

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
53(8):889-897; 4 August 2013  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 市售酸奶中乳酸菌的鉴定与耐药性

秦宇轩<sup>1</sup>, 李晶<sup>2</sup>, 王秋涯<sup>3</sup>, 高可心<sup>4</sup>, 朱宝利<sup>2</sup>, 律娜<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> 贵州大学生命科学学院, 贵阳 550025

<sup>2</sup> 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

<sup>3</sup> 清华大学附属中学, 北京 100084

<sup>4</sup> 中国人民大学附属中学, 北京 100080

**摘要:**【目的】检测市售酸奶中乳酸菌的种类及其耐药情况。【方法】收集 10 种来自 5 个不同厂家的酸奶, 通过细菌基因组重复基因外回文序列-PCR (repetitive extragenic palindromic-PCR, rep-PCR) 结合 16S rRNA 同源性分析的方法对分离的乳酸菌进行基因分型和菌种鉴定。利用药敏纸片扩散法 (K-B 法) 对分离的乳酸菌进行针对 7 种抗生素的药敏实验, 用 PCR 特异性扩增结合测序的方法检测每个样品中不同基因型菌株的耐药基因 (包括红霉素耐药基因 *erm A*、*erm B* 和四环素耐药基因 *tet M*、*tet K*、*tet S*、*tet Q*、*tet O*、*tet L*、*tet W*)。【结果】10 种市售酸奶中分离到 100 株乳酸菌。其中, 德氏乳杆菌保加利亚亚种 (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*) 23 株, 干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*) 26 株, 嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*) 30 株, 嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) 5 株, 植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 6 株, 副干酪乳杆菌 (*Lactobacillus paracasei*) 10 株。药敏实验发现所有 100 株乳酸菌均对链霉素和庆大霉素耐药, 42 株对万古霉素耐药, 没有菌株对头孢氨苄, 四环素, 红霉素以及土霉素耐药。在 28 株经过 16S rRNA 测序的乳酸菌中检测到 5 种不同的耐药基因, 在 8 株乳酸菌中检测到 *erm B* 基因, 4 株检测到 *tet K* 基因, 2 株菌检测到 *tet L* 基因, 4 株菌检测到 *tet M* 基因, 2 株菌检测到 *tet O* 基因, 没有检测到 *erm A*, *tet S*, *tet Q*, *tet W* 基因。28 株乳酸菌中有 15 株 (53.57%) 检测到耐药基因, 其中有 4 株 *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 检测到 2-3 种不同的耐药基因。【结论】本研究在市售酸奶中除了检测到商品标签上标注的 *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 和 *S. thermophilus* 以外, 还检测到商标上没有标注的乳酸菌; 作为常用发酵剂的德氏乳杆菌保加利亚亚种和嗜热链球菌更容易检测到耐药基因; 分离得到的乳酸菌均对红霉素和四环素敏感却检测到相应的耐药基因, 再一次证明了没有耐药表型的菌株也可能携带耐药基因。

**关键词:** 酸奶, 乳酸菌, 基因分型, 分子鉴定, 耐药基因

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2013)08-0889-09

酸奶是以鲜奶为原料, 经过巴氏杀菌后添加发酵剂, 发酵后, 再冷却灌装的一种发酵乳制品。乳酸菌作为主要发酵剂, 因其良好的发酵性能, 以及益生

功效在发酵食品行业中占有不可替代的位置。

乳酸菌是指发酵糖类, 主要代谢产物为乳酸的一类无芽孢、革兰氏阳性细菌的总称<sup>[1]</sup>。乳酸菌有

\* 通信作者。Tel: +86-10-64807433; E-mail: lvna@im.ac.cn

作者简介: 秦宇轩 (1989-), 男, 河北保定人, 硕士研究生, 研究方向为微生物与生化药学。E-mail: qinyuxuan8899@163.com

收稿日期: 2012-12-19; 修回日期: 2013-04-02

着相当长的安全使用历史,长期以来发酵产品中所使用的乳酸菌普遍被人们认为是安全(Generally regarded as safe, GRAS)菌株,并且它还与人以及动物肠道内生微生物群落存在着相互作用,产生益生作用,有益于人和动物的健康<sup>[2]</sup>。2002年,国际乳业联合会公布的在发酵乳制品中有长期安全使用历史的微生物名单中细菌有18个属81个种,其中乳酸杆菌有36个种、双歧杆菌有8个种<sup>[3]</sup>。其中德氏乳酸杆菌保加利亚亚种和嗜热链球菌是目前制作酸奶的主要发酵剂,所有酸奶的标签上都标注有这两种乳酸菌。

rep-PCR(repetitive extragenic palindromic-PCR)即细菌基因组重复基因外回文序列扩增技术,该技术是扩增细菌基因组DNA中广泛存在的短重复序列,根据扩增产物的电泳条带差异,揭示细菌基因组之间的差异,达到对细菌进行基因分型的目的。本研究利用乳酸菌中的1个长度为38 bp的重复序列(由1个保守回文段及两端分别6个简并位点和1个5 bp的可变框组成<sup>[4]</sup>)进行乳酸菌种内的基因分型,结合16S rRNA序列同源性的方法对酸奶中的乳酸菌进行菌种鉴定。

