

编者按：由《中国食品学报》杂志社与中国食品科学技术学会青年工作委员会共同主办的“第五届中国食品科学青年论坛”于 2021 年 9 月 25–26 日在重庆召开。来自全国 150 余所高校、科研单位的近 500 名青年学者、企业代表参加了本届论坛。论坛以“集聚青年才俊,坚持四个面向;探讨学科热点,把握行业动态”为主题,邀请食品及相关领域专家、国家自然科学基金-杰出青年基金、优秀青年基金获得者,以及全国食品领域的青年科技工作者,围绕当前食品科技领域的最新研究成果、动态、热点科研领域研究进展等问题进行研讨。

经论坛组委会的严格评审,从收录的 200 余篇国家及各省青年科学基金项目论文中优选出 24 篇论文,现以专刊报道,以飨广大的食品科技工作者。

水产源大肠杆菌耐药可移动遗传元件 II 型整合子的结构特征及适应性代价

焦雪¹, 余庭¹, 方结红¹, 唐标², 汪雯², 蒋晗^{1*}

¹中国计量大学生命科学学院 浙江省海洋食品品质及危害物控制技术重点实验室 杭州 310018

²浙江省农业科学院农产品质量标准研究所 农产品质量安全危害因子与风险防控国家重点实验室 杭州 310021)

摘要 为分析水产源大肠杆菌耐药可移动遗传元件 II 型整合子的结构特征及适应性代价,采集了浙江省市售南美白对虾、牡蛎和大黄鱼样品各 200 份,分离鉴定大肠杆菌,分析其耐药特征和 II 型整合子携带情况。利用竞争试验和流式细胞术等方法,比较携带 II 型整合子的大肠杆菌在无抗环境和抗生素亚抑制浓度下适应性代价的差异。结果表明,分离到的 278 株大肠杆菌中,有 28 株多重耐药菌携带 II 型整合子,其结构均含功能缺陷型整合酶,其中 27 个含典型耐药基因盒 *dfrA1-sat2-aadA1*,1 个含非典型基因盒 *dfrA1-catB2-sat2-aadA1*。在无抗 LB 培养条件下,上述两类 II 型整合子的选择系数 *S* 依次为-0.068 和-0.117,均小于 0,表明携带 II 型整合子的大肠杆菌在无抗环境下存在适应性代价。在抗生素亚抑制浓度(40%MIC 和 20%MIC)下,两类 II 型整合子的选择系数 *S* 均大于 0,适应性良好。综上,II 型整合子在水产源大肠杆菌中已有一定比例,且低浓度抗生素有利于其维持和富集,从而促进其有效应对外界抗生素压力,以及在细菌间传播扩散。

关键词 II 型整合子; 适应性代价; 大肠杆菌; 水产

文章编号 1009-7848(2022)04-0025-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.04.003

抗生素因可治疗细菌性疾病,并可在低剂量下促生长,故被广泛应用乃至滥用于水产养殖中,由此引发了严重的水产源微生物耐药性问题^[1]。研究表明,耐药微生物不仅能在水产品体内、养殖环境和供应链等环节中残留,还可通过食物链等多种途径进一步传递到人体中,对人类健康造成严重危害^[2]。

整合子因在水产源细菌耐药基因快速传播中发挥至关重要的作用而备受关注^[3-4]。它是一种可以定位于质粒、转座子或染色体上的遗传元件,通常由 5' 保守末端、3' 保守末端和两者之间嵌有耐药基因盒的可变区组成^[5]。整合子既可通过位点特异性基因重组来捕获、整合或剪切基因盒,使耐药基因在细菌间水平转移,也可借助接合型质粒等可移动元件进行整体横向传播,从而增强细菌在抗生素等压力下的生存适应性^[6]。然而,当外界抗生素压力解除时,整合子会成为细菌的额外负担,其适应环境的能力可能会小于野生型菌株,这一现象被称为适应性代价^[7]。如果适应性代价很大,当无抗生素压力时,耐药细菌就无法和野生型菌

收稿日期: 2021-08-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(31801655,31901792);
浙江省属高校基本科研业务费(2020YW34);
浙江省重点研发计划项目(2020C02031)

作者简介: 焦雪(1996—),女,硕士生

通信作者: 蒋晗 E-mail: jianghan825@126.com

株竞争,容易被淘汰。反之,如果适应性代价小,整合子既可以在无抗生素压力时得到保留,又可以使宿主菌很快适应外界环境中的抗生素压力并介导耐药基因的水平传播^[8-9]。较低的适应性代价是整合子介导耐药基因广泛传播与流行的重要生物学基础^[10]。

