感染等；福氏志贺菌可引起肠道感染，也可使人畜共患细菌性痢疾；抗辐射不动杆菌为一种条件致病菌，不容易被杀死，可引起多种组织损伤。耐药益生菌可能成为抗生素抗性基因的储藏库，使耐药基因在益生菌和致病菌之间传播^[9]；致病菌的存在也会影响养殖动物的健康，水产品携带的人畜共患菌更会给人类的健康造成巨大威胁。

3.2 微生态制剂耐药性

水产用微生态制剂大都分离自健康动物的肠道和养殖水体，养殖过程中益生菌和抗生素的联合应用，致使耐药菌的数量逐渐增多，分离益生菌技术不规范或者缺乏耐药菌的筛选等环节，就会大大降低微生态制剂的产品质量。药敏实验发现耐药菌株对除恩诺沙星外的 8 种抗生素都有不同程度的耐药表型，且有 46% 的菌株同时存在六大类抗生素抗性基因，恩诺沙星耐药表型低可能与恩诺沙星原代药与其代谢产物环丙沙星在生物体内共同发挥作用有关^[10]。Cataloluk 等^[11]从不同来源的乳制品中分离到 195 株乳杆菌，发现有 91 株菌分别携带或同时携带红霉素耐药基因 *ermB* 和四环素耐药基因 *tetM*；Temmerman 等^[12]从欧洲 55 种益生菌产品中分离到 187 株益生菌，发现其对四环素、万古霉素、卡那霉素等多种抗生素都有耐药性，且多重耐药率为 68.4%。以上研究结果与本实验结果相似，但是针对食品和保健领域微生态制剂耐药性的研究，目前在水产养殖领域未见相关性报道。水产养殖环境中益生菌耐药性的研究仅见零星报道，但耐药性结果略低于本实验结果。贺刚等^[13]从草鱼肠道分离到一株枯草芽孢杆菌，发现其对磺胺类和土霉素药物具有较强的耐药性，但对氟苯尼考、诺氟沙星、四环素和

庆大霉素高度敏感；高盼盼等^[14]从天津 6 个养殖场的底泥和水样中采集样品，用抗性平板筛选磺胺甲恶唑耐药菌株，发现筛选的耐药菌株中芽孢杆菌属所占比例最大，为 63.27%，肠球菌属占 2.04%。水产养殖领域存在耐药益生菌，耐药益生菌如若成为微生态制剂菌种资源，势必会给水产养殖业带来巨大威胁。在微生态制剂广泛大量应用于水产、畜禽、医药、食品等领域的今天，加强益生菌耐药性监测对微生态制剂产业的发展以及人类的健康具有重要意义。

3.3 微生态制剂可移动遗传元件检测

获得性耐药又叫做耐药基因的水平转移，是细菌产生耐药的主要方式。细菌利用该种方式借助质粒、整合子、转座子和插入序列等遗传元件实现耐药基因在同种细菌乃至不同种细菌之间的传播。*traA* 和 *trbC* 接合性质粒遗传标记基因是细菌性毛的编码基因，具备该基因说明细菌具备接合的能力。国内外已有从肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)中检出 *traA* 和 *trbC* 的报道^[15-16]，本实验 *traA* 的检出率为 23%，全部来源于芽孢杆菌属和肠球菌属。转座子是一种可携带多种耐药基因且极易改变自身座位的 DNA 片段，插入序列为一种简单的转座子。陈文标等^[17]从临床中分离到 45 株肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)，发现其对多种抗生素都存在抗性，且 *intTn916/Tn1514* 转座酶的检出率为 91%；苏兆亮等^[18]检测了 19 株多药耐药鲍氏不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)，其中 IS_{Saba1}、IS₂₆、*tnp513* 都有不同程度的检出；Ruzin 等^[19]研究发现 IS_{Saba1} 插入鲍氏不动杆菌 *adeABC* 外排泵编码基因之前可致外排泵高表达而耐多种药。本实验转座子 *intTn916/Tn1514* 和插入序列 IS_{Saba1} 的阳性率分别为 100% 和 78%，且菌株 4 重以上耐药率为 85.3%，与之前研究结果相似。整合子极易捕获和切除耐药基因盒，在介导细菌多重耐药的同时使耐药基因易发生传播转移。Ndi 等^[20]研究发现从鳟鱼养殖环境中分离到 I 类整合子阳性菌株与鱼源 I 类整合子同源性较高；冯永永等^[21]从猪-鱼复合养殖场分离了 317 株气单胞菌(*Aeromonas*)，发现携带 I 类整合子的 50 株菌中存在 16 种耐药基因盒，携带耐药基因盒的菌株多重耐药性较高。本实验携带耐药基因盒的菌株中五重及五重以上耐药菌株占 65.8%，与冯永永等研究结果相似。微生态制剂中耐药菌株及可转移遗传元件的检出，提示我们益生菌耐药性问题不容忽视，

