

南美白对虾肠道内乳酸菌的分离鉴定及其对抗生素的耐药性

宋俊男¹, 张久峰², 罗剑飞¹, 赵丹丹², 林炜铁¹

(1. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

(2. 马鞍山市产品质量监督检验所, 安徽马鞍山 243000)

摘要:以南美白对虾为研究对象, 采用平板分离法从其肠道内筛得 26 株乳酸菌, 通过 16S rRNA 测序鉴定可归为 4 种: 乳酸乳球菌乳亚种 *L. lactis subsp. lactis*、台湾乳球菌 *L. taiwanensis*、格式乳球菌 *L. garvieae*、乳酸乳球菌 *L. lactis*。选取 7 株具有代表性的乳酸菌, 用 PCR 的方法检测对虾中检出率较高的 6 类 18 种抗性基因 (ARGs) 在乳酸菌中的分布, 辅以平板涂布的方法用抗生素选择性培养基研究乳酸菌对抗生素的耐药性。研究发现: 7 株乳酸菌具有相似的耐药谱, 对四环素、磺胺吡啶、乙酰螺旋霉素表现出耐药性 (抑菌率 < 50.00%), 对盐酸金霉素、土霉素、硫酸庆大霉素、氯霉素、红霉素敏感 (抑菌率 100%); 含有多重抗性基因, ARGs 的检出率: 磺胺类(92.86%)>四环素类(53.06%)>喹诺酮类(23.81%)>氨基糖苷类(4.76%)>氯霉素类=大环内酯类(0.00%), 其 ARGs 基因型与菌株的抗生素表型并不能完全吻合。

关键词: 乳酸菌; 分离筛选; 抗性基因; 抗生素耐药性

文章编号: 1673-9078(2020)05-192-199

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.5.026

Antibiotic Resistance of Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Intestinal Microflora of *Penaeus vannamei*

SONG Jun-nan¹, ZHANG Jiu-feng², LUO Jian-fei¹, ZHAO Dan-dan², LIN Wei-tie¹

(1. College of Biological Sciences and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

(2. Product Quality Supervision and Inspection Institute, Ma'anshan 243000, China)

Abstract: In this work, *P. vannamei* was used as the research object. The 26 strains of lactic acid bacteria were isolated from the intestine and classified into 4 species: *L. lactis subsp. Lactis*, *L. taiwanensis*, *L. garvieae* and *L. lactis*. Seven representative lactic acid bacteria were selected to study their resistance to antibiotics from the genotype and phenotype based on the method of PCR as well as the antibiotic selective plate coating method. The results showed that 7 strains of lactic acid bacteria had similar drug resistance spectrum, indicating resistance to tetracycline, sulfapyridine, acetylspiramycin (inhibition rate < 50.00%) while being sensitive to gold mold, oxytetracycline, chlortetracycline sulfate, chloramphenicol and erythromycin (inhibition rate 100%). More than 3 ARGs were detected in all strains with the detection rate of ARGs were as the follows: sulfonamides (92.86%) > tetracyclines (53.66%) > quinolones (23.81%) > aminoglycosides (4.76%) > chloramphenicol = macrolides (0.00%). The ARGs genotype did not exactly match the antibiotic phenotype of the strain.

Key words: lactic acid bacteria; isolation and screening; antibiotic resistant genes (ARGs); antibiotic resistance

引文格式:

宋俊男,张久峰,罗剑飞,等.南美白对虾肠道内乳酸菌的分离鉴定及其对抗生素的耐药性[J].现代食品科技,2020,36(5):192-199

SONG Jun-nan, ZHANG Jiu-feng, LUO Jian-fei, et al. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria strains isolated from intestinal microflora of *Penaeus vannamei* [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(5): 192-199

收稿日期: 2019-07-04

基金项目: 企业资助项目 (D9182520)

作者简介: 宋俊男 (1995-), 女, 研究生, 研究方向: 生物工程

通讯作者: 林炜铁 (1964-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 微生物生态学、发酵工程等

我国是水产养殖第一大国,对虾养殖是水产养殖的支柱产业,在对虾的养殖过程中抗生素被广泛用于预防和治疗对虾易患的细菌性疾病,同时小剂量的抗生素也常被作为一种特殊的“营养添加剂”添加到饲料中以促进对虾生长发育,缩短养殖周期^[1]。由于抗生素的滥用,对虾养殖环境和虾体内抗生素污染严重,诱导了大量对抗生素有抗性的细菌(Antibiotics resistance bacterium, ARB)及抗生素抗性基因(Antibiotics resistance genes, ARGs)的产生。ARGs作为一种新的环境污染物,可以在细菌间通过与可移动遗传元件(质粒、转座子、整合子等)结合进行基因的水平转移,使得环境中的细菌获得耐药性并有可能逐渐发展为ARB^[2-4]。据2017年世界卫生组织报道,抗生素耐药性已对人类健康,粮食安全和全球可持续发展构成了极大的威胁^[5]。

