市售发酵食品中乳酸菌的耐药性评估及传播风险研究

李宇行， 何继玮， 钱 敏， 韩剑众， 曲道峰*
（浙江工商大学 食品与生物工程学院，浙江 杭州 310018）

摘要： 为评估发酵食品中乳酸菌的耐药性及其传播风险，作者对市售酸奶和泡菜中的乳酸菌进行分离鉴定。以纸片扩散法鉴定其耐药表型，分析多重耐药情况，PCR 鉴定其耐药基因型。从 40 份样品中共分离得到包括 9 种不同种属在内的 62 株乳酸菌，其中酸奶源乳酸菌均为多重耐药菌，对卡那霉素等 5 种抗生素的耐药率均高于泡菜源菌株，而泡菜源乳酸菌对庆大霉素和链霉素的耐药率均在 40%以上。耐药基因型鉴定结果表明，*tetM* 的检出率最高，为 16.12%，酸奶样品分离株中有 5 种基因的检出率高于泡菜样品。2 株酸奶源菌株中四环素耐药基因 *tetM* 可通过质粒接合作用转移到受体菌 EC600 中。作者对市售发酵食品乳酸菌进行了耐药性评估与传播风险研究，为保障发酵食品安全提供理论依据。

关键词： 乳酸菌；耐药性；发酵食品；传播风险
中图分类号：TS 201.3　　**文章编号：**1673-1689(2024)06-0021-10　　**DOI：**10.12441/spyswjs.20230101001

Antibiotics Resistance Evaluation and Transmission Risk of Lactic Acid Bacteria in Commercial Fermented Foods

LI Yuxing， *HE Jiwei*， *QIAN Min*， *HAN Jianzhong*， *QU Daofeng**
（School of Food Science and Biotechnology，Zhejiang Gongshang University，Hangzhou 310018，China）

Abstract： To evaluate the antibiotic resistance of lactic acid bacteria in fermented foods and their transmission risk, this study was conducted to isolate and identify lactic acid bacteria from commercially available yogurt and kimchi, to identify their antibiotic resistance phenotypes by disk diffusion method, to analyze multi-antibiotic resistance, and to identify their antibiotic resistance genotypes by PCR. A total of 62 strains of lactic acid bacteria including 9 different species were isolated from 40 samples. Most of the strains were multi-antibiotic resistant from the yogurt origin. The resistance rates of yogurt-derived *Lactobacillus* to five antibiotics, including kanamycin, were higher than those of kimchi-derived strains, while the resistance rates of kimchi-derived *Lactobacillus* to gentamicin and streptomycin were above 40%. The results of antibiotic-resistant genotype identification showed the detection rate of *tetM* gene was the highest at 16.12%. The detection rates of fivegenes in yogurt sample isolates were higher than kimchi samples. The results of plasmid conjugation transfer showed that the tetracycline resistance gene *tetM* could be transferred to

收稿日期： 2023-01-01　　**修回日期：** 2023-03-10
基金项目： 国家自然科学基金面上项目(32172188)。
* **通信作者：** 曲道峰(1983—)，男，博士，教授，硕士研究生导师，主要从事食源性微生物快速检测及耐药菌环境适应性研究。
E-mail: daofeng@mail.zjgsu.edu.cn

the recipient bacterium EC600 from two yogurt-derived strains. Overall, this study was conducted to assess the antibiotic resistance and transmission risk of lactic acid bacteria in commercially available fermented food, it can provide theoretical basis for ensuring the safety of fermented food.
Keywords: lactic acid bacteria, antibiotic resistance, fermented food, transmission risk

乳酸菌(lactic acid bacteria)是一类通过发酵碳水化合物产生乳酸的革兰氏阳性菌的总称,是一种对人体健康有重要作用的有益细菌。大部分乳酸菌存在于人体肠道内并产生乳酸和醋酸等代谢产物,可以显著降低肠道 pH 并抑制其他有害微生物的生长繁殖,对人体健康具有非常重要的意义[1];乳酸菌还具有提高食品消化率和改善食品风味的特点,所以一部分乳酸菌在酸奶[2]、腐乳、泡菜等食品中作为发酵剂和辅助培养物来控制食物发酵,在食品工业中应用广泛[3-4]。

乳酸菌一直被公认为是一种安全的细菌[5],但随着抗生素在动物性食品中的广泛使用,科学家发现乳酸菌、双歧杆菌等非致病微生物也对抗生素具有耐药性[6]。研究表明,原料奶发酵产品中存在大量乳酸菌菌株,是人类产生抗生素耐药细菌的潜在载体[7-8]。许女等从泡菜和发酵乳制品中分离出 97 株乳酸菌,其对所测试的 15 种抗生素均表现出不同程度的耐药性[9]。生物被膜的产生能力也影响菌株多重耐药性。于涛从市售的乳品中分离到31 株乳杆菌和 25 株嗜热链球菌,经基因测序后共检出 5 种不同的耐药基因且多位于可移动元件上[10]。Haryani等用纸片扩散法分析了马来西亚发酵食品中乳酸菌对 13 种抗生素的耐药性,并在 40 株携带质粒的分离株中检测到 32 个平均大小为 7 kb 的质粒[11]。Keter 等发现短乳杆菌具有多重耐药性,表现出对万古霉素、氨苄青霉素、头孢噻肟、苯唑西林和庆大霉素等多种抗生素耐药[12]。以上研究说明乳酸菌耐药性较为严重,且耐药基因可通过质粒、整合子等可移动元件进行传递,并通过养殖、销售等场所进行传播,给人体健康带来极大危害。

目前对细菌耐药性的研究主要集中于养殖端[13]与肉制品[14],而关于发酵食品耐药性及其传播可能性的研究较少。中国酸奶产业发展迅速,酸奶销售份额逐年上升,市场潜力十分巨大[15],泡菜作为一种有着独特营养和风味的食品也被人民群众广泛接受[16-17]。乳酸菌作为这两种食品的主要发酵剂,其耐药性以及相关耐药基因的传播机制值得关注。作者对市场销售的酸奶、泡菜中的乳酸菌进行分离和鉴定,对其耐药表型和基因型进行研究,探究食品中乳酸菌耐药情况差异,为乳酸菌耐药性监测提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