依据氨基酸序列的不同,整合子可分为5种类型,日常食用的水产品中已监测到携带I型和II型整合子的细菌,尤以大肠杆菌居多^[11-12]。其中II型整合子发现时间相对较晚,因其有别于I型整合子的独特结构和仍未清晰的传播机制,近年来日益受到关注^[13]。然而,II型整合子在相关宿主菌中的适应性代价尚未阐明,严重制约了对其在水产品中传播机制的深入理解。鉴于此,本研究采集浙江省市售南美白对虾、牡蛎和大黄鱼样品,分离鉴定大肠杆菌,分析其II型整合子携带情况和结构特征,比较携带II型整合子的大肠杆菌在无抗环境和抗生素亚抑制浓度下适应性代价的差异,为进一步揭示II型整合子介导的耐药基因在水产源耐药微生物中的传播机制奠定理论基础,同时为打造有效的食源性致病菌耐药防控链提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

材料:2019年3月至2021年3月,从浙江省杭州市各大型超市和农贸市场购买南美白对虾、牡蛎和大黄鱼样品各200份。

试剂:伊红美蓝培养基、LB琼脂培养基,青岛海博生物技术有限公司;抗生素药敏片,杭州微生物试剂有限公司;克隆菌株大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)DH5 α 和质控菌株大肠杆菌(*E. coli*)ATCC25922,中国普通微生物菌种保藏管理中心;Platinum™ Taq高保真DNA聚合酶,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;Ex Taq DNA聚合酶、琼脂糖、DNA marker、切胶回收试剂盒、细菌基因组DNA试剂提取盒、质粒DNA提取试剂盒等,宝生物工程(大连)有限公司;pEASY-T1载体,北京全式金生物技术有限公司;所有引物均由上海生工生物工程股份有限公司合成。

仪器:BD AccuriC6流式细胞仪,美国BD

Biosciences公司;Arktik PCR仪,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;Allegra X-30R高速冷冻离心机,美国Beckman公司;电泳及凝胶成像系统,上海天能科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 样品前处理 每份样品用独立无菌均质袋封装后,置于4℃保温箱,2h内低温运输至实验室进行样品前处理。无菌条件下,将样品切碎,按1g/mL加入无菌生理盐水,均质2min,取均质液50 μ L,接种入5mL LB液体培养基中,200r/min,37℃过夜培养。

1.2.2 大肠杆菌的分离与分子鉴定 将过夜培养的均质液划线接种于伊红美蓝培养基,37℃过夜培养,挑取平板上具黑色中心有绿色金属光泽的典型菌落进行PCR分子鉴定(每份样品挑取1株大肠杆菌作为代表)。靶标基因为大肠杆菌特异基因*uidA*(Genbank ID:S69414),PCR引物序列见表1。取过夜培养的待测菌液1 μ L,加入30 μ L Tri-HCl缓冲液,金属浴煮沸5min,4℃冷却2min,12000 $\times g$ 离心2min,取上清液用作PCR反应DNA模板。PCR反应体系为:0.25 μ L Ex Taq,5 μ L 10 \times Ex Taq buffer,4 μ L dNTPs,2 μ L上游引物(10 μ mol/L),2 μ L下游引物(10 μ mol/L),1 μ L DNA模板,35.75 μ L灭菌去离子水;反应程序:94℃预变性4min,98℃变性10s,56℃退火30s,72℃延伸30s,循环35次后72℃延伸10min。PCR产物进行1.2%琼脂糖凝胶电泳。

1.2.3 II型整合子的分离鉴定及结构分析 通过PCR方法检测II型整合酶基因*intI2*,分析大肠杆菌分离株携带II型整合子情况。PCR引物序列见表1,反应体系同1.2.2节,反应程序:94℃预变性1min;98℃变性30s,55℃梯度退火30s,72℃延伸1min,循环35次后72℃延伸10min。PCR产物进行1.2%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

进一步分析*intI2*基因阳性的大肠杆菌分离株的II型整合子完整结构。根据II型整合子5'-CS和3'-CS序列设计PCR扩增引物P1,P2,引物序列见表1。利用Platinum高保真混合DNA聚合酶对II型整合子进行PCR扩增,反应体系:45 μ L Platinum PCR SuperMix,1 μ L引物P1(10 μ mol/L),1 μ L引物P2(10 μ mol/L),2 μ L DNA模

板,1 μL 灭菌去离子水;PCR 反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,62 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 4 min,32 个循环。PCR 产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定和切胶回收。利用 GeneArt Seamless Cloning & Assembly 克隆试剂盒,将切胶回收的 II 型整合子与 pEASY-T1 克隆载体进行连接。连接反应体系为:5 μL GeneArt 2 \times Enzyme Mix,2 μL 切胶回收产物,1 μL pEasy-T1 (*Xho* I/*Bam* HI),1 μL 灭菌去离子水;反应条件:室温放置 20 min 后,冰上放置 2~3 min。连接产物全部转化感受态细胞大肠杆菌 DH5 α ,挑选阳性克隆送上海生工测序。测序结果通过 NCBI BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行比对分析,获