乳酸菌是一大类能利用碳水化合物产生大量乳酸的细菌的统称,是人及动物肠道中非常重要的生理菌群,大量研究表明乳酸菌能增强机体免疫力,抑制病原菌的生长繁殖,具有很好的抑菌活性^[6-8]。乳酸菌在水产养殖中常作为调节动物肠道、调节水质、预防疾病的微生态制剂^[7,9]。但近年来有研究发现一些抗性基因能在乳酸菌与病原菌之间进行传播,如存在于接合质粒pRE25上的氯霉素、红霉素抗性基因能从粪肠球菌转移到李斯特菌、乳酸菌等多种细菌中^[10]。根据欧洲食品安全局(EFSA)的建议:携带有可转移抗性基因的菌株不应该用于动物饲料、可食用性发酵制品和益生菌制品^[11]。目前我国针对乳酸菌抗性的研究比较少,且大多停留在表型分析上,缺乏对其基因水平上的深入分析,因此本研究主要用PCR的技术手段对从对虾肠道中筛选出的乳酸菌进行抗性基因检测,同时借助传统的平板涂布法,用抗生素选择性培养基来检测乳酸菌对抗生素的耐药性,以期为微生态制剂的研发提供优质的菌种资源与理论指导。

1 材料与方法

1.1 实验材料

主要试剂:MRS营养肉汤购于青岛高科技工业园海博生物技术有限公司;琼脂粉,广州环凯微生物科技有限公司;Taq PCR Mastermix 购于天一辉远有限公司;DL2000 Marker 购于 Zomanbio 公司;Gel-Red 购于广州硕恒生物科技有限公司;安宁包,三菱瓦斯化学株式会社;盐酸金霉素、土霉素、四环素、磺胺嘧啶、环丙沙星、硫酸庆大霉素、妥布霉素、氯霉素、红霉素、乙酰螺旋霉素,购于上海阿拉丁生化科技股

份有限公司。

主要仪器:TCA0002 PCR 扩增仪、JM-B5002 电子天平、LRH-250-Z 恒温培养箱、分光光度计、SW-CJ-1F 单人双面净化工作台、HWS24 型水浴锅、Eppendorf 5804R 冷冻离心机、PC-420D 加热磁力搅拌器、厌氧罐。

样本采集:采集了广州市新造镇市场、体育西路便民综合市场、黄沙海鲜批发市场(3个供应商)共5个采样点所售的健康成熟的南美白对虾,样品采集完毕后当天立即进行前处理。

培养基:细菌的分离采用MRS固体平板培养基,菌株富集有氧条件下用试管装MRS液体培养基,无氧条件下用试管装MRS液体培养基上层加液体石蜡进行密封。

盐酸金霉素选择培养基:将经过灭菌后的MRS固体培养基放置于超净工作台上冷却至50℃左右,加入盐酸金霉素至抗生素浓度为25 μg/mL,搅拌均匀后倒平板备用。

土霉素选择培养基:将经过灭菌后的MRS固体培养基放置于超净工作台上冷却至50℃左右,加入土霉素至抗生素浓度为25 μg/mL,搅拌均匀后倒平板备用。

四环素选择培养基:将经过灭菌后的MRS固体培养基放置于超净工作台上冷却至50℃左右,加入四环素至抗生素浓度为25 μg/mL,搅拌均匀后倒平板备用。

磺胺选择培养基:将经过灭菌后的MRS固体培养基放置于超净工作台上冷却至50℃左右,加入磺胺嘧啶至抗生素浓度为50 μg/mL,搅拌均匀后倒平板备用。

环丙沙星选择培养基:将经过灭菌后的MRS固体培养基放置于超净工作台上冷却至50℃左右,加入环丙沙星至抗生素浓度为5 μg/mL,搅拌均匀后倒平板备用。

硫酸庆大霉素选择培养基:将经过灭菌后的MRS固体培养基放置于超净工作台上冷却至50℃左右,加入硫酸庆大霉素至抗生素浓度为50 μg/mL,搅拌均匀后倒平板备用。

妥布霉素选择培养基:将经过灭菌后的MRS固体培养基放置于超净工作台上冷却至50℃左右,加入妥布霉素至抗生素浓度为25 μg/mL,搅拌均匀后倒平板备用。

氯霉素选择培养基:将经过灭菌后的MRS固体培养基放置于超净工作台上冷却至50℃左右,加入氯霉素至抗生素浓度为25 μg/mL,搅拌均匀后倒平板

备用。

红霉素选择培养基: 将经过灭菌后的 MRS 固体培养基放置于超净工作台上冷却至 50 °C 左右, 加入红霉素至抗生素浓度为 200 μg/mL, 搅拌均匀后倒平板备。

乙酰螺旋霉素选择培养基: 将经过灭菌后的 MRS 固体培养基放置于超净工作台上冷却至 50 °C 左右, 加入乙酰螺旋霉素至抗生素浓度为 25 μg/mL, 搅拌均匀后倒平板备。

1.2 实验方法

1.2.1 对虾肠道中乳酸菌的分离

分别取以上 5 个采样点对虾 50 尾, 清水清洗虾体表面, 用 75% 的酒精喷洒对虾体表进行消毒。用无菌解剖针挑取对虾完整肠道, 并将其肠道纵向剖开, 后将剖开的肠道和粪便混合物置于预冷的无菌 PBS 缓冲液中, 放于磁力搅拌器上磁力搅拌均匀。将匀浆液梯度稀释后取 0.1 mL 涂布于 MRS 固体培养基, 37 °C 静置培养 48 h。挑取菌落形态不同的单菌落, 多次划线培养获得纯菌, 根据采样点和培养方式对菌株进行编号, 后接种于斜面培养基用于短时保藏, 同时转接到液体培养基中进行富集, 之后用 50% 的甘油保存于 -80 °C 冰箱。