试验样品:购于杭州 4 家大型市场,酸奶样品 20 份,泡菜样品 20 份,共 40 份;受体菌:EC600;质控菌株:ATCC25922;MH、M17、MRS 培养基:青岛海博生物技术有限公司;药敏纸片:杭州微生物试剂有限公司;细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒、16S rRNA 基因通用引物、50× TAE 缓冲液:上海生工生物工程有限公司;2× Taq PCR Master Mix、10 mg/mL 溴化乙锭、琼脂糖、DL2000 DNA Marker:BBI 生命科学有限公司。

1.2 仪器与设备

SPX-250B-Z 型生化培养箱:上海博迅实业有限公司医疗设备厂;LX-3000 离心机:海门市其林贝尔仪器制造有限公司;PCR 仪:Life Technologies;DYY-2C 型电泳仪:北京市六一仪器厂;ChemiDooc XRS 蛋白质印迹检测系统:美国 BIO-RAD 公司。

1.3 方法

1.3.1 乳酸菌分离与鉴定 将市场购买的样品用生理盐水稀释到 10^{-9}~10^{-7} CFU/mL,吸取100 μL 涂布于 MRS 和 M17 固体培养基,在生化培养箱中于 37 ℃厌氧培养 48 h。挑取典型单菌落划线于MRS 平板上进行纯化,纯化后的菌株进行 16S rDNA 菌种鉴定。

1.3.2 DNA 模版的制备 按照细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒的方法提取乳酸菌分离菌株基因组,制备 DNA 模板。

1.3.3 16S rDNA 的 PCR 扩增 以乳酸菌菌株中提取的 DNA 作为模版,选用引物进行扩增,上下游引物分别为 27F –AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 和 1492R–TACGGYTACCTTGTTACGACTT。PCR 体系:2× Taq PCR Master Mix 25 μL、ddH_2O 19 μL、上游引物 0.5 μL、下游引物 0.5 μL、模板 DNA 5 μL。将 PCR 程序设定为:95 ℃预变性 3 min;95 ℃变性 1 min,55 ℃退火 1 min,72 ℃延伸 1 min,30 个循环;72 ℃延伸 10 min。PCR 扩增结束后,将扩增成功的 PCR 产物送至上海生工股份有限公司进行双向测序,测序结果通过 NCBI[18]数据库 Blast[19]比对来鉴定菌株。

1.3.4 乳酸菌耐药表型检测 采用 K–B (kindy–bauer) 纸片扩散法对乳酸菌进行耐药表型测定,选择 β–内酰胺类的青霉素, 氨基糖苷类的链霉素、庆大霉素、卡那霉素,大环内酯类的红霉素,四环素类的四环素,喹诺酮类的环丙沙星,头孢菌素类的头孢噻肟,磺胺类的复方新诺明,糖肽类的万古霉素以及氯霉素类的氯霉素共 11 种抗生素进行测定,并参照美国临床试验室标准化委员会(CLSI)的标准进行结果判定和质量控制。

1.3.5 乳酸菌耐药基因的 PCR 扩增 采用 PCR 方法对氨基糖苷类、四环素类和 β–内酰胺类等耐药基因进行检测,将成功扩增出清晰条带的样品送往生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序分析,测序结果经 Blast 比对后进行分析。

1.3.6 乳酸菌耐药性转移 选取耐药乳酸菌作为供体菌,大肠杆菌 EC600 作为受体菌,采用滤膜杂交法[20]对乳酸菌耐药性的转移进行分析。将过夜活化后的耐药乳酸菌和受体菌接种到新鲜的培养基中,培养至菌液 OD_{600} 为 1.0。将 4 mL 供体菌和 4 mL 受体菌混合,取 1 cm^2 大小的 0.45 μm 孔径的滤膜平铺于 MH 平板上, 待滤膜充分吸收菌液,将平板倒置于 37 ℃培养过夜, 用 1 mL MH 液体培养基冲洗滤膜,将洗涤的菌悬液涂布于含有 50 μg/mL 的利福平和 10 μg/mL 的四环素平板上, 培养 72 h 后观察结果。另外将供体菌和受体菌分别涂布于含有利福平和四环素的 MH 双抗平板作为阴性对照。当阴性对照组供体菌在双抗板无细菌生长时,计算接合效率。为了确认接合前后耐药质粒和耐药基因的转移,采用微量肉汤稀释法测定供体菌、受体菌和接合子的药物敏感性。

1.4 数据分析

运用 SPSS 16.0 对试验数据进行统计分析,并通过 Origin 8.0 可视化。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌的分离与鉴定

从酸奶、泡菜中分离鉴定得到 62 株乳酸菌菌株,经过 16S rDNA 种属分析后从两种食品中得到 9 种不同种类的乳酸菌,具体分布见图 1。酸奶中共分离出 36 株乳酸菌, 其中保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus bulgaricus*) 和嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)分离率较高,分别为 13 株(36.11%)和 18 株(50.00%),是优势菌种。除此之外, 从酸奶中还分离到 3 株植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)(8.33%) 和 2 株嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)(5.56%)。泡菜中共分离到乳酸菌 26 株,种类相较于酸奶更丰富,包含了 11 株植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)(42.31%)、5 株短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)(19.22%)、3 株戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*)(11.54 %)、3 株鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*)(11.54%)、3 株干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)(11.54%) 和 1 株肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)(3.85%)。