得 II 型整合子结构。

1.2.4 II 型整合子阳性大肠杆菌的药敏分析 根据美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 推荐的 Kirby-Bauer 纸片扩散法测定 28 株 II 型整合子阳性大肠杆菌分离株对 9 大类 18 种抗生素的药敏性,质控菌株为大肠杆菌 ATCC25922。按照 CLSI(2019) 推荐的标准判定分离株对该抗生素敏感(Susceptible, S)、中介(Intermediate, I)或耐药(Resistance, R)^[16]。18 种抗生素的药敏片浓度及耐药折点如表 2 所示。对 3 类或以上抗生素耐药的大肠杆菌记为多重耐药菌。

表 1 引物信息表

Table 1 Primer sequences information

扩增靶标	引物名称	引物序列(5'-3')	扩增片段长度/bp	参考文献
<i>uidA</i> 基因	uidAF	GTCCTGTAGAAACCCCAACCCGTGAA	424	[14]
	uidAR	GGGATAGTCTGCCAGTTCAGTTCGT		
II 型整合子整合酶基因 <i>intI2</i>	intI2F	CACGGATATGCGACAAAAAGGT	789	[15]
	intI2R	GTAGCAAACGAGTGACGAAATG		
II 型整合子	P1	CCGCTCGAGCGTTACTGATTGATAAGTAGC	可变	本研究设计
	P2	CGCGGATCCGCGAACGAATTGTTAGACATTA		

表 2 抗生素种类、药敏片含量和耐药折点

Table 2 The category, concentration and breakpoint of the antibiotics used for Kirby-Bauer susceptibility test

种类	抗生素(缩写)	药敏片含量/ μg	耐药折点		
			R	I	S
四环素类	四环素(TET)	30	≤ 11	12~14	≥ 15
	多西环素(DOX)	30	≤ 10	11~13	≥ 14
β -内酰胺酶类	氨苄青霉素(AMP)	10	≤ 13	14~16	≥ 17
	头孢唑啉(CZ)	30	≤ 19	20~22	≥ 23
	头孢孟多(CM)	30	≤ 14	15~17	≥ 18
	头孢唑肟(ZOX)	30	≤ 21	22~24	≥ 25
	头孢吡肟(FEP)	30	≤ 18	19~24	≥ 25
	美罗培南(MEP)	10	≤ 19	20~22	≥ 23
	大环内酯类	红霉素(ERY)	15	≤ 13	14~22
氨基糖苷类	链霉素(STR)	10	≤ 11	12~14	≥ 15
	大观霉素(SPT)	100	≤ 14	15~17	≥ 18
喹诺酮类	恩诺沙星(ENR)	10	≤ 27	28~36	≥ 37
酰胺醇类	氟苯尼考(FLO)	30	≤ 11	12~18	≥ 19
	氯霉素(CHL)	30	≤ 12	13~17	≥ 18
多肽类	多粘菌素 B(PB)	300	≤ 12	13~19	≥ 20
呋喃类	呋喃妥因(FUR)	300	≤ 14	15~16	≥ 17
磺胺类	甲氧苄胺嘧啶(TMP)	5	≤ 10	11~15	≥ 16
	磺胺异恶唑(SZE)	300	≤ 12	13~16	≥ 17

1.2.5 II型整合子适应性代价研究用大肠杆菌基因工程菌构建 适应性代价研究用质粒 pAKM 和大肠杆菌基因工程菌大肠杆菌 MG1656 $\lambda att::gfp$ 为本实验室前期构建。质粒 pAKM 含 p15a 低拷贝复制子、卡那霉素抗性基因和多克隆位点。菌株大肠杆菌 MG1656 $\lambda att::gfp$ 在不引入适应性代价的 λatt 位点插入组成型表达的 gfp 基因,可稳定表达绿色荧光蛋白 GFP。将质粒 pAKM 转化至菌株大肠杆菌 MG1656 $\lambda att::gfp$, 获得适应性代价研究对照菌株 LC。将 II 型整合子与质粒 pAKM 连接,构建含典型 II 型整合子基因盒的质粒 pAKM- $intI2^*-3GC$ 和含非典型 II 型整合子基因盒的质粒 pAKM- $intI2^*-4GC$, 将 2 个质粒分别转化至菌株大肠杆菌 MG1656 $\lambda att::gfp$, 获得试验菌株 LA1 和 LA2。

1.2.6 大肠杆菌基因工程菌最小抑菌浓度测定 参照 CLSI 推荐的微量营养肉汤稀释法测定链霉素对照菌株 LC 的最小抑菌浓度 (Minimal inhibitory concentration, MIC)^[6]。

