



24株鸡源丁酸梭菌的分离鉴定及耐药基因与毒力基因携带情况

范伟祥¹, 曹艳丽¹, 崔璐璐¹, 逯晓寒¹, 林海^{1,2*}, 孙淑红^{1,2,3*}

¹ 山东农业大学动物科技学院, 山东 泰安 271000

² 山东省动物生物工程与疾病防治重点实验室, 山东 泰安 271000

³ 山东省畜禽疫病防控工程技术研究中心, 山东 泰安 271000

摘要:【目的】旨在对鸡源丁酸梭菌进行分离鉴定与安全性评估。【方法】利用厌氧培养方法对源自汶上芦花鸡与 SPF 鸡粪便样品进行丁酸梭菌的分离与纯化, 挑选可疑菌落进行微生物质谱鉴定, 进一步通过 16S rRNA 基因测序进行鉴定, 16S rRNA 测序结果与 NCBI 核苷酸数据库中丁酸梭菌的 16S rRNA 序列进行同源性分析; 同时, 进行所有分离株对氧氟沙星、头孢吡肟等 9 种药物的药敏试验, 利用 PCR 方法进行 *mefA* 等 23 种耐药基因扩增, 基于益生菌安全要求对样品进行 *alpha* 等 4 种梭菌毒素基因以及 *typeA* 等 4 种肉毒毒素基因的测定。【结果】共分离鉴定了 24 株丁酸梭菌。24 株均对氧氟沙星等 7 种抗生素表现为敏感, L-1、L-6、L-12 仅对新霉素表现为中介, L-19 仅对头孢吡肟表现为中介。全部菌株的 *mefA* 等 16 种耐药基因结果全部为阴性, *sul2*、*flor*、*bla_{TEM}* 3 种耐药基因全部呈阳性, *tetC* 携带率为 79.2%, *cmlA* 携带率为 45.8%, *bla_{OXA}* 携带率为 37.5%, *aadB* 携带率为 12.5%, *qnrA* 携带率为 4.2%。PCR 结果显示所有分离菌株的 *alpha*、*beta*、*epsilon*、*iota* 等 4 种梭菌毒素基因携带率 0%。全部分离菌株均未携带 *typeA*、*typeB*、*typeE*、*typeF* 4 种肉毒毒素基因。【结论】结果表明, 从未饲喂抗生素和丁酸梭菌的汶上芦花鸡与 SPF 鸡群中获得的 24 株丁酸梭菌分离株达到预期的安全性要求, 可作为益生添加剂的筛选参考株。

关键词: 丁酸梭菌, 药敏试验, 耐药基因, 梭菌毒素基因, 肉毒毒素基因

丁酸梭菌归属于梭菌属, 是一种产芽孢、周生鞭毛的革兰阳性菌, 细胞直或稍弯, 内生孢子卵圆, 偏心或次端生, 培养过程中发酵产酸产气^[1]。

丁酸梭菌对各种外界条件的抵抗能力强, 具有耐酸、耐胆盐和耐高温等特性^[2-3]。作为一种常见的人和动物肠道共生细菌, 也经常环境中发现。

基金项目: 国家十三五重点研发计划(2016YFD0500510); 山东省农业重大应用技术创新项目(SD2019XM009); 山东省“双一流”计划(SYL2017YSTD11)

*通信作者。E-mail: 林海, hailin@sdau.edu.cn; 孙淑红, sunshuhong@sdau.edu.cn

收稿日期: 2020-03-01; 修回日期: 2020-05-21; 网络出版日期: 2020-06-08

有文献指出部分丁酸梭菌会产梭菌毒素或肉毒毒素^[4-5],且报道多与 E 型肉毒毒素有关,如携带 *typeE* 丁酸梭菌被认为是婴儿肉毒中毒或早产儿坏死性小肠结肠炎的原因之一^[6]。丁酸梭菌是严格厌氧菌,已有研究表明丁酸梭菌出现耐药性并可能与 E 型肉毒毒素基因有关^[7],非产毒菌株目前在亚洲被用作益生菌^[8],丁酸可增强断奶仔猪肠屏障功能^[9],在国内 2020 年起饲料中禁止添加抗生素^[10]的大环境下,丁酸梭菌在畜禽生产中作为一种益生菌制剂具有良好的应用前景^[11]。依据 Isa 等^[12]对丁酸梭菌 CBM588 进行了 7 毒素基因的安全性评估,以及 FAO/WHO 2006 年颁布的益生菌评价指南^[13]中提出益生菌耐药谱和对人体安全的要求,我们对样品进行了更全面的 8 种毒力基因的 PCR 检测,CBM588 在多次安全评估后于 2014 年获得欧盟批准作为食品原料。目前国内并未对丁酸梭菌进行毒素基因方面的安全性评估,所以仅以产量与抗逆性作为筛选标准可能会将携带毒素基因的菌株误作为益生添加,造成潜在风险。本研究对山东省汶上芦花鸡场与 SPF 鸡场分得的丁酸梭菌进行了耐药、梭菌毒素和肉毒毒素基因方面的安全性评价,分析两家鸡场内丁酸梭菌野株的耐药与毒素基因携带情况,为后续优良菌株的筛选打下基础,旨在保护动物健康。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 样品来源:汶上芦花鸡的新鲜粪样 24 份,来自 9 月龄公母混养鸡群,采用随机采样;SPF 鸡的新鲜粪样 24 份,来自 231 日龄公母混养鸡群,采用随机分样。两家种鸡饲料中均未添加丁酸梭菌及抗生素。丁酸梭菌 A1 株为从市场上某饲用菌

粉中分离得到的菌株。

1.1.2 主要试剂和仪器:强化梭菌培养基(RCM);DNA 提取试剂盒(TIANGEN 生化科技有限公司);抗生素药敏片(杭州微生物试剂有限公司);微生物质谱仪(德国 BRUKER)。

1.2 菌株分离

称取每份采集的粪便样品 5 g 与生理盐水 1:9 比例加入到 50 mL 离心管中配成稀释液,振荡混匀,85 °C 水浴 10 min 后再次振荡,取稀释液 1 mL 与 RCM 培养液以 1:4 比例加入至 5 mL 离心管中,37 °C 厌氧增菌 48 h,再次 85 °C 水浴 10 min,重复 1 次 RCM 增菌,以三线法接种于 RCM 固体培养基,厌氧培养 24 h。

