

5株发酵食品源乳酸菌的抗药性分析

黄晓棠, 姚妞妞, 周璇, 郭润芳, 于宏伟

(河北农业大学食品科技学院, 河北保定 071000)

摘要:以实验室前期分离自混合果蔬酵素的植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum* S)、分离自树莓酵素的植物乳杆菌(*L. plantarum* WD)和分离自不同奶制品的保加利亚乳杆菌(*L. bulgaricus* LB-DR)、鼠李糖乳杆菌(*L. rhamnosus* Lr-05-281)与干酪乳杆菌(*L. casei* D-400)5株乳酸菌为研究对象,采用平板药敏纸片扩散法、PCR及RT-PCR技术从表型、基因型以及基因表达几个方面分析菌株的抗药性。结果表明5株菌对氨基糖苷类、喹诺酮类、糖肽类抗生素、多粘菌素B均有抗性;对大环内酯类、四环素类、磺胺类抗生素、呋喃妥因均敏感,并有较为相似的耐药谱;而对不同的 β -内酰胺类抗生素敏感性不同;5株乳酸菌均含有质粒,供试的12个抗性基因中,在质粒上检测到*erm*、*aph*、*van I*、*aac I* 4种抗性基因,基因组DNA上检测到*aph*、*erm*、*van I*、*bla II*、*aac I*、*aac II* 6种抗性基因。部分抗性基因在MRS和加抗生素的MRS培养下会表达,不表达的抗性基因在相应抗生素诱导的条件下其抗性基因不表达。*L. plantarum* WD菌株质粒上因只含一种*van I*抗性基因,其应用安全性较好。

关键词:发酵食品,乳酸菌,抗药性,抗药基因,质粒

Antimicrobial Resistance Analysis of 5 Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Foods

HUANG Xiao-tang, YAO Niu-niu, ZHOU Xuan, GUO Run-fang, YU Hong-wei

(College of Food Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000, China)

Abstract: *Lactobacillus plantarum* S isolated from mixed fruit and vegetable juice, *L. plantarum* WD isolated from raspberry enzyme, *L. bulgaricus* LB-DR, *L. rhamnosus* Lr-05-281 and *L. casei* D-400 isolated from different dairy products were used as research objects. The antimicrobial resistance of strains were analyzed by phenotypic, genotype and gene expression using plate susceptibility paper diffusion method, PCR and RT-PCR. The results showed that 5 strains were resistant to aminoglycosides, quinolones, glycopeptide antibiotics, polymyxin B, and sensitive to macrolides, tetracyclines, sulfonamides, and nitrofurantoin. They had similar drug resistance spectrum and different sensitivities to different β -lactam antibiotics. 5 strains contained plasmids. Among the 12 resistance genes tested, four resistance genes of *erm*, *aph*, *van I* and *aac I* were detected on the plasmid, and six resistant genes of *aph*, *erm*, *van I*, *bla II*, *aac I* and *aac II* were detected on the genomic DNA. Some of the resistance genes were expressed in MRS and MRS cultured with antibiotics, and the resistance genes that were not expressed were still not expressed under the conditions induced by the corresponding antibiotic. The plasmid of *L. plantarum* WD strain contained only one kind of *van I* resistance gene, so its application safety was better.

Key words: fermented foods; lactic acid bacteria; antimicrobial susceptibility; resistance gene; plasmid

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2020)08-0111-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020.08.018

引文格式: 黄晓棠, 姚妞妞, 周璇, 等. 5株发酵食品源乳酸菌的抗药性分析[J]. 食品工业科技, 2020, 41(8): 111-116.

乳酸菌是发酵食品生产中一类重要的微生物,它们能改善发酵食品的风味和质地,提高发酵食品的营养价值,而且能产生一些特殊物质来抑制食物腐败细菌的生长,对调节免疫、维持肠道平衡和健康具有重要作用^[1-3],因此乳酸菌膳食补充剂以及乳酸菌发酵食品越来越得到人们的青睐。乳酸菌是从传统发酵食品或动物肠道中分离而来,是安全性菌株(Generally recognized as safe, GRAS),因此人们更多

关注的是乳酸菌的益生功能和健康应用。

随着抗生素的滥用,乳酸菌的抗药性也逐渐成为公众关注的安全问题,并引起了全世界专业学者的研究与重视,尤其是抗药性的增加以及抗性基因对致病菌或非致病菌的潜在转移^[4]。近年来,关于发酵食品中乳酸菌抗药性的报道层出不穷,研究也取得了一定的进展。研究发现,大部分乳酸菌对氨基糖苷类、喹诺酮类、多粘菌素B等抗革兰阴性菌的抗