(1) 有氧培养条件: 将接种好的培养皿水平倒置于 37 °C 恒温培养箱中静置培养 48 h。

(2) 厌氧培养条件: 将接种好的培养皿重叠放置于厌氧罐中, 每罐 10 皿, 加入一包安妥包, 密封, 将厌氧罐置于 37 °C 恒温培养箱中静置培养 48 h。

1.2.2 菌株基因组 DNA 的提取

采用 CTAB 法提取纯培养菌株的 DNA, 具体操作如下:

(1) 取 2 mL 菌液于离心管中, 离心条件: 14000 r/min, 5 min 弃上清液。

(2) 称 0.4 g 石英砂, 0.5 mL 植物 RNA 提取辅助液于上述离心管中, 放于涡旋振荡仪上, 予以充分研磨振荡。

(3) 向上述离心管中加入 80 μL 5 M 的 NaCl, 100 μL CTAB 抽提液, 65 °C 水浴 10 min。

(4) 加入等体积氯仿异戊醇溶液, 轻轻地上下颠倒数次混匀, 于 14000 r/min 离心 2 min, 小心吸取上清液于新的 2 mL 离心管中。

(5) 加入等体积的异丙醇, 1 μL 糖原, 混合均

匀后于 -20 °C 冰箱静置 10 min, 之后 14000 r/min 离心 2 min, 弃上清液, 加入 1 mL 70% 的乙醇, 再次离心, 14000 r/min 离心 2 min, 弃上清液, 样品于室温下静置 2 min, 待酒精挥发干净后用 ddH₂O 溶解 DNA。

(6) 用 1% 的琼脂糖凝胶对提取的 DNA 进行检测。电泳条件: 110 V 30 min, 后用 Gelred 染色 8 min, 用紫外凝胶成像仪拍照分析。

1.2.3 16S rRNA 基因鉴定

利用 PCR 方法, 以提取菌株的 DNA 为模板扩增细菌 16S rDNA, PCR 反应体系为 25 μL: 2×Taq PCR Mastermix 12.5 μL, 通用引物 27F (5'-AGAGTTTG ATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACCTTGTTACG ACTT-3') 各 1 μL, ddH₂O 10.5 μL, 模板 1 μL。PCR 反应程序: 95 °C 预变性 10 min、95 °C 变性 30 s、55 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 90 s, 30 个循环, 72 °C 持续 10 min。取 2 μL PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 用凝胶成像仪检测电泳条带, 扩增序列送广州天一辉远有限公司测序, 获得的序列经 Blast 比对、鉴定。将测定的各细菌的 16S rRNA 序列测定的结果在 GenBank 数据库中进行搜索, 分别选定其中同源性较高的相关菌株, 用 MAGE 7.0 软件邻比法分析, 以得到各菌株在分类学上的地位。

1.2.4 抗性基因型确定

以菌株基因组 DNA 为模板, 含有该抗性基因的环境样为阳性对照, 选取了水产品中检出率较高的 6 类 18 种 ARGs: 四环素类 ARGs(*tecA*、*tecB*、*tecC*、*tecE*、*tecG*、*tecG'*、*tecM*), 磺胺类 ARGs(*sul I*、*su II I*), 喹诺酮类 ARGs(*qnrA*、*qnrS*、*gyrA*), 氯霉素类 ARGs(*floR*、*cat II*), 氨基糖苷类 ARGs(*strA*、*strB*、*aadA*), 大环内酯类 ARG(*ermB*)。PCR 反应体系(25 uL)为: 基因组 DNA 1 uL, 上下游引物各 1 uL, 2×Taq MasterMix 12.5 μL, ddH₂O 9.5 μL。PCR 反应程序: 95 °C 预变性 10 min、95 °C 变性 30 s、T_m 退火 30 s、72 °C 延伸 30 s, 35 个循环, 72 °C 延伸 5 min。用 1% 的琼脂糖电泳检测扩增产物, 将可能含有目的条带的 PCR 产物送广州天一辉远测序公司进行测序, 得到测序序列进一步与 NCBI 数据库相比对, 确定是否含有 ARGs。各目的片段上下游引物序列见表 1, 本研究所用引物均由广州天一辉远测序公司合成。不同引物所需扩增反应的退火温度不同, 根据其 T_m 值确定扩增反应的退火温度。