1.3 菌株鉴定

1.3.1 微生物质谱鉴定:挑选菌落边缘不规则的疑似菌落进行微生物质谱鉴定,对经微生物质谱仪鉴定结果为丁酸梭菌的菌落进行纯化增菌。

1.3.2 16S rRNA 鉴定:提取细菌基因组 DNA,16S 通用引物(27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCT CAG-3'; 1492R: 5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3')委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成,对 DNA 进行 16S rRNA 的 PCR 扩增,PCR 反应体系 25 μL: MIX 12.5 μL, ddH₂O 9.5 μL,上下游引物各 1 μL, DNA 模板 1 μL。PCR 反应条件为: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 100 s, 34 个循环; 72 °C 5 min。对 PCR 产物进行测序。16S rRNA 测序结果在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对,记录与分离株比对结果最高的 16S 序列及其频次。

1.4 16S rRNA 基因同源性分析

采用 Megalign 软件的 CLUSTALW 功能将 16S rRNA 测序结果与 NCBI 核苷酸数据中比对频

次高的丁酸梭菌 16S 序列: KP944151.1 (脓, 中国北京, 2015)、KC195777.1 (沼气污泥, 中国, 2013)、MK156151.1 (海洋沉积, 中国, 2018)、MK764959.1 (中国, 2019) HQ830243.1 (稻田, 新加坡, 2011) 进行同源性分析。

1.5 药敏试验

选用 9 种对革兰阳性菌有效的抗生素药敏片: 氧氟沙星、头孢吡肟、青霉素 G、新霉素、呋喃妥因、氟苯尼考、红霉素、万古霉素、四环素, 以无菌棉签将增菌 24 h 的菌液均匀涂布于 RCM 固体培养基上, 每个 20 mL 培养基上等距离贴三种药敏纸片, 培养基 37 °C 厌氧培养 24 h 后量取抑菌圈直径, 判定参考说明。

1.6 耐药基因测定

选用不同种类抗生素耐药基因引物(大环内酯类^[14]: *ermB*、*mefA*、*mrsD*, 多肽类^[15]: *vanA*、*vanB*、*vanC1*, 四环素类: *tetC*、*tetD*、*tetE*、*tetG*, 磺胺类: *sul1*、*sul2*、*sul3*, 酰胺醇类: *cmlA*、*flor*, β -内酰胺类: *bla_{PSE}*、*bla_{TEM}*、*bla_{SHV}*、*bla_{OXA}*, 喹诺酮类: *qnrS*、*qnrA*、*oqxA*, 氨基糖苷类: *aac(3)-Ia*、*aadB*, 共 24 种耐药基因), 进行 PCR 检测, 以 ddH₂O 为阴性对照。*sul1*、*bla_{SHV}*、*bla_{OXA}* 参考文献[16], 引物委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 引物序列及退火温度见表 1。

1.7 梭菌毒素基因的测定

依据 CBM588 安全评估以及 FAO/WHO2006 年颁布的益生菌评价指南, 选用 4 种梭菌毒素引物对分离菌株, 进行 PCR 检测以进行安全性评估, 4 种梭菌毒素基因分别为: *alpha* 毒素蛋白基因(*CPA*)、*beta* 毒素蛋白基因(*CPB*)、*epsilon* 毒素蛋白基因(*CPE*)、*iota* 毒素蛋白基因(*CPI*), A1 为参

考, 以 ddH₂O 为阴性对照。引物委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 引物序列及退火温度^[17]见表 2。阳性结果的 PCR 扩增产物委托上海生工进行测序, 进一步鉴定。

1.8 肉毒毒素基因的测定

依据 CBM588 安全评估, 选用 4 种肉毒毒素基因: A 型肉毒毒素基因(*typeA*)、B 型肉毒毒素基因(*typeB*)、E 型肉毒毒素基因(*typeE*)、F 型肉毒毒素基因(*typeF*), 以 PCR 方法对分离株与 A1 进行两类毒力基因的测定, 以 ddH₂O 阴性对照。引物委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 引物序列及退火温度^[12,18]见表 3。

2 结果和分析

2.1 菌株的鉴定

2.1.1 微生物质谱仪鉴定: 经微生物质谱鉴定结果显示分离到 24 株丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*), 部分菌株鉴定结果如表 4 示。

2.1.2 16S rRNA 鉴定结果: BLAST 结果显示 24 株分离株均为丁酸梭菌, 其中汶上芦花鸡场分离到 21 株, SPF 鸡场分离到 3 株, 统计比对结果最高的 NCBI ACCESSION VERSION 与频次如表 5 所示。

2.2 菌株的培养特征

对分离到的 24 株丁酸梭菌, 汶上芦花鸡源分离株分别标记为 L-1-L-21, SPF 鸡源分离株分别标记为 S-22-S-24。菌株培养产物有臭味, 菌落形态呈不规则, 菌落颜色在 RCM 培养基呈白色到黄白色, 表面光滑, 部分分离株如图 1 所示。