1.2.7 II 型整合子适应性代价分析 参照文献 [17] 的方法,利用竞争试验法分析 II 型整合子的适应性代价。将试验菌株 LA1、LA2 与对照菌株 LC 在 LB 液体培养基中过夜培养后,按 1:1 (体积比)混合,每培养 24 h 后以 1:100 (体积比)接种至新鲜 LB 液体培养基,连续转接 4 次,共培养 5 d。竞争试验混合液每转接前取 100 μ L 样品,通过 BD AccuriC6 流式细胞仪测定混合液中含 GFP 蛋白细胞数量和总细胞数量,从而获得试验菌株 LA1 或 LA2 相对于对照菌株 LC 的相对频数 F ($F_{non-GFP}/F_{GFP}$)。

以竞争试验中获得的相对频数自然对数 $\ln F$ 为因变量 y ,以时间 (d) 为自变量 x ,拟合线性回归方程 $y=kx+b$ 。试验菌株相对于对照菌株的适应性代价选择系数 $S=k/\ln(1/t)$, t ——稀释倍数 (1:100)。

1.2.8 数据统计分析 试验做 3 个重复。采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 和最小显著差异法 (Least significant difference) 比较不同数据组间的差异。采用 SPSS (Version 20.0) 软件对数据进行统计分析, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。利用 GraphPad Prism 8 作图。

2 结果与分析

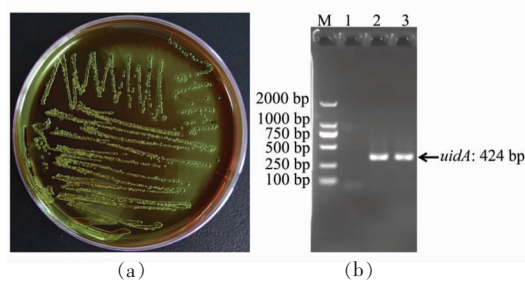
2.1 水产源大肠杆菌的分离鉴定

本研究采集了浙江省市售南美白对虾、牡蛎和大黄鱼样品各 200 份,预处理并培养后挑取具黑色中心有绿色金属光泽的大肠杆菌疑似菌落 (图 1a), 以大肠杆菌特异基因 $uidA$ 为靶标进行 PCR 鉴定 (图 1b), 共分离到 278 株大肠杆菌, 其中 93 株来自南美白对虾样品, 102 株来自牡蛎样品, 83 株来自大黄鱼样品, 大肠杆菌总分离率为 46.3%。据文献报道, 大肠杆菌因在水产品中宿主广泛、易通过水平基因转移获得耐药基因, 常成为耐药基因的蓄积库和传播媒介, 故大肠杆菌也被用作监测环境中耐药基因或元件的指示菌^[18-19]。

2.2 II 型整合子的分离鉴定及结构分析

278 株水产源大肠杆菌中, 有 28 株 (10.1%) II 型整合酶基因 $intI2$ 阳性 (图 2a), 其中 27 个 II 型整合子全长约 3 200 bp (图 2b), 1 个 II 型整合子全长约 4 000 bp (图 2c)。

对 28 个 II 型整合子全长扩增片段进行回收测序和 BLAST 比对分析, 并结合文献报道绘制出基本结构^[5-6, 20-21]。28 个 II 型整合子的基本结构如图 3 所示: (1) II 型整合酶基因 $intI2$, 编码 II 型整合酶; 本研究分离到的 28 个 II 型整合子均含缺陷型整合酶, 即 $intI2$ 在第 178 位氨基酸后出现终止密码子 TAA, 致使其无法表达出完整的具有催化活性的整合酶蛋白, 故标为 $intI2^*$ 。(2) $attI$ 重组位点, 可特异性组合 $attC$ 重组位点, 用以整合和捕获

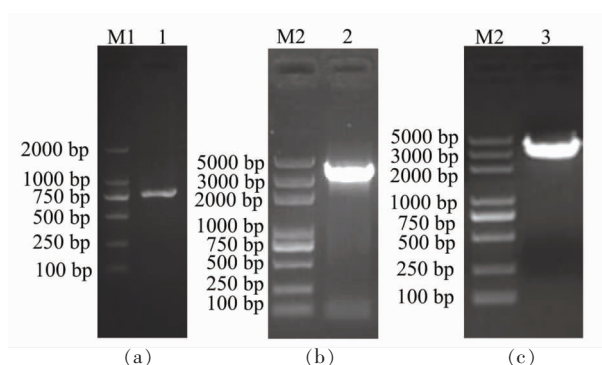


注:a:伊红美蓝培养基上黑色中心有绿色金属光泽的菌落为疑似大肠杆菌;b:M:DL 2000 DNA Marker;泳道 1:空白对照;泳道 2:大肠杆菌标准菌株 ATCC25922;泳道 3:疑似大肠杆菌分离株。