表1 各目的片段的引物及其产物长度

Table 1 Primers sequences and products length

引物	序列(5'→3')	长度/bp	Tm	参考文献
<i>sul I</i> -F	CGCACCGGAAACATCGCTGCAC	163	63	[12]
<i>sul I</i> -R	TGAAGTTCCGCCGCAAGGCTCG			
<i>sul II</i> -F	TCCGGTGGAGGCCGGTATCTGG	191	63	[12]
<i>su II</i> -R	CGGGAATGCCATCTGCCTTGAG			
<i>tetA</i> -F	GCTACATCCTGCTTGCCTTC	210	55	[13]
<i>tetA</i> -R	CATAGATCGCCGTAAGAGG			
<i>tetB</i> -F	TTGGTTAGGGCAAGTTTTG	659	55	[13]
<i>tetB</i> -R	GTAATGGGCAATAACACCG			
<i>tetC</i> -F	CTTGAGAGCCTTCAACCCAG	418	55	[11]
<i>tetC</i> -R	ATGGTCGTCATCTACCTGCC			
<i>tetE</i> -F	AAACCACATCCTCCATACGC	278	55	[11]
<i>tetE</i> -R	AAATAGGCCACAACCGTCAG			
<i>tetG</i> -F	GCTCGGTGGTATCTCTGCTC	468	55	[11]
<i>tetG</i> -R	AGCAACAGAATCGGGAACAC			
<i>tetG'</i> -F	CAGCTTTCGGATTCTTACGG	844	55	[11]
<i>tetG'</i> -R	GATTGGTGAGGCTCGTTAGC			
<i>tetM</i> -F	GTGGACAAAGGTACAACGAG	406	55	[11]
<i>tetM</i> -R	CGGTAAAGTTCGTCACACAC			
<i>qnrA</i> -F	TCAGCAAGAGGATTTCTCA	515	55	[14]
<i>qnrA</i> -R	GGCAGCACTATGCCCA			
<i>qnrS</i> -F	CCCTCGAGCATGGAAACCTACAATCATAATATC	657	55	[14]
<i>qnrS</i> -R	CGGGATCCTTAGTCAGGATAAACAATACC			
<i>gyrA</i> -F	TGCCAGATGTCCGAGAT	268	60	[15]
<i>gyrA</i> -R	GTATAACGCATTGCCGC			
<i>ermB</i> -F	GATACCGTTTACGAAATTGG	364	50	[16]
<i>ermB</i> -R	GAATCGAGACTTGAGTGTGC			
<i>strA</i> -F	CTTGGTGATAACGGCAATTC	548	55	[12]
<i>strA</i> -R	CCAATCGCAGATAGAAGGC			
<i>strB</i> -F	ATCGTCAAGGGATTGAAACC	509	56	[12]
<i>strB</i> -R	GGATCGTAGAACATATTGGC			
<i>floR</i> -F	CGCCGTCATTCCTCACCTTC	215	62	[12]
<i>floR</i> -R	GATCACGGGCCACGCTGTGTC			

1.2.5 抗性表型鉴定

采用平板涂布的方法用抗生素选择性培养基研究乳酸菌对水产养殖种常见的6类10种抗生素的耐药性。挑选具有代表性的乳酸菌接种到液体培养基中,培养24 h后调节其初始接种 OD₆₀₀ 为0.5,用无菌水梯度稀释至 10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵,分别取 100 μL 菌悬液涂布于基础培养基;四环素类选择培养基(盐酸金霉素选择培养基、土霉素选择培养基、四环素选择培养基),磺胺类选择培养基(磺胺吡啶选择培养基),喹诺酮类选择培养基(环丙沙星选择培养基),

氨基糖苷类选择培养基(硫酸庆大霉素选择培养基、妥布霉素选择培养基),氯霉素类选择培养基(氯霉素选择培养基),大环内酯类选择培养基(红霉素选择培养基、乙酰螺旋霉素选择培养基)。每个样品3个平行实验,培养48 h后,选取基础培养基菌落数在30~300个的培养皿,统计同一稀释度的3个平行培养皿的菌落数,计算抗生素对乳酸菌的抑菌率。

$$\text{抑菌率} = 1 - \frac{\text{抗生素培养皿中菌落数}}{\text{空白培养皿中菌落数}} \times 100\%$$

1.2.6 数据处理

使用 NCBI 数据库中 Blast 的在线比对功能,对筛得的乳酸菌进行种属鉴定,借助 MAGE 7.0 软件,对测序菌株序列进行邻比法分析,得到各菌株分类学上的地位。从每类 ARGs 中挑选一个具有代表性的抗性基因,用 PPT 软件对其电泳检测图进行整合,用 Excel 分析乳酸菌对抗生素的耐药性。

2 结果与讨论

2.1 对虾肠道中乳酸菌的筛选和鉴定

通过 16S rRNA 基因鉴定,结果表明:筛得的 26 株细菌均属于乳酸菌,同 NCBI 数据库中 Blast 的在线比对匹配的菌种均具有较高的相似性(均大于 98.00%)。利用 MEGA 7.0 软件邻接法(NJ)构建系统发育树,如图 1 所示。

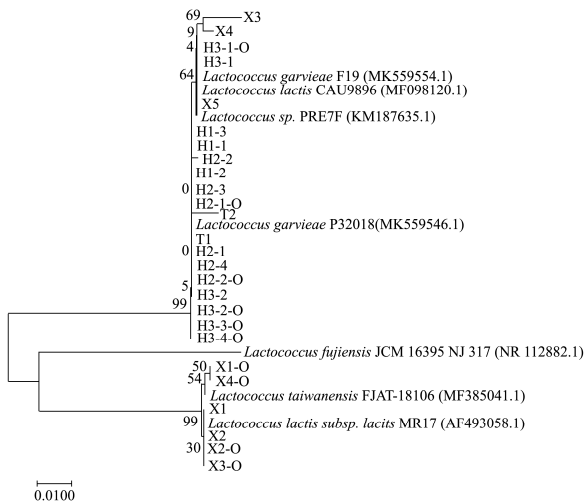


图 1 对虾肠道中乳酸菌的 16S rRNA 基因序列系统进化树

Fig.1 Dendrogram of lactic acid bacterias isolated from Intestinal microflora of *Penaeus vannamei* on 16s RNA gene sequences