表 1. 耐药基因引物及退火温度
Table 1. Primer and annealing temperature of resistance gene

Resistance	Gene	Sequence (5'→3')	Fragment/bp	Annealing temp./°C
Macrolides	<i>mefA</i>	F: AGTATCATTAATCACTAGTGC R: TTCTTCTGGTACTAAAAAGT	348	53
	<i>ermB</i>	F: GAAAAGGATCTCAACCAAATA R: AGTAACGGTACTTAAATTGTTT	639	53
	<i>mrsD</i>	F: GCCTTCCGGAGCTCCTACTT R: GCGTCCAATGTATCTCTAT	500	53
Tetracyclines	<i>tetC</i>	F: GCTGTAGGCATAGGCTTGGTTA R: CGCTCTCCCTTATGCGACTC	515	60
	<i>tetD</i>	F: GTTGCGGCTTCGGTAGTGG R: CTGCGCTTCTTGTCTCTCGT	256	60
	<i>tetE</i>	F: CGGCGTTATTACGGGAGTTT R: CCAGCTTGTGTAATGACCGC	821	60
	<i>tetG</i>	F: CTGCTGATCGTGGGTCTTGA R: GCTTGGAAGATCGCATGTGTT	761	60
Peptides	<i>vanA</i>	F: GTAGGCTGCGATATTCAAAGC R: CGATTCAATTGCGTAGTCCAA	231	56
	<i>vanB</i>	F: GTAGGCTGCGATATTCAAAGC R: GCCGACAATCAAATCATCCTC	330	56
	<i>vanC1</i>	F: TGGTATTGGTATCAAGGAAACC R: AGATTGGAGCGCTGTTTTGTC	447	56
Sulfa	<i>sul1</i>	F: CTTTCGATGAGAGCCGGCGG C R: GCAAGGCGGAAACCCGCGCC	238	58
	<i>sul2</i>	F: CGGCATCGTCAACATAAC C R: GTGTGCGGATGAAGTCAG	722	60
	<i>sul3</i>	F: CATTCTAGAAAACAGTCGTAGTTCG R: CATCTGCAGCTAACCTAGGGCTTTGGA	990	50
Amide alcohols	<i>cmlA</i>	F: GCTGCTACTCCCCGTTAAGTG R: GCGACACCAATACCCACTAGC	351	60
	<i>flor</i>	F: GGTGATTTTTGGTCCGCTCTC R: CGGACACCGTGAAGACAATACC	779	60
β-lactams	<i>bla_{TEM}</i>	F: CAACATTTTCGTGTCGCC T R: TTATCCGCCTCCATCCAGTCT	629	60
	<i>bla_{PSE}</i>	F: GCGTGCTTCGCAACTATGACT R: GCCATTGAAGCCTGTGTTTGA	449	60
	<i>bla_{SHV}</i>	F: TTATCTCCCTGTTAGCCACC R: GATTTGCTGATTTGCTCGG	150	57
	<i>bla_{OXA}</i>	F: TCAACTTTCAAGATCGCA R: GTGTGTTTAGAATGGTGA	591	50
Quinolones	<i>qnrA</i>	F: ATTTCTCACGCCAGGATTTG R: GATCGGCAAAGGTTAGGTCA	516	53
	<i>qnrS</i>	F: ACGACATTCGTCAACTGCAA R: TAAATTGGCACCCCTGTAGGC	469	53
	<i>oqxA</i>	F: GATCAGTCAGTGGGA TAGTTT R: TACTCGGCGTTAACTGATTA	670	55
Aminoglycosides	<i>Aac(3)-Ia</i>	F: AAGTATGGGCATCATTGCGAC R: CAATGACGCTTAGCACCTCTGA	897	60
	<i>aadB</i>	F: GGACACAACGCAGGTCACATT R: ACGCAAGACCTCAACCTTTTC	502	60

表 2. 梭菌毒素引物序列及退火温度

Table 2. Primer sequence and annealing temperature of clostridium toxin

Clostridium toxin gene	Sequence	Fragment/bp	Annealing temp./°C
<i>CPA</i>	F: GTTGATAGCGCAGGACATGTTAAG R: CATGTAGTCATCTGTTCCAGCATC	402	55
<i>CPB</i>	F: ACTATACAGACAGATCATTCAACC R: TTAGGAGCAGTTAGAACTACAGAC	236	55
<i>CPE</i>	F: ACTGCAACTACTACTCATACTGTG R: CTGGTGCCTTAATAGAAAGACTCC	541	55
<i>CPI</i>	F: GCGATGAAAAGCCTACACCACTAC R: GGTATATCCTCCACGCATATAGTC	317	55

表 3. 肉毒毒素基因引物及退火温度

Table 3. Botox gene primers and annealing temperature

Botulinum neurotoxin gene	Sequence	Fragment/bp	Annealing temp./°C
<i>typeA</i>	F: AGCTACGGAGGCAGCTATGTT R: CGTATTTGAAAGCTGAAAAGG	782	60
<i>typeB</i>	F: CAGGAGAAGTGGAGCGAAAA R: CTTGCGCCTTTGTTTTCTTG	205	60
<i>typeE</i>	F: CCAAGATTTTCATCCGCCTA R: GCTATTGATCCAAAACGGTGA	389	60
<i>typeF</i>	F: CGGCTTCATTAGAGAACGGA R: TAACTCCCCTAGCCCCGTAT	543	60

表 4. 部分分离菌株质谱鉴定结果

Table 4. Identification results of partially isolated strains by mass spectrometry

Analyte name	Organism (best match)	Score value	Organism(second best match)	Score value
L-1(++)	<i>Clostridium butyricum</i>	2.171	<i>Clostridium butyricum</i>	2.150
L-13(++)	<i>Clostridium butyricum</i>	2.227	<i>Clostridium butyricum</i>	2.219
L-14(++)	<i>Clostridium butyricum</i>	2.145	<i>Clostridium butyricum</i>	2.113

--: score value 0.000–1.699; +: 1.700–1.999 is; ++: 2.000–2.299; +++: 2.300–3.000.

表 5. 部分丁酸梭菌菌株 16S rRNA 序列 BLAST 结果

Table 5. Results of BLAST of the 16S rRNA sequence of some strains of *Clostridium butyricum*

NCBI version	Source	Country	Wen shang reed chicken farm	SPF
KP944151.1	Pus	China	7	1
KC195777.1	Biogas sludge	China	6	–
MK156151.1	Marine deposit	China	5	1
MK764959.1	–	China	1	1
HQ830243.1	Rice field	Singapore	2	–

--: not detected.

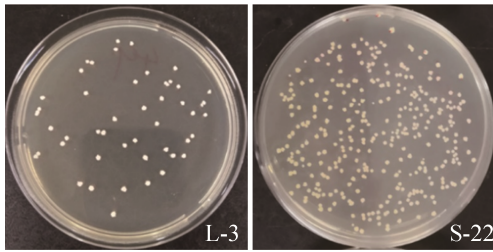


图 1. 丁酸梭菌分离株菌落形态

Figure 1. Characteristics of *Clostridium butyricum* strain. Colony forms are irregular, colony color in RCM medium white to yellowish white, the surface is smooth.