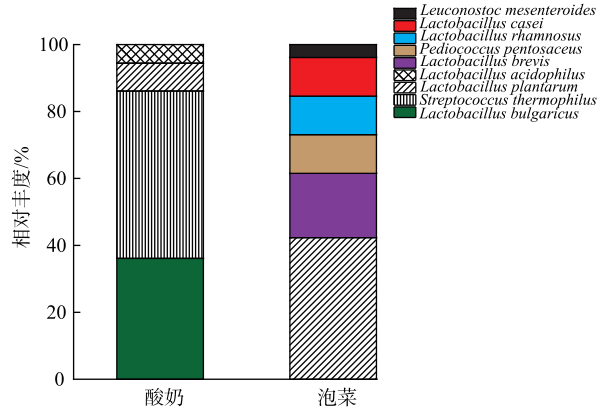


图 1 62 株乳酸菌分离株在酸奶和泡菜中的分布

Fig. 1 Distribution of 62 lactic acid bacteria isolates in yogurt and kimchi samples

2.2 乳酸菌菌株耐药结果

根据 Klinker 等关于 R/I/S 判定折点,对药敏试验结果进行判定[21]。由表 1 可知,分离得到的 62 株乳酸菌对万古霉素、四环素等 11 种抗生素表现出

不同程度的耐药性,其中保加利亚乳杆菌和植物乳杆菌的耐药情况较严重。13 株保加利亚乳杆菌对庆大霉素、链霉素、卡那霉素、四环素、环丙沙星和万古霉素这 6 种抗生素均表现出高耐药性,耐药率分别为 76.92%、92.31%、92.31%、30.77%、53.85%、38.46%;对红霉素、青霉素、氯霉素等则表现为敏感。植物乳杆菌对 11 种抗生素耐药程度不同,对链霉素、卡那霉素和庆大霉素耐药的菌株分别为 78.57%、57.14%和 35.71%,并且有 9 株菌对环丙沙星和万古霉素有耐药性,耐药率均达到 60%以上;对青霉素等抗生素则表现出较好的抑菌效果,耐药率普遍较低。所有嗜热链球菌分离株对卡那霉素均表现出耐药,其耐药率从高到低分别为链霉素(83.3%)、环丙沙星(44.44%)、四环素(27.78%)和万古霉素(22.22%)。与乳杆菌属不同的是,嗜热链球菌对庆大霉素表现为低耐药性,仅有 1 株耐药。总体而言,在所测试的抗生素中,庆大霉素(38.71%)、链霉素(70.97%)、卡那霉素(74.19%)、四环素(25.81%)、环丙沙星(48.39%)和万古霉素(33.87%)的耐药情况较为严重,耐药率均在 25%以上。相比之下,红霉素、青霉素、复方新诺明和氯霉素的耐药率较低,所有分离株对头孢噻肟均敏感。

表 1　乳酸菌分离株对 11 种抗生素的耐药性

Table 1　Antibiotic resistance rate of lactic acid bacteria to 11 antibiotics

菌种	数量/株	耐药菌株数量/株										
		庆大霉素	头孢噻肟	链霉素	卡那霉素	红霉素	四环素	环丙沙星	万古霉素	复方新诺明	青霉素	氯霉素
嗜热链球菌	18	1	0	15	18	1	5	8	4	2	1	1
植物乳杆菌	14	5	0	11	8	0	2	9	9	3	2	0
保加利亚乳杆菌	13	10	0	12	12	1	4	7	5	0	1	0
短乳杆菌	5	2	0	1	1	0	2	3	1	0	0	0
戊糖片球菌	3	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1
鼠李糖乳杆菌	3	1	0	1	2	0	0	0	1	0	0	0
干酪乳杆菌	3	2	0	1	2	0	1	1	1	0	0	0
嗜酸乳杆菌	2	2	0	2	2	0	1	2	0	0	0	0
肠膜明串珠菌	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
总计	62	24	0	44	46	2	16	30	21	6	4	2

2.3　不同食品乳酸菌菌株耐药性差异

酸奶和泡菜中乳酸菌耐药性的差异见图 2。链霉素和卡那霉素这两种抗生素在两种食品中的耐药率都在 45%以上,且酸奶中乳酸菌对链霉素(86.11%)、卡那霉素(94.44%)的耐药率普遍高于泡菜中的菌株。所测试的 11 种抗生素中有 4 种抗生素的耐药率较高,分别为庆大霉素(36.11%)、四环素(30.56%)、环丙沙星(50.00%)和万古霉素(27.78%)。除此之外,泡菜中乳酸菌对红霉素、复方新诺明和青霉素耐药性高于酸奶中的分离株,其中泡菜中的耐药菌株数目分别为 2 株、4 株,2 株;酸奶则为 1 株、2 株和 2 株。氯霉素和头孢噻肟则都对受试菌株表现出较好的抑菌效果,仅有泡菜中有 1 株戊糖片球菌对氯霉素耐药,酸奶中的乳酸菌则对氯霉素完全敏感;两种食品源乳酸菌对头孢噻肟的药敏试验结果完全一致,所有菌株都对其敏感。

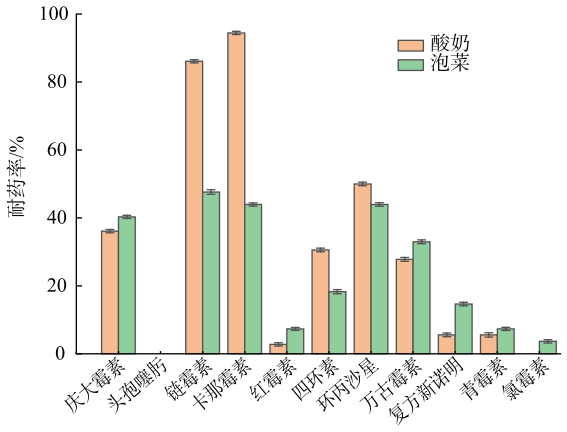


图 2　2 种食品乳酸菌分离株对 11 种抗生素的耐药性

Fig. 2　Antibiotic resistance rate of Lactic acid bacteria to 11 antibiotics in 2 foods