注: X、T、H1、H2、H3 分别指广州市 5 个采样点(新造镇市场,体育西路便民综合市场,黄沙 1 号海鲜批发市场、2 号海鲜批发市场、3 号海鲜批发市场)。以 X1 和 X1-O 为例, X1: 从新造镇市场购买的对虾,在有氧条件下筛得的第一株乳酸菌; X1-O: 从新造镇市场购买的对虾,在无氧条件下筛得的第一株乳酸菌。

从图 1 中可以看出 X1、X2、X2-O、X3-O、X1-O、X4-O 同乳酸乳球菌乳亚种 *L. lactis subsp. lactis* MR17 和台湾乳球菌 *L. taiwanen* FJAT-18106 (MF385041.1) 聚为一类, X3、X4、X5、H3-1、H3-1-O 同乳酸乳球菌 *L. lactis* CAU9896 (MF098120.1)、格氏乳球菌 *L. garvieae* F19MK559554.1、乳球菌属 *L. sp.* PRE7F (KM187635.1)同聚为一类,可认为上述菌株各分属于

同种聚类中的某一类乳酸菌。同理,其余菌株聚为一类,与格式乳球菌 *L. garvieae* 相似度最大,极有可能属于同一种菌。以上筛得的乳酸菌很可能是对虾肠道内的优势菌种,且有研究报道 *L. garvieae*、*L. lactis* 可以分泌生物活性物质,抑制病原菌的繁殖,具备一定的抑菌活性,对维持对虾肠道内微生态的平衡起重要作用^[6,17,18]。

2.2 乳酸菌耐药性分析

筛得乳酸菌经系统发育树聚类分析后,根据其采样点,培养方式,分类学地位挑选出 7 株具有代表性的乳酸菌,从基因型和表型两个层面研究其对抗生素的耐药性。ARGs 检测结果见表 2,每类抗性基因中选取一个具有代表性的基因电泳图为例,PCR 检测结果见图 2。表型分析以抗生素对乳酸菌的抑制率为参考指标,结果见表 2。

表 2 乳酸菌的 ARGs 检出结果

ARGs	菌株						
	HI-2	H2-2	H3-4-O	T1	X3	X3-O	X5
<i>tecA</i>	-	-	+	-	+	-	+
<i>tecB</i>	-	-	+	-	-	-	-
<i>tecC</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>tecE</i>	+	+	+	+	-	+	-
<i>tecG'</i>	-	-	+	-	-	-	-
<i>tecG</i>	+	-	+	+	+	+	+
<i>tecM</i>	-	+	+	+	-	-	-
<i>qnrA</i>	-	+	-	-	-	-	-
<i>qnrS</i>	-	+	-	-	-	-	-
<i>gyrA</i>	-	-	-	+	+	-	+
<i>sull</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>sul II</i>	+	+	+	+	-	+	+
<i>strA</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>strB</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>aadA</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>floR</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>cat2</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>ermB</i>	-	-	-	-	-	-	-
总计检出数	5	7	9	7	6	5	6

四环素类、磺胺类、喹诺酮类、氨基糖苷类、氯霉素类,大环内酯类 ARGs 通常存储在水产品如对虾肠道内以及水产品养殖环境中^[19]。四环素类、磺胺类、喹诺酮类、大环内酯类抗生素因其价格低廉,且有广谱性和低毒性等特点,被广泛应用于水产养殖中,以

用于预防和治疗细菌感染(如气单胞菌),由此诱导了多种此类 ARGs 的产生。氨基糖苷类抗生素具有广谱杀菌作用,在水产养殖业以及畜牧业中也得到普遍的应用,但由于其本身的副作用,在动物组织中的残留就可能给人类带来很大的危害,一些发达国家和食品法典委员会对氨基糖苷类抗生素的限量都作了很严格的规定^[20]。而氯霉素类抗生素因为具有遗传毒性和致癌风险,可能会诱导再生障碍性贫血,目前临床治疗很少使用该类药物,欧洲,美国在内的许多国家已命令禁止在饲养动物过程中添加此类抗生素^[21]。

挑选 7 株具有代表性的乳酸菌,分析其对抗生素的耐受性。用于评价细菌对不同抗生素的耐受性的指标主要包括:是否含有 ARGs、抗生素抑菌率、最小抑制浓度(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)、半抑制浓度 IC₅₀、抗生素抗性指数。在抗生素规定使用浓度下,如果抑菌率低于 80.00%,则可认为该菌株对此抗生素具有抗性^[22,23]。如表 3 所示,所有菌株有较为相似的耐药谱,对四环素、磺胺吡啶、乙酰螺旋霉素表现出耐药性(抑菌率<50.00%),对盐酸金霉素、土霉素、硫酸庆大霉素、氯霉素、红霉素敏感(抑菌率 100.00%)。