近几十年来抗生素在医疗,兽医以及动物饲料等行业得到了广泛应用,甚至出现了滥用现象,导致微生物耐药问题日趋严重,使人们在应对细菌感染疾病时将面临前所未有的挑战<sup>[5]</sup>。早期有关细菌耐药的研究主要集中在病原微生物的研究上,但是近些年对于环境中的共生细菌以及以乳酸菌为代表的益生菌耐药的关注越来越多<sup>[6-9]</sup>。研究发现乳酸菌对甲氧苄氨嘧啶,氟喹诺酮类以及磺胺类抗生素具有天然耐受能力<sup>[10]</sup>;对除氨基糖苷类以外的蛋白抑制类抗生素敏感;除德氏乳酸杆菌保加利亚亚种(*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*),嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*),约氏乳酸杆菌(*Lactobacillus johnsonii*),弯曲乳杆菌(*Lactobacillus crispatus*)以外的许多乳酸菌都对糖肽类的抗生素具有天然耐受能力<sup>[7-9]</sup>。在研究初期,学者们认为乳酸菌的耐药对其定植于人类或动物肠道内发挥益生功效有一定的帮助,但随后越来越多的报道显示乳酸菌的耐药机制与许多病原菌的耐药机制十分相似。已有报道称某些乳酸菌携带耐药基因且具有相应的耐药表型<sup>[11]</sup>。如 Mathur, Hummel 以及 Cataloluk 等人就在发酵食品中检测到红霉素和四环

素的耐药基因<sup>[2,6,12]</sup>。在生产酸奶用的乳杆菌、双歧杆菌和嗜热链球菌的某些菌株中也检测到一些耐药基因<sup>[6]</sup>。这些乳酸菌作为益生菌在进入人体后(尤其是肠道),有将耐药基因水平传播给体内的其他细菌,包括条件致病菌和致病菌的可能性<sup>[13]</sup>,从而对人类健康产生潜在的威胁。因此,是否携带耐药基因已经成为评价益生菌安全与否的重要标准之一<sup>[14]</sup>。

近年来国内外越来越多的研究表明,长期以来被认为安全的、广泛应用于发酵食品领域的乳酸菌已经产生耐药并携带了相应的耐药基因。本研究通过调查市售酸奶中的乳酸菌及其耐药情况,了解酸奶中的乳酸菌组成;在确定耐药表型的情况下,检测针对红霉素和四环素的耐药基因,验证耐药表型为敏感的乳酸菌是否携带相应的耐药基因;为乳酸菌的安全评价提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂和仪器

de Man, Rogosa and Sharpe(MRS)乳酸菌选择性培养基购于英国OXOID公司;细菌基因组DNA提取试剂盒购于北京艾德莱生物科技有限公司;TaqDNA聚合酶购于宝生物工程(大连)有限公司;PCR扩增所需引物均由上海生工生物工程有限公司合成。微量核酸定量仪(ND1000型)购于美国NanoDrop公司,PCR仪(2720型)购于美国Applied Biosystems公司;电泳仪(Powerpac™基础型)购于美国BIO-RAD公司;凝胶成像系统(AlphaImager EP通用型)购于美国Alpha Innotech公司;离心机(Z216 MK型)购于德国HERMLE公司,恒温培养箱(HPX-9272 MBX型)购于上海博迅公司等。

### 1.2 乳酸菌株分离

5个品牌的10种酸奶全部购于北京市正规超市,至实验时均处于产品保质期内。样品A1-A4来自厂商A,B1-B2、C1-C2分别来自厂商B和C,D1和E1分别来自厂商D和E。样品稀释10000倍后涂布于MRS固体培养基上,40℃培养48 h。每个样本随机挑选10个单菌落,接种于4 mL MRS液体培养基(蛋白胨10 g/L;牛肉膏8 g/L;酵母提取物4 g/L;葡萄糖20 g/L;吐温80 1 mL/L;K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 g/L;CH<sub>3</sub>COONa·3H<sub>2</sub>O 5 g/L;柠檬酸三铵2 g/L;

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g/L; MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.05 g/L)中, 37℃富集培养 48 h 备用。样品的单菌落编号为样品名-菌落号,如样本 A1 的菌落编号为 A1-1, A1-2 ……A1-10,富集培养出的菌株用于菌种的保藏、基因组 DNA 的提取和耐药表型检测。

### 1.3 菌株基因组 DNA 的提取

取 3 mL 富集培养的菌液,按照北京艾德莱生物有限公司提供的细菌基因组 DNA 提取试剂盒的使用说明提取基因组 DNA。DNA 提取结果用 1% 琼脂糖凝胶电泳经溴化乙锭 (EB) 染色后通过凝胶成像系统进行检测。

### 1.4 rep-PCR 基因分型与 16S rRNA 测序

为了节约实验成本,本研究首先对 100 株分离菌株用 rep-PCR 的方法进行基因分型,然后对同一样本中基因型不同的菌株进行 16S rRNA 的测序。rep-PCR 扩增引物为: REP1R-Dt (3'-CGGNCTACNGCNGCNIII-5') 和 REP2-Dt (3'-CATCCGGNCTATTCNGCN-5')<sup>[15]</sup>。PCR 反应体系 (25 μL): 1 × PCR 缓冲液,二甲基亚砜 10%,上游及下游引物各 50 pmol, dNTPs 1.2 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 7 mmol/L, 2.5 U *Taq* DNA 聚合酶, 100ng DNA 模板。反应条件为: 94℃ 7 min; 90℃ 30 s, 40℃ 1 min, 65℃ 8 min, 32 个循环; 65℃ 16 min。所得产物用 1.5% 琼脂糖进行凝胶电泳,经 EB 染色后通过凝胶成像系统观察 rep-PCR 带型,挑选出各个样品中带型不同的菌株进行 16S rRNA 测序。