2.4　乳酸菌多重耐药性分析

如表 2 所示,62 株乳酸菌中大多数为多重耐药

菌,只有 1 株短乳杆菌和 1 株鼠李糖乳杆菌对单种抗生素产生耐药性,其余菌株都至少对 2 种及以上抗生素耐受。酸奶和泡菜样品中的分离株大多数对 2~5 种抗生素耐药，其中嗜热链球菌主要耐受 3 种抗生素,占菌株数目的 44.44%;而肠膜明串珠菌、戊糖片球菌和鼠李糖乳杆菌的所有菌株都只对 2 种抗生素耐受。除此之外,对 6 种不同抗生素都产生耐药性的只有 1 株植物乳杆菌和 1 株保加利亚乳杆菌。总体而言,20 株乳酸菌对 2 种抗生素耐药,20 株乳酸菌对 3 种抗生素耐药,12 株乳酸菌对 4 种抗生素耐药,7 株乳酸菌对 5 种抗生素耐药,2 株乳酸菌对 6 种抗生素耐药。

表 2　乳酸菌分离株的多重耐药性

Table 2　Multi– antibiotics resistance rates of lactic acid bacteria

乳酸菌种类	菌株数量/株	耐药菌株数量/株				
		2 种抗生素	3 种抗生素	4 种抗生素	5 种抗生素	6 种抗生素
嗜热链球菌	18	6	8	2	2	0
植物乳杆菌	14	2	5	4	2	1
保加利亚乳杆菌	13	2	3	5	3	1
短乳杆菌	5	3	1	0	0	0
戊糖片球菌	3	3	0	0	0	0
鼠李糖乳杆菌	3	2	0	0	0	0
干酪乳杆菌	3	1	2	0	0	0
嗜酸乳杆菌	2	0	1	1	0	0
肠膜明串珠菌	1	1	0	0	0	0

2.5　乳酸菌菌株耐药基因检测结果

对 62 株乳酸菌耐药基因进行 PCR 扩增，共扩增出 7 种耐药基因相应目的片段，检测结果见表3和图 3。在酸奶样品中,共有磺胺类耐药基因 *sul1* 阳性分离株 15 株,检出率为 41.67%;氨基糖苷类耐药基因 *ant*(6)、*aac*(6′)–*aph*(2″)和四环素类耐药基因 *tetM*，其检出率分别为 13.89%、11.11%和 16.67%。对 36 株乳酸菌的氨基糖苷类抗性基因 *aph*(3′)–Ⅲ进行检测,发现 2 株保加利亚乳杆菌和 1 株嗜热链球菌携带 *aph*(3′)–Ⅲ基因;相较于上述耐药基因,氯霉素耐药基因菌株 *cat* 检出率较低,为 5.56%。其他抗性基因如万古霉素抗性基因 *vanX* 及喹诺酮类抗性基因 *qnrB* 在酸奶样品中均未检出。

26 株泡菜样品菌株中，四环素类耐药基因 *tetM*、磺胺类耐药基因 *sul1* 和氨基糖苷类耐药基因 *aph*(3′)–Ⅲ的检出率分别为 15.38%、11.54%和 7.69%;氨基糖苷类耐药基因 *aph*(3′)–Ⅲ和氯霉素耐药基因 *cat* 的携带率分别为 7.69%和 3.85%。在 1

表 3　乳酸菌分离株抗生素耐药基因检出率

Table 3　Detection rate of antibiotic resistance genes of lactic acid bacteria

菌株	菌株数量/株	耐药菌株数量/株										
		aph(3′)–III	*tetM*	*tetK*	*qnrB*	*vanX*	*sul1*	*cat*	*cmlA*	*strA*	*ant(6)*	*aac(6′)–aph (2″)*
嗜热链球菌	18	1	3	0	0	0	4	1	0	0	2	3
植物乳杆菌	14	2	2	0	0	0	1	0	0	1	3	3
保加利亚乳杆菌	13	2	2	0	0	0	10	1	0	0	1	2
短乳杆菌	5	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1
戊糖片球菌	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
鼠李糖乳杆菌	3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
干酪乳杆菌	3	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
嗜酸乳杆菌	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
肠膜明串珠菌	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
总计	62	5	10	0	0	0	9	4	0	1	9	10

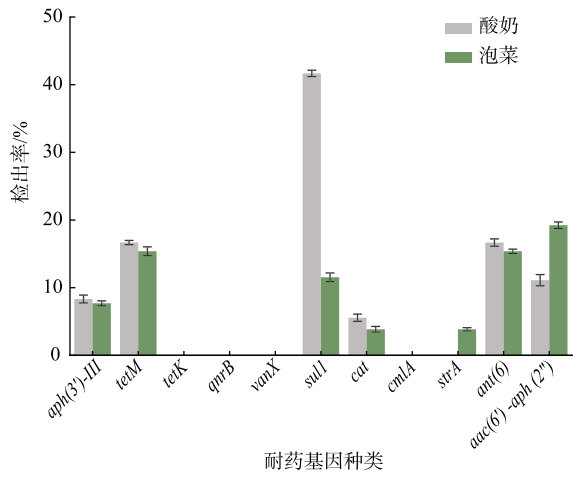


图 3　2 种食品乳酸菌分离株耐药基因的检出率

Fig. 3　Detection rate of antibiotic resistance genes of lactic acid bacteria in 2 foods

株短乳杆菌、2 株植物乳杆菌、1 株干酪乳杆菌和 1 株戊糖片球菌中检测到 *aac*(6′)-*aph*(2″);*ant*(6)则被 1 株短乳杆菌、2 株植物乳杆菌和 1 株鼠李糖乳杆菌携带。相比于酸奶样品没有检出氨基糖苷类耐药基因 *strA*，泡菜样品中检测出 1 株植物乳杆菌携带 *strA*，检出率为 3.85%。除上述耐药基因外，喹诺酮类耐药基因 *qnrB*、氯霉素耐药基因 *cmLA* 等基因均未被检出。