提取 7 株乳酸菌的基因组 DNA 进行 ARGs 的 PCR 扩增反应,结果由表 2 可知,所有菌株都检测到了四环素类和磺胺类 ARGs,其 ARGs 基因型与菌株的抗生素抗性表现一致。H3-4-O 在表型上表现出对环丙沙星和妥布霉素具有耐药性,但在基因型上未检测到喹

诺酮类 ARGs(*qnrA*、*qnrS*、*gyrA*)和氨基糖苷类 ARGs(*strA*、*strB*、*aadA*)

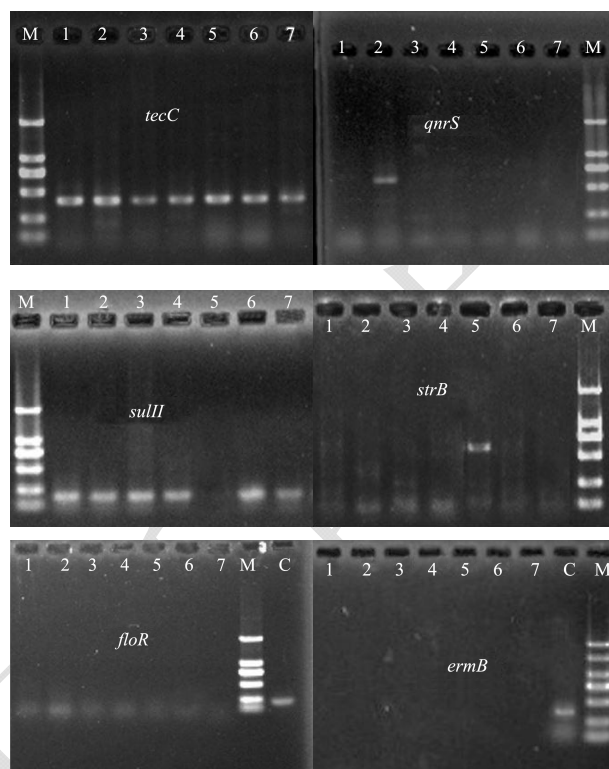


图 2 乳酸菌的 ARGs 检测电泳图

Fig.2 Electrophoresis pattern of ARGs in lactic acid bacteria

注: M: Marker DL 2000 (100、250、500、750、1000、2000 bp); 1、2、3、4、5、6、7 分别对应编号为: HI-2、H2-2、H3-4-O、T1、X3、X3-O、X5,共 7 株乳酸菌, C 为阳性对照。

表 3 抗生素对乳酸菌的抑制率 (%)

Table 3 Inhibition rate of antibiotics against lactic acid bacterias (%)

抗生素	菌株						
	HI-2	H2-2	H3-4-O	T1	X3	X3-O	X5
盐酸金霉素	100±0.00	100±0.00	100±0.00	100±0.00	100±0.00	100±0.00	100±0.00
土霉素	100±0.00	100±0.00	100±0.00	100±0.00	100±0.00	100±0.00	100±0.00
四环素	34.92±6.77	13.22±3.59	18.73±3.07	39.39±5.72	30.56±2.55	14.81±5.24	35.30±3.69
磺胺吡啶	2.39±4.29	19.54±7.77	4.97±0.84	18.18±7.87	34.44±2.55	7.41±5.24	30.68±3.88
环丙沙星	100±0.00	100±0.00	73.45±6.87	100±0.00	100±0.00	100±0.00	100±0.00
硫酸庆大霉素	100±0.00	100±0.00	100±0.00	100±0.00	100±0.00	100±0.00	100±0.00
妥布霉素	100±0.00	100±0.00	43.65±7.81	100±0.00	100±0.00	100±0.00	100±0.00
氯霉素	100±0.00	100±0.00	100±0.00	100±0.00	100±0.00	100±0.00	100±0.00
红霉素	100±0.00	100±0.00	100±0.00	100±0.00	100±0.00	100±0.00	100±0.00
乙酰螺旋霉素	48.61±3.00	13.79±6.22	30.72±2.18	12.88±7.98	14.44±5.85	39.51±9.32	33.11±3.97

这表明该株同时抗喹诺酮类和氨基糖苷类抗生素的乳酸菌的抗性不只是由 *qnrA*、*qnrS*、*gyrA*、*strA*、*strB*、*aadA* 这些基因表达,还存在其他喹诺酮类和氨基糖苷类 ARGs,而我们并未对其研究。例如研究报道检出率较高的氯霉素类 ARGs 还有 *catI*、*catIII*和

catIV, 如 Dang 等在分离水产养殖环境里的耐药菌时发现, 65%的耐氯霉素的菌株包含 *catII*或 *catIV*^[24]。同理也可解释, 7 株乳酸菌均不含大环内酯类 ARG(*ermB*)但对乙酰螺旋霉素表现出普遍的抗性。H2-2 在基因型上检测到含有 *qnrA*、*qnrS*, T1、X3、

X5 在基因型上检测到 *gyrA*, 但均不表现环丙沙星抗性, 可能的原因是菌株携带 ARGs, 但基因没有得到表达或表达量过低, 也可能是因培养条件限制, 无法满足该菌株的正常生长。Mao 等人的研究也报道了抗生素抗性表现型与基因型不一致的现象。从美洲鳗鲡体内及其养殖池塘中筛选出耐药菌, 对抗生素抗性表现型和基因型分析发现: 氨基糖苷类、喹诺酮类、大环内酯类耐药菌中既存在只有抗性基因的菌株, 也存在只有抗性表现型的菌株^[25]。