2.3 同源性分析

部分丁酸梭菌菌株与 KP944151.1、KC195777.1、HQ30243.1、MK156151.1、MK764959.1 同源性分析如图 2 所示, 结果表明丁酸梭菌在同源性上与地理源没有明显相关性。

2.4 药敏试验结果

17 株汶上芦花鸡场分离得到的丁酸梭菌与 3 株

		Percent identity																							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22		
Divergence	1	■	92.2	91.5	80.8	86.9	87.6	87.3	88.6	88.0	88.3	88.0	87.7	88.4	88.1	87.8	88.5	89.0	90.2	91.8	88.5	88.4	88.8	1	HQ830243.1
	2	0.8	■	97.9	73.6	93.3	93.7	80.2	94.5	93.9	94.5	94.0	93.7	94.2	80.9	94.4	93.9	95.2	97.0	98.6	94.7	94.4	94.7	2	KC195777.1
	3	1.0	1.4	■	73.0	92.7	93.2	79.7	94.0	93.5	94.4	93.6	93.2	93.6	80.3	93.9	93.8	94.9	97.8	98.7	94.2	94.1	94.2	3	KP944151.1
	4	0.1	0.1	0.1	■	74.9	75.7	89.4	75.2	75.6	74.4	75.0	74.3	74.9	91.0	74.6	75.2	75.5	71.5	73.1	75.5	75.3	74.8	4	L-3
	5	2.7	3.2	3.0	0.0	■	96.9	81.5	97.3	96.7	95.7	96.0	95.7	97.1	81.6	96.2	95.5	96.0	91.3	93.1	96.2	96.2	96.5	5	L-5
	6	2.4	2.8	2.6	0.1	1.6	■	81.4	97.3	98.3	96.1	96.4	96.0	96.9	82.5	97.1	96.3	97.6	91.6	93.3	97.2	97.8	96.3	6	L-7
	7	2.2	2.1	2.0	0.2	0.4	0.7	■	80.9	81.1	82.0	81.1	81.1	80.8	96.9	80.8	81.6	81.1	78.3	79.8	81.0	82.3	81.1	7	L-9
	8	2.1	2.8	2.6	0.0	1.3	1.3	0.4	■	97.4	96.5	96.0	95.7	97.8	81.9	96.5	96.0	97.1	92.4	94.2	96.4	96.9	97.4	8	L-10
	9	2.3	2.9	2.6	0.1	2.0	0.7	1.0	1.3	■	96.7	96.7	96.4	97.2	82.6	96.9	96.7	98.2	91.8	93.6	96.9	97.8	96.2	9	L-11
	10	3.5	3.7	3.1	0.2	1.7	1.6	0.9	1.5	1.3	■	96.9	95.2	96.4	82.3	96.0	95.5	96.5	92.7	94.4	96.0	97.5	96.7	10	L-12
	11	2.8	3.3	3.0	0.2	1.8	2.2	1.2	1.8	2.1	1.6	■	95.5	96.2	83.2	95.9	95.3	97.4	92.1	93.8	96.7	97.5	96.6	11	L-13
	12	2.0	2.6	2.4	0.0	2.0	2.0	0.5	2.1	2.0	2.3	2.5	■	96.3	81.7	95.7	96.3	96.0	91.6	93.4	95.5	95.8	94.9	12	L-14
	13	1.9	2.6	2.6	0.0	1.1	1.4	0.5	1.2	1.4	1.6	1.7	1.7	■	82.1	96.3	96.7	96.5	92.0	93.8	96.1	96.0	97.3	13	L-15
	14	1.3	1.2	1.3	0.0	1.1	1.2	1.1	0.7	1.1	0.7	0.7	0.8	0.6	■	81.9	82.3	83.1	79.1	80.6	82.7	83.0	82.2	14	L-16
	15	2.7	3.1	3.0	0.3	1.7	1.0	1.0	1.4	1.0	1.6	2.0	1.7	1.5	1.1	■	96.0	96.9	92.6	94.1	97.1	96.8	96.0	15	L-18
	16	2.6	3.4	3.0	0.0	2.0	1.7	0.7	2.0	1.5	2.1	2.3	1.4	1.3	1.0	2.0	■	96.0	92.2	93.8	95.3	96.0	95.8	16	L-19
	17	1.8	2.0	1.7	0.0	2.1	1.2	0.9	1.3	1.2	1.7	1.9	2.0	1.7	0.5	1.0	1.8	■	93.2	95.0	97.6	98.0	96.3	17	L-21
	18	0.8	0.9	1.0	0.0	2.9	2.6	2.0	2.6	2.7	3.3	3.0	2.3	2.5	1.1	2.8	3.1	1.8	■	98.0	92.7	92.4	92.7	18	MK156151.1
	19	0.8	1.0	1.1	0.0	2.9	2.7	1.9	2.6	2.8	3.4	3.1	2.4	2.6	1.1	3.1	3.1	1.9	0.6	■	94.3	94.2	94.5	19	MK764959.1
	20	1.8	2.6	2.4	0.1	2.4	1.7	1.3	1.6	1.6	1.9	2.2	2.0	1.9	0.6	1.1	2.5	1.1	2.3	2.5	■	97.2	95.8	20	S-22
	21	2.7	3.2	2.8	0.1	1.6	0.8	0.5	0.9	0.7	1.2	1.7	1.8	1.4	0.8	0.9	1.4	1.0	2.9	3.0	1.6	■	96.9	21	S-23
	22	2.5	3.1	2.9	0.2	1.0	1.8	0.8	1.3	2.0	1.7	1.9	2.5	1.1	1.2	1.9	2.3	1.9	2.8	2.9	2.3	1.6	■	96.9	22
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22		

图 2. 部分菌株同源性分析

Figure 2. Homology analysis of some strains.

SPF 鸡场分得的丁酸梭菌的药敏试验中对氧氟沙星、头孢吡肟、青霉素 G、新霉素、呋喃妥因、氟苯尼考、红霉素、万古霉素、四环素全部表现为敏感。L-1、L-6、L-12 仅对新霉素表现为中介, 抑菌圈直径分别为 16、15、16 mm, 对其他药物均表现为敏感; L-19 仅对头孢吡肟表现为中介, 抑菌圈直径为 16 mm, 对其他药物表现为敏感。部分菌株药敏试验结果如图 3 所示, 统计情况如图 4 所示。

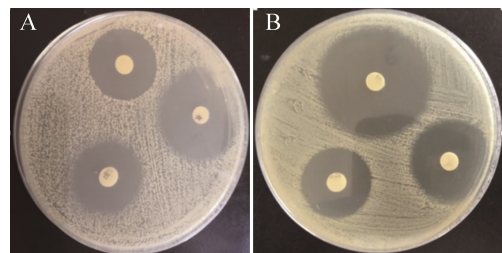


图 3. 部分丁酸梭菌分离株的药敏试验图片

Figure 3. Photo of *Clostridium butyricum* antibiotic sensitivity test: L-4 (A) and L-6 (B).