2.6　乳酸菌菌株耐药性转移结果

对 10 株 *tetM* 阳性菌株进行质粒接合转移试验，2 株接合转移成功，接合频率分别为 3.2×10^{-6} 和 4.3×10^{-5}，表明部分菌株 *tetM* 基因位于质粒上，并可通过接合转移进行传播，在对其进行药物敏感性测试后，结果表明接合子对四环素表现出耐药性增强，说明 *tetM* 耐药基因在受体菌株中可发挥功能，见表 4。在 6 组酸奶源菌株接合试验中有 2 组出现阳性接合子，而 4 株泡菜源 *tetM* 阳性菌株与 EC600 进行杂交时双抗平板上均无菌落生长。

2.7　讨论

作者分离得到的 62 株乳酸菌经 16S rDNA 种属鉴定后，得到了 4 个属 9 种乳酸菌。其中，酸奶样品共分离得到 4 种乳酸菌，优势菌株为保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌，这与周宁等对中国不同地区酸奶样品进行分析的结果一致[22]，董春阳在对酸奶样品进行分离鉴定后也有类似报道[23]，以上结果说明了保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌为酸奶中的优势菌种。泡菜作为一种主要由乳酸菌发酵制成的食品，许多学者从中分离得到乳酸菌。曾维友等以重庆市售泡菜为样品，从 71 株菌株中分离得到 32 株消化乳杆菌、27 植物乳杆菌、9 株有害片球菌、2 株棒状乳杆菌和 1 株发酵乳杆菌[24]；赵山山和解文利等研究发现泡菜在发酵过程中植物乳杆菌的数量最多，为主要菌种[25-26]。本研究中分离得到的植物乳杆菌、短乳杆菌、戊糖片球菌、鼠李糖乳杆菌和干酪乳杆菌，与上述报道不尽相同。这一结果可能是因为泡菜为开放式发酵，各地区在泡菜生产过程中发酵温度、时间以及制作工艺的不同导致了乳酸菌种

表 4　*tetM* 阳性菌接合转移情况及药物敏感性试验

Table 4　Conjugation andAntimicrobial susceptibility test in *tetM*–postive isolates

菌株编号	四环素		利福平		转移频率
	MIC 值/(μg/mL)	药物敏感性	MIC 值/(μg/mL)	药物敏感性	
SN-3	≥16	R	≤1	S	3.2×10^{-6}
SN-3-EC600	≤4	S	≥4	R	
SN-5-1	≥16	R	≤1	S	
SN-5-1-EC600	≤4	S	≥4	R	
SN-8-2	≥16	R	≤1	S	
SN-8-2-EC600	≥16	R	≥4	R	
N-11	≥16	R	≤1	S	
SN-11-EC600	≤4	S	≥4	R	
SN-14-1	≥16	R	≤1	S	
SN-14-1-EC600	≤4	S	≥4	R	
SN-18-1	≥16	R	≤1	S	4.3×10^{-5}
SN-18-1-EC600	≥16	R	≥4	R	
PC6-1	≥16	R	≤1	S	
PC6-1-EC600	≤4	S	≥4	R	
PC9	≥16	R	≤1	S	
PC9-EC600	≤4	S	≥4	R	
PC-12	≥16	R	≤1	S	
PC-12-EC600	≤4	S	≥4	R	
PC-19	≥16	R	≤1	S	
PC-19-EC600	≤4	S	≥4	R	
EC600	≤4	S	≥4	R	

类的不同[29];而且一旦在储存、运输过程中温度、酸度控制不当,会导致一些菌种数量的减少,不易分离得到。

抗生素的频繁使用使得抗生素耐药基因通过养殖场、屠宰场和市场的食物链传播,并在动物性食品中积累,最终威胁人类健康[27-28]。目前对细菌耐药性的研究并不仅仅局限于致病菌,乳酸菌等也对抗生素产生耐药现象,是耐药基因的携带者[29]。作者从市场购买的酸奶和泡菜样品中分离得到的 62 株乳酸菌对庆大霉素和链霉素的耐药率较高。秦宇轩等从市售分离的 100 株乳酸菌对庆大霉素与链霉素全部耐药[30];石磊等对广州市售酸奶乳酸菌耐药性进行调查,发现对庆大霉素和链霉素的耐药率分别为 50%与 100%[31]。以上结果说明受试乳酸菌对庆大霉素与链霉素的耐药率普遍处于较高水平,这与宋晓敏等关于乳酸菌对庆大霉素与链霉素存在天然耐药性的报道一致[32]。在 2 种食品中,泡菜分离株对红霉素的耐药率更高,为 7.69%,而其他研究表明意大利传统发酵食品中的乳酸菌对红霉素的耐药率在 70%以上[33]。在邯郸市零售店随机购买的酸奶中的乳酸菌对红霉素的耐药率仅为 2.08%[34],这表明红霉素的耐药率在不同食品中差异较大,这可能与食品种类、来源与加工方式有关[37]。有学者曾报道鼠李糖乳杆菌、植物乳杆菌对万古霉素具有天然耐药性,并证实其耐药性是由 *vanX* 基因编码产生[35]。本研究中 2 种食品乳酸菌分离株对万古霉素的耐药率均在 25%以上,且泡菜样品菌株耐药率较高,接近 35%。从四川传统发酵食品中分离的乳酸菌对糖肽类抗生素的耐药率为 31.58%[4],从山西、内蒙古等地发酵乳制品、泡菜汁和醋醅中分离的乳酸菌对万古霉素的耐药率在60%以上[9],从广州酸奶及发酵剂中分离的乳酸菌对糖肽类抗生素的耐药率达到了 70.9%[36],表明全国范围内不同地区间乳酸菌对万古霉素都存在较高程度的耐药性,说明乳酸菌对糖肽类抗生素产生耐药现象的普遍性。

