

发酵用鲜辣椒中乳酸菌抗生素耐药性与耐药基因

蔡婷¹, 徐顾榕¹, 林凯¹, 宋菲菲¹, 张其圣²,
陈功², 蔡义民³, 张庆¹, 向文良^{*1}

(1. 西华大学 食品与生物工程学院, 四川 成都 610039; 2. 四川省食品发酵工业研究设计院, 四川 成都 611130;
3. 日本国际农业科学研究中心, 日本 筑波 30528686)

摘要: 以四川泡菜发酵用的新鲜二荆条辣椒表面上附着的乳酸菌为研究对象, 分析其对四环素(TET)、链霉素(STR)和红霉素(ERY)的耐药性与耐药基因。研究表明: 用于发酵的鲜辣椒中, 乳酸菌的含量约为 2.18×10^4 CFU/g, 属于 *Weissella cibaria* (61.93%)、*Lactococcus lactis* (16.06%)、*Enterococcus mundtii* (5.50%)、*Enterococcus faecalis* (3.67%)、*Enterococcus hirae* (3.67%)、*Leuconostoc mesenteroides* (6.88%) 和 *Leuconostoc holzapfelii* (2.29%)。所有 218 株分离株均无 ERY 耐药, 但其中 30 株 (13.76%) 表现出 TET 和 STR 耐药, 包括 10 株 *W. cibaria* (4.59%)、2 株 *Lac. lactis* (0.92%)、1 株 *E. mundtii* (0.46%)、2 株 *Leu. mesenteroides* (0.92%) 和 1 株 *Leu. holzapfelii* (0.46%) STR 耐药菌株, 9 株 *W. cibaria* (4.12%)、2 株 *Lac. lactis* (0.92%)、1 株 *E. faecalis* (0.46%) 和 2 株 *E. hirae* (0.92%) TET 和 STR 二重耐药菌株; 除 TET 和 STR 二重耐药菌株 *W. cibaria* CT024 中未检出任何 TET 被检基因外, 其它耐药株都有相应 1 个或多个被检基因被检出。其中, 在 5 种 STR 被检耐药基因中, *strB* 的检出率最高, 达 60.00%; *aad6* 的检出率最低, 为 16.67%。11 种 TET 被检耐药基因中, *tetB* 和 *tetC* 的检出率最高, 达到 85.71%; *tetZ* 的检出率最低, 为 7.14%。同时, 同种内的不同菌株对 STR 或 TET 的耐药性高低与耐药基因的种类和数量多少无相关性。

关键词: 鲜辣椒; 乳酸菌; 抗生素耐药性; 抗生素耐药基因

中图分类号: TS 201.3 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2016)09—0941—09

Investigation of Antibiotic Resistance and Resistant Genes of Lactic Acid Bacteria on the Fresh Hot Pepper Used to Fermentation

CAI Ting¹, XU Gurong¹, LIN Kai¹, SONG Feifei¹, ZHANG Qisheng²,
CHEN Gong², CAI Yimin³, ZHANG Qing¹, XIANG Wenliang^{*1}

(1. College of Food and Bioengineering, Xihua University, Chengdu 610039, China; 2. Sichuan Academy of Food and Fermentation Industries, Chengdu 611130, China; 3. Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba 30528686, Japan)

收稿日期: 2015-01-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(31571935); 教育部春晖计划项目(Z2014061); 四川省应用基础项目(2014JY0045); 四川省教育厅重点项目(14ZA0110); 四川省食品生物技术重点实验室项目(SZJJ2014-007)。

* 通信作者: 向文良(1973—), 男, 四川仁寿人, 理学博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事中国西南地区特色发酵食品微生物分子生态与生物过程学方面的研究。E-mail: xwllm7687@sina.com