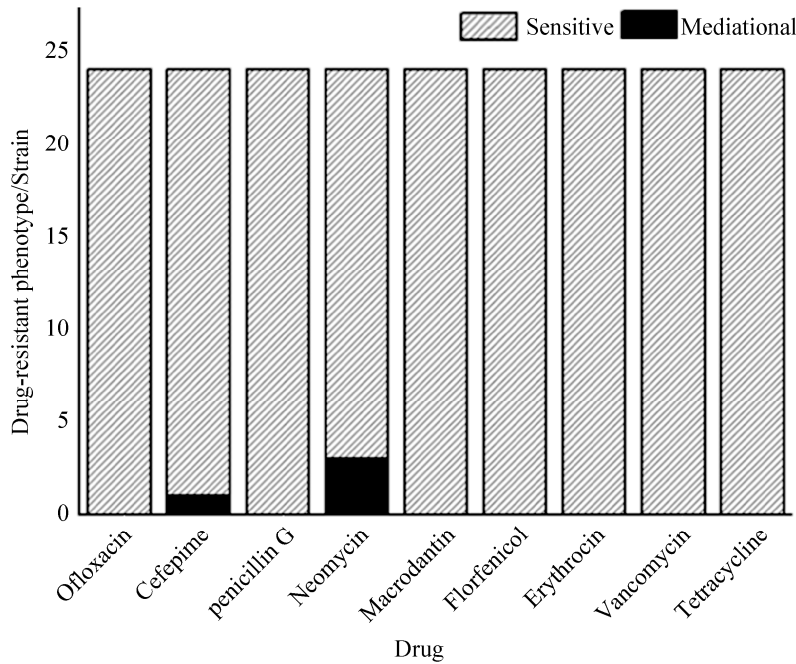


图 4. 24 株丁酸梭菌药敏试验结果统计

Figure 4. Statistical results of antibiotic sensitivity test for 24 strains of *Clostridium butyricum*. One strain of cefepime was intermediate, three strains of neomycin were intermediates, the rest are intermediary.

2.5 耐药基因结果

PCR 结果显示 24 株丁酸梭菌均不携带 *ermB*、*mefA*、*mrsD*、*vanA*、*vanB*、*vanC1*、*tetD*、*tetE*、*tetG*、*sul1*、*sul3*、*bla_{PSE}*、*bla_{SHV}*、*qnrS*、*oqxA*、*aac(3)-Ia* 16 种耐药基因。24 株丁酸梭菌全部携带有磺胺类的 *sul2*、酰胺醇类的 *flor* 以及 β-内酰胺类的 *bla_{TEM}* 3 种耐药基因；5 种耐药基因结果显示为不同程度的携带，其中 *tetC* 有 19 株呈阳性，携带率为 79.2%，*cmlA* 有 11 株呈阳性，携带率为 45.8%，*bla_{OXA}* 有 9 株携带，携带率为 37.5%，*aadB* 有 3 株呈阳性，携带率为

12.5%，*qnrA* 有 1 株呈阳性，携带率为 4.2%，具体阳性株见表 6。

2.6 梭菌毒素基因结果

PCR 结果显示，汶上芦花鸡源与 SPF 鸡源的所有 24 株丁酸梭菌均不携带 *alpha*、*beta*、*epsilon*、*iota* 4 种梭菌毒素基因中的任何一种，而从市场上某饲用菌粉中分离到的丁酸梭菌 A1 的 *alpha*(α)毒素蛋白基因的 PCR 结果显示为阳性，且片段长度符合目的条带，如图 5 所示。A1 PCR 扩增产物测序后在 GenBank 中进行 BLAST，与 α 毒素蛋白基因同源性为 99.43% (图略)。

表 6. 不同程度携带耐药基因的菌株

Table 6. Strains carrying resistance genes to varying degrees

Gene	L-1	L-2	L-3	L-4	L-5	L-6	L-7	L-8	L-9	L-10	L-11	L-12	L-13	L-14	L-15	L-16	L-17	L-18	L-19	L-20	L-21	S-22	S-23	S-24	Negative
<i>tetC</i>	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
<i>cmlA</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
<i>bla_{OXA}</i>	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>aadB</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>qnrA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: carrying resistance genes; -: not carrying resistance genes.

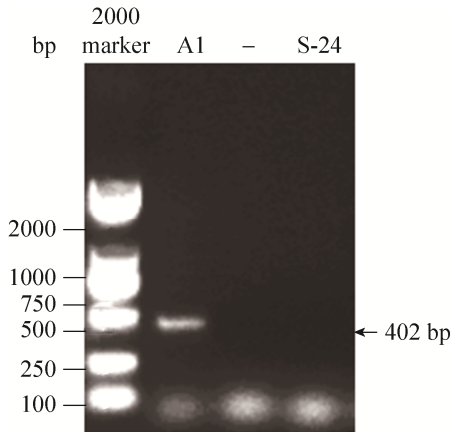


图 5. *CPA* 基因 PCR 检测结果

Figure 5. PCR test results of *CPA* gene. The reference strain of *Clostridium butyricum* were positive, *Clostridium butyricum* isolates were negative. A1 is a strain isolated from a feeding powder on the market.

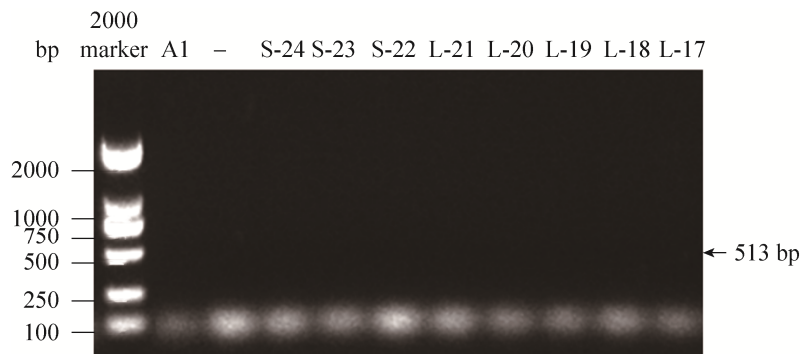


图 6. *typeE* 肉毒毒素基因 PCR 检测结果

Figure 6. Results of PCR detection of *typeE* botulinum toxin gene. PCR showed that both samples and A1 were negative.

