

海产源多重耐药共生菌的耐药表型及 耐药基因分析

吴书香^{1,2}, 李丽倩², 姚琳², 王联珠², 曲梦², 李凤铃²,
谭志军^{2,3}, 江艳华^{2*}, 王鹏^{1*}

(1. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 青岛 266003; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部水产品
质量安全检测与评价重点实验室, 青岛 266071; 3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室, 青岛 266033)

摘 要: 目的 对市售牡蛎和大黄鱼中分离的多重耐药共生菌进行耐药性分析、全基因组测序及耐药基因分析。**方法** 采用药敏纸片法进行耐药性分析, 采用二代测序技术进行基因组框架图测序, 通过与 CARD 数据库比对进行耐药基因分析。**结果** 菌株呈现高度的多重耐药性, 对 10 种或 10 种以上药物耐药, 多重耐药系数大于或等于 0.48, 所有菌株对头孢唑啉、萘啶酸、四环素、复方新诺明及氯霉素耐药。分离菌株为水产品中常见共生菌, 基因组差异显著。菌株含有 β -内酰胺类、氨基糖苷类、喹诺酮类、四环素类、磺胺类、氯霉素类、消毒剂类等药物的耐药基因, 与耐药表型基本一致, 部分菌含有对同一类药物具有不同耐药机制的多个基因。**结论** 牡蛎和大黄鱼中存在多重耐药共生菌, 耐药基因丰富, 如果耐药基因传播到致病菌会造成临床治疗失效, 具有潜在的危害。

关键词: 耐药性; 耐药基因; 共生菌; 全基因组测序; 牡蛎; 大黄鱼

Analysis of antimicrobial resistance phenotype and genotype of multiple-antimicrobial resistant commensal bacteria from marine products

WU Shu-Xiang^{1,2}, LI Li-Qian², YAO Lin², WANG Lian-Zhu², QU Meng², LI Feng-Ling²,
TAN Zhi-Jun^{2,3}, JIANG Yan-Hua^{2*}, WANG Peng^{1*}

(1. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Key Laboratory of Testing and Evaluation for Aquatic Product Safety and Quality, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 3. Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266033, China)

ABSTRACT: Objective To analyze the antimicrobial resistance, whole genome sequence and antimicrobial resistance genes of multiple-antimicrobial resistant commensal bacteria isolated from commercially available oysters

基金项目: 中国水产科学研究院基本科研业务费项目(2020TD71)、中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费项目(20603022020004)

Fund: Supported by the Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD71), and the Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, YSFRI, CAFS (20603022020004)

***通信作者:** 江艳华, 高级工程师, 主要研究方向为水产品中生物危害物检测与控制。E-mail: jiangyh@ysfri.ac.cn

王 鹏, 教授, 主要研究方向为海洋微生物。E-mail: pengwang@ouc.edu.cn

***Corresponding author:** JIANG Yan-Hua, Senior Engineer, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, No.106, Nanjing Road, Qingdao 266071, China. E-mail: jiangyh@ysfri.ac.cn

WANG Peng, Professor, Ocean University of China, No.5, Yushan Road, Qingdao 266003, China. E-mail: pengwang@

ouc.edu.cn

and large yellow croaker. **Methods** Antimicrobial resistance was performed by disk diffusion method, draft genome was sequenced by next-generation sequencing technology, and antimicrobial resistance genes were obtained by aligning the genome sequences to the CARD database. **Results** The strains showed a high degree of multiple resistance to 10 or more antimicrobials, with a multiple antimicrobial resistance index equal to or greater than 0.48. All strains were resistant to cefazoline, nalidixic acid, tetracycline, sulphamethoxazole/trimethoprim, and chloramphenicol. The isolates were commensal bacteria commonly found in aquatic products, and their genomic sequences were significantly different. The strains contained the resistance genes related to β -lactams, aminoglycosides, quinolones, tetracyclines, sulfonamides, chloramphenicol, disinfectants, *etc.*, which were basically consistent with the resistance phenotypes. Some strains had several genes with different resistance mechanisms for the same class of antimicrobial. **Conclusion** Multiple-antimicrobial resistant commensal bacteria are present in oysters and large yellow croaker and rich in lots of resistance genes. These bacteria and resistance genes may be the potential hazards if the resistance genes transfer to the pathogens and jeopardize the treatment of infections.

KEY WORDS: antimicrobial resistance; antimicrobial resistance gene; commensal bacteria; whole genome sequencing; oyster; large yellow croaker

0 引言

抗菌药的过度使用导致全球细菌耐药性日益严重,已成为全球公共卫生的主要威胁之一。当今耐药菌形势非常严峻,细菌耐药性会造成临床用药的失效,据估计,全球范围内由耐药菌引起的死亡人数约70万,预计到2050年,死亡人数将高达一千万,超过癌症导致的死亡人数^[1]。细菌耐药性给全球经济带来巨大压力,据估计,到2050年经济损失将高达100万亿美元^[2]。我国是水产养殖大国,抗菌药在防治水产动物疾病方面发挥了重要作用,然而仅20%~30%的抗菌药被吸收利用,其余的抗菌药会随着食物残渣和粪便排放,最终进入水环境而在不同水生动物体内再次积累,导致污染的水环境成为巨大的耐药基因池^[3-6]。