相关部门在检测致病菌耐药性及可转移遗传元件的同时要加强对微生态制剂益生菌的检测,促进微生态市场的健康发展。

参考文献:

- [1] FAO. The state of world fisheries and aquaculture: Opportunities and challenges[J]. State of World Fisheries & Aquaculture, 2014, 4(78): 40-41.
- [2] 郭云峰, 赵文武, 高宏泉, 等. 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2017: 1-143.
Guo Yunfeng, Zhao Wenwu, Gao Hongquan, et al. China Fishery Statistics Yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2017: 1-143.
- [3] 夏蒙, 李朋富. 微生态制剂作用机理及其在水产养殖中的应用[J]. 江西水产科技, 2013, 2: 42-44.
Xia Meng, Li Pengfu. The mechanism of microbial ecological agent and its application in aquaculture[J]. Jiangxi Fishery Sciences and Technology, 2013, 2: 42-44.
- [4] Calva J J, Sifuentes-osornio J, Ceron C. Antimicrobial Resistance in Fecal Flora: Longitudinal Community-Based Surveillance of Children from Urban Mexico[J]. Antimicrobial Agents & Chemotherapy, 1996, 40(7): 1699-702.
- [5] Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing Of yeasts; approved standard M27-A3, 3rd ed[S]. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2007.
- [6] 李梅花, 王芳, 孙婷, 等. 自然发酵乳中粪肠球菌和屎肠球菌的 4 种鉴定方法的比较[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(9): 98-103.
Li Meihua, Wang Fang, Sun Ting, et al. Comparison of four methods for differentiation of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*[J]. Food and Fermentation Industries, 2011, 37(9): 98-103.
- [7] 吕永辉, 李明爽. 我国水产养殖用微生态制剂行业现状与发展策略[J]. 中国水产, 2015, 8: 34-36.
Lü Yonghui, Li Mingshuang. Current situation and development strategy of microbial ecological agent industry for aquaculture in China[J]. China Fisheries, 2015, 8: 34-36.
- [8] 范韩生. 世界水产品市场竞争激烈 中国产品路在何方[J]. 中国检验检疫, 2003, 5: 45-47.
Fan Hansheng. The world's aquatic product market is fiercely competitive and where is the road of Chinese products[J]. China Inspection and Quarantine, 2003, 5: 45-47.
- [9] Salyers A A, Gupta A, Wang Y P. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes[J]. Trends In Microbiology, 2004, 12(9): 412-416.
- [10] 郭娇娇, 宫智勇. 恩诺沙星在水产养殖中的研究进展[J]. 江苏农业科学, 2011, 39(4): 290-292.
Guo Jiaojiao, Gong Zhiyong. Research progress of enrofloxacin in aquaculture[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2011, 39(4): 290-292.
- [11] Cataloluk O, Gogebaken B. Presence of drug resistance in intestinal lactobacilli of dairy and human origin in Turkey[J]. FEM Smicrobiology letters, 2004, 236(1): 7-12.
- [12] Temmerman R, Pot B, Huys G, et al. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products[J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 81(1): 1-10.
- [13] 贺刚, 何力, 谢从新, 等. 草鱼肠道枯草芽孢杆菌的耐药性分析[J]. 现代农业科技, 2008, 22: 219-222.
He Gang, He Li, Xie Congxin, et al. Analysis of drug resistance of *Bacillus subtilis* in the intestinal tract of grass carp[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2008, 22: 219-222.
- [14] 高盼盼, 罗义, 毛大庆. 天津水产磺胺类耐药细菌及其分布[J]. 生态毒理学报, 2011, 6(1): 74-79.
Gao Panpan, Luo Yi, Mao Daqing. Sulfonamide resistant bacteria in tianjin's aquaculture and their distribution[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2011, 6(1): 74-79.
- [15] 高慧, 蔡培泉, 郁震. 泛耐药肺炎克雷伯菌 β -内酰胺类、氨基糖苷类、喹诺酮类耐药基因研究分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(21): 4805-4808.
Gao Hui, Cai Peiquan, Yu Zhen. Drug resistance genes in pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* to β -lactams, aminoglycosides, and quinolones[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2016, 26(21): 4805-4808.
- [16] Fricke W F, Wright M S, Lindell A H, et al. Insights into the Environmental Resistance Gene Pool from the Genome Sequence of the Multidrug-Resistant Environmental Isolate *Escherichia coli* SMS-3-5[J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(20): 6779-6794.
- [17] 陈文标, 朱焱, 黄东红, 等. 临床分离的肺炎链球菌耐药性分析及多位点序列分型[J]. 中国抗生素杂志, 2016, 41(1): 60-63.
Chen Wenbiao, Zhu Yan, Huang Donghong, et al. Antibiotic resistance analysis and multi-locus sequence type of *Streptococcus pneumoniae* isolated from clinic[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2016, 41(1): 60-63.
- [18] 苏兆亮, 糜祖煌, 孙光明, 等. 多药耐药鲍氏不动杆菌耐药性与转座子及插入序列遗传标记研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2010, 20(20): 3085-3087.
Su Zhaoliang, Mi Zuhuang, Sun Guangming, et al. Drug resistant and transposon and insertion sequence of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. Chi-