Abstract: The antibiotic resistance and resistant genes of lactic acid bacteria (LABs) were investigated on the fresh hot pepper used to fermentation. In current study, 218 isolates suggested that about 2.18×10^4 CFU/g LABs were on the fresh hot pepper used to fermentation. These isolates were assigned to *Weissella cibaria* (61.93%), *Lactococcus lactis* (16.06%), *Leuconostoc mesenteroides* (6.88%), *Enterococcus mundtii* (5.5%), *Enterococcus faecalis* (3.67%), *Enterococcus hirae* (3.67%) and *Leuconostoc holzapfelii* (2.29%). Of the 218 isolates, no one displayed the resistance of erythromycin (ERY), but 30 isolates (13.76%) were found to be against streptomycin (STR) and tetracycline (TET) with one or two resistance, including 10 *W. cibaria* (4.59%), 2 *Lac. lactis* (0.92%), 1 *E. mundtii* (0.46%), 2 *Leu. mesenteroides* (0.92%) and 1 *Leu. holzapfelii* (0.46%) with resistance to STR, And 9 *W. cibaria* (4.12%), 2 *Lac. lactis* (0.92%), 1 *E. faecalis* (0.46%) and 2 *E. hirae* (0.92%) with resistance of TET and STR. In the TET and STR resistant strain *W. cibaria* CT024, none of TET resistant genes was found. While, the other TET and STR resistant strains had harbored one or more corresponding resistant genes. In 5 STR resistant genes had the highest detection rate with 60.00%, but *aad6* with only 16.67%. Among 11 TET resistant genes, *tetB* and *tetC* had the highest detection rate, 85.71%, and *tetZ* was found with 7.14% lowest detection rate. For the current antibiotic resistant strains, the STR or TET resistant phenotype of different strains in the same species was not directly related to the types or quantities of the corresponding antibiotic resistant genes.

Keywords: fresh pepper, lactic acid bacteria, antibiotic resistance, antibiotic resistant genes

抗生素耐药性作为一种新型污染物于 2006 年由美国学者 Pruden 首先提出^[1], 由于在环境介质中的持久残留以及在不同宿主间的传播往往比抗生素本身危害更大, 因此其对公共健康和食品安全构成的威胁目前已成为植物学、土壤学、环境科学和食品科学等领域的研究热点^[2-4]。发酵蔬菜是一类以新鲜蔬菜为原料, 在盐存在条件下, 经乳酸菌等有益微生物发酵而成的一种食品。长期以来, 发酵食品中的乳酸菌被认为是安全的。但是近年来, 随着发酵食品中乳酸菌的抗生素耐药性被大量发现, 曾经认为是安全的发酵食品也出现了可转移的抗生素耐药性, 为发酵食品的安全带来了新的挑战^[5]。

蔬菜发酵技术是世界上最为古老的一种生物储藏技术, 是我国先民在生物技术领域对世界的一大贡献。辣椒发酵是辣椒加工的一种重要方式, 在中国民间历史悠久, 发酵方式多样^[6]。鲜辣椒经乳酸菌发酵后的辣椒制品, 不仅具有脆嫩芳香、解腻开胃、酸辣鲜纯等独特的风味, 而且其中富含的乳酸菌具有防便秘、降胆固醇、抗肿瘤以及调节人体各种生理机能等保健功效, 因此深受消费者喜爱^[7]。然而, 近年来随着抗生素耐药性污染的加剧, 中国

常见的传统发酵蔬菜产品中也发现了较高比例的抗生素耐药菌株, 为中国传统发酵蔬菜的食品安全埋下了安全隐患^[8-10]。过去人们通常认为: 发酵食品原料中抗生素的残留是导致生产过程中耐药菌产生的主要原因。然而, 新的研究结果表明: 环境介质中的抗生素残留水平除了对耐药细菌的选择以外, 几乎没有环境毒性风险^[11]。因此, 食品原料和加工环境中被污染的耐药菌在食品生产过程中的增殖或耐药性的水平传播是食品生产过程中产生的新的耐药菌的主要原因。

辣椒表面的乳酸菌是辣椒自然发酵微生物的主要来源。尽管大多数与食物相关的乳酸菌“一般被认为是安全的”^[12], 但是近年来乳酸菌可转移耐药性的发现为乳酸菌的安全性敲响了警钟。辣椒在种植过程中, 环境中的耐药菌不可避免会附着在辣椒表面, 尽管浓度低, 但是一旦它们进入发酵系统, 就可能向其它微生物传播抗生素耐药性, 造成耐药菌群的扩大。基于此, 作者以四川某泡菜企业用于发酵的新鲜二荆条辣椒表面附着的乳酸菌为研究对象, 以辣椒种植过程中常用的农用抗生素链霉素、四环素和红霉素为选择因子, 分析其抗生素耐药