收稿日期: 2019-07-29

作者简介: 黄晓棠(1995-),女,硕士研究生,研究方向:食品工程, E-mail: xiaotang0547@163.com。

* 通讯作者: 于宏伟(1978-),男,博士,副教授,研究方向:农产品加工与贮藏, E-mail: yhw78588@sohu.com。

基金项目: 河北省教育厅重点项目(ZD2017040);河北省科技计划(17227117D-03)。

生素有抗性^[5],Li等^[6]报道了19种乳酸菌对喹诺酮类抗生素的抗性,结果表明所有菌株均对诺氟沙星和环丙沙星有抗性,且喹诺酮抗性的遗传基础可能与*gyrA*基因的突变密切相关。Nawaz等^[7]报道了分离自发酵食品中的乳酸菌携带*ermB*和*tetM*抗性基因,且可通过过滤器成功转移到粪肠球菌中。抗性基因在菌株之间的相互传递具有一定的危害性^[8],例如某些耐药基因可能会以某种方式在肠道内微生物菌群之间相互传递,从而导致某些致病菌也获得了耐药性^[9]。

作为益生菌,植物乳杆菌、干酪乳杆菌、鼠李糖乳杆菌和保加利亚乳杆菌因优良发酵特性及多种益生作用被广泛应用于工业生产、食品发酵及医疗保健等领域^[10-13],除了益生功能研究外,其耐药性的相关研究也逐年增多^[14-16]。本研究前期从自制混合发酵果蔬汁和树莓酵素中分到2株植物乳杆菌,从奶制品中分离到干酪乳杆菌、鼠李糖乳杆菌和保加利亚乳杆菌,并发现这些菌株对果蔬有良好的发酵特性^[17]。因此,本文以这5株菌为研究对象,采用平板药敏纸片扩散法、PCR及RT-PCR技术从表型、耐药基因定位及基因表达进行系统的分析,为全面评价5株菌的安全性及其应用价值提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

植物乳杆菌 S (*Lactobacillus plantarum* S) 分离自苹果、梨、香蕉混合发酵果蔬,命名为 Z1,河北农业大学酶工程实验室;植物乳杆菌 WD (*L. plantarum* WD) 分离自树莓酵素,命名为 Z2;保加利亚乳杆菌 LB-DR (*L. bulgaricus* LB-DR)、鼠李糖乳杆菌 Lr-05-281 (*L. rhamnosus* Lr-05-281)、干酪乳杆菌 D-400 (*L. casei* D-400) 分离自不同奶制品,分别命名为 B1、L1、G1,河北农业大学酶工程实验室;MRS 肉汤培养基、MRS 琼脂培养基 北京索莱宝科技有限公司;27种药敏纸片:氨基糖苷类(阿米卡星、卡那霉素、庆大霉素、链霉素)、喹诺酮类(诺氟沙星、氧氟沙星、左氟沙星、环丙沙星)、糖肽类(万古霉素)、大环内酯类(红霉素)、四环素类(四环素)、 β -内酰胺类(头孢呋辛、头孢唑啉、头孢噻吩、头孢噻肟、头孢曲松、头孢他啶、哌拉西啉、氨苄西林、苯唑西林、青霉素 G、氨基曲南)、磺胺类(复方新诺明)、其他(呋喃妥因、氯霉素、多粘菌素 B、克林霉素) 杭州滨和微生物试剂有限公司;6 × Loading Buffer、DL2000 DNA Marker 保定宝生物有限公司;Quick-RNA 真菌/细菌 Microprep 试剂盒 ZYMO RESEARCH 生物公司;HiFiScript 快速去基因组 cDNA 第一链合成试剂盒 北京康为世纪生物科技有限公司。

CP214 型电子天平 上海奥豪斯仪器有限公司;SW-CJ-1FD 型洁净工作台 苏州安泰空气技术有限公司;LS-35HD 型立式压力蒸汽灭菌器 江阴滨江医疗设备有限公司;ABI-2720 型 PCR 扩增仪 赛默飞世尔科技有限公司;SPX-250S-II 型生化培养箱 上海新苗医疗器械制造有限公司;JY600C 型电泳仪、JY04S-3E 型电泳凝胶成像分析系统 北京君

意东方电泳设备有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株活化 从-20℃冻存管中取2%菌液接种于MRS液体培养基,37℃培养12h,传代2~3次,保证菌种活力。

1.2.2 药敏试验 采用药敏纸片扩散法检测5株乳酸菌对27种抗生素的敏感性,抗性判定参照美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)最新版手册^[18]进行。