图 1 大肠杆菌的选择性分离与 PCR 分子鉴定
Fig.1 Selective isolation and PCR molecular identification of *Escherichia coli*

基因盒。(3)Pc 启动子,负责可变区内基因盒转录表达;II 型整合子的 Pc 启动子有 Pc2A,Pc2B,Pc2C 和 Pc2D,共 4 个。(4) P_{int2} 启动子负责整合酶转录表达,方向与 Pc 的方向相反。(5)嵌有耐药基因盒的可变区:27 个片段的耐药基因盒阵列为 *dfrA1-sat2-aadA1*,1 个片段的耐药基因盒阵列为 *dfrA1-catB2-sat2-aadA1*(分别为介导细菌对甲氧苄氨嘧啶耐药的二氢叶酸还原酶基因 *dfrA1*,介导细菌对链霉素耐药的链丝菌素转乙酰酶基因 *sat2*,介导细菌对链霉素和大观霉素耐药的氨基糖苷类腺苷转移酶基因 *aadA1* 和介导细菌对氯霉素耐药的乙酰基转移酶基因 *catB2*)。(6)3'CS 保守序列。

研究表明,流行最广的典型 II 型整合子包含缺陷型整合酶基因 *intI2** 与耐药基因盒阵列 *dfrA1-sat2-aadA1*(图 3A),该类 II 型整合子虽有 *attI* 和 *attC* 重组位点,但因为整合酶的缺陷,导致其理论上仅能表达耐药基因,不具备捕获和剪切的功能^[22],因此,耐药基因盒的阵列也相对固定。近年来,越来越多的新型 II 型整合子基因盒阵列被发现,如本研究获得的 *dfrA1-catB2-sat2-aadA1* 也曾在变形杆菌属 (*Proteus*)、嗜水气单胞菌属 (*Aeromonas*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、柠檬酸杆菌属 (*Citrobacter*) 和希瓦氏菌属 (*Shewanella*)

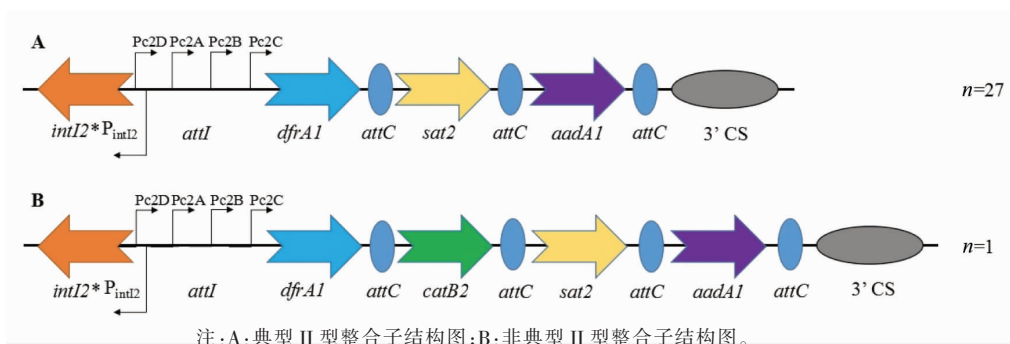


注:M1:DL 1000 DNA Marker;M2:DL 5000 DNA Marker;a:II 型整合子整合酶基因 *intI2* PCR 扩增产物(789 bp);b:典型 II 型整合子 PCR 扩增产物(约 3 200 bp);c:非典型 II 型整合子 PCR 扩增产物(约 4 000 bp)。

图 2 II 型整合子的分离鉴定

Fig.2 Isolation and identification of class II integrons

等菌中分离到的 II 型整合子中发现过^[23],说明 II 型整合子仍然具有剪切捕获耐药基因和在不同细菌间传播的功能,只是不依赖或不完全依赖 II 型整合酶的作用^[23]。此外,II 型整合子在自然界中没有 I 型整合子流行广泛和耐药基因盒多样,然而仍具备重要的传播耐药基因的能力,其整合酶的特殊结构可能是为了维持功能进化与适应性代价间的平衡^[13]。



注:A:典型 II 型整合子结构图;B:非典型 II 型整合子结构图。

图 3 II 型整合子结构图

Fig.3 Structure chart of class II integrons

2.3 II 型整合子阳性大肠杆菌的药敏分析

对 28 株 II 型整合子阳性大肠杆菌分离株进行耐药分析,发现均为多重耐药菌,且共有 17 种耐药表型组合,耐药模式多样化(表 3)。其中所有菌株都对甲氧苄氨嘧啶、链霉素和大观霉素耐药,可能与 II 型整合子耐药基因盒发挥相关作用

有关。

2.4 适应性代价分析

根据选择系数 S 值可判断试验菌株的适应性代价,若 $S > 0$,说明菌株适应性良好;若 $S < 0$,则菌株有适应性代价,且绝对值越大适应性代价越大^[17]。如图 4 所示,在无抗 LB 培养条件下,试验菌