四环素可通过抑制基因转译阻止蛋白质合成,使细菌繁殖受到抑制。在已发现的 40 多种四环素耐药基因中,*tetM* 在乳酸菌等革兰氏阳性菌中分布较为广泛。Nawaz 等在 14 株对四环素耐药的乳酸菌中检测到 10 株携带 *tetM*[37],无菌株携带 *tetK*;于涛等检出 3 株菌携带 *tetM*,检出率为 5.36%,未检出其他四环素类耐药基因[10];有学者对广州市售酸奶进行 *tetM* 和 *tetS* 检测,发现有 3 株保加利亚乳杆菌携带 *tetM*,未检测到 *tetS*[23]。作者对四环素类耐药基因 *tetM* 和 *tetK* 进行检测,其中 *tetM* 的检出率较高,为 16.12%;而 *tetK* 在 2 种样品中均未被检出,这与上述报道一致,说明 *tetM* 在乳酸菌中存在可能更为普遍,是介导菌株对四环素类抗生素产生耐药性的主要基因。除此之外,氨基糖苷类耐药基因 *aph*(3′)-Ⅲ、*aac*(6′)-*aph*(2″)和 *ant*(6)检出率较高,与其高耐药率相符;而 *strA* 只在 1 株植物乳杆菌中检出。周宁等对中国不同地区酸奶进行检测,结果显示 *ant*(6)和 *aph*(3′)-Ⅲ分别有 12.5%和 16.3%的检出率[22];分离自发酵鲜辣椒的乳酸菌 *aph*(3′)-Ⅲ基因的携带率为 53.3%,*strA* 的携带率则为 36.67%[38];Houngbédji 等在 2021 年对发酵面团中乳酸菌进行检测发现,分别有 2 株和 5 株携带 *aph*(3′)-Ⅲ和 *ant*(6)[39]。*aph*(3′)-Ⅲ和 *ant*(6)是编码修饰链霉素钝化酶,是导致链霉素等氨基糖苷类抗生素失效的重要基因,其高检出率是人类健康的潜在威胁。乳酸杆菌和肠球菌对万古霉素表现为固有耐药[32],耐药基因 *vanX* 可以编码 *D*-丙氨酰-*D*-丙氨酸水解酶,从而使万古霉素的结合能力下降,达到耐药的效果。本研究结果显示,乳酸菌对万古霉素有较高的耐药率,为 33.87%,*vanX* 则未在任何受试菌株中检出。这一结果与谢丽斯等[40]和许女等[9]的报道一致,即受试乳酸菌耐药率都较高,分别为 61.86%和 60%,而耐药基因的检出率都为 0。

有一类序列被称为可移动基因元件,其主要包括插入序列、转座子、整合子和质粒等相对细菌染色体较小的基因元件,可以使细菌的耐药基因在种内、种间甚至细菌和真菌之间进行传播,在很大程度上促进了多重耐药菌的产生与传播[38]。作者对 10 株 *tetM* 阳性菌株进行质粒接合转移试验,发现有 2 株酸奶源乳酸菌成功转移,且转移频率为 10^{-6}~10^{-5},这与 Gevers 的研究相似[41]。2009 年,Toomey 等就通过体外滤膜接合试验证明分离自乳制品的乳酸菌中存在可转移的耐药基因[42];Ouoba 等通过体外转移试验发现,干酪乳杆菌中的 *ermB* 基因可转移给肠球菌[43];Hummel 研究发现,81.3%的四环素耐药菌株含有整合酶基因转座子,这表明 *tetM* 等基因可通过转座子进行转移[44];除此之外,Pan 等在某些乳酸菌中质粒和染色体内发现 *tetM* 和 *ermB* 基因,且这些基因只在质粒和染色体中存在,这可能会导致乳

酸菌向环境中传递耐药基因[45]。以上结果显示,质粒、整合子等可移动元件的存在会促进耐药基因的水平转移,因此在运输、储存、销售的过程中需要注意酸奶与泡菜等不同食品可能通过基因水平转移的方式相互传播,造成交叉污染,进而危害人类健康。

3 结 语

作者从40份酸奶和泡菜样品中分离鉴定出62株乳酸菌,包括了保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌、植物乳杆菌在内的9种不同种属的乳酸菌。在对表型与基因型进行鉴定后,发现乳酸菌对链霉素、卡那霉素和庆大霉素等抗生素具有较高的耐药率,大部分受试菌株都具有多重耐药性;*tetM*、*ant*(6)、*rpoB*、*aac*(6′)-*aph*(2″)在2种食品中均有较高的检出率。接合转移试验结果显示,2株酸奶源菌株中的耐药性质粒可以在不同的菌株之间进行转移。对酸奶和泡菜这2种不同食品中乳酸菌耐药性进行对比发现,酸奶与泡菜分离株的耐药性相似,都具有较高程度的耐药率,耐药情况较为严重,且酸奶乳酸菌的耐药率及耐药基因检出率都更高,这种差异的形成可能与食品种类、加工方式等因素有关,但耐药基因借助可移动元件在不同食品中传播的影响仍值得深入探究。本研究对保障发酵食品安全、控制耐药性传播提供了理论依据。

参考文献:

[1] 罗正山,徐铮,李莎,等. 生物工程在食品领域的研究与应用进展[J]. 食品与生物技术学报,2020,39(9):1-5.
LUO Z S,XU Z,LI S,et al. Research and application of bioengineering in food field[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2020,39(9):1-5. (in Chinese)

[2] 王志锋. 内蒙古传统乳制品中乳酸菌益生作用的研究[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2006.

[3] ISSAOUI K E,KHAY E O,ABRINI J,et al. Molecular identification and antibiotic resistance of bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated from table olives[J]. **Archives of Microbiology**,2021,203(2):597-607.