1.2.3 菌株基因组 DNA 的提取 采用传统酚-氯仿的方法^[19]提取5株乳酸菌的基因组 DNA。

1.2.4 菌株质粒的提取 采用张波等^[20]高效提取乳酸菌质粒的方法提取5株乳酸菌的质粒。

1.2.5 抗药基因的 PCR 检测 根据乳酸菌抗药性表型结果,NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)查找并下载抗性基因全序列,使用 DNAMAN 5.0 软件(美国 Lynnon Biosoft 公司)进行比对,选取同源性高的片段进行引物设计,共自行设计9对引物:卡那霉素抗性基因 *aph*、庆大霉素抗性基因 *aacI* 和 *aacII*、链霉素抗性基因 *ant*(6)、四环素抗性基因 *tet*、红霉素抗性基因 *erm*、万古霉素耐药基因 *van I* 和 *van II*、 β -内酰胺类抗性基因 *bla I*;而 β -内酰胺类抗性基因 *bla II*、磺胺类抗性基因 *sul*、喹诺酮类抗性基因 *qnr* 引自参考文献[21-23]。设计的引物由北京华大基因公司合成,序列及退火温度见表1。

分别以5株菌的基因组 DNA 和质粒为模板进行 PCR 扩增。扩增程序为:94℃预变性3min,94℃变性45s,相应退火温度45s,72℃延伸45s,72℃终延伸3min,30次循环。扩增体系为:DNA 模板1μL,上下引物(10μmol/L)各1μL,2 × ES taq Master Mix 12.5μL,ddH₂O 补足25μL。反应结束后取5μL产物点样于琼脂糖凝胶(1.0%)点样孔,120V 电泳40min,电泳结束后紫外灯下观察并拍照记录。

1.2.6 抗性基因的表达分析 5株菌分别采用MRS和添加抗生素的MRS两种培养基培养,然后用 Quick-RNA 真菌/细菌 Microprep 试剂盒提取各菌株的总 RNA,HiFiScript 试剂盒对提取到的总 RNA 进行反转录,以反转录产物为模板进行 PCR 扩增以检测抗性基因是否表达;RT-PCR 反应体系和扩增条件同上。

1.3 数据处理

数据以平均值 ± 标准偏差表示,采用 SPSS 16.0 进行统计分析,每个实验重复3次。

2 结果与分析

2.1 5株乳酸菌的药敏反应

由表2可见,5株菌的抑菌圈均在合理范围之内,试验结果可靠。5株菌均表现为多重抗药性,包括对氨基糖苷类、喹诺酮类、糖肽类抗生素和多粘菌素 B 的抗性;但对大环内酯类、四环素类、磺胺类抗生素和呋喃妥因敏感,有较为相似的耐药谱,而对 β -内酰胺类抗生素表现出不同程度的抗性,可见不同菌株的抗药性是有差异的。

已有研究报道,Zhou 等^[24]检测了4种益生乳酸

表1 抗性基因引物序列及条件

Table 1 Primer sequences of the resistance gene and conditions

抗性基因	引物序列(5'-3')	退火温度(℃)	目的片段长(bp)	参考文献
<i>aph</i>	<i>aph</i> -F: GKATGTGCTTGTTCACGAT <i>aph</i> -R: TTGCTTCGACGTCGCCAT	54	406/350	-
<i>ant</i> (6)	<i>ant</i> (6)-F: CCWTTYTGTTTCAGGATTTTAG <i>ant</i> (6)-R: GCAGAGGTAACGAAAGCAA	54	402	-
<i>aac</i> I	<i>aac</i> I-F: GCGTTTCAAATCCTCATCAA <i>aac</i> I-R: ATTACCCCGGGCTGTTGT	56	485	-
<i>aac</i> II	<i>aac</i> II-F: GCCAKGCTGCTWTTACCAT <i>aac</i> II-R: TTGACCCGGGATGAGCTTAA	56	702	-
<i>tet</i>	<i>tet</i> -F: CTGAACAATGGGATACRGAAT <i>tet</i> -R: GTAGAAGSGGATCACTATC	54	589	-
<i>van</i> I	<i>van</i> I-F: ACGCCATGTTTCAGGTAGAT <i>van</i> I-R: GAGCACCGTCAACAATTT	54	252	-
<i>van</i> II	<i>van</i> II-F: GGGAAAGTTTAACGATGATTTTC <i>van</i> II-R: ATCACCAACTCAATTTAGC	52	657	-
<i>erm</i>	<i>erm</i> -F: GCTAAGCATAATACCGAAACT <i>erm</i> -R: GCATCTTCACGGGTACTATA	52	853	-
<i>bla</i> I	<i>bla</i> I-F: TGKCGAGATAGGAAAGTGTGC <i>bla</i> I-R: ACTGTCCGGCAAGGTAAGTTG	56	526	-
<i>bla</i> II	<i>bla</i> II-F: GAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGC <i>bla</i> II-R: GACTTCCCGTCGTGTAGATAAC	58	490	[21]
<i>sul</i>	<i>sul</i> I-F: CCTGTTTCGTCCGACACAGA <i>sul</i> I-R: GAAGCGCAGCCGCAATTCAT	57	435	[22]
<i>qnr</i>	<i>qnr</i> I-F: ATGACGCCATTACTGTATAA <i>qnr</i> I-R: GATCGCAATGTGTGAAGTTT	50	562	[23]