以往的研究重点关注致病菌的耐药性,然而环境中绝大多数菌为非致病性的共生菌,且环境中非致病共生菌耐药情况更为严峻^[7-10]。共生菌携带的耐药基因大部分位于质粒、转座子、整合子等可移动基因元件上,耐药基因会随着这些基因元件发生水平转移,当转移到食源性致病菌上,人体感染后会给临床治疗带来巨大挑战。如果耐药菌随着食物进入人体肠道,会使肠道微生物产生耐药性,从而危害人体健康^[11-13]。由于特殊的生活环境,水产品极易富集水体中的微生物,因此,开展水产品中共生菌的耐药性及耐药机制研究,对于防范耐药基因的传播扩散,保障我国水产品的安全和人类健康具有重要意义。

目前,关于水产品中共生菌耐药性的研究主要是通过药敏试验分析表型、通过聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术获得耐药基因,使用的药物种类和获取的耐药基因有限。因此,本研究针对来源于2种典型养殖海产品——牡蛎和大黄鱼中的6株耐药共生菌,基于全基因组测序技术获得菌株中所有耐药基因的分布特征,全

面反映菌株的耐药情况及耐药机制,为进一步开展水产品中共生菌的耐药形成、传播机制和控制技术研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株

6株多重耐药菌,通过多重药物平板分离自2021年从青岛市农贸市场采集的活牡蛎(可食部分)和冰鲜大黄鱼(肌肉组织)中,其中ML1、ML2、ML3来源于牡蛎, HY1、HY2、HY3来源于大黄鱼。

1.1.2 培养基与试剂

2216E 液体培养基(青岛高科技工业园海博生物技术有限公司); 2216E 固体培养基: 2216E 液体培养基中添加15~20 g/L 琼脂粉; Mueller-Hinton (MHA)固体培养基(北京陆桥技术股份有限公司); 21种抗生素药敏纸片(英国OXOID公司), 药物种类和浓度见表1; 细菌基因组提取试剂盒(北京天根生物技术有限公司); Hieff NGS® MaxUp II DNA Library Prep Kit for Illumina®(上海翌圣生物科技有限公司); Qubit™dsDNA HS Assay Kit(美国Thermo Fisher Scientific公司); Hieff NGS™ DNA Selection Beads(上海翌圣生物科技有限公司); 琼脂糖(西班牙Biowest公司)。

1.2 仪器设备

NU-425-600E Class II生物安全柜(美国Nuair公司); ETC811 PCR仪(北京东胜创新生物技术有限公司); Thermo Qubit 4.0 荧光定量仪(美国Thermo Fisher Scientific公司); ZHWY-2102C 恒温培养振荡器(上海智城分析仪器制造有限公司); MLS-3780 高压蒸汽灭菌锅(日本SANYO公司); MIR-254生化培养箱(日本SANYO公司); PowerPac 水平电泳仪(美国Bio-Rad公司); Infinity 3026 凝胶成像分析系统

(法国 VilberLourmat 公司); MF2 菌落分析仪(杭州迅数科技有限公司); Heal Force Neofuge 15R 台式冷冻离心机(力新仪器上海有限公司); S220 超声波 DNA 破碎仪(美国 Covaris 公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 药敏试验

药敏试验结果以美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)制定的微生物药敏试验标准^[14]为依据,将菌株接种至 2216E 液体培养基中,30℃培养至 0.5 麦氏浓度(约 1×10^8 CFU/mL),将培养液用生理盐水稀释,取 0.3 mL 稀释液涂布含 0.85% NaCl 的 MHA 平板,待水分吸收后将药敏纸片贴在琼脂表面,在 30℃下培养 24 h $\pm$ 2 h,采用菌落分析仪测量抑菌圈直径。多重耐药(multiple antimicrobial resistance, MAR)系数以菌株耐受抗菌药物总数与受试抗菌药物总数的比值表示^[15]。

1.3.2 基因组 DNA 提取

将菌株接入 2216E 液体培养基中活化,取 1 mL 加入 100 mL 2216E 液体培养基培养,30℃振荡培养 18~24 h,取菌液于 12000 r/min 离心 5 min 获取菌体,依据试剂盒说明书要求提取基因组 DNA。提取后的 DNA 用 1%琼脂糖凝胶检测 DNA 完整性,Qubit 定量检测 DNA 样本浓度。

1.3.3 全基因组测序及基因功能分析

菌株的全基因组测序在生工生物工程(上海)股份有限公司完成。使用 DNA 破碎仪将样品 DNA 片段化,采用 NEB Next® Ultra™ DNA Library Prep Kit for Illumina®试剂盒构建文库,得到供测序的模板,在 DNBSEQ-T7(深圳华大)平台上进行二代测序。对测序数据通过 FastQC 进行质量评估,通过 Trimmomatic 对测序数据进行质量剪切^[16],得到相对准确的有效数据。使用 SPAdes 对测序数据进行拼装^[17],然后采用 GapFiller 对拼接得到的 contig 补 Gap^[18],最后采用 PilonSeS-G 进行序列校正,修正拼接过程中的剪辑错误及小片段的插入缺失。