表3 28株II型整合子阳性大肠杆菌分离株的耐药谱

Table 3 Drug resistance spectra of 28 class II integron positive *Escherichia coli* isolates

抗生素耐药性	株数
TET-DOX-AMP-CZ-CM-ERY-STR-SPT-ENR-FLO-CHL-PB-TMP	1
TET-DOX-AMP-CZ-CM-MEP-ERY-STR-SPT-ENR-PB-TMP-SZE	2
TET-DOX-AMP-CZ-CM-STR-SPT-ENR-CHL-PB-FUR-TMP-SZE	2
TET-DOX-AMP-CZ-CM-MEP-ERY-STR-SPT-ENR-FUR-TMP	1
TET-CZ-ERY-STR-SPT-ENR-FUR-TMP-SZE	1
TET-DOX-AMP-ERY-STR-SPT-TMP-SZE	3
TET-DOX-AMP-STR-SPT-ENR-FLO-TMP	1
TET-DOX-AMP-ERY-STR-SPT-ENR-TMP	3
AMP-CZ-STR-SPT-CHL-FUR-TMP-SZE	2
AMP-SZ-STR-SPT-FLO-TMP-SZE	3
TET-CZ-ERY-STR-SPT-ENR-TMP	2
AMP-CZ-STR-SPT-TMP-SZE	1
DOX-ERY-STR-SPT-ENR-TMP	2
DOX-AMP-CZ-STR-SPT-TMP	1
AMP-CZ-STR-SPT-TMP	1
TET-AMP-STR-SPT-TMP	1
AMP-STR-SPT-TMP	1

株 LA1 和 LA2 相对于对照菌株 LC 的选择系数 S 依次为 -0.068 ± 0.006 和 -0.117 ± 0.009 , 均小于 0, 表明携带 II 型整合子的大肠杆菌在不含抗生素的环境下存在适应性代价。此外, 试验菌株 LA2 比 LA1 多 1 个 *catB2* 耐药基因盒, 生长速率又下降了 4.9%, 说明基因盒的数量和种类在一定程度上也影响整合子阳性菌株的适应性代价。据文献报道, I 型整合子阳性的大肠杆菌工程菌选择系数 S 在 -0.013 ± 0.002 至 -0.04 ± 0.003 之间, 即大肠杆

菌的生长速率下降在 1.3%~4% 之间, 显著低于 II 型整合子 ($P < 0.05$), 这可能也是环境中 I 型整合子比 II 型整合子数量多且基因盒类型丰富的主要原因之一。

在亚抑制浓度试验中, 因本次分离到的 II 型整合子基因盒以及试验菌株 LA1 和 LA2 均含链霉素耐药基因, 而对照菌株 LC 不含链霉素耐药基因, 故选择链霉素作为亚抑制浓度下竞争试验的代表抗生素。链霉素对对照菌株 LC 的 MIC 值为

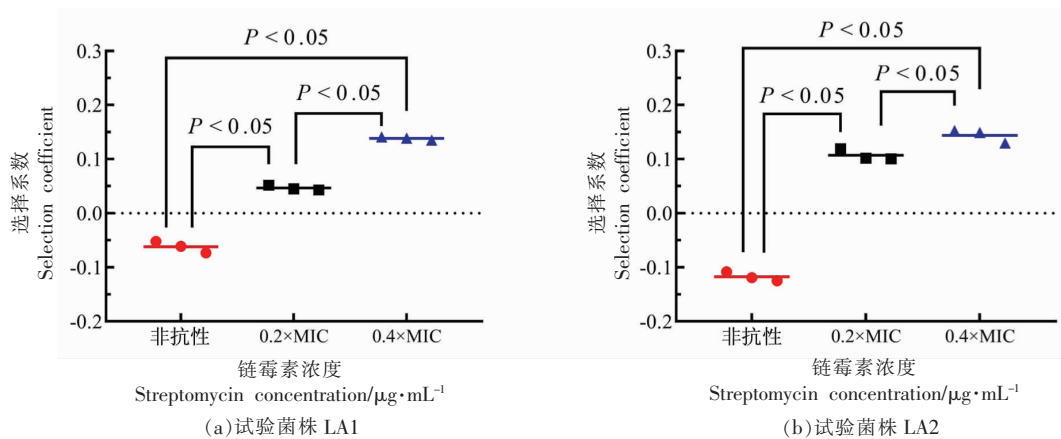
图4 II型整合子阳性大肠杆菌基因工程菌在无抗和抗生素亚抑制浓度下的适应性代价选择系数 S

Fig.4 Fitness cost selection coefficient S of class II integron positive *Escherichia coli* genetically engineered bacteria in the absence of antibiotics and at subinhibitory concentrations of antibiotics