表2 5株菌药敏试验结果

Table 2 Antibiotic resistance results of 5 strains

抗生素名称	纸片含药量(μg)	抑菌圈直径判断标准(mm)			Z1	Z2	B1	G1	L1
		R	I	S					
阿米卡星	30	≤14	15~16	≥17	R	R	R	R	R
卡那霉素	30	≤12	13~14	≥15	R	R	R	R	R
庆大霉素	10	≤12	13~14	≥15	R	R	R	R	R
链霉素	10	≤11	12~14	≥15	R	R	R	R	I
诺氟沙星	10	≤12	13~16	≥17	R	R	R	R	I
氧氟沙星	5	≤13	14~16	≥17	R	R	I	R	R
左氟沙星	5	≤12	13~16	≥17	R	I	I	I	R
环丙沙星	5	≤15	16~20	≥21	R	R	R	R	R
万古霉素	30	≤14	15~16	≥17	R	R	R	R	R
红霉素	15	≤13	14~22	≥23	I	S	S	S	S
四环素	30	≤14	15~18	≥19	I	S	S	S	S
头孢呋辛	30	≤14	15~17	≥18	R	S	S	S	S
头孢唑啉	30	≤14	-	≥15	S	S	S	S	S
头孢噻吩	30	≤14	15~17	≥18	S	S	S	S	S
头孢噻肟	30	≤22	23~25	≥26	R	S	R	S	I
头孢曲松	30	≤13	14~20	≥21	I	S	I	S	S
头孢他啶	30	≤14	15~17	≥18	R	S	R	S	R
哌拉西啉	10	≤28	-	≥29	R	S	S	S	S
氨苄西林	10	≤16	18~24	≥25	S	S	S	S	S
苯唑西林	1	≤17	-	≥25	R	I	I	R	R
青霉素 G	10	≤28	-	≥29	R	R	R	R	I
氨基曲南	30	≤15	16~21	≥22	R	R	R	R	R
复方新诺明	23.75	≤10	11~15	≥16	S	S	S	S	S
呋喃妥因	300	≤14	15~16	≥17	S	S	S	S	S
氯霉素	30	≤12	13~17	≥18	R	S	S	S	S
多粘菌素 B	30	≤11	12~14	≥15	R	R	R	R	R
克林霉素	2	≤13	14~17	≥18	I	S	S	S	S

注:R:抗性;I:中介;S:敏感性。

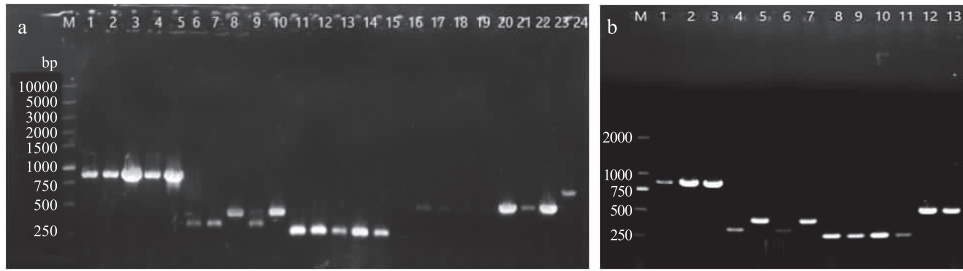


图1 5株菌的抗性基因PCR电泳图谱

Fig.1 PCR amplification results of 5 strains of resistance genes

注:a 图为基因组 DNA 为模板;a 图中:M:Super DNA Marker;1~5:*erm*(Z1、Z2、B1、G1、L1);6~10:*aph*;11~15:*van I*;16~20:*bla II*;21~23:*aac I*(B1、G1、L1);24:*aac II*(L1)。b 图为质粒 DNA 为模板;b 图中:M:DL2000 DNA Marker;1~3:*erm*(Z1、B1、L1);4~7:*aph*(Z1、B1、G1、L1);8~11:*van I*(Z1、Z2、G1、L1);12~13:*aac I*(B1、L1)。