采用 Prokka 对组装结果进行基因元件预测^[19],调用 Prodigal 预测编码基因^[20],通过 Aragorn 预测 tRNA、RNAmmer 预测 rRNA。同时采用 RepeatModeler 对组装结果进行重复序列 Denovo 预测,再通过 RepeatMasker 寻找基因组区段上各类型重复序列出现的位置和频率。将获得的基因开放阅读框 ORF (open reading frame)翻译成氨基酸,通过 BLAST (basic local alignment search tool)与 CDD (conserved domain database)、COG (clusters of orthologous groups of proteins)、NR [national center for biotechnology information (NCBI) non-redundant protein sequences]、NT (NCBI nucleotide sequences)、PFAM、Swissport 和 TrEMBL 数据库进行比对,获得相似度最高的蛋白序列,从而注释该基因的蛋白功能。通过 CARD (comprehensive antibiotic resistance databases)数据库中的 RGI (resistance gene identifier)进行比对获得耐药性相关基因,以“strict”和

“perfect”作为筛选原则^[21]。

通过 BLAST 将基因预测得到的 16s rRNA 序列与 NCBI 数据库进行比对(设置参数 identify>95),然后选取 identify 最高的前 30 条 16s rRNA 序列进行序列多重比对后构建系统发育树,通过遗传距离确定菌株的种属^[22]。

1.4 数据处理

药敏试验重复 3 次,以平均值作为最终的结果进行判定。

2 结果与分析

2.1 药敏试验结果

本研究测定了牡蛎和大黄鱼中分离的 6 株耐药共生菌对 8 大类 21 种抗菌药的耐药性,结果见表 1。所有菌株耐受 10 种或 10 种以上的抗菌药, MAR 系数为 0.48~0.71。测定的所有菌株对头孢唑啉、萘啶酸、四环素、复方新诺明及氯霉素具有耐药性; 5 株菌对氨苄西林和卡那霉素耐药; 4 株菌对头孢呋辛钠、链霉素、环丙沙星及氟苯尼考耐药; 对头孢吡肟、氧氟沙星和强力霉素耐药菌株数为 3 株; 少量菌株耐受其他类抗菌药,包括 1 株菌耐受阿莫西林/克拉维酸、美罗培南, 2 株耐受头孢曲松、亚胺培南和呋喃妥因。大部分菌株对阿米卡星、呋喃妥因和碳青霉烯类药物(美罗培南和亚胺培南)敏感。

从结果可以看出,分离的耐药共生菌对使用时间较长的药物耐药率较高,例如第一代头孢类(头孢唑啉)、第二代头孢类(头孢呋辛钠)、四环素、复方新诺明、链霉素和卡那霉素等,表明环境中细菌长期在这些药物胁迫作用下易产生耐药性;而对一些比较新型的药物,例如第四代头孢类药物(头孢吡肟)、碳青霉烯类药物等则敏感率较高,表明这些新型的药物抑菌效果仍然显著。值得一提的是,虽然氯霉素被禁用多年,但是所有菌株对氯霉素都耐受,推测可能是环境中长期存在相关耐药基因,通过水平转移进入菌株体内而产生了耐药性。

KRUMPERMAN^[15]最早提出采用 MAR 系数反映产品受抗菌药污染的程度,从而进一步评价其对人类健康的危害。通常而言, MAR 系数大于 0.2,表明产品受到较严重的污染,对人体可能会产生较大危害。目前 MAR 系数已广泛应用于致病菌多重耐药性的评价中,包括肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)、沙门氏菌(*Salmonella*)、大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)等。本研究中,所有测试菌株耐受 10 种及以上抗菌药, MAR 系数均大于 0.2,表明这些菌株来源的产品受到抗菌药污染的程度较高、对人类健康的风险较大。

以往对于水产品中细菌耐药性的研究多集中于食源性致病菌,而对于共生菌的耐药性则是近几年才逐渐开始关注。研究发现,水产品中含有大量的耐药菌,对复方新

表 1 药敏试验结果
Table 1 Results of antimicrobial susceptibility

	抗菌药	浓度/ μg	ML1	ML2	ML3	HY1	HY 2	HY3
β -内酰胺类	氨苄西林	10	R	R	I	R	R	R
	阿莫西林/克拉维酸	20/10	S	S	I	R	S	S
	头孢唑啉	30	R	R	R	R	R	R
	头孢呋辛钠	30	S	I	R	R	R	R
	头孢曲松	30	S	R	I	S	I	R
	头孢吡肟	30	S	R	R	I	I	R
	亚胺培南	10	R	S	R	I	I	S
	美罗培南	10	I	S	R	S	S	S
氨基糖苷类	链霉素	10	R	I	S	R	R	R
	阿米卡星	30	S	S	S	S	S	I
	庆大霉素	10	S	I	S	S	I	R
	卡那霉素	30	R	R	R	R	I	R
喹诺酮类	萘啶酸	30	R	R	R	R	R	R
	环丙沙星	5	R	I	R	R	I	R
	氧氟沙星	5	R	I	I	R	S	R
四环素类	四环素	30	R	R	R	R	R	R
	强力霉素	10	R	I	I	R	R	I
磺胺类	复方新诺明 (磺胺甲恶唑/甲氧苄啶 19:1)	25	R	R	R	R	R	R
氯霉素类	氯霉素	30	R	R	R	R	R	R
	氟苯尼考	30	R	R	S	R	I	R
硝基呋喃类	呋喃妥因	300	S	R	S	S	R	S
MAR 系数			0.62	0.52	0.52	0.67	0.48	0.71