挑选出来的菌株用引物 8FLP-F: (5'-GGATCCGCGGCCGCTGCAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 XB4-R: (5'-GTGTGTACAAGGCCCCGGAAC-3')<sup>[16]</sup> 进行 16S rRNA 的 PCR 扩增。PCR 扩增体系 (25 μL): 1 × PCR 缓冲液, 200 μmol/L dNTPs, 上下游引物各 0.2 μmol/L, 1 U *Taq* DNA 聚合酶, 100 ng 模板 DNA。反应条件为: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 90 s, 35 个循环; 72℃ 10 min。PCR 产物送北京诺赛基因组中心有限公司,用相同引物进行双向测序。测序结果经拼接后在 NCBI 数据库中进行 BLAST 同源比对,所测序列与已知序列的一致性大于 98% 就认为是该种乳酸菌。

### 1.5 乳酸菌耐药表型分析

分离得到的 100 株乳酸菌经富集培养后,取 100 μL 菌液涂布于固体 MRS 培养基上,将 7 种不同的药敏检测纸片 (英国 OXOID 公司): 土霉素 (四环素类, 30 μg), 万古霉素 (糖肽类, 30 μg), 头孢氨苄 (β-内酰胺类, 30 μg), 庆大霉素 (氨基糖苷类, 10 μg), 四环素 (四环素类, 30 μg), 链霉素 (氨基糖苷类, 10 μg) 以及红霉素 (大环内脂类, 5 μg), 放置于涂布乳酸菌的 MRS 培养基上。经 40℃ 培养 48 h 后观察抑菌圈的情况。结果参照美国临床实验室标准委员会 (NCCLS) 关于纸片扩散法判读标准进行判断。

### 1.6 乳酸菌耐药基因扩增及测序

本研究对经过 16S rRNA 测序的乳酸菌进行了

表 1. 耐药基因扩增引物及退火温度

Table 1. Primers and PCR conditions for selected antibiotic resistance genes tested in the LAB strains

| Primer name  | Primer sequence(5' → 3')                                | Annealing temperature/°C | Size/bp | Reference |
|--------------|---------------------------------------------------------|--------------------------|---------|-----------|
| <i>erm</i> A | F: AAGCGTAAACCCCTCTGA<br>R: TTCGCAAATCCCTTCTCAAC        | 55                       | 190     | [17]      |
| <i>erm</i> B | F: GAAAAGRTACTCAACCAAATA<br>R: AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC | 52                       | 642     | [18]      |
| <i>tet</i> M | F: GTTAAATAGTGTCTTGGAG<br>R: CTAAGATATGGCTCTAACAA       | 55                       | 576     | [19]      |
| <i>tet</i> K | F: TTAGGTGAAGGTTAGGTCC<br>R: GCAAACCTATCCAGAAGCA        | 55                       | 697     | [19]      |
| <i>tet</i> L | F: CATTGGTCTTATTGGATCG<br>R: ATTACACTTCCGATTTCCG        | 50                       | 456     | [19]      |
| <i>tet</i> S | F: ATCAAGATATTAAGGAC<br>R: TTCTCTATGTGTAATC             | 56                       | 573     | [20]      |
| <i>tet</i> O | F: AACTTAGGCATTCTGGCTCAG<br>R: TCCCACCTGTCCATATCGTCA    | 52                       | 515     | [20]      |
| <i>tet</i> Q | F: AGAATCTGCTGTTTGCAGTG<br>R: CGGAGTGTCAATGATATTGCA     | 56                       | 169     | [20]      |
| <i>tet</i> W | F: GAGAGCCTGCTATATGCCAGC<br>R: GGGCCTATCCACAATGTTAAC    | 64                       | 168     | [21]      |

耐药基因的检测,包括 2 个针对红霉素的耐药基因 (*erm A*、*erm B*) 和 7 个针对四环素的耐药基因 (*tet M*、*tet L*、*tet O*、*tet Q*、*tet S*、*tet W*、*tet K*),上述基因采用表 1 中的引物进行扩增。PCR 反应体系 (50  $\mu$ L): 上下游引物各 25 pmol, 根据反应需要加入  $MgCl_2$  1.5、2.0、2.5 或 3.0 mmol/L, DNA 模板加入 50–100 ng, *Taq* DNA 聚合酶 2.5 U。反应条件为: 94 $^{\circ}C$  5 min; 94 $^{\circ}C$  30 s, 退火时间 30 s (不同基因退火温度见表 1), 72 $^{\circ}C$  60 s, 共 40 个循环; 72 $^{\circ}C$  10 min。PCR 产物送北京诺赛基因组中心有限公司, 用同样的引物进行测序。测序结果在 NCBI 数据库中进行 BLAST 同源比对。