菌的抗药性,发现3株鼠李糖乳杆菌均对万古霉素有抗性,对红霉素、四环素敏感,与本研究一致。吕耀龙等^[25]研究发现内蒙古达茂旗牧区牛乳中植物乳杆菌均对红霉素敏感,而本研究中2株植物乳杆菌对红霉素有不同的抗药性,Z1对红霉素表现为中介,Z2对红霉素表现为敏感,由此可见,同种菌的不同菌株对同种抗生素的抗药性不同,这可能由于菌株来源不同,所以其抗药性也有差异。药敏纸片扩散法操作简单、省时省力的优点被广泛应用,但影响结果的因素较多,如抗生素纸片的含药量不同、培养基不同、菌体生长情况不同等。菌株对于同类抗生素的抗药表型与携带的抗药基因有一定的关联,因此,乳酸菌抗药性的检测还常常借助于特异性引物PCR方法。

2.2 抗性基因的遗传定位

为了确定抗性基因是存在于基因组上,还是质粒上,亦或者是二者均有,本试验分别以基因组DNA和质粒DNA为模板进行PCR扩增,扩增结果见图1。基因组上共检测到6个抗性基因(*erm*、*aph*、*van I*、*bla II*、*aac I*和*aac II*),质粒上共检测到4个基因(*erm*、*aph*、*van I*和*aac I*),其它供试抗性基因(*qnr*、*sul*、*ant(6)*、*tet*、*van II*、*bla I*)均未检测到。对这5株菌而言,基因组上都检测到*erm*、*aph*、*van I*、*bla II*,B1、G1和L1这3株菌同时检测到*aac I*,L1还检测到*aac II*;至于*aph*基因扩增片段大小不同,原因是不同的菌抗性基因本身大小不同所致。

抗性基因在质粒上的分布也不一致,其中菌株Z2质粒上只检测到*van I*,而L1质粒上4种抗性基因都检测到,另外3株菌质粒上也分别有2~3种抗性基因。已有文献表明,乳酸菌中存在接合质粒和转座子,接合作用被认为是乳酸菌获得抗性基因的主要方式^[26]。目前许多研究者都证实乳酸菌上的几种抗性基因会在乳酸菌与同种菌株或其他菌株之间发生转移^[27],因此有待进一步研究质粒上的抗性基因是否会转移到其他菌株上。如果仅在基因组DNA上检测到,在质粒上却未检测到,说明这个抗性基因可能是固有耐药基因,不会发生水平转移;但只要有抗性质粒,就存在抗性质粒水平转移的可能性,因此,相较于其它供试菌株,Z2菌株在抗药性方面更具安全性。

2.3 抗性基因与表型的关系

表3总结了抗生素抗性与相关抗性基因之间的关系,菌株携带的抗药基因与抗药表型之间有一定关联。如5株菌对卡那霉素、万古霉素有抗性,且检测到*aph*、*van I*,5株菌对复方新诺明敏感,且未检测到

表3 抗生素抗性与相关抗性基因之间的关系

Table 3 Relationship between antibiotic resistance and related resistance genes

抗生素	表型/基因	菌株				
		Z1	Z2	B1	G1	L1
卡那霉素	表型	R	R	R	R	R
	<i>aph</i> 耐药基因	+	+	+	+	+
庆大霉素	表型	R	R	R	R	R
	<i>aac I</i> 耐药基因	-	-	+	+	+
	<i>aac II</i> 耐药基因	-	-	-	-	+
链霉素	表型	R	R	R	R	I
	<i>ant(6)</i> 耐药基因	-	-	-	-	-
环丙沙星	表型	R	R	R	R	R
诺氟沙星	表型	R	R	R	R	I
氧氟沙星	表型	R	R	I	R	R
左氟沙星	表型	R	I	I	I	R
万古霉素	<i>qnr</i> 耐药基因	-	-	-	-	-
	表型	R	R	R	R	R
红霉素	<i>van I</i> 耐药基因	+	+	+	+	+
	<i>van II</i> 耐药基因	-	-	-	-	-
四环素	表型	I	S	S	S	S
	<i>erm</i> 耐药基因	+	+	+	+	+
青霉素 G	表型	I	S	S	S	S
	<i>tet</i> 耐药基因	-	-	-	-	-
氨基曲南	表型	R	R	R	R	R
	表型	R	I	I	R	R
苯唑西林	表型	S	S	S	S	S
	表型	S	S	S	S	S
头孢唑啉	表型	S	S	S	S	S
	表型	S	S	S	S	S
头孢噻吩	表型	S	S	S	S	S
	表型	S	S	S	S	S
氨苄西林	表型	R	S	S	S	S
	<i>bla I</i> 耐药基因	-	-	-	-	-
哌拉西林	<i>bla II</i> 耐药基因	+	+	+	+	+
	表型	S	S	S	S	S
复方新诺明	表型	S	S	S	S	S
	<i>sul</i> 耐药基因	-	-	-	-	-