注: R: 耐药; I: 中等耐药; S: 敏感。

诺明、四环素、头孢噻肟钠和红霉素的耐药菌数量较高^[23]。此外,从牡蛎中分离的共生菌呈现高度耐药性。王瑞旋等^[24]通过普通培养基平板从健康牡蛎中分离的共生菌,对呋喃唑酮、青霉素、利福平、四环素、复合磺胺和卡那霉素呈现较高的耐药率。而通过抗性平板分离则可获得牡蛎中大量的耐药共生菌,例如张红芝等^[25]利用抗性平板从牡蛎中分离到 76 株耐药菌,超过 90%菌株对四环素、氨苄西林耐药,超过 50%菌株对诺氟沙星、左氧氟沙星、复方新诺明、环丙沙星、头孢唑林和氯霉素耐药。李炳等^[26]利用抗性平板从香港牡蛎消化道分离的细菌对青霉素、卡那霉素、阿莫西林、呋喃唑酮、克林霉素和万古霉素表现出较高的耐药率。本研究从牡蛎中分离的共生菌呈现多重耐药性,与已有的报道研究结果相近。此外,从冰鲜大黄鱼肌肉中分离到的 3 株耐药菌多重耐药性更为严重。这些结果表明,海产品中存在大量的耐药共生菌,已经成为耐药菌的巨大储存库,可能会造成耐药基因在共生菌和致病菌间的扩散,导致多重耐药致病菌的出现,从而危害人类健康。

2.2 菌株基因组序列特征及种属

6 菌株的全基因组序列经测序、拼接和组装后,其基

本组成如表 2 所示。从表 2 中可以看出,细菌基因组序列总长度为 3437993~5279677 bp; GC 含量为 41.58%~59.30%; 编码基因数量最高为 4719,最低为 3301; 有 3 株菌的 tRNAs 数量大于 100,最高为 103,最低为 58; rRNAs 数量最高为 13,最低为 3。通过 16S rRNA 基因序列的比对分析,获得 6 株的种属名称,其中 ML1、ML3 和 HY3 属于希瓦氏菌属(*Shewanella*), ML2 属于不动杆菌属(*Acinetobacter*), HY1 为摩氏摩根菌(*Morganella morganii*), HY2 属于假单胞菌属(*Pseudomonas*)。这些菌都是水产品中的共生菌,其中希瓦氏菌、不动杆菌和假单胞菌是水产品中常见的优势腐败菌,能引起水产品的腐败变质^[27]。

2.3 耐药基因特征

细菌耐药性的产生主要是由于灭活酶或钝化酶作用、结合位点改变、基因突变、外排作用、膜的通透性改变等,由相关的耐药基因编码^[28]。为了探讨耐药菌株的耐药分子机制,对 6 株耐药共生菌的基因组进行耐药基因的查询与分析,获得每株菌中耐药基因的分布情况(见表 3)。

表 2 基因组序列特征及种属名称
Table 2 Characteristics of genome sequences and genus/species

特性	ML1	ML2	ML3	HY1	HY2	HY3
序列全长/bp	4766263	3437993	5279677	4070225	4152072	5099221
GC 含量/%	47.95	41.58	46.12	50.90	59.30	46.42
编码基因	4274	3301	4719	3986	3931	4553
编码基因的总长度/bp	4131868	2978987	4474058	3558044	3711905	4347631
编码基因的比率/%	86.69	86.65	84.74	87.42	89.40	85.26
tRNAs	101	76	102	72	58	103
rRNAs	13	5	9	7	3	7
种属	<i>Shewanella</i> sp.	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Shewanella</i> sp.	<i>Morganella morganii</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Shewanella</i> sp.