性,并检测耐药基因,以期为发酵辣椒选用安全的辣椒原料提供参考,确保发酵辣椒的食品安全。

1 材料与方法

1.1 材料

辣椒:四川某泡菜企业用于发酵的新鲜二荆条辣椒,产地分布在西南、西北和东南省份;培养基:MRS 与改良的 MRS 琼脂培养基(含 0.75% 的 CaCO_3)^[13];链霉素(STR)、四环素(TET)和红霉素(ERY)标准品:北京标准品中心。

1.2 方法

1.2.1 菌株分离与生化特征分析 随机选取上述产地新鲜辣椒各 1 kg,混匀后装入盛有 3 000 mL 无菌生理盐水的无菌均质袋中,用拍击式均质器 Bagmixer 均质 5 min。取适量均质液,10 倍梯度稀释后涂布于改良 MRS 琼脂培养基上,37 °C 培养 48 h。选取菌落适宜的平板统计菌落数,并挑取有明显溶钙圈的菌落于 MRS 平板上划线纯化。纯化菌株接种到 MRS 液体培养基中富集培养后,转移至 30% 的无菌甘油冻藏管中,-20 °C 保藏备用。菌株的生理生化特征按《乳酸细菌分类鉴定及试验方法》进行^[13]。

1.2.2 RAPD 聚类分析 菌株基因组 DNA 的提取和 RAPD 聚类分析参见 Xiang^[14] 等的方法。PCR 扩增引物为 G1:5'-GAAGTCGTAACAAGG-3' 和 L1:5'-CAAGGCATCCACCGT-3'。PCR 扩增条件:94 °C 变性 1 min,55 °C 退火 2 min,72 °C 延伸 3 min,25 个循环。扩增产物经 PAGE 电泳后,条带用 LabImage 2.7.1 识别并转化成 0/1 矩阵,NTSYS PC 2.11 做非加权组平均法(unweighted pair-group method with arithmetic mean,UPGMA)聚类分析^[15-16]。

1.2.3 16S rRNA 序列分析 16S rRNA 扩增与序列分析见 Xiang^[17] 等的方法。PCR 扩增引物为 Eu27F:5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3' 和 1490R:5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'。PCR 条件:95 °C 预变性 5 min,然后 95 °C 变性 1 min,50 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 2 min,30 个循环,最后 72 °C 保持 10 min。PCR 产物连接到 pGEM-T 载体后克隆入感受态 *E. coli* DH5 α 中,提取重组质粒,测定 16S rRNA 序列。通过 CLASSIFIER(RDP II,http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp) 软件,无嵌合体的 16S rRNA 序列与 RDP 数据库中的模式菌株的进行相似性比较,确定菌株的分类学地位。

1.2.4 抗生素耐药性分析 依据欧洲微生物药物敏感委员会(http://www.eucast.org)关于微生物对抗生素的敏感阈值 X (http://www.eucast.org/mic_distributions/),分析菌株的抗生素耐药性。当分离菌株的最小抑菌质量浓度(Minimal Inhibitory Concentration, MIC) $\leq X$ $\mu\text{g/mL}$ 时,为敏感菌株;反之,则为耐药菌株。

MIC 测定采用微量肉汤稀释法^[18]。分别将链霉素(STR)、四环素(TET)和红霉素(ERY)配制成 2 048 $\mu\text{g/mL}$ 的贮存液,MRS 液体培养基 2 倍梯度稀释成使用液。STR 质量浓度为 2~1 024 $\mu\text{g/mL}$,TET 和 ERY 质量浓度为 1~512 $\mu\text{g/mL}$ 。向无菌的 96 孔板中加入 198 μL 含不同质量浓度抗生素的 MRS 液体培养基后,接种 2 μL 菌株的培养液(约 1.0×10^7 CFU/mL),37 °C 静止培养 24 h 后,统计不同菌株的 MIC。每组重复 3 次,并设置对照组。

1.2.5 抗生素耐药基因分析 PCR 检测菌株的 STR 耐药报告基因 *aph*(3')-IIIa、*strA*、*strB*、*aadA* 和 *aad6*^[19-20];TET 耐药报告基因 *tetB*、*tetC*、*tetD*、*tetG*、*tetH*、*tetK*、*tetM*、*tetS*、*tetT*、*tetX* 和 *tetZ*^[21-23];ERY 耐药报告基因 *ermA*、*ermB* 和 *mphA*^[22,24]。PCR 程序:95 °C 预变性 4 min,95 °C 变性 30 s,待检基因引物的退火温度见表 1。退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,30 次循环后 72 °C 延伸 5 min。1.0 g/dL 的琼脂糖电泳检测扩增产物,胶回收与上述报告基因的大小相同的片段。回收片段连接到 pGEM-T 载体后,克隆入感受态 *E. coli* DH5 α 中,测定扩增片段序列,NCBI 中利用 BlastX 程序比对扩增序列,进一步判断分离株是否含有上述被检耐药基因。