注:R:抗性;I:中介;S:敏感性;+:检测到抗性基因,-:未检测到抗性基因。

到 *sul*, 表型与基因型结果一致。

然而, 在部分抗药菌株中并没有检测到相应的抗药基因, 本研究中 5 株菌对喹诺酮类抗生素、链霉素有抗性, 却未检测到相应的抗性基因, 分析产生这种现象的原因可能是 5 株菌对链霉素或喹诺酮类抗生素的抗性可能是抗性基因检测不够全面, 有其他或新的抗性基因导致菌株具有抗药性, 还可能是这个抗性基因在某种特定条件下才会表达等其他原因。类似的结果之前也有文献报道, Hummel 等^[28]研究了 45 种乳酸菌的抗药性, 结果发现植物乳杆菌 BFE 7440 对氯霉素有抗性, 却未检测到氯霉素抗性基因 *cat*; Rojo-Bezares 等^[29]研究了酒中乳酸菌的耐药性, 研究表明植物乳杆菌 C709 对万古霉素有抗性, 也未检测到相关抗性基因。另外, 表型敏感的菌株也可能携带抗性基因, 本研究中 4 株菌对红霉素敏感, 却都检测到红霉素抗性基因 *erm*。秦宇轩等^[30]检测了酸奶中分离出的乳酸菌的抗药性, 研究表明干酪乳杆菌对四环素敏感, 但在干酪乳杆菌中检测到四环素抗性基因 *tetK*、*tetM*。这可能是由于其携带的抗性基因沉默所致。

5 株菌对不同的 β -内酰胺类抗生素有不同的敏感性, 对头孢菌素类抗生素、哌拉西林、氨苄西林有较高的敏感性, 对苯唑西林、青霉素 G、氨曲南有较高的抗性, 5 株菌均检测到 β -内酰胺类抗性基因 *bla II* 而未检测到 *bla I*, 分析原因可能是抗性基因 *bla II* 导致菌株的抗药性。

2.4 抗性基因的表达分析

抗性基因能否表达也是其评价指标之一, 针对检测到的 6 种抗性基因进行了 RT-PCR。试验采用了 MRS 培养和抗生素诱导培养两种方式, 从而进一步证明抗性基因的表达条件。氨基糖苷类抗生素选取庆大霉素、卡那霉素, 糖肽类抗生素用万古霉素, 大环内酯类用红霉素, β -内酰胺类抗生素用青霉素 G。除了红霉素诱导不长菌之外, 其余抗生素诱导都长菌。

表 4 抗性基因表达检测结果
Table 4 Result of resistance gene expression

菌株	诱导方式	抗性基因					
		<i>erm</i>	<i>aph</i>	<i>van I</i>	<i>bla II</i>	<i>aac I</i>	<i>aac II</i>
Z1	MRS	-	-	+	+	×	×
	MRS + 抗生素	/	-	+	+	×	×
Z2	MRS	-	+	+	+	×	×
	MRS + 抗生素	/	-	+	+	×	×
B1	MRS	+	+	-	+	+	×
	MRS + 抗生素	/	+	-	+	+	×
G1	MRS	-	-	+	+	-	×
	MRS + 抗生素	/	-	+	+	-	×
L1	MRS	+	+	-	+	+	-
	MRS + 抗生素	/	+	-	+	+	-

注: +: 检出; -: 未检出; /: 未长菌, 无法检验; ×: 未提取到抗性基因。

由表 4 可见, 对 *aph* 抗性基因来说, 植物乳杆菌 Z2 菌株与其它四种菌表现不同, 用 MRS 培养基上卡

那霉素抗性基因 *aph* 表达, 用添加卡那霉素后其 *aph* 基因不表达; 对 *van I*、*bla II*、*aac I* 和 *aac II* 4 种抗性基因而言, 5 株菌在 MRS 培养基和添加抗生素的 MRS 培养基中的表达情况一致, 表达的仍旧表达, 不表达的依然不表达, 由此说明沉默的抗性基因在诱导培养的条件下依然沉默, 这些沉默的抗性基因可能在特定的条件下才能被激活表达, 这个特定的表达条件有待进一步研究。