表 3 6 株耐药共生菌的耐药基因
Table 3 Antimicrobial resistance genes in 6 antimicrobial resistant commensal bacteria

抗生素/ 菌株编号	ML1	ML2	ML3	HY1	HY2	HY3	作用机制
β -内酰胺类	<i>bla</i> _{OXA-436} 、 <i>bla</i> _{CARB-3}	<i>bla</i> _{OXA-651} 、 <i>bla</i> _{TEM-2}	<i>bla</i> _{OXA-551}	<i>bla</i> _{OXA-1} 、 <i>bla</i> _{DHA-21} 、PBP3 (SNP: D350N)	<i>bla</i> _{CARB-3}	<i>bla</i> _{OXA-551} 、 <i>bla</i> _{OXA-10} 、 <i>bla</i> _{VEB-1} 、 <i>bla</i> _{CARB-3}	PBP3 结合位点改变, 其余灭活作用
氨基糖苷类	<i>aac</i> (6')-IIa、 <i>aadA16</i> 、 <i>aph</i> (3'')-Ib、 <i>aph</i> (6)-Id	<i>aac</i> (3)-Ile、 <i>aph</i> (3')-Ia、 <i>aph</i> (6)-Id	<i>aac</i> (6')-IIa	<i>aac</i> (6')-Ib-cr6、 <i>aadA</i> 、 <i>aadA2</i>	<i>aac</i> (6')-Ib9、 <i>aadA3</i>	<i>aac</i> (6')-Ia、 <i>aac</i> (6')-IIa、 <i>aadA2</i> 、 <i>ant</i> (3'')-IIa、 <i>ant</i> (2'')-Ia	灭活作用
喹诺酮类	<i>qnrVC6</i>	/	/	<i>qnrD1</i> 、 <i>aac</i> (6')-Ib-cr6、 <i>gyrB</i> (SNP: S463A)	<i>qnrVC1</i>	<i>qnrA1</i>	<i>qnr</i> 位点保护, <i>aac</i> (6')-Ib-cr6 灭活作用, <i>gyrB</i> 位点突变
四环素类	<i>tetC</i> 、 <i>tetD</i>	<i>tetD</i>	<i>tetA</i>	<i>tetD</i> 、 <i>tetM</i>	<i>tetD</i>	<i>tetD</i>	<i>tetM</i> 位点保护, 其余外排作用
磺胺及其增效剂类	<i>sul2</i> 、 <i>dfrA27</i>	<i>sul2</i> 、 <i>dfrA1</i>	<i>dfrA1</i>	<i>sul1</i> 、 <i>dfrA1</i> 、 <i>dfrA12</i>	<i>sul1</i>	<i>dfrA12</i>	结合位点改变
氯霉素类	<i>catII</i>	/	<i>catII</i> 、 <i>catB11</i>	<i>catII</i> 、 <i>catB2</i> 、 <i>catB3</i>	<i>cmlA9</i>	<i>cmlA5</i>	<i>cat</i> 灭活作用, <i>cmlA</i> 外排作用
大环内酯类	<i>mphE</i>	<i>mphE</i>	<i>mphE</i>	<i>mphA</i> 、 <i>mphE</i>	/	<i>mphE</i>	灭活作用
利福霉素类	<i>arr-3</i>	/	/	<i>arr-3</i>	<i>arr-2</i>	<i>arr-2</i>	灭活作用
核苷类	/	/	/	SAT-2	/	/	灭活作用
Elfamycins	EF-Tu (SNP: R234F)	/	EF-Tu (SNP: R234F)	EF-Tu (SNP: R234F)	/	/	位点突变
消毒剂类	<i>qacG</i> 、 <i>qacJ</i>	<i>qacJ</i>	<i>qacJ</i>	<i>qacG</i> 、 <i>qacEdelta1</i>	<i>qacG</i> 、 <i>qacEdelta1</i>	<i>qacJ</i> 、 <i>qacL</i>	外排作用
非特异外排泵	<i>adeF</i> 、 <i>rsmA</i> 、 <i>msrE</i>	<i>msrE</i>	<i>adeF</i> 、 <i>rsmA</i> 、 <i>msrE</i>	<i>rsmA</i> 、 <i>kpnH</i> 、 <i>crp</i> 、 <i>msrE</i>	<i>rsmA</i> 、 <i>adeF</i>	<i>rsmA</i> 、 <i>adeF</i> 、 <i>msrE</i>	外排作用

注: *adeF*: 氟喹诺酮类、四环素; *crp*: 大环内酯类、氟喹诺酮类、青霉素类; *rsmA*: 氟喹诺酮类、二氨基嘧啶类、氯霉素类; *msrE*: 大环内酯类、链阳菌素类; /: 不含有耐药基因。

细菌对 β -内酰胺类药物的耐药机制包括由 β -内酰胺酶导致药物的失活(水解或钝化作用)和结合位点发生改变^[29]。本研究中,6株菌中含有的 β -内酰胺类耐药基因大多为编码 β -内酰胺酶的基因,包括编码广谱酶的基因 bla_{TEM-2} 、 bla_{DHA-21} ,编码氯唑西林酶的基因 bla_{OXA-1} 、 bla_{OXA-10} ,编码超广谱酶的基因 $bla_{OXA-436}$ 、 $bla_{OXA-551}$ 、 $bla_{OXA-651}$ 、 bla_{VEB-1} ,编码羧苄酶的基因 bla_{CARB-3} 。此外,菌株HY1中编码识别与结合抗菌药物相关蛋白PBP3的基因发生突变,导致药物结合位点发生改变,从而降低杀菌作用^[30]。