2 结果与分析

2.1 RAPD 聚类与生化特征分析

乳酸菌是指发酵时能够产生乳酸的一大类细菌,包括 40 个属,近 300 个种。MRS 平板分离乳酸菌时,利用其产生的乳酸溶解 CaCO_3 形成溶钙圈的特性,即可实现乳酸菌的初步分离。在当前研究中,10 g 鲜辣椒均质液在稀释度为 10^{-1} 、接种 200 μL 时,平板上有溶钙圈的菌落共计 218 个,表明用于发酵的鲜辣椒原料中,附生乳酸菌的含量约为 2.18×10^4 CFU/g。基于 RAPD 的 UPGMA 聚类分析发现:218 株乳酸菌共分为 7 个群,见图 1。其中,菌株 CT002 代表的群最大(135 株),约占 61.93%;菌株

表 1 被检抗生素耐药基因的 PCR 引物序列、退火温度和扩增片段大小

Table 1 PCR primer, anneal temperature and amplified fragment length of antibiotic resistance genes

抗生素	基因	退火温度/℃	引物序列(5'→3')	大小/bp	参考文献
链霉素 (STR)	<i>strA</i>	55	F:CTTGGTGATAACGGCAATTC	R:CCAATCGCAGATAGAAGGC	548 [19]
	<i>strB</i>	55	F:ATCGTCAAGGGATTGAAACC	R:GGATCGTAGAACATATTGGC	509
	<i>aadA</i>	56	F:ATCCTTCGGCGCGATTTC	R:GCAGCGCAATGACATTCTTG	300
	<i>aad6</i>	46	F:AGAAGATGTAATAATATAG	R:CTGTAATCACTGTTCCCGCCT	978 [20]
	<i>aph(3')-IIIa</i>	50	F:GCCGATGTGGATTGCGAAAA	R:GCTTGATCCCCAGTAAGTCA	292
四环素 (TET)	<i>tetB</i>	56	F:TTGGTTAGGGCAAGTTTTC	R:GTAATGGGCCAATAACACCG	659 [21]
	<i>tetC</i>	55	F:CTTGAGAGCCTTCAACCCAG	R:ATGGTCGTCTCTACCTGCC	418
	<i>tetD</i>	56	F:AAACCATTACGGCATTCTGC	R:GACCGGATACACCATCCATC	787
	<i>tetG</i>	55	F:GCTCGGTGGTATCTCTGCTC	R:AGCAACAGAATCGGGAACAC	468 [23]
	<i>tetH</i>	61	F:CAGTGAAAATTCAGTGGCAAC	R:ATCCAAATGTGGGTTGAGAAT	185
	<i>tetK</i>	55	F:TTAGGTGAAGGGTTAGGTCC	R:GCAAACTCATTCCAGAAGCA	697
	<i>tetM</i>	55	F:GTGGACAAAGGTACAACGAG	R:CGGTAAAGTTCGTACACAC	406 [22]
	<i>tetS</i>	56	F:CATAGACAAGCCGTTGACC	R:ATGTTTTTGAACGCCAGAG	667 [23]
	<i>tetT</i>	46	F:AAGGTTTATTATATAAAAGTG	R:AGGTGTATCTATGATATTTAC	169
	<i>tetX</i>	55	F:CAATAATTGGTGGTGGACCC	R:TCTTACCTTGGACATCCCG	468
	<i>tetZ</i>	61	F:CCTTCTCGACCAGGTCGG	R:ACCCACAGCGTGTCCGTC	204
红霉素 (ERY)	<i>ermA</i>	57	F:AAGCGGTAAAACCCCTCTGAG	R:TCAAAGCCTGTCCGAATTGG	420 [24]
	<i>ermB</i>	56	F:CATTTAACGACGAAACTGGC	R:GGAACATCTGTGGTATGGCG	546 [22]
	<i>mphA</i>	50	F:AACTGTACGCACTTGC	R:GGTACTTCGTTACC	837