3 结论

5 株菌均表现出对氨基糖苷类、喹诺酮类、糖肽类抗生素和多粘菌素 B 的多重抗药性。其耐药基因型分别为: Z1 和 Z2 为 *erm*^r、*aph*^r、*van I*^r、*bla II*^r, B1 和 G1 为 *erm*^r、*aph*^r、*van I*^r、*bla II*^r、*aac I*^r, L1 为 *erm*^r、*aph*^r、*van I*^r、*bla II*^r、*aac I*^r、*aac II*^r。5 株菌质粒上所含的抗药基因数量不同, Z2 菌株质粒上因只含一种 *van I* 抗性基因, 其应用安全性较好。

另外, 质粒上的抗性基因可能存在转移到其他菌株的风险。目前关于乳酸菌耐药性的研究多在耐药表型、耐药基因检测及耐药机制等方面, 我们也应多研究如何消除耐药基因及消除耐药基因后乳酸菌益生性能有无变化。因此, 要加强对乳酸菌抗药性的研究, 进一步研究消除耐药基因后乳酸菌的益生性变化, 从而保障发酵食品的质量安全, 同时为发酵食品企业评估菌株的抗药性提供理论基础。

参考文献

- [1] Tsai Y T, Cheng P C, Pan T M. The immunomodulatory effects of lactic acid bacteria for improving immune functions and benefits [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 96 (4): 853-862.
- [2] Bourdichon F, Casaregola S, Farrokh C, et al. Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use [J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 154 (3): 87-97.
- [3] Riaz Rajoka M S, Shi J, Zhu J, et al. Capacity of lactic acid bacteria in immunity enhancement and cancer prevention [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101 (1): 35-45.
- [4] Fraqueza João M. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from dry-fermented sausages [J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 212: 76-88.
- [5] 张灼阳, 刘畅, 郭晓奎. 乳酸菌耐药性的研究进展 [J]. 中国微生物学杂志, 2007, 19 (5): 478-480.
- [6] Li S, Li Z, Wei W, et al. Association of mutation patterns in *gyrA* and *parC* genes with quinolone resistance levels in lactic acid bacteria [J]. The Journal of Antibiotics, 2015, 68 (2): 81-87.
- [7] Nawaz M, Wang J, Zhou A, et al. Characterization and transfer of antibiotic resistance in lactic acid bacteria from fermented food products [J]. Current Microbiology, 2011, 62 (3): 1081-1089.
- [8] Shalini Mathur, Rameshwar Singh. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria - A review [J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 105: 281-295.
- [9] 李福, 贾丹, 刘军龙, 等. 新分离植物乳杆菌的药敏性和抑菌性试验 [J]. 中国兽医科学, 2019, 49 (7): 879-886.