## 2 结果和分析

### 2.1 菌株 rep-PCR 分型结果和 16S rRNA 序列分析

从 5 个品牌的 10 种市售酸奶中分离到 100 株菌, 并成功提取了基因组 DNA。利用 rep-PCR 对所分离菌株进行基因分型, 发现不同样本中检测到的基因型不完全相同, 在某些样本中还检测到多种不同的基因型。如在样品 C2 中检测到 3 种不同的基因型 (图 1), 而样品 E1 中只检测到一种基因型 (图 2), 且两个样品中乳酸菌的基因型完全不同。我们在每个样品中挑选出带型不同的菌株 (共 28 株) 进行 16S rRNA 测序和菌种鉴定。

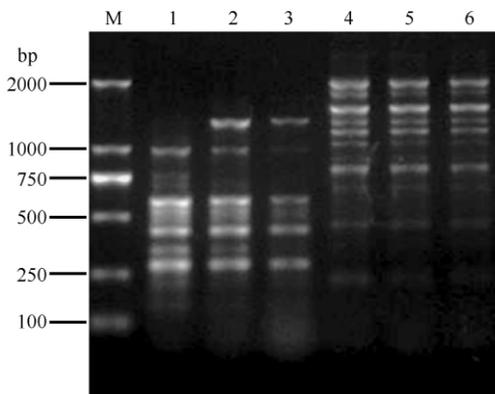


图 1. 样品 C2 中乳酸菌 rep-PCR 指纹图谱

Figure 1. rep-PCR fingerprint of sample C2. M, DNA marker; lane 1, Strain C2-4; lane 2, Strain C2-5; lane 3, Strain C2-6; lane 4, Strain C2-7; lane 5, Strain C2-8; lane 6, Strain C2-9.

16S rRNA 序列同源性分析结果 (表 2) 显示, 28 株乳酸菌中有 8 株 *S. thermophilus*, 7 株 *L.*

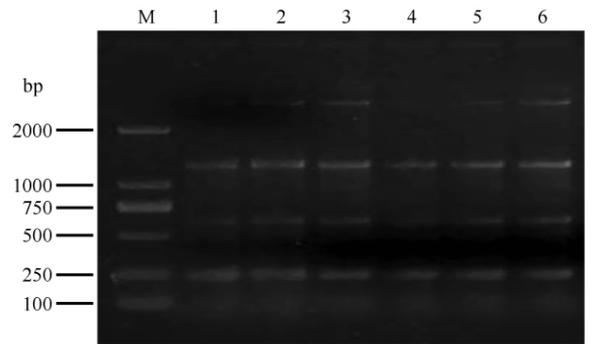


图 2. 样品 E1 中乳酸菌 rep-PCR 指纹图谱

Figure 2. rep-PCR fingerprint of sample E1. M, DNA marker; lane 1, Strain E1-1; lane 2, Strain E1-2; lane 3, Strain E1-3; lane 4, Strain E1-4; lane 5, Strain E1-5; lane 6, Strain E1-6.

*delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, 7 株 *L. casei*, 3 株 *L. acidophilus*, 2 株 *L. plantarum* 和 1 株 *L. paracasei*。结合 rep-PCR 的结果, 在酸奶中分离的 100 株乳酸菌中有 23 株为 *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, 30 株 *S. thermophilus*, 26 株 *L. casei*, 5 株 *L. acidophilus*, 6 株 *L. plantarum*, 10 株 *L. paracasei*。与 rep-PCR 的结果相同, 各个样品中分离到的乳酸菌种类不完全相同, 如表 2 所示: 样品 A2 和 A4 中分离得到的 10 株乳酸菌均为 *S. thermophilus*; 样品 A1 和 C1 中分离得到的 10 株乳酸菌均为 *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*; 样品 D1 和 B2 中分离得到的 10 株乳酸菌均为 *L. casei*; 样品 E1 中分离得到的 10 株乳酸菌均为 *L. paracasei*; 样品 A3 中分离得到 6 株 *S. thermophilus* 和 4 株 *L. acidophilus*; 样品 B1 中分离得到 3 株 *L. casei*, 1 株 *L. acidophilus* 和 6 株 *L. plantarum*; 样品 C2 中包括 4 株 *S. thermophilus*, 3 株 *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 和 3 株 *L. casei*。其中样品 B1、B2、C2、D1 和 E1 中检测到的乳酸菌在商标上没有标注。在对不同样品中分离到的乳酸菌进行 16S rRNA 序列比对后发现, 不同酸奶中分离得到的同种乳酸菌, 即使来自不同的生产厂家, 序列也完全相同。仅在样品 C2 中检测到 2 株 *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 序列与其它样品中的 *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 有差异, 但这 2 株 *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 的 16S rRNA 序列完全相同。