16S rRNA 测序结果表明,SPF 鸡场的 3 株丁酸梭菌之间差异较显著,汶上芦花鸡场的 21 株丁酸梭菌之间的差异参差不齐,表明即使在同一鸡场中,丁酸梭菌也会表现出差异。易至等^[20] 2020 年发表的论文中采用比较基因组学的方法,发现宿主源和地理来源与丁酸梭菌的系统进化没有明显的相关性;本研究基于 16S rRNA 序列对丁酸梭菌分离株的同源性分析结果显示,宿主

2.7 肉毒毒素基因结果

PCR 结果表明,24 株分离得的丁酸梭菌不携带 *typeA*、*typeB*、*typeE*、*typeF* 4 种肉毒毒素基因中的任何一种, *typeE* PCR 结果见图 6。

3 讨论

本研究从汶上芦花鸡场与 SPF 鸡场分得的丁酸梭菌在 RCM 固体培养基上呈现为大小不等的白色到黄白色、边缘不规则菌落,这与目前研究^[19] 中丁酸梭菌的菌落特征相符。16S rRNA 鉴定结果与质谱鉴定结果一致,表明质谱与 16S rRNA 均可以快速准确地完成丁酸梭菌鉴定。

源和地理来源与丁酸梭菌的系统进化无明显相关性,与前者结果相符。为进行优良菌株筛选提供更多具有个性的选择。其中, L-17 与 KP944151.1 相似性最高,为 96.64%,樊晓璐等^[21] 研究中丁酸梭菌与 CP016332.1 的梭菌属菌株的相似性为 100%,廖秀冬分离的丁酸梭菌相似性最高为 99%^[22]。

本次试验中丁酸梭菌分离株在耐药方面差异

不大。3 株 SPF 源丁酸梭菌对所有药物均表现敏感；汶上芦花鸡场中仅 4 株菌株存在对 2 种抗生素的中介。易至等^[20]研究中受试菌株对万古霉素表现同样为敏感，但对四环素表现出了抗性。高文文等^[19]研究中丁酸梭菌对青霉素有抗性，对红霉素中介，而此次分离得到的丁酸梭菌对青霉素 G 和红霉素均表现为敏感；在四环素、万古霉素结果相同为敏感。王腾浩等^[23]研究中，丁酸梭菌对新霉素有抗性，对青霉素、红霉素、氧氟沙星表现为中介。本研究 24 株丁酸梭菌中，3 株汶上芦花鸡源分离株对新霉素表现中介；对青霉素、红霉素、氧氟沙星表现敏感；在万古霉素、四环素表现敏感。Kaneko 等研究结果表明分得的丁酸梭菌对选用的 20 种抗生素中的 17 种不具有耐药性^[24]。而 Ferraris 等从早产儿粪便分得的丁酸梭菌对万古霉素与此次试验结果都表现为敏感，但其表现出青霉素 G(15%)、四环素(7.5%)的耐药^[25]。从药敏试验结果来看，证实汶上芦花鸡不饲用抗生素，与本研究前期调查结果一致，SPF 鸡场也一定不使用抗生素。*sul2*、*flor*、*bla_{TEM}* 三种耐药基因在菌株中携带率为 100%。董睿从鸡蛋源分离的沙门菌 *flor* 携带率为 100%^[26]，试验结果与 *flor* 耐药基因目前只发现存在于革兰阴性菌^[27]不符；近些年多种细菌的 *sul2* 耐药基因有较高携带率，李晴分离的大肠杆菌耐药基因中 *bla_{TEM}* 携带率为 100%^[28]。5 种不同程度携带的耐药基因 *tetC*、*cmlA*、*bla_{OXA}*、*aadB*、*qnrA* 的来源以及是否会转移有待研究，易至等^[20]就其研究中的四环素抗性结果提出丁酸梭菌可能携带有 *tet* 耐药基因，而本研究耐药基因检测结果显示 *tetC* 携带率为 79.2% 与其推论基本相符，但本研究中受试菌株对四环素未表现出耐药。*sul2*、*flor*、*bla_{TEM}* 等 3 种耐药

基因，尤其 *flor* 是否能表达并发挥作用还需进一步验证。目前由于丁酸梭菌作为益生菌的广泛应用，本研究揭示，未来丁酸梭菌的筛选与使用上应避免作为其成为耐药基因的储存库，以减少有害菌获得新耐药基因的几率。

本研究分离鉴定的 24 株丁酸梭菌均未发现携带 *alpha*、*beta*、*epsilon*、*iota* 等 4 种梭菌毒素基因，但发现市场上某饲用菌粉中分离得到的菌株 A1 中携带 *alpha* 毒素蛋白基因。Sulthana 等^[29]在健康人粪便中未分离到携带梭菌毒素的丁酸梭菌，Isa 等^[17]在对丁酸梭菌标准株 CMB588 的梭菌内也未发现梭菌毒素基因。梭菌毒素基因的检测结果初步表明本研究 24 株丁酸梭菌比市场上的部分产品更具安全性。

已有研究表明肉毒毒素基因可通过质粒转移到梭菌中^[30]，目前针对丁酸梭菌携带毒素基因的研究也以肉毒毒素基因为主。肉毒毒素基因鉴定结果显示，本研究 24 株丁酸梭菌均未携带肉毒毒素基因，这与 Ghodduzi 等^[31]从土壤等多处分离得的 93 株丁酸梭菌中筛选携带 E 型肉毒毒素基因的研究结果一致(在 93 个被检测的分离株中，均未发现 *typeE* 的存在)；本研究的 24 株分离株的肉毒毒素基因携带率为 0%，表明不会产生 *typeA*、*typeB*、*typeE* 或 *typeF* 肉毒毒素，也进一步验证了本研究 24 株丁酸梭菌的安全性。