细菌对氨基糖苷类药物的耐药机制主要是由于钝化酶对药物进行修饰,导致药物与细菌的核糖体结合不紧密而产生耐药性^[31]。测试的6株菌中含有能编码氨基糖苷磷酸转移酶的基因 aph ,编码氨基糖苷核糖转移酶的基因 ant ,编码氨基糖苷乙酰转移酶的基因 aac ,大部分菌株还含有链霉素耐药基因 $aadA$ 。此外,菌株HY1含有 $aac(6')-Ib-cr6$,该基因能编码氨基糖苷类药物的代谢酶,使菌株产生耐药性^[32]。

细菌对喹诺酮类药物的耐药机制分为特异性和非特异性,特异性耐药机制包括DNA旋转酶/拓扑异构酶氨基酸序列的突变和耐药性质粒的出现,导致药物作用靶位的改变,使药物不能对其产生作用^[33]。非特异性耐药机制主要由于外排泵表达水平和膜通透性的改变,使药物主动外排增加或进入细胞内的药物减少^[33]。菌株HY1中含有编码DNA旋转酶的 $gyrB$ 基因突变,突变位点为S463A;还含有质粒介导的耐药基因,其中 qnr 基因通过改变药物靶位降低药物敏感性,而 $aac(6')-Ib-cr6$ 编码的代谢酶不仅能降解氨基糖苷类药物,还能降解特定的喹诺酮类药物^[32]。菌株ML1、HY2和HY3含有 qnr 基因,ML2和ML3中不含有这些耐药基因。

细菌对四环素类药物的耐药机制之一是外排泵的外排作用,四环素类外排泵也是细菌含有的不同外排泵中种类最多的,大多属于主要易化子超家族,由 tet 基因编码的膜蛋白介导,保护核糖体免遭药物的作用从而产生耐药性^[34]。测试的6株菌中含有外排泵基因 $tetA$ 、 $tetC$ 和 $tetD$ 。HY1中还含有 $tetM$,该基因编码的核糖体保护蛋白TetM能够使已结合的四环素移位,降低四环素类的抑菌作用导致菌株产生耐药性。

测试菌株中含有磺胺类耐药基因 $sul1$ 和 $sul2$,编码二氢蝶酸合酶,以及增效剂甲氧苄啶的耐药基因 $dhfr$,编码二氢叶酸还原酶,导致菌株产生耐药性^[35]。菌株中含有氯霉素类耐药基因 cat 和 $cmlA$,其中 cat 基因编码氯霉素乙酰转移酶,乙酰化的氯霉素不能与核糖体结合从而产生耐药性,而 $cmlA$ 编码外排泵,降低氯霉素类药物在体内的浓度从而产生耐药性^[36]。ML2菌株中不含有氯霉素类耐药基因。菌株对大环内酯类的耐药机制是由于灭活酶的作用^[37],

5株菌均含有编码大环内酯磷酸转移酶的基因 $mphE$,此外,菌株HY1还含有 $mphA$,HY2中不含有相关耐药基因。4株菌中含有利福霉素类药物耐药基因 $aar-2$ 或 $aar-3$,HY1中含有核苷类药物因子SAT-2。ML1、ML3和HY1中还发现Elfamycins这类药物的耐药基因。所有菌株中都含有质粒介导的消毒剂类耐药基因 qac ,包括 $qacG$ 、 $qacJ$ 、 $qacL$ 、 $qacEdelta1$ 。此外,菌株中还含有非特异性的外排泵,介导对2种或2种以上药物的耐药性,包括基因 $adeF$ 、 crp 、 $rsmA$ 、 $msrE$ 。

通过药敏试验结果和耐药基因的比对分析,6株菌的耐药表型和耐药基因型基本一致,其中对喹诺酮类耐受的ML2、ML3未发现特异性的喹诺酮类耐药基因,对氯霉素耐受的ML2不含有特异性的氯霉素类耐药基因,推测它们的耐药性可能是由非特异性的外排泵引起。药敏试验是表型检测方法,但检测的抗菌药物种类有限,且有些细菌需要特殊培养环境。目前,随着全基因组测序技术、生物信息学的发展和测序价格的显著下降,其在细菌耐药性的研究方面应用越来越广泛,推动该研究领域的重要发展^[38]。通过全基因组测序能够挖掘细菌中所有的耐药基因,弥补药敏试验测试药物不全、工作量大等缺陷,更重要的是能发现一些新型的耐药基因。本研究在CARD数据库中查询耐药基因时,以“strict”和“perfect”作为筛选条件,如果采用“loose”作为筛选条件会发现更多的耐药基因,可以通过调整筛选条件,结合耐药表型得出更精准的结果。

从本研究结果来看,海产品中耐药菌含有丰富的耐药基因,几乎对常见的抗菌药都有对应的耐药基因。有报道从广州市水产中分离的耐药菌中检测到丰富的 $sul1$ 、 $sul2$ 、 $tetE$ 、 $tetM$ 、 $tetL$ 、 bla_{TEM} 、 bla_{CMY} 、 $ermB$ 等耐药基因^[23],从东南沿海地区水产品分离的耐药菌中含有大量的 $tetA$ 、 $tetS$ 、 $tetK$ 、 $sul1$ 、 $sul2$ 以及氨基糖苷类耐药基因等^[39]。这些结果表明海产品中耐药菌污染程度严重。这些耐药基因有的位于染色体上,介导的耐药性通过细菌繁殖造成垂直传播;有的位于质粒上,质粒介导的耐药不仅可垂直传播,还可通过质粒的接合作用造成耐药基因的水平转移,在共生菌和致病菌中传播,其危害更大^[40]。