8 $\mu\text{g/mL}$, 以 40% MIC (3.2 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素) 和 20% MIC (1.6 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素) 作为亚抑制浓度值。如图 4 所示, 在抗生素亚抑制浓度 (40% MIC 和 20% MIC) 下, 2 类 II 型整合子的选择系数 S 均大于 0, 适应性良好。在 20% MIC 时, 试验菌株 LA1 的 S 值为 0.047 ± 0.005 , LA2 的 S 值为 0.107 ± 0.010 ; 在 40% MIC 时, 试验菌株 LA1 的 S 值为 0.138 ± 0.003 , LA2 的 S 值为 0.144 ± 0.012 。40% MIC 下的菌株适应性显著好于 20% MIC 下的适应性, 且亚抑制浓度下菌株适应性显著好于无抗条件下的菌株适应性 ($P < 0.05$)。因此, 环境中低浓度抗生素有利于 II 型整合子在宿主菌中的维持和富集, 从而促进其有效应对外界抗生素压力以及在细菌间传播扩散。

3 结论

采集浙江省市售南美白对虾、牡蛎和大黄鱼样品各 200 份, 分离到大肠杆菌 278 株, 其中 28 株携带 II 型整合子且均为多重耐药菌株, 耐药模式多样。对 II 型整合子进行结构分析可得, 整合酶均为缺陷型, 其中 27 个含典型耐药基因盒 *dfrA1-sat2-aadA1*, 1 个含非典型基因盒 *dfrA1-catB2-sat2-aadA1*。此外, 携带 II 型整合子的大肠杆菌工程菌在抗生素亚抑制浓度下选择系数 S 均大于 0, 适应性良好, 然而在无抗环境下均有明显的适应性代价。综上, II 型整合子在水产源大肠杆菌中已有一定比例, 且低浓度抗生素有利于其维持和富集, 从而促进其有效应对外界抗生素压力以及在细菌间的传播扩散。

参 考 文 献

- [1] SÁENZ J, MARQUES T V, BARONE R, et al. Oral administration of antibiotics increased the potential mobility of bacterial resistance genes in the gut of the fish *Piaractus mesopotamicus* [J]. *Microbiome*, 2019, 7: 24.
- [2] LEE K, KIM D W, LEE D H, et al. Mobile resistome of human gut and pathogen drives anthropogenic bloom of antibiotic resistance [J]. *Microbiome*, 2020, 8: 2.
- [3] GILLINGS M R. Integrons: Past, present, and future [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2014, 78(2): 257–277.
- [4] KAUSHIK M, KUMAR S, KAPOOR R K, et al. Integrons in *Enterobacteriaceae*: Diversity, distribution and epidemiology [J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2017, 51(2): 167–176.
- [5] 欧阳润泽, 贺艳艳, 徐海. 细菌整合子中整合酶基因调控的研究进展 [J]. *微生物学报*, 2015, 55(10): 1231–1237.
- [6] OUYANG R Z, HE Y Y, XU H. Advances in integrase regulations of bacteria—A review [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2015, 55(10): 1231–1237.
- [7] 李紫云, 王明钰, 徐海. 细菌 II 型、III 型整合子在耐药性传播中的作用 [J]. *中国抗生素杂志*, 2018, 43(2): 156–162.
- [8] LI Z Y, WANG M Y, XU H. Dissemination on the antimicrobial resistance of bacterial class 2 and 3 integrons [J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2018, 43(2): 156–162.
- [9] MILLAN A S, MACLEAN R C. Fitness costs of plasmids: A limit to plasmid transmission [J]. *Microbiology Spectrum*, 2017, 5(5): 1–12.
- [10] ALVARO S M. Evolution of plasmid-mediated antibiotic resistance in the clinical context [J]. *Trends in Microbiology*, 2018, 26(12): 978–985.
- [11] 刘德俊. 携带 *ermS* 基因畜禽源弯曲菌的流行及适应性机制的研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2017.
- [12] LIU D J. Studies on prevalence and fitness mechanisms of *ermB*-positive *Campylobacter* from livestock and poultry [D]. Beijing: China Agricultural University, 2017.
- [13] 余庭. 虾源大肠杆菌耐药关联 II 型整合子的体外适应性代价研究 [D]. 杭州: 中国计量大学, 2021.
- [14] YU T. Study on the *in vitro* fitness cost of antibiotic resistance-associated class II integron of *Escherichia coli* from *Penaeus vannamei* [D]. Hangzhou: China Jiliang University, 2021.
- [15] CHENG H, JIANG H, FANG J, et al. Antibiotic resistance and characteristics of integrons in *Escherichia coli* isolated from *Penaeus vannamei* at a freshwater shrimp farm in Zhejiang province, China [J]. *Journal of Food Protection*, 2019, 82(3): 470–478.
- [16] YU T, JIANG H, CHENG H, et al. Antimicrobial resistance pattern and characteristics of integrons in *Escherichia coli* strains isolated from aquatic retail