### 2.2 分离菌株的耐药表型检测结果

对市售酸奶中分离到的 100 株乳酸菌进行药敏实验, 其结果显示, 所有菌株均对链霉素以及庆大霉素耐药, 42 株对万古霉素耐药, 但所有检测的菌株

均对头孢氨苄,四环素,红霉素以及土霉素敏感 (表3)。

表2. 各个样本中检测到的乳酸菌及其耐药基因的分布

Table 2. LABs in the detected samples and the distribution of resistance genes

| Samples | No. of selected LABs | No. of sequencing | Genera of sequenced LABs                                                                | No. of detected resistance genes | Resistance genes                                                     |
|---------|----------------------|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| A1      | 10                   | 4                 | <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>                                            | 6                                | <i>erm B</i> <sup>a</sup> , <i>tet K</i> <sup>b</sup> , <i>tet O</i> |
| A2      | 10                   | 3                 | <i>S. thermophilus</i>                                                                  | 3                                | <i>erm B</i>                                                         |
| A3      | 10                   | 5                 | <i>L. acidophilus</i> , <i>S. thermophilus</i>                                          | 3                                | <i>erm B</i>                                                         |
| A4      | 10                   | 1                 | <i>S. thermophilus</i>                                                                  | 0                                | none                                                                 |
| B1      | 10                   | 5                 | <i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i>                           | 0                                | none                                                                 |
| B2      | 10                   | 3                 | <i>L. casei</i>                                                                         | 2                                | <i>tet M</i>                                                         |
| C1      | 10                   | 1                 | <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>                                            | 0                                | none                                                                 |
| C2      | 10                   | 4                 | <i>S. thermophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>L. casei</i> | 5                                | <i>tet M</i> <sup>c</sup> , <i>tet K</i> , <i>tet L</i>              |
| D1      | 10                   | 1                 | <i>L. casei</i>                                                                         | 0                                | none                                                                 |
| E1      | 10                   | 1                 | <i>L. paracasei</i>                                                                     | 1                                | <i>erm B</i>                                                         |

<sup>a</sup>: *erm B* represent erythromycin resistance gene which encoding methyltransferase; <sup>b</sup>: *tet K* and *tet L* represent different tetracycline resistance genes which encoding effluent pump protein; <sup>c</sup>: *tet M* and *tet O* represent different tetracycline resistance gene which encoding ribosomal protection protein.

表3. 分离菌株的耐药性分布

Table 3. Distribution of antibiotic resistance phenotype

| Antibiotic       | Name            | Susceptive |              | Resistant |              |
|------------------|-----------------|------------|--------------|-----------|--------------|
|                  |                 | No. /n     | Percentage/% | No. /n    | Percentage/% |
| Tetracyclines    | Tetracycline    | 100        | 100          | 0         | 0            |
|                  | Oxytetracycline | 100        | 100          | 0         | 0            |
| Aminoglycosides  | Gentamicin      | 0          | 0            | 100       | 100          |
|                  | Streptomycin    | 0          | 0            | 100       | 100          |
| $\beta$ -lactams | Cefalexin       | 100        | 100          | 0         | 0            |
| Glycopeptides    | Vancomycin      | 58         | 58           | 42        | 42           |
| Macrolides       | Erythromycin    | 100        | 100          | 0         | 0            |

### 2.3 耐药基因扩增结果

由于每个样品中乳酸菌耐受的 药物类型较单一,所以我们选取已鉴定的菌株进行耐药基因的检测。28 株乳酸菌中检测到 15 株携带耐药基因,占总数的 53.57%。阳性 PCR 产物通过测序和序列比对的方法确认扩增的 DNA 片段为目的耐药基因片段。在 15 株携带有耐药基因的乳酸菌中有 8 株菌扩增出了 *erm B* 基因,4 株菌扩增出了 *tet K* 基因,2 株菌扩增出 *tet L* 基因,4 株菌扩增出了 *tet M* 基因,2 株菌扩增出了 *tet O* 基因,没有菌株扩增出 *erm A*,*tet S*,*tet Q*,*tet W* 基因(图3所示)。3 株 *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 检测到 2 种不同的耐药基因,1 株 *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 检测到 3 种不同的耐药基因,且同时包括针对红霉素和四环素的耐药基因。表4显示在不同乳酸菌中检测到的耐药基因,其中 8 株 *S. thermophilus* 中有 5 株检测出了 *erm B* 基因,

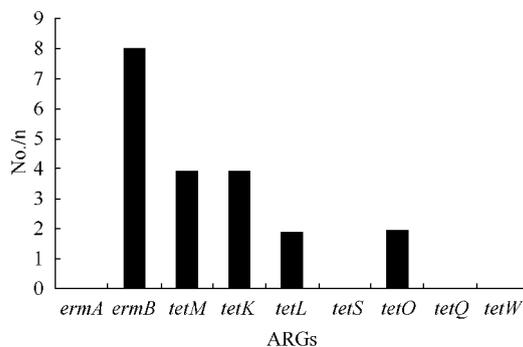


图3. 部分乳酸菌中耐药基因的分布情况

Figure 3. Distribution of antibiotic resistance genes detected in part of the LABs.

检出率为 62.5%;7 株 *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 中有 1 株检测出了 *erm B* 基因,各有 2 株检测出了 *tet M*、*tet O* 基因,3 株检测出了 *tet K* 基因,检出率分别为 14.3%、14.3%、28.6% 以及 42.9%;7 株 *L.*

*casei* 中有 2 株检测出 *tet M* 基因, 1 株检测出 *tet K* 基因, 检出率分别为 28.6% 和 14.3%; 3 株 *L. acidophilus* 中有 1 株检测到了 *erm B* 基因, 检出率为

33.3%; 1 株 *L. paracasei* 中检测到了 *erm B* 基因, 检出率为 100%; 2 株 *L. plantarum* 没有检测到任何耐药基因。