[4] 万倩,李启明,吴华星,等. 传统发酵食品中乳酸菌的安全性评估[J]. 现代食品科技,2021,37(6):276-286.
WAN Q,LI Q M,WU H X,et al. Evaluation for lactic acid bacteria safety in traditional fermented food[J]. **Modern Food Science and Technology**,2021,37(6):276-286. (in Chinese)

[5] 李丽娜,郭慧玲,任彩霞,等. 蒙古国传统发酵乳制品中保加利亚乳杆菌耐药性的研究[J]. 食品与生物技术学报,2019,38(12):52-58.
LI L N,GUO H L,REN C X,et al. Antibiotic resistance of *Lactobacillus bulgaricus* isolated from traditional Mongolian fermented dairy products[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2019,38(12):52-58. (in Chinese)

[6] 孙海龙,李佳益,张敏,等. 新疆特色果蔬中乳酸菌分离鉴定及其抑菌活性[J]. 食品与生物技术学报,2018,37(11):1201-1206.
SUN H L,LI J Y,ZHANG M,et al. Identification and antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from fruits and vegetables collected from different areas in Xinjiang[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2018,37(11):1201-1206. (in Chinese)

[7] NUNZIATA L,BRASCA M,MORANDI S,et al. Antibiotic resistance in wild and commercial non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria strains of dairy origin:an update[J]. **Food Microbiology**,2022,104:103999.

[8] 王磊,高宗露,宗丽娜,等. 酸乳用乳酸菌抗生素耐药性研究[J]. 食品研究与开发,2021,42(6):162-169.
WANG L,GAO Z L,ZONG L N,et al. Study on antibiotic resistance of lactic acid bacteria for yoghurt[J]. **Food Research and Development**,2021,42(6):162-169. (in Chinese)

[9] 许女,李雅茹,王超宇,等. 传统发酵食品中乳酸菌的抗生素耐药性评估及耐药基因分析[J]. 中国食品学报,2020,20(7):160-171.
XU N,LI Y R,WANG C Y,et al. Antimicrobial resistance evaluation and resistant gene profiles of lactic acid bacteria isolated from traditional fermented foods[J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**,2020,20(7):160-171. (in Chinese)

[10] 于涛,姜晓冰,李磊,等. 市售酸奶中乳酸菌耐药性及耐药基因的检测[J]. 食品科学,2016,37(11):131-136.

YU T,JIANG X B,LI L,et al. Antimicrobial resistance and resistance genes in lactic acid bacteria isolated from commercial yogurt[J]. **Food Science**,2016,37(11):131-136. (in Chinese)

[11] HARYANI Y, HALID N A, GUAT G S, et al. High prevalence of multiple antibiotic resistance in fermented food-associated lactic acid bacteria in Malaysia[J]. **Food Control**, 2023, 147: 109558.

[12] KETER M T,HALFAWY N M,NAGGAR M Y. Incidence of virulence determinants and antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from food products[J]. **Future Microbiology**,2022,17:325-337.

[13] 高玉斌,赵格,邹明,等. 我国不同区域鸡源大肠杆菌的致病性与耐药性状分析[J]. 中国兽医杂志,2019,55(3):81-84.
GAO Y B,ZHAO G,ZOU M,et al. Analysis of virulence gene carrying and drug resistance of *Escherichia coli* isolated from chickens in different regions of China[J]. **Chinese Journal of Veterinary Medicine**,2019,55(3):81-84. (in Chinese)

[14] RINCÓN-GAMBOA S M,POUTOU-PIÑALES R A,CARRASCAL-CAMACHO A K. Antimicrobial resistance of non-typhoid *Salmonella* in meat and meat products[J]. **Foods**,2021,10(8):1731.

[15] 黄耀雄,甘祥武. 酸奶中乳酸菌的分离、鉴定及性能研究[J]. 现代食品,2021(3):222-225.
HUANG Y X,GAN X W. Study on isolation,identification and performance of lactic acid bacteria in yogurt[J]. **Modern Food**,2021(3):222-225. (in Chinese)

[16] 刘宗敏,周红丽,谭兴和. 泡菜中乳酸菌的研究进展[J]. 中国酿造,2016,35(10):18-21.
LIU Z M,ZHOU H L,TAN X H. Research progress of lactic acid bacteria in pickled vegetable[J]. **China Brewing**,2016,35(10):18-21. (in Chinese)

[17] MARTELLI F,LAMBERT M,BUTT P,et al. Evaluation of an enhanced cleaning and disinfection protocol in *Salmonella* contaminated pig holdings in the United Kingdom[J]. **PLoS One**,2017,12(6):e0178897.

[18] RANGWALA S H,KUZNETSOV A,ANANIEV V,et al. Accessing NCBI data using the NCBI sequence viewer and genome data viewer(GDV)[J]. **Genome Research**,2021,31(1):159-169.

[19] NOWICKI M, BZHALAVA D, BAŁA P. Massively parallel implementation of sequence alignment with basic local alignment search tool using parallel computing in java library[J]. **Journal of Computational Biology**, 2018, 25(8): 871-881.

[20] TOOMEY N,BOLTON D,FANNING S. Characterisation and transferability of antibiotic resistance genes from lactic acid bacteria isolated from Irish pork and beef abattoirs[J]. **Research in Microbiology**,2010,161(2):127-135.

[21] PALMEIRA J D, FERREIRA H. CLSI-EUCAST: Comparison of antibiotic-susceptibility profile of *Enterobacteriaceae* of animal origin according to the standards[J]. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, 2019, 66(4): 413-22.

[22] 周宁. 中国不同地区市售酸奶中乳酸菌的药物敏感性分析[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2012.

[23] 董春阳. 广州市售酸奶中乳酸菌的药物敏感性分析[D]. 广州:华南理工大学,2013.