- products in Zhejiang province, China[J]. American Journal of Biochemistry and Biotechnology, 2020, 16(4): 568–578.
- [13] THOMAS J, DA R S, AUORE T, et al. Gene expression in class 2 integrons is SOS-independent and involves two Pc promoters[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1499.
- [14] FANG J, SHEN Y, QU D, et al. Antimicrobial resistance profiles and characteristics of integrons in *Escherichia coli* strains isolated from a large-scale centralized swine slaughterhouse and its downstream markets in Zhejiang, China[J]. Food Control, 2019, 95: 215–222.
- [15] ODUMOSU B T, ADENIYI B A, RAM C. Analysis of integrons and associated gene cassettes in clinical isolates of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* from Southwest Nigeria[J]. Annals of Clinical Microbiology & Antimicrobials, 2013, 12: 29.
- [16] Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[S]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019.
- [17] LACOTTE Y, PLOY M C, RAHERISON S. Class 1 integrons are low-cost structures in *Escherichia coli* [J]. The ISME Journal, 2017, 11(7): 1535–1544.
- [18] HUDDLESTON J R. Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: Potential spread of antibiotic resistance genes[J]. Infection and Drug Resistance, 2014, 7: 167–176.
- [19] PARAOAN C E M, RIVERA W L, VITAL P G. Detection of class I and II integrons for the assessment of antibiotic and multidrug resistance among *Escherichia coli* isolates from agricultural irrigation waters in Bulacan, Philippines[J]. Journal of Environmental Science and Health Part B –Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes, 2017, 52(5): 306–313.
- [20] AMOS G, PLOUMAKIS S, ZHANG L, et al. The widespread dissemination of integrons throughout bacterial communities in a riverine system[J]. The ISME Journal, 2018, 12: 681–691.
- [21] XIA R, REN Y, GUO X, et al. Molecular diversity of class 2 integrons in antibiotic-resistant gram-negative bacteria found in wastewater environments in China[J]. Ecotoxicology, 2013, 22(2): 402–414.
- [22] PARTRIDGE S R, KWONG S M, FIRTH N, et al. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2018, 31(4): e00088.
- [23] LIN M, WU X, YAN Q, et al. Incidence of antimicrobial-resistance genes and integrons in antibiotic-resistant bacteria isolated from eels and aquaculture ponds[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2016, 120(2): 115–123.

Structural Characteristic and Fitness Cost of the Drug-resistant Mobile Genetic Elements— Class II Integrons of *Escherichia coli* from Aquatic Food

Jiao Xue¹, Yu Ting¹, Fang Jiehong¹, Tang Biao², Wang Wen², Jiang Han^{1*}

(¹Key Laboratory of Marine Food Quality and Hazard Controlling Technology of Zhejiang Province, College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018

²State Key Laboratory for Managing Biotic and Chemical Threats to the Quality and Safety of Agro-products & Institute of Agro-product Safety and Nutrition, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021)

Abstract The aim of this study is to analyze the structural characteristic and fitness cost of class II integron, a drug-resistant mobile genetic element of *Escherichia coli* from aquatic food. Each 200 samples of commercially available Pacific white shrimp, oyster and large yellow croaker were collected from Zhejiang Province, and *E. coli* were isolated and identified for analyzing their drug-resistance characteristics and class II integron carriage rates. Then the fitness cost of *E. coli* carrying class II integrons in a non-antibiotic resistant environment and at sub-inhibitory concentrations of antibiotics were compared using competition tests and flow cytometry. The results showed that 28 multidrug-resistant strains of the 278 *E. coli* strains isolated carried class II integrons, all of which contained functionally deficient integrase structures. Of these, 27 contained typical drug-resistance gene cassettes *dfrA1-sat2-aadA1* and one contained an atypical gene cassette

dfrA1-catB2-sat2-aadA1. Under the non-antibiotic condition of LB culture, the selection coefficients S for the above 2 types of class II integrons were -0.068 and -0.117 , respectively, both less than 0, indicating that there is a fitness cost for *E. coli* carrying class II integrons in a non-antibiotic environment. At sub-inhibitory antibiotic concentrations (40% MIC and 20% MIC), the selection coefficients S for the above 2 types of class II integrons were greater than 0 and were well adapted. In conclusion, class II integrons are already present in a certain proportion of *E. coli* from aquatic food. In addition, low concentration of antibiotics is conducive to the maintenance and enrichment of class II integrons, so as to promote the effective response to external antibiotic pressure and spread among bacteria.

Keywords class II integron; fitness cost; *Escherichia coli*; aquatic food