表 4. 不同类型乳酸菌中检测到的耐药基因数量及比例

Table 4. Number and percentage of ARGs detected from different LABs

| Genera                                | No. /n | No. and rate of ARGs/%    |              |                           |              |                           |              |              |              |              |
|---------------------------------------|--------|---------------------------|--------------|---------------------------|--------------|---------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|                                       |        | <i>erm A</i> <sup>a</sup> | <i>erm B</i> | <i>tet K</i> <sup>b</sup> | <i>tet L</i> | <i>tet M</i> <sup>c</sup> | <i>tet S</i> | <i>tet O</i> | <i>tet Q</i> | <i>tet W</i> |
| <i>S. thermophilus</i>                | 8      | 0                         | 5<br>(62.5)  | 0                         | 0            | 0                         | 0            | 0            | 0            | 0            |
| <i>L. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> | 7      | 0                         | 1<br>(14.3)  | 3<br>(42.9)               | 2<br>(28.6)  | 2<br>(28.6)               | 0            | 2<br>(28.6)  | 0            | 0            |
| <i>L. casei</i>                       | 7      | 0                         | 0            | 1<br>(14.3)               | 0            | 2<br>(28.6)               | 0            | 0            | 0            | 0            |
| <i>L. acidophilus</i>                 | 3      | 0                         | 1<br>(33.3)  | 0                         | 0            | 0                         | 0            | 0            | 0            | 0            |
| <i>L. plantarum</i>                   | 2      | 0                         | 0            | 0                         | 0            | 0                         | 0            | 0            | 0            | 0            |
| <i>L. paracasei</i>                   | 1      | 0                         | 1<br>(100)   | 0                         | 0            | 0                         | 0            | 0            | 0            | 0            |

<sup>a</sup>*erm A* and *erm B* represent different erythromycin resistance genes which encoding methyltransferase; <sup>b</sup>*tet K* and *tet L* represent different tetracycline resistance genes which encoding effluent pump protein; <sup>c</sup>*tet M*, *tet S*, *tet O*, *tet Q* and *tet W* represent different tetracycline resistance genes which encoding ribosomal protection protein.

### 3 讨论

乳酸菌作为益生菌用在发酵食品中已经有很长的历史<sup>[1]</sup>, 它是酸奶发酵的主要发酵剂。目前市场销售的酸奶其主要发酵剂为 *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* 和 *S. thermophilus*, 部分酸奶中还添加了 *L. casei* 和 *Bifidobacterium* 等益生菌来增强酸奶的益生作用。但是本研究在市售酸奶中不仅检测到标签上标注的 *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* 和 *S. thermophilus*, 还检测到商标上没有标注的 *L. casei*, *L. paracasei*, *L. acidophilus* 和 *L. plantarum*。这些商标上没有标注的乳酸菌可能是由于厂商为了提高酸奶的品质、延长保质期限, 将某些可以产生细菌素的乳酸菌如 *L. paracasei* 和 *L. plantarum* 等, 作为食品添加剂加入到酸奶中所导致的。16S rRNA 同源性分析结果发现, 不同品牌酸奶中检测到的 *S. thermophilus* 完全相同; 所有 *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* 也仅有 2 株 16S rRNA 的序列与其它菌株的不同。这样的结果可能是由于现在各大酸奶生产厂家多采用直投式乳酸菌 (DVS) 作为发酵剂, 而世界上生产直投式乳酸菌的厂商就丹麦科汉森公司, 法国罗地亚公司等几家知名公司<sup>[22]</sup>, 国内各大厂商

所购置的直投式乳酸菌有可能来源于同一或同几家公司。这些少数的被广泛应用的乳酸菌的安全更应该受到重视, 其中就包括这些乳酸菌的耐药情况。

目前已经明确乳酸菌存在天然耐药和获得性耐药<sup>[23]</sup>。乳酸菌对氨基糖苷类抗生素的耐受性属于天然耐药, 我们检测的 100 株乳酸菌均对氨基糖苷类抗生素表现为耐药; 大部分乳酸菌对万古霉素也存在天然耐药, 如除 *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, *L. acidophilus* 以外, 本研究分离到的 42 株乳酸菌均对万古霉素耐药; 以上结果与 Mathur, Hummel 和 Danielsen 等人的报道一致<sup>[2,6,11]</sup>。本研究所检测的 100 株乳酸菌均对获得性耐药, 四环素类、 $\beta$ -内酰胺类和大环内酯类抗生素表现为敏感, 这与 Charteris, Coppola 和 Zhou 等人的研究结果一致<sup>[9, 24-25]</sup>。我们的结果显示市售酸奶中还并没有具有获得性耐药表型的菌株。

目前, 是否携带耐药基因已经成为评价乳酸菌是否安全的一个重要指标, 决定其是否可以作为食品用安全菌株<sup>[6]</sup>。我们在所检酸奶样品中没有检测到获得性耐药表型, 但是不能说明这些样品就不携带耐药基因。2007 年 Hummel 等人在没有氯霉素耐药表型的乳酸菌中检测到氯霉素耐药基因 (*cat*), 证明无耐药表型的细菌可能携带耐药基因<sup>[6]</sup>。2011