4 结论

结果表明，从未饲喂抗生素和丁酸梭菌的汶上芦花鸡与 SPF 鸡获得的 24 株丁酸梭菌分离株达到预期的安全性要求，可作为益生添加菌的筛选参考株。

参考文献

- [1] 布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰细菌鉴定手册. 第8版. 北京: 科学出版社, 1984: 776–780.
- [2] Xie LJ, Wang L, Wang WH, Wang HK, Zhang RW. Antimicrobial activity and stress resistance of superior *Clostridium butyricum* LXYB-2. *China Brewing*, 2018, 37(6): 91–96. (in Chinese)
谢丽静, 王丽, 王伟华, 王海宽, 张仁文. 丁酸梭菌优良菌株 LXYB-2 抑菌活性及抗逆性研究. *中国酿造*, 2018, 37(6): 91–96.
- [3] 贾丽楠. 丁酸梭菌抗逆性能及其对肉仔鸡益生性能的体外研究. 河北农业大学硕士学位论文, 2018.
- [4] Wang XM, Maegawa T, Karasawa T, Kozaki S, Tsukamoto K, Gyobu Y, Yamakawa K, Oguma K, Sakaguchi Y, Nakamura S. Genetic analysis of type E botulinum toxin-producing *Clostridium butyricum* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(11): 4992–4997.
- [5] Fencia L, Franciosa G, Pourshaban M, Aureli P. Intestinal toxemia botulism in two young people, caused by *Clostridium butyricum* type E. *Clinical Infectious Diseases*, 1999, 29(6): 1381–1387.
- [6] Aureli P, Fencia L, Pasolini B, Gianfranceschi M, McCroskey LM, Hatheway CL. Two cases of type E infant botulism caused by neurotoxicogenic *Clostridium butyricum* in Italy. *Journal of Infectious Diseases*, 1986, 154(2): 207–211.
- [7] Camerini S, Marcocci L, Picarazzi L, Iorio E, Ruspantini I, Pietrangeli P, Crescenzi M, Franciosa G. Type E botulinum neurotoxin-producing *Clostridium butyricum* strains are aerotolerant during vegetative growth. *mSystems*, 2019, 4(2): e00299–18.
- [8] Cassir N, Benamar S, La Scola B. *Clostridium butyricum*: from beneficial to a new emerging pathogen. *Clinical Microbiology and Infection*, 2016, 22(1): 37–45.
- [9] Li HH, Li YP, Zhu Q, Qiao JY, Wang WJ. Dietary supplementation with *Clostridium butyricum* helps to improve the intestinal barrier function of weaned piglets challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. *Journal of Applied Microbiology*, 2018, 125(4): 964–975.
- [10] In 2020, the feed end of the total ban, feed enterprises and breeding enterprises how to deal with? *Jiangxi Feed*, 2018, (3): 50–51. (in Chinese)
2020 年饲料端全面禁抗, 饲料企业和养殖企业该如何应对? *江西饲料*, 2018, (3): 50–51.
- [11] He JJ, Yang XJ, Meng QX, Liu BX, Xie XX. Research progress and prospect of *Clostridium butyrate* in livestock production. *Feed and Husbandry*, 2019, (11): 52–57. (in Chinese)
何家俊, 杨昕润, 孟庆翔, 刘宝祥, 解祥学. 丁酸梭菌在畜牧生产上的研究进展及展望. *饲料与畜牧*, 2019, (11): 52–57.
- [12] Isa K, Oka K, Beauchamp N, Sato M, Wada K, Ohtani K, Nakanishi S, McCartney E, Tanaka M, Shimizu T, Kamiya S, Kruger C, Takahashi M. Safety assessment of the *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588® probiotic strain including evaluation of antimicrobial sensitivity and presence of *Clostridium* toxin genes *in vitro* and teratogenicity *in vivo*. *Human & Experimental Toxicology*, 2016, 35(8): 818–832.
- [13] FAO/WHO. Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation. FAO Food and Nutritional paper No.85, 2006.
- [14] Guan L, Wang DD, Zhu HD, Zhou JM, Sun K, Lv LX, Yu ZY, He KW, Li B, Ni YX. Analysis of drug resistance and resistance gene of *Streptococcus suis* serotype 9 isolates. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2019, 35(11): 1015–1020. (in Chinese)
关琳, 王丹丹, 祝昊丹, 周俊明, 孙珂, 吕立新, 俞正玉, 何孔旺, 李彬, 倪艳秀. 猪链球菌 9 型分离株的耐药性及耐药基因分析. *中国人兽共患病学报*, 2019, 35(11): 1015–1020.
- [15] Cheng C, Tan ZW, Liu YM, Zong S, Jiang F, Xie SS, Gu B. Genotype and analysis of drug resistance for vancomycin resistant enterococci. *Chinese Journal of Clinical Laboratory Science*, 2019, 37(7): 504–507. (in Chinese)
程晨, 谭枝微, 刘颖梅, 纵帅, 姜飞, 谢硕硕, 顾兵. 耐万古霉素肠球菌基因分型及耐药性分析. *临床检验杂志*, 2019, 37(7): 504–507.
- [16] 杨杰. 鸭源沙门菌流行特点及耐药特点分析. 山东农业大学硕士学位论文, 2019.
- [17] Yoo HS, Lee SU, Park KY, Park YH. Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of *Clostridium perfringens* types by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, 35(1): 228–232.
- [18] Lindström M, Keto R, Markkula A, Nevas M, Hielm S, Korkeala H. Multiplex PCR assay for detection and identification of *Clostridium botulinum* types A, B, E, and F