其次, 乳酸菌对同类不同种的抗生素抗性存在差异, 如 7 株乳酸菌均含有多个四环素类 ARGs, 对四环素(抑菌率<50.00%)表现出较强的抗性, 但对盐酸金霉素和土霉素敏感, 此两种抗生素对乳酸菌的抑制率为 100.00%。同张雅为等人的研究发现大致相同, 其发现从鸡场筛选出的抗性菌对四环素耐药率(63.60%)较高, 对金霉素敏感耐药率仅 18.20%^[26]; 同秦宇轩等人的研究不同, 其发现从酸奶中晒出的抗性菌均对四环素敏感^[27], 这可能和不同地区间药物使用习惯和治疗方式有关。

3 结论

本研究从对虾肠道中共分离得到 26 株乳酸菌, 根据采样点、培养方式以及聚类分析情况, 选取 7 株具有代表性的乳酸菌: HI-2、H2-2、H3-4-O、T1、X3、X3-O、X5, 通过检测其 ARGs 的分布和抗生素对其生长的抑制率来研究乳酸菌对抗生素的耐药性。虽然 7 株乳酸菌的采样点和培养方式不尽相同, 但 7 株乳酸菌具有相似的耐药谱, 对四环素、磺胺吡啶、乙酰螺旋霉素表现出耐药性(抑菌率<50.00%), 对盐酸金霉素、土霉素、硫酸庆大霉素、氯霉素、红霉素敏感(抑菌率 100.00%); 含有多重抗性基因, ARGs 的检出率: 磺胺类(92.86%)>四环素类(53.06%)、喹诺酮类(23.81%)>氨基糖苷类(4.76%)>氯霉素类=大环内酯类(0.00%), 且 ARGs 基因型与菌株的抗生素表型并不能完全吻合。其次, 乳酸菌对同类不同种的抗生素抗性存在差异。这表明对虾肠道内的乳酸菌普遍具有多重耐药性含有多重 ARGs, 甚至可能已在细菌与宿主之间实现了普遍性的 ARGs 的转移, 这给我国水产养殖业抗生素的规范化使用敲响了警钟, 同时也提醒我们在发掘新菌种的应用方面应从基因层面考虑, 尽可能从源头规避可能出现的风险, 如超级细菌的诞生。

参考文献

[1] A Sapkota, A R Sapkota, M Kucharski, et al. Aquaculture practices and potential human health risks: Current

knowledge and future priorities [J]. *Environment International*, 2008, 34(8): 1215-1226

[2] A Tatavarthy, K Peak, W Veguilla, et al. Comparison of antibiotic susceptibility profiles and molecular typing patterns of clinical and environmental *Salmonella enterica* serotype Newport [J]. *Journal of Food Protection*, 2006, 69(4): 749-756

[3] D I Prabhu, R S Pandian, P T Vasan. Pathogenicity, antibiotic susceptibility and genetic similarity of environmental and clinical isolates of *Vibrio cholerae*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 2007, 45(9): 817

[4] E A Warnemuende, R S Kanwar. Effects of swine manure application on bacterial quality of leachate from intact soil columns [C]// 2000 ASAE Annual International Meeting, Milwaukee, Wisconsin, USA, 9-12 July 2000, 2002, 45(6): 2053

[5] Ziyang Wei, Yueni Wu, Kai Feng, et al. ARGs, a pipeline for primer evaluation on antibiotic resistance genes [J]. *Environment International*, 2019, 128: 137-145

[6] 向明,李媛媛,郭乾鹏,等.尿肠球菌对哺乳仔猪结肠微生物群落优势门属的影响[J].南方农业学报,2019,50(3):477-484

XIANG Ming, LI Yuan-yuan, GUO Qian-peng, et al. Effects of *Enterococcus faecium* on dominant phyla and genera of colonic microbial communities in suckling piglets [J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2019, 50(3): 477-484

[7] 高鹏飞,张善亭,赵树平,等.乳酸菌在水产养殖业中的应用[J].家畜生态学报,2014,35(7):82-86

GAO Peng-fei, ZHANG Shan-ting, ZHAO Shu-ping, et al. Application of lactic acid bacteria in aquaculture [J]. *Acta Ecologica Animalis Domastici*, 2014, 35(7): 82-86

[8] 刘倩,陈营.乳酸菌对病原菌定植的拮抗作用及其在水产养殖中的应用[J].中国水产,2006,372(11):63-64

LIU Qian, CHEN Ying. Antagonistic effect of lactic acid bacteria on colonization of pathogenic bacteria and its application in aquaculture [J]. *China Fisheries*, 2006, 372(11): 63-64

[9] 宫魁.几种微生态制剂应用于刺参作用机理的初步研究[D].北京:中国科学院研究生院(海洋研究所),2012

GONG Kui. Preliminary study on the application mechanism of several microecological preparations to sea cucumber [D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences (Marine Research Institute), 2012