年 Nawaz 等人在酸奶等发酵食品中分离到了对红霉素和四环素耐受的乳酸菌并且检测到了相应的耐药基因<sup>[10]</sup>,但是没有检测敏感菌株是否携带耐药基因。Hummel 和 Cataloluk 等也在包括酸奶在内的不同来源的乳酸菌中检测到 *erm B* 和 *tet M* 基因<sup>[6,12]</sup>。以上研究结果表明,乳酸菌中携带有红霉素和四环素耐药基因的可能性比较大,所以我们也首先致力于红霉素和四环素耐药基因的检测。虽然所有检测的乳酸菌对红霉素和四环素敏感,但是我们在 8 株乳酸菌中检测到红霉素的 *erm B* 基因,4 株检测到针对四环素的 *tet M* 基因。与此同时我们还新检测到四环素的耐药基因 *tet K*、*tet L* 和 *tet O*。本研究再一次证明了没有耐药表型的菌株也可能携带耐药基因。这些带有四环素或红霉素耐药基因的菌株之所以还没有相应的耐药表型,可能由于其所携带的耐药基因还未表达或者表达不充分。

通过分析耐药基因在不同乳酸菌中的分布情况发现,作为主要发酵剂的 *S. thermophilus* 和 *L. delbruechii* ssp. *bulgaricus* 携带的耐药基因最多,如 62.5% 的 *S. thermophilus* 携带有 *erm B* 基因,而在 7 株 *L. delbruechii* ssp. *bulgaricus* 中检测到 10 个耐药基因。有 4 株 *L. delbruechii* ssp. *bulgaricus* 检测到两种或两种以上的耐药基因,占被检菌株的一半以上,尤其是样本 A1 中的一株 *L. delbruechii* ssp. *bulgaricus* (A1-10) 不仅携带有 *tet K* 和 *tet O* 基因,还携带 *erm B* 基因。以上结果表明 *S. thermophilus* 和 *L. delbruechii* ssp. *bulgaricus* 耐药基因发展的速度明显高于酸奶中的其它乳酸菌,这样的结果很可能与这两种乳酸菌属于工业生产菌有关。工业生产菌的菌种保藏、接种、传代及生产的过程中都会有人的参与,而人的参与无形中加快了 *S. thermophilus* 和 *L. delbruechii* ssp. *bulgaricus* 的耐药进程。

本研究的结果显示有些乳酸菌虽然药敏试验为敏感,但是检测到相应的耐药基因,间接地威胁人类的健康。因此,我们应该加强对乳酸菌等益生菌、食品工业用菌的耐药情况的监测力度,不要局限于耐药表型,更应该对其耐药基因进行跟踪监测。在提高食品品质的同时维护广大消费者的健康权益。

## 参考文献

[ 1 ] Leroy F, Vuyst LD. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends*

*in Food Science & Technology*, 2004, 15(2): 67-78.

- [ 2 ] Mathur S, Singh R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria-a review. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 105(3): 281-295.
- [ 3 ] Dong Y, Li F, Cui S, Yu H. Isolation and identification of probiotics from yoghurt in Beijing. *Journal of Hygiene Research*, 2010, 5(39): 552-555. (in Chinese)  
董银苹,崔生辉,李凤琴,于红霞.北京市售酸奶中益生菌的分离鉴定及耐药性检测. *卫生研究*, 2010, 5(39): 552-555.
- [ 4 ] Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA-sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 1991, 19(24): 6823-6831.
- [ 5 ] Bronzwaer SLAM, Cars O, Buchholz U, Molstad S, Goettsch W, Veldhuijzen IK, Kool JL, Sprenger MJW, Degener JE. A European study on the relationship between antimicrobial use and antimicrobial resistance. *Emerging Infectious Diseases*, 2002, 8(3): 278-282.
- [ 6 ] Hummel AS, Hertel C, Holzapfel WH, Franz CM. Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(3): 730-739.
- [ 7 ] Ammor MS, Flórez AB, Mayo B. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology*, 2007, 24(6): 559-570.
- [ 8 ] Belletti N, Gatti M, Bottari B, Neviani E, Tabanelli G, Gardini F. Antibiotic resistance of *Lactobacilli* isolated from two Italian hard cheeses. *Journal of Food Protection*, 2009, 72(10): 2162-2169.
- [ 9 ] Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *Journal of Food Protection*, 1998, 61(12): 1636-1643.
- [ 10 ] Nawaz M, Wang J, Zhou A, Ma C, Wu X, Moore JE, Millar BC, Xu J. Characterization and transfer of antibiotic resistance in lactic acid bacteria from fermented food products. *Current Microbiology*, 2011, 62(3): 1081-1089.
- [ 11 ] Danielsen M, Wind A. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 82(1): 1-11.
- [ 12 ] Cataloluk O, Gogebakan B. Presence of drug resistance in