- in food and fecal material. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(12): 5694–5699.
- [19] Gao WW, Shang JC, Zhou X, Fan XP, Li XR, Zhao A, Zhao PH, Zhao L, Meng XC. Isolation and identification of a strain of *Clostridium butyricum* with high yield of butyric acid and its biological characteristics. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(7): 82–88, 101. (in Chinese)
高文文, 尚佳萃, 周雪, 范小飘, 李欣芮, 赵桢, 赵鹏昊, 赵乐, 孟祥晨. 一株高产丁酸的丁酸梭菌分离鉴定及其生物学性质研究. *食品工业科技*, 2020, 41(7): 82–88, 101.
- [20] Yi Z, Ding JQ, Wang HC, Lu WW, Zhao JX, Chen W, Zhang H. Genetic diversity and biological characteristics of *Clostridium butyricum* based on comparative genomics. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(10): 1–7. (in Chinese)
易至, 丁洁琼, 王鸿超, 陆文伟, 赵建新, 陈卫, 张灏. 基于比较基因组学的丁酸梭菌遗传多样性及生物学特性. *食品与发酵工业*, 2020, 46(10): 1–7.
- [21] Fan XL, Zhang WL, Wu YR, Zou Y, Li N. Isolation and identification of *Clostridium butyricum* and study of its basic characteristics. *Liquor-Making Science & Technology*, 2017, (11): 31–37. (in Chinese)
樊晓璐, 张苇莉, 吴幼茹, 邹毅, 李楠. 丁酸梭菌的分离、鉴定与基本特性研究. *酿酒科技*, 2017, (11): 31–37.
- [22] 廖秀冬. 丁酸梭菌的筛选及其对动物抗氧化能力和肉鸡肉品质影响的研究. 中国农业大学博士学位论文, 2015.
- [23] Wang TH, Zong X, Song DG, Wang YZ. Screening, identification and *in vitro* functional study of *Clostridium butyricum* which produce antimicrobial protein. *Chinese Journal of Animal Science*, 2015, 51(13): 75–81. (in Chinese)
王腾浩, 宗鑫, 宋德广, 汪以真. 产抑菌蛋白的丁酸梭菌的筛选和鉴定及体外益生功能研究. *中国畜牧杂志*, 2015, 51(13): 75–81.
- [24] Kaneko N, Nakayama T, Ichikawa N. Susceptibility of spore-forming butyric acid bacteria to antimicrobial agents. *Yakugaku Zasshi*, 2012, 132(7): 849–853.
- [25] Ferraris L, Butel MJ, Aires J. Antimicrobial susceptibility and resistance determinants of *Clostridium butyricum* isolates from preterm infants. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2010, 36(5): 420–423.
- [26] 董睿. 鸡蛋源沙门菌的分离鉴定及其耐药基因和毒力基因的检测. 西北农林科技大学硕士学位论文, 2012.
- [27] Wu FD. Florfenicol resistance and sequence analysis of *floR* gene in different bacteria. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2019, 35(2): 122–126. (in Chinese)
吴方达. 不同菌属的氟苯尼考耐药特点及 *floR* 基因的序列分析. *中国农学通报*, 2019, 35(2): 122–126.
- [28] 李晴. 污水产 ESBL 大肠杆菌水平传递耐药性的研究. 山东农业大学硕士学位论文, 2018.
- [29] Sulthana A, Thorramamidi A, Lakshmi SG, Madempudi RS. Whole-genome shotgun sequencing and characterization of probiotic strain *Clostridium butyricum* UBCB 70 to assess its safety. *Microbiology Resource Announcements*, 2019, 8(5): e01732–18.
- [30] Nawrocki EM, Bradshaw M, Johnson EA. Botulinum neurotoxin-encoding plasmids can be conjugatively transferred to diverse clostridial strains. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 3100.
- [31] Ghoddusi HB, Sherburn R. Preliminary study on the isolation of *Clostridium butyricum* strains from natural sources in the UK and screening the isolates for presence of the type E botulinum toxin gene. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 142(1/2): 202–206.

Detection of resistance and virulence genes from 24 *Clostridium butyricum* strains isolated from chickens

Weixiang Fan¹, Yanli Cao¹, Lulu Cui¹, Xiaohan Lu¹, Hai Lin^{1,2*}, Shuhong Sun^{1,2,3*}

¹ College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an 271000, Shandong Province, China

² Shandong Provincial Key Laboratory of Animal Biotechnology and Disease Control and Prevention, Tai'an 271000, Shandong Province, China

³ Shandong Provincial Engineering Technology Research Center of Animal Disease Control and Prevention, Tai'an 271000, Shandong Province, China

Abstract: [Objective] To isolate, identify and evaluate the safety of *Clostridium butyricum* from two breeding hen farms in Shandong province. [Methods] Anaerobic culture was used to isolate anaerobic bacterial strains from both Luhua chicken and SPF bird droppings originated in Shandong Province. Suspicious colonies were selected for mass spectrometry and then identified by 16S rRNA gene sequencing. The 16S rRNA sequencing results were analyzed for homology with 16S rRNA sequence of *Clostridium butyricum* in NCBI nucleotide data. Meanwhile, all isolates were tested for susceptibility to 9 drugs, such as ofloxacin and cefepime. PCR was used for the determination of 23 antimicrobial resistance genes such as *mefA*. Four clostridium toxin genes including alpha and four botulinum toxin genes including typeA were determined based on probiotic safety requirements. [Results] A total of 24 strains of *Clostridium butyricum* were identified, and they were sensitive to 7 antibiotics such as ofloxacin. L-1, L-6 and L-12 were moderated only for neomycin and L-19 was moderated only for cefepime. All strains of 16 drug-resistant genes were negative, and 3 drug-resistant genes of *sul2*, *flor* and *bla_{TEM}* were positive, *tetC* carrying rate is 79.2%, *cmlA* carrying rate is 45.8%, *bla_{OXA}* carrying rate is 37.5%, *aadB* carrying rate is 12.5%, *qnrA* carrying rate is 4.2%. PCR results showed that the *alpha*, *beta*, *epsilon*, *iota* clostridium toxin gene carrying rates of all isolated strains were 0%. The carrying rate of botulinum toxin genes *typeA*, *typeB*, *typeE* and *typeF* of all isolates was 0%. [Conclusion] The 24 isolates of *Clostridium butyricum* from tested chickens never fed with antibiotics and *Clostridium butyricum* met the expected safety requirements and could be used as a screening reference strain for probiotic added bacteria.

Keywords: *Clostridium butyricum*, drug sensitivity test, resistance gene, clostridium toxin gene, botulinum toxin gene

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Key National Research Developed Projects During the 13th Five Year Program (2016YFD0500510), by the Major Agricultural Application Technology Innovation Projects in Shandong Province (SD2019XM009) and by the "Double first class" Plan of Shandong Province (SYL2017YSTD11)

*Corresponding authors. E-mail: Hai Lin, hailin@sdau.edu.cn; Shuhong Sun, sunshuhong@sdau.edu.cn

Received: 1 March 2020; Revised: 21 May 2020; Published online: 8 June 2020