3 结 论

本研究对牡蛎和大黄鱼中分离的6株耐药共生菌进行耐药表型和耐药基因型分析,这6株菌对 β -内酰胺类、氨基糖苷类、喹诺酮类、四环素类、磺胺类药物呈现耐药性,可同时耐受10种及以上的药物,多重耐药程度严重。通过全基因组测序获得菌株耐受的每类药物相对应的耐药基因,耐药基因种类丰富,同一类药物可能含有多个耐药基因,表明菌株以不同的耐药机制对抗药物。结果表

明海产品中耐药菌污染程度严重,有必要进一步开展海产品尤其是生食海产品中耐药菌的筛查、风险评估和控制技术研究,防范水产品中耐药基因的传播扩散、食源性疾病的暴发等奠定基础。

参考文献

- [1] ONEILL J. Antimicrobial resistance. Tackling a crisis for the health and wealth of nations [Z]. 2014.
- [2] ONEILL J. Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations [Z]. 2016.
- [3] GAO P, MAO D, LUO Y, *et al.* Occurrence of sulfonamide and tetracycline-resistant bacteria and resistance genes in aquaculture environment [J]. *Water Res*, 2012, 46(7): 2355–2364.
- [4] MONTEIRO SH, ANDRADE GCRM, GARCIA F, *et al.* Antibiotic residues and resistant bacteria in aquaculture [J]. *Pharm Chem J*, 2018, 5(4): 127–147.
- [5] PREENA PG, SWAMINATHAN TR, KUMAR VJR, *et al.* Antimicrobial resistance in aquaculture: A crisis for concern [J]. *Biologia*, 2020, 75: 1497–1517.
- [6] HOSSAIN A, HABIBULLAH-AI-MAMUN M, NAGANO I, *et al.* Antibiotics, antibiotic-resistant bacteria, and resistance genes in aquaculture: Risks, current concern, and future thinking [J]. *Environ Sci Pollut R*, 2022, 29: 11054–11075.
- [7] WANG HH, MICHELE M, MARK L, *et al.* Food commensal microbes as a potentially important avenue in transmitting antibiotic resistance genes [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2006, 254(2): 226–231.
- [8] AHMED AM, MARUYAMA A, KHALIFA HO, *et al.* Seafood as a reservoir of gram-negative bacteria carrying integrons and antimicrobial resistance genes in Japan [J]. *Biomed Environ Sci*, 2015, 28(12): 924–926.
- [9] 王亚楠, 胡永飞, 朱宝利, 等. 养殖动物及其相关环境耐药组的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2018, 34(8): 1226–1233.
- WANG YN, HU YF, ZHU BL, *et al.* Antibiotic resistome in farm animals and their related environments: A review [J]. *Chin J Biotechnol*, 2018, 34(8): 1226–1233.
- [10] XIONG L, SUN Y, SHI L, *et al.* Characterization of antimicrobial resistance genes and class 1 integrase gene in raw meat and aquatic product, fresh vegetable and fruit, and swine manure in southern China [J]. *Food Control*, 2019, 104: 240–246.
- [11] BOGAARD A, STOBBERINGH EE. Epidemiology of resistance to antibiotics links between animals and humans [J]. *Int J Antimicrob Ag*, 2000, 14(4): 327–335.
- [12] JIAN Z, ZENG L, XU T, *et al.* Antibiotic resistance genes in bacteria: Occurrence, spread, and control [J]. *J Basic Microbiol*, 2021, 61(12): 1049–1070.
- [13] 李海北, 杨沂楠, 李君文, 等. 人类肠道菌群中抗生素耐药基因的研究进展[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2021, 35(2): 81–89.
- LI HB, YANG YD, LI JW, *et al.* Research progress of antibiotic resistance genes in human intestinal microbiota [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2021, 35(2): 81–89.
- [14] Clinical and laboratory standards institute. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. M45 3rd edition [Z]. 2016.
- [15] KRUMPERMAN PH. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods [J]. *Appl Environ Microb*, 46(1): 165–170.
- [16] BOLGER AM, LOHSE M, USADEL B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(15): 2114–2120.
- [17] BANKEVICH A, NURK S, ANTIPOV D, *et al.* SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing [J]. *J Comput Biol*, 2012, 19 (5): 455–477.
- [18] BOETZER M, PIROVANO W. Toward almost closed genomes with Gap Filler [J]. *Genome Biol*, 2012, 13: R56.
- [19] SEEMANN T. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(14): 2068–2069.
- [20] HYATT D, CHEN G, LOCASCIO PF, *et al.* Prodigal: Prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification [J]. *BMC Bioinformatics*, 2010, 11: 119.
- [21] ALCOCK BP, RAPHENYA AR, LAU TTY, *et al.* CARD 2020: Antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database [J]. *Nucl Acids Res*, 2020, 48: D517–D525.
- [22] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. *Mol Biol Evol*, 2016, 33(7): 1870–1874.
- [23] 叶蕾. 广州市水产养殖品中耐药共生菌分布及耐药基因传播机制的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2012.
- YE L. Distribution of drug-resistant commensal bacteria and transmission mechanism of drug-resistant genes in aquaculture products in Guangzhou [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2012.
- [24] 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.
- WANG RX, LI B, LIN HJ, *et al.* Study on bacterial resistance in oyster and its culture water [J]. *Mar Sci*, 2020, 44(6): 56–63.
- [25] 张红芝, 朱颖莹, 顾其芳, 等. 牡蛎污染耐药性细菌调查及整合子检测 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2017, 12(7): 654–657.
- ZHANG HZ, ZHU YY, GU QF, *et al.* A study to characterize the integrons and drug resistance of bacteria from oysters [J]. *J Pathog Biol*, 2017, 12(7): 654–657.
- [26] 李炳, 王瑞旋, 谢燕纯, 等. 广东沿海香港牡蛎消化道异养菌统计及其耐药性研究[J]. *海洋科学*, 2020, 44(3): 50–58.
- LI B, WANG RX, XIE YC, *et al.* Study on antibiotic resistance of bacteria in oysters and their farming water [J]. *Mar Sci*, 2020, 44(3): 50–58.
- [27] 张小敏, 周国燕, 郭全友, 等. 水产品特定腐败菌及其在鲜度评估中的应用[J]. *食品与发酵科技*, 2020, 56(6): 100–107.
- ZHANG XM, ZHOU GY, GUO QY, *et al.* Specific spoilage bacteria of aquatic products and its application in the evaluation of freshness [J]. *Food Ferment Sci Technol*, 2020, 56(6): 100–107.
- [28] LIN J, NISHINO K, ROBERTS M, *et al.* Mechanisms of antibiotic resistance [J]. *Front Microbiol*, 2015, 6: 00034.