[24] 曾维友,周於强,池浩. 泡菜中乳酸菌的分离鉴定及抗性筛选[J]. 中国酿造,2021,40(10):163-167.
ZENG W Y,ZHOU Y Q,CHI H. Isolation,identification and resistance screening of lactic acid bacteria in Paocai[J]. **China Brewing**,2021,40(10):163-167. (in Chinese)

[25] 赵山山,杨园园,周玉岩,等. 贵州泡菜中乳酸菌的分离鉴定及其在泡菜发酵中的应用[J]. 中国酿造,2020,39(12):113-119.
ZHAO S S,YANG Y Y,ZHOU Y Y,et al. Isolation and identification of lactic acid bacteria from Guizhou pickles and its application in pickle fermentation[J]. **China Brewing**,2020,39(12):113-119. (in Chinese)

[26] 解文利,吴雨炯,白雪,等. 四川传统泡菜中乳酸菌的分离鉴定及抗氧化评估[J]. 食品与发酵科技,2022,58(1):35-41.
JIE W L,WU Y T,BAI Xue,et al. Isolation,identification and antioxidant evaluation of lactic acid bacteria from Sichuan traditional pickles[J]. **Food and Fermentation Science & Technology**,2022,58(1):35-41. (in Chinese)

[27] DE ALCANTARA RODRIGUES I,FERRARI R G,PANZENHAGEN P H N,et al. Antimicrobial resistance genes in bacteria from animal-based foods[J]. **Advances in Applied Microbiology**,2020,112:143-183.

[28] 夏飞,郑雪,吴静,等. 陕西省常见食源性致病菌耐药性研究进展[J]. 食品与生物技术学报,2021,40(7):10-18.
XIA F,ZHENG X,WU J,et al. Antimicrobial resistance of foodborne pathogenic bacteria in Shaanxi Province[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2021,40(7):10-18. (in Chinese)

[29] ANISIMOVA E A, YARULLINA D R. Antibiotic resistance of *Lactobacillus* strains[J]. **Current Microbiology**,2019,76(140):7-16.

[30] 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 Y X,LI J,WANG A W,et al. Identification of lactic acid bacteria in commercial yogurt and their antibiotic resistance[J].

Acta Microbiologica Sinica,2013,53(8):889-897. (in Chinese)

[31] 石磊,李艳莉,梁暖意,等. 广州市售酸奶中乳酸菌的耐药性评估[J]. 现代食品科技,2014,30(10):245-250.
SHI L,LI Y L,LIANG N Y,et al. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria in yogurt from Guangzhou[J]. **Modern Food Science and Technology**,2014,30(10):245-250. (in Chinese)

[32] 宋晓敏,李少英,马春艳,等. 发酵食品中乳酸菌的耐药性现状分析[J]. 微生物学通报,2015,42(1):207-213.
SONG X M,LI S Y,MA C Y,et al. Antibiotic resistance in fermented food lactic acid bacteria: a review[J]. **Microbiology China**,2015,42(1):207-213. (in Chinese)

[33] COMUNIAN R,DAGA E,DUPRÉ I,et al. Susceptibility to tetracycline and erythromycin of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from traditional Italian fermented foods[J]. **International Journal of Food Microbiology**,2010,138(1/2):151-156.

[34] 杨国兴,靳增军,丁国涛,等. 市售酸奶中乳酸菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. 医学动物防制,2019,35(12):1142-1145.
YANG G X,JIN Z J,DING G T,et al. Isolation,identification and antibiotic resistance analysis of lactic acid bacteria in commercially available yogurt[J]. **Journal of Medical Pest Control**,2019,35(12):1142-1145. (in Chinese)

[35] HAMILTON-MILLER J M, SHAH S. Vancomycin susceptibility as an aid to the identification of lactobacilli[J]. **Letters in Applied Microbiology**,1998,27(2):121-123.

[36] 李艳莉. 酸奶及发酵剂中分离乳酸菌药物敏感性研究[D]. 广州:华南理工大学,2015.

[37] NAWAZ M,WANG J,ZHOU A P,et al. Characterization and transfer of antibiotic resistance in lactic acid bacteria from fermented food products[J]. **Current Microbiology**,2011,62(3):1081-1089.

[38] 蔡婷,徐顾榕,林凯,等. 发酵用鲜辣椒中乳酸菌抗生素耐药性与耐药基因[J]. 食品与生物技术学报,2016,35(9):941-949.
CAI T,XU G R,LIN K,et al. Investigation of antibiotic resistance and resistant genes of lactic acid bacteria on the fresh hot pepper used to fermentation[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2016,35(9):941-949. (in Chinese)

[39] HOUNGBÉDJI M,PADONOU S W,PARKOUDA C,et al. Multifunctional properties and safety evaluation of lactic acid bacteria and yeasts associated with fermented cereal doughs[J]. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**,2021,37(2):34.

[40] 谢丽斯. 发酵食品中乳酸菌分离鉴定及生物被膜介导其耐药性的研究[D]. 广州:广东工业大学,2012.

[41] GEVERS D,HUYS G,SWINGS J. *In vitro* conjugal transfer of tetracycline resistance from *Lactobacillus* isolates to other gram-positive bacteria[J]. **FEMS Microbiology Letters**,2003,225(1):125-130.

[42] TOOMEY N,MONAGHAN A,FANNING S,et al. Transfer of antibiotic resistance marker genes between lactic acid bacteria in model rumen and plant environments[J]. **Applied and Environmental Microbiology**,2009,75(10):3146-3152.

[43] OUOBA L I I,LEI V,JENSEN L B. Resistance of potential probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria of African and European origin to antimicrobials:determination and transferability of the resistance genes to other bacteria[J]. **International Journal of Food Microbiology**,2008,121(2):217-224.

[44] HUMMEL A,HOLZAPFEL W H,FRANZ C M. Characterisation and transfer of antibiotic resistance genes from enterococci isolated from food[J]. **Systematic and Applied Microbiology**,2007,30(1):1-7.

[45] PAN L,HU X Q,WANG X Y. Assessment of antibiotic resistance of lactic acid bacteria in Chinese fermented foods[J]. **Food Control**,2011,22(8):1316-1321.

(责任编辑:李春丽)