[10] 张丹青,李婉,丁秀云,等.五株嗜热链球菌抗药性研究[J].食品工业科技,2016,37(10):154-157

- ZHANG Dan-qing, LI Wan, DING Xiu-yun, et al. Study on antibiotic resistance of *Streptococcus thermophilus* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(10): 154-157
- [11] Miguel Gueimonde, Borja Sánchez, Los ReyesGavilán Clara G Deet, et al. Antibiotic resistance in probiotic bacteria [J]. Front Microbiol, 2013, 4(July): 202
- [12] Lou Yang, Haiquan Liu, Zhaohuan Zhang, et al. Mismatch between antimicrobial resistance phenotype and genotype of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seafood [J]. Food Control, 2015, 59: 207-211
- [13] L K Ng, I Martin, M Alfa, et al. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes [J]. Molecular and Cellular Probes, 2001, 15(4): 209-215
- [14] 刘丹.质粒介导的喹诺酮抗性基因在环境污水中的分布及相关耐药肠道细菌的筛选[D].济南:山东大学,2014
LIU Dan. Distribution of plasmid-mediated quinolone resistance gene in wastewater and isolation of resistance bacteria [D]. Ji'nan: Shandong University, 2014
- [15] 蒋杰,胡大春,邵剑春,等.耐左氧氟沙星大肠埃希菌 *gyrA/gyrB/parC/parE* 基因突变研究[J].国际检验医学杂志,2009, 30(12):1155-1157
JIANG Jie, HU Da-chun, SHAO Jian-chun, et al. The study on the mutations in *gyrA / gyrB / parC / parE* genes for levofloxacin-resistant *Escherichia coli* [J]. Int J Lab Med, 2009, 30(12): 1155-1157
- [16] Y Ma, C A Wilson, J T Novak, et al. Effect of various sludge digestion conditions on sulfonamide, macrolide, and tetracycline resistance genes and class I integrons [J]. Environmental Science & Technology, 2011, 45(18): 7855-7861
- [17] 冯秀娟,左芳雷,陈丽丽,等.乳酸菌耐酸耐胆盐分析与胆盐水解酶研究[J].中国食品学报,2013,13(11):139-147
FENG Xiu-juan, ZUO Fang-lei, CHEN Li-li, et al. Analysis of acid and bile salt tolerance and study on bile salt hydrolase in lactic acid bacteria [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2013, 13(11): 139-147
- [18] Lionel Kenneth Dygico, Paula M O'Connor, Maria Hayaset, et al. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* as a natural anti-listerial agent in the mushroom industry [J]. Food Microbiology, 2019, 82: 30-35
- [19] Sivagami K, Vignesh V J, Divyapriya R S G, et al. Antibiotic usage, residues and resistance genes from food animals to human and environment: An Indian scenario [J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2018: S2213343718301003
- [20] 刘晓冬.水产品中氨基糖苷类抗生素高效液相检测方法的建立[D].青岛:中国海洋大学,2010
LIU Xiao-dong. Studies on establishment of HPLC determination methods of aminoglycosides residue in seafood [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2010
- [21] Jaap C, Hanekamp, Aalt Bast. Antibiotics exposure and health risks: Chloramphenicol [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2015, 39(1): 213-220
- [22] 席劲瑛,黄晶晶,胡洪营,等.污水处理厂二级出水中四环素抗性菌的生长特性与耐药性[J].环境科学学报,2014,34(7): 1724-1729
XI Jin-ying, HUANG Jing-jing, HU Hong-ying, et al. Characterization of tetracycline-resistant bacteria in the secondary effluent of a municipal wastewater treatment plant [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2014, 34(7): 1724-1729
- [23] 李忠玲,李本光,岳淑宁,等.常用抗生素对益生菌存活率影响的研究[J].中国酿造,2012.31(1):61-64
LI Zhong-ling, LI Ben-guang, YUE Shu-ning, et al. Effect of antibiotic on survival rates of probiotics [J]. China Brewing, 2012, 31(1): 61-64
- [24] Hongyue Dang, Linsheng Song, Mingna Chen, et al. Concurrence of *Cat* and *Tet* genes in multiple antibiotic-resistant bacteria isolated from a sea cucumber and sea urchin mariculture farm in China [J]. Microbial Ecology, 2006, 52(4): 634-643
- [25] Gao P, Mao D, Luo Y, et al. Occurrence of sulfonamide and tetracycline-resistant bacteria and resistance genes in aquaculture environment [J]. Water Research, 2012, 46(7): 2355-2364
- [26] 张雅为,高锋,刘耀川,等.阜新某鸡场大肠埃希菌四环素类药物敏感性试验及耐药基因检测[J].动物医学进展,2017, 10:122-125
ZHANG ya-wei, GAO Feng, LIU Yao-Chuan, et al. Tetracycline sensitivity test and drug resistance gene detection of *Escherichia coli* in one chicken farm of Fuxin [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2017, 10: 122-125
- [27] 秦宇轩,李晶,王秋涯,等.市售酸奶中乳酸菌的鉴定与耐药性[J].微生物学报,2013,53(8):889-897.
QIN Yu-xuan, LI Jing, WANG Qiu-ya, et al. Identification of lactic acid bacteria in commercial yogurt and their antibiotic resistance [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2013, 53(8): 889-897