- [29] KING DT, SOBHANIFAR S, STRYNADKA NC. The mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics [Z]. 2017.
- [30] SUN S, SELMER M, ANDERSSON DI. Resistance to β -lactam antibiotics conferred by point mutations in penicillin-binding proteins PBP3, PBP4 and PBP6 in *Salmonella enteric* [J]. PLoS One, 2014, 9(5): e97202.
- [31] DAVIES J, COURVALIN P. Mechanisms of resistance to aminoglycosides [J]. Am J Med, 2003, 62(6): 868–872.
- [32] RAMIREZ MS, NIKOLAS N, TOLMASKY ME. Rise and dissemination of aminoglycoside resistance: The *aac* (6')-Ib paradigm [J]. Front Microbiol, 2013, 4:121.
- [33] CAMBAU E, GUTMANN L. Mechanisms of resistance to quinolones [J]. Drugs, 1993, 45(3): 15–23.
- [34] ONAKOYA OM, SABA AB. Bacterial resistance to the tetracyclines and antimicrobial therapeutics: A review [J]. Trop Vet, 2012, 30(1): 1–16.
- [35] SKÖLD O. Resistance to trimethoprim and sulfonamides [J]. Vet Res, 2001, 32(3–4): 261–273.
- [36] ROBERTS MC, SCHWARZ S. Tetracycline and chloramphenicol resistance mechanisms [J]. 2017. DOI: 10.1007/978-3-319-46718-4_15
- [37] LECLERQ R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: Nature of the resistance elements and their clinical implications [J]. Clin Infect Dis, 2002, 34(4): 482–492.
- [38] 沈应博, 史晓敏, 沈建忠, 等. 全基因组测序与生物信息学分析在细菌耐药性研究中的应用[J]. 生物工程学报, 2019, 35(4): 541–557.
- SHEN YB, SHI XM, SHEN JZ, *et al.* Application of whole genome sequencing technology and bioinformatics analysis in antimicrobial

resistance researches [J]. Chin J Biotechnol, 2019, 35(4): 541–557.

- [39] 巴永兵. 水产品中抗生素抗性基因的污染特征研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2017.

BA YB. Pollution characteristics of antibiotic resistance genes in aquatic products [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2017.

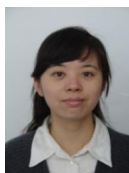
- [40] FABIAN S, RANKIN DJ. The evolution of plasmid-carried antibiotic resistance [J]. BMC Evol Biol, 2011, 11: 130.

(责任编辑: 黄周梅 张晓寒)

作者简介



吴书香, 硕士研究生, 主要研究方向为水产品中生物危害物检测与控制。
E-mail: 15864525853@163.com



江艳华, 高级工程师, 主要研究方向为水产品中生物危害物检测与控制。
E-mail: jiangyh@ysfri.ac.cn



王 鹏, 教授, 主要研究方向为海洋微生物。
E-mail: pengwang@ouc.edu.cn