- nese Journal of Nosocomiology, 2010, 20(20): 3085-3087.
- [19] Ruzin A, Keeney D, Bradford. AdeABC multidrug efflux pump is associated with decreased susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex[J]. J Antimicrobial Chemother, 2007, 59(5): 1001-1004.
- [20] Ndi O L, Barton M D. Incidence of class 1 integron and other antibiotic resistance determinants in *Aeromonas* spp[J]. Journal of Fish Diseases, 2011, 34(8): 589-599.
- [21] 冯永永, 姜兰, 邓玉婷, 等. 猪-鱼复合养殖模式中气单胞菌类整合子的流行情况及其耐药特征[J]. 水产学报, 2016, 40(1): 92-99.
- Feng Yongyong, Jiang Lan, Deng Yuting, et al. Prevalence and characterization of class I integron in *Aeromonas* from pig-fish integrated farm[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(1): 92-99.

Assessment of drug resistance and detection of resistance genes and mobile genetic elements of aquatic microecologic agents

CHEN Zhao-di^{1, 2, 3}, LI Jian^{1, 2, 3}, ZHAI Qian-qian^{2, 3}, CHANG Zhi-qiang^{2, 3}, WANG Jia-jia^{2, 3}, GE Qian-qian^{2, 3}

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education (Shanghai Ocean University), Shanghai 201306, China; 2. Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology, Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao 266071, China; 3. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao 266071, China)

Received: Apr. 8, 2018

Key words: microbial ecological agent; antibiotics; resistance genes; removable genetic elements

Abstract: In order to provide reference for the safe production and monitoring of microecologic agents, the agar dilution method was used to screen 9 kinds of aquatic microecologic agents purchased on the market. A broth dilution antifungal susceptibility testing was used to detect resistance of the isolates to the antibiotics gentamicin, enrofloxacin, norfloxacin, florfenicol, sulfadiazine, sulfamerazine, tetracycline, terramycin, vancomycin, and then detect the resistance genes and mobile genetic elements (genetic markers of conjugal plasmids, transposons, integrons and insertion sequences) by Polymerase Chain Reaction. The results showed that drug resistant strains were found in all the samples, and 100 isolates have different degrees of resistance to 8 antibiotics except to enrofloxacin. Among them, 46% of the strains carried fluoroquinolone, amphenicol, sulfonamide, tetracycline, aminoglycoside and glycopeptide resistant genes. 15 isolates carried integron-gene boxes, plasmids, transposons and insert sequences simultaneously, and 95% carry more than one removable genetic element. There are some hidden dangers of the probiotics, therefore quality monitoring and market supervision should be strengthened.

(本文编辑: 康亦兼)