- intestinal *Lactobacilli* of dairy and human origin in Turkey. *Fems Microbiology Letters*, 2004, 236 (1): 7-12.
- [13] Gevers D, Danielsen M, Huys G, Swings J. Molecular characterization of *tet*(M) genes in *Lactobacillus* isolates from different types of fermented dry sausage. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(2): 1270-1275.
- [14] Food and Agriculture Organization/World Health Organization. Guidelines for the evaluation of probiotics in food: report of a Joint FAO / WHO Working Group, Cordoba: FAO/WHO, 2002.
- [15] Antonio MAD, Hillier SL. DNA fingerprinting of *Lactobacillus crispatus* strain CTV-05 by repetitive element sequence-based PCR analysis in a pilot study of vaginal colonization. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41 (5): 1881-1887.
- [16] Xu J, Smyth CL, Buchanan JA, Dolan A, Rooney PJ, Millar BC, Goldsmith CE, Elborn JS, Moore JE. Employment of 16S rDNA gene sequencing techniques to identify culturable environmental eubacteria in a tertiary referral hospital. *Journal of Hospital Infection*, 2004, 57 (1): 52-58.
- [17] Klare I, Konstabel C, Werner G, Huys G, Vankerekhoven V, Kahlmeter G, Hildebrandt B, Müller-Bertling S, Witte W, Goossens H. Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2007, 59(5): 900-912.
- [18] Sutcliffe J, Grebe T, Tait-Kamradt A, Wondrack L. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1996, 40(11): 2562-2566.
- [19] Aarestrup FM, Agerso Y, Gerner-Smidt P, Madsen M, Jensen LB. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2000, 37(2): 127-137.
- [20] Ge B, Jiang P, Han F, Saleh NK, Dhiman N, Fedorko DP, Nelson NA, Meng J. Identification and antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria from retail fermented foods. *Journal of Food Protection*, 2007, 70(11): 2606-2612.
- [21] Kastner S, Perreten V, Bleuler H, Hugenschmidt G, Lacroix C, Meile L. Antibiotic susceptibility patterns and resistance genes of starter cultures and probiotic bacteria used in food. *Systematic and Applied Microbiology*, 2006, 29(2): 145-155.
- [22] Lu H. The preliminary study on cultivate of DVS lactic-acid bacteria. *China Dairy Industry*, 2001, 6(29): 28-31. (in Chinese)  
鲁卉. 直投式乳酸菌菌种传代培养初探. *中国乳品工业*, 2001, 6(29): 28-31.
- [23] Saarela M, Mogensen G, Fondén R, Mättö J, Mattila-Sandholm T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 2000, 84(3): 197-215.
- [24] Coppola R, Succi M, Tremonte P, Reale A, Salzano G, Sorrentino E. Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *Le Lait*, 2005, 85(3): 193-204.
- [25] Zhou JS, Pillidge CJ, Gopal, PK, Gill HS. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 98(2): 211-217.

# Identification of lactic acid bacteria in commercial yogurt and their antibiotic resistance

Yuxuan Qin<sup>1</sup>, Jing Li<sup>2</sup>, Qiuya Wang<sup>3</sup>, Kexin Gao<sup>4</sup>, Baoli Zhu<sup>2</sup>, Na Lv<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China

<sup>2</sup>Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

<sup>3</sup>The High School Attached to Tsinghua University, Beijing 100084, China

<sup>4</sup>The High School Affiliated to Renmin University of China, Beijing 100080, China

**Abstract:** [ **Objective** ] To identify lactic acid bacteria (LAB) in commercial yogurts and investigate their antibiotic resistance. [ **Methods** ] LABs were cultured from 5 yogurt brands and the isolates were identified at the species level by 16S rRNA sequence. Genotyping was performed by repetitive extragenic palindromic PCR (rep-PCR). The sensitivity to 7 antibiotics was tested for all LAB isolates by Kirby-Bauer paper diffusion (K-B method). Meanwhile, 9 antibiotic resistance genes (ARGs), including erythromycin resistance genes (*ermA* and *ermB*) and tetracycline resistance genes (*tetM*, *tetK*, *tetS*, *tetQ*, *tetO*, *tetL* and *tetW*), were detected by PCR amplification in the identified LAB isolates. The PCR products were confirmed by sequencing. [ **Results** ] Total 100 LABs were isolated, including 23 *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, 26 *Lactobacillus casei*, 30 *Streptococcus thermophilus*, 5 *Lactobacillus acidophilus*, 6 *Lactobacillus plantarum*, and 10 *Lactobacillus paracasei*. The drug susceptibility test shows that all 100 isolates were resistant to gentamicin and streptomycin, 42 isolates were resistant to vancomycin, and on the contrary all were sensitive to cefalexin, erythromycin, tetracycline and oxytetracycline. Moreover, 5 ARGs were found in the 28 sequencing confirmed isolates, *ermB* gene was detected in 8 isolates, *tetK* in 4 isolates, *tetL* in 2 isolates, *tetM* in 4 isolates, *tetO* in 2 isolates. *ermA*, *tetS*, *tetQ* and *tetW* genes were not detected in the isolates. Antibiotic resistance genes were found in 53.57% (15/28) sequenced isolates, 2–3 antibiotic resistance genes were detected in 4 isolates of *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. [ **Conclusions** ] Some LABs were not labeled in commercial yogurt products. Antibiotic resistance genes tend to be found in the starter culture of *L. delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* and *S. thermophilus*. All the LAB isolates were sensitive to erythromycin and tetracycline, even though some carried erythromycin and/or tetracycline resistance genes. We proved again that LAB could carry antibiotic resistance gene(s) though it is sensitive to antibiotics.

**Keywords:** yogurt, lactic acid bacteria, genotyping, molecular identification, antibiotic resistance gene

(本文责编:王晋芳)

\* Corresponding author. Tel: +86-10-64807433; E-mail: lvna@im.ac.cn

Received: 19 December 2012/Revised: 2 April 2013