- [10] 杨子燕,赵世伟,马万平,等.干酪乳杆菌的筛选及其在活性乳酸菌饮料中的应用[J].食品工业科技,2018,39(3):106-111.
- [11] 符恒,袁爽,陈杰,等.保加利亚乳杆菌在酸奶制品中的应用及其研究进展[J].食品工业科技,2014,35(9):360-362.
- [12] 任伟,杜晓华,何伟,等.鼠李糖乳杆菌在发酵乳中的应用[J].中国乳业,2019,211(7):79-81.
- [13] 武万强,王琳琳,赵建新,等.植物乳杆菌生理特性及益生功能研究进展[J].食品与发酵工业,2019,45(1):5-17.
- [14] Asli Akpinar, Oktay Yerlikaya, Sevda Kilic. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains isolated from Turkish homemade yoghurts [J]. African Journal of Microbiology Research, 2011, 5(6): 675-682.
- [15] 李红叶,姜帅铭,赵永平,等.植物乳杆菌 HNU082 抗生素抗性及相关基因的关系[J].食品工业科技,2019,40(6):6-12.
- [16] Kafili T, Razavi S H, Djomeh Z E, et al. Antibiotic resistance -susceptibility profiles of *Lactobacillus* strains from Lighvan, a traditional Iranian raw milk cheese. [J]. Milchwissenschaft -milk Science International, 2010, 65(1): 59-62.
- [17] 常曼曼,李颖,阴芳冉,等.保加利亚乳杆菌 LB-DR 发酵红树莓汁的特性及代谢产物研究[J].林业与生态科学,2018,33(4):408-414.
- [18] Clinical and Laboratory Standards Institute. M100 - S25 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-eighth informational supplement [S]. CLSI, 2018.
- [19] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E. Current protocols in molecular biology [J]. Quarterly Review of Biology, 1987, 1(4): 286.
- [20] 张波,李晨,董慧,等.1种快速高效提取乳酸菌质粒的方法[J].中国食品学报,2014,14(9):7-13.
- [21] 赖海梅,邹立扣,刘书亮,等.肉鸡屠宰产业链中沙门氏菌耐药基因检测与耐药相关性分析[J].食品工业科技,2015,36(7):187-191.
- [22] 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.
- [23] 姜晓冰,张家洋,王艳博,等.动物性食品源大肠杆菌质粒介导喹诺酮的耐药机制研究[J].现代食品科技,2016,32(1):58-64.
- [24] Zhou J S, Pillidge C J, Gopal P K, et al. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains [J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 98(2): 211-217.
- [25] 吕耀龙,李少英,赵春杰,等.内蒙古达茂旗牧区牛乳中乳酸菌的耐药性及 *gyrA* 基因分析[J].食品工业科技,2017,38(3):166-169.
- [26] Sharma P, Tomar S K, Goswami P, et al. Antibiotic resistance among commercially available probiotics [J]. Food Research International, 2014, 57: 176-195.
- [27] 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.
- [28] Hummel A S, Hertel C, Holzappel W, et al. Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2007, 73(3): 730-739.
- [29] Rojo-Bezares B, Yolanda Sáenz, Poeta P, et al. Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolated from wine [J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 111(3): 234-240.
- [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.
- [31] 张波,李晨,董慧,等.1种快速高效提取乳酸菌质粒的方法[J].食品工业,2016,37(10):64-69.
- [32] 张波,李晨,董慧,等.1种快速高效提取乳酸菌质粒的方法[J].食品工业,2016,37(10):64-69.
- [33] grape juices by HPLC: Method validation and characterization of products from northeast Brazil [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2018, 66: 160-167.
- [34] Radin L, Pronzato C, Casareto L, et al. Tartaric acid in wines may be useful for preventing renal calculi: Rapid determination by HPLC [J]. Journal of Liquid Chromatography, 1994, 17(10): 2231-2246.
- [35] 张超,徐洲,游玲,等.野生猕猴桃果酒带渣发酵的研究[J].食品研究与开发,2012,33(8):23-27.
- [36] 杨春霞,苟春林,单巧玲.葡萄酒酿造过程中有机酸变化规律研究[J].中国酿造,2017(4):83-86.
- [37] 张婷,陈小伟,张琪,等.木薯酒发酵过程中的有机酸变化及其对其品质的影响分析[J].中国酿造,2018,37(5):86-91.
- [38] Sun L, Zhang J, Lu X, et al. Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves [J]. Food and Chemical Toxicology, 2011, 49(10): 2689-2696.
- [39] 莫大美,吴荣书.复合菌种发酵法制备玫瑰酵素工艺研究[J].食品工业,2016,37(10):64-69.
- [40] Lacan D, Baccou J C. High levels of antioxidant enzymes correlate with delayed senescence in nonnetted muskmelon fruits [J]. Planta, 1998, 204(3): 377-382.
- [41] 崔国庭,王缎,刘向丽,等.响应面法优化草莓酵素的发酵工艺及其生物活性初探[J].食品工业科技,2018,39(9):143-148.
- [42] Hunaefi D, Riedel H, Akumo D N, et al. Effect of lactic acid bacteria fermentation on rosmarinic acid and antioxidant properties of *in vitro* shoot culture of *Orthosiphon aristatus* as a model study [J]. Food Biotechnology, 2013, 27(2): 152-177.
- [43] Bei Q, Liu Y, Wang L, et al. Improving free, conjugated, and bound phenolic fractions in fermented oats (*Avena sativa* L.) with *Monascus anka* and their antioxidant activity [J]. Journal of Functional Foods, 2017, 32: 185-194.
- [44] Mareček V, Mikyška A, Hampel D, et al. ABTS and DPPH methods as a tool for studying antioxidant capacity of spring barley and malt [J]. Journal of Cereal Science, 2017, 73: 40-45.

(上接第 110 页)

grape juices by HPLC: Method validation and characterization of products from northeast Brazil [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2018, 66: 160-167.

[37] Radin L, Pronzato C, Casareto L, et al. Tartaric acid in wines may be useful for preventing renal calculi: Rapid determination by HPLC [J]. Journal of Liquid Chromatography, 1994, 17(10): 2231-2246.

[38] 张超,徐洲,游玲,等.野生猕猴桃果酒带渣发酵的研究[J].食品研究与开发,2012,33(8):23-27.

[39] 杨春霞,苟春林,单巧玲.葡萄酒酿造过程中有机酸变化规律研究[J].中国酿造,2017(4):83-86.

[40] 张婷,陈小伟,张琪,等.木薯酒发酵过程中的有机酸变化及其对其品质的影响分析[J].中国酿造,2018,37(5):86-91.

[41] Sun L, Zhang J, Lu X, et al. Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves [J]. Food and Chemical Toxicology, 2011, 49(10): 2689-2696.

[42] 莫大美,吴荣书.复合菌种发酵法制备玫瑰酵素工艺研