CT081、CT110、CT142、CT147、CT217 和 CT218 代表的群中, 分别有 12 (5.50%)、8 (3.67%)、8 (3.67%)、15 (6.88%)、5 (2.29%) 和 35 (16.06%) 株乳酸菌。218 株乳酸菌对糖和醇的利用特征进一步证实了 RAPD 分类的正确性, 见表 2。

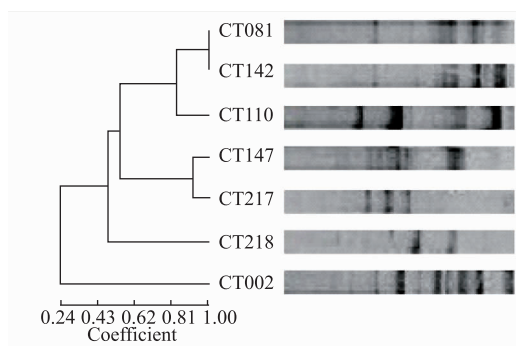


图 1 发酵用的鲜辣椒中乳酸菌的 RAPD 聚类分析

Fig. 1 RAPD cluster analysis of LABs on the fresh hot pepper used to fermentation

2.2 16S rRNA 序列分析

为进一步确定分离株的分类学地位, 在上述 7 个乳酸菌群中, 小于 10 株的群随机选取 5 株、10~

30 株的群随机选取 10 株、大于 30 株的群随机选取 15 株, 大于 50 株的群随机选取 25 株, 大于 100 株选取 30 株进行 16S rRNA 序列分析。结果表明: 用于发酵的新鲜辣椒原料中, 附生乳酸菌分为 *Weissella*、*Enterococcus*、*Leuconostoc* 和 *Lactococcus* 属, 见表 3。

CT002 群属于 *Weissella* 属, 抽检菌株的 16S rRNA 序列与 *W. cibaria* LMG 17699^T 的 16S rRNA 皆表现出 100% 相似性。同时, CT002 群中的菌株对糖或醇的利用也与 LMG 17699^T 表现一致, 因此, CT002 群中的乳酸菌被鉴定为 *W. cibaria*。

CT081、CT110 和 CT142 群皆属于 *Enterococcus* 属。3 个群中, 抽检菌株的 16S rRNA 序列分别与 *E. mundtii* ATCC 43186^T、*E. faecalis* JCM 5803^T 和 *E. hirae* DSM 20160^T 的 16S rRNA 相似 99%。三个群中的菌株对糖和醇的利用也分别与各自群的相似菌株表现相同。因此, CT081、CT110 和 CT142 群中的乳酸菌分别被鉴定为 *E. mundtii*、*E. faecalis* 和 *E. hirae*。

CT147 和 CT217 群中的菌株均属于 *Leuconostoc* 属。两个群中, 抽检菌株的 16S rRNA 序

表 2 发酵用的鲜辣椒中乳酸菌的生理生化特征

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of LABs on the fresh hot pepper used for fermentation

生化特征	CT002	CT081	CT110	CT142	CT147	CT217	CT218
蔗糖	+	+	+	+	+	+	-
乳糖	-	+	-	+	+	-	+
半乳糖	-	+	+	+	+	+	+
果糖	+	+	+	+	+	+	+
阿拉伯糖	+	+	-	+	+	+	-
麦芽糖	+	+	+	+	+	+	+
纤维二糖	+	+	+	+	+	-	+
木糖	+	+	-	-	+	-	+
水杨苷	+	+	-	-	+	-	+
D-核糖	-	+	-	+	+	-	+
蜜二糖	-	-	+	+	+	+	-
鼠李糖	-	+	-	-	-	-	+
海藻糖	-	+	+	+	+	+	+
棉子糖	-	-	+	-	+	+	-
山梨醇	-	-	-	-	-	+	-
甘露醇	+	-	+	-	+	+	-
数量(株)	135	12	8	8	15	5	35

注:“+”代表“利用”;“-”代表“不利用”

列皆以 100%相似性分别与 *Leu. mesenteroide* ATCC 8293^T 和 *Leu. holzapfelii* LMG 23990^T 的 16S rRNA 相似。两群中的菌株对糖和醇的利用也分别与 ATCC 8293^T 和 LMG 23990^T 表现相同。因此,CT147 和 CT217 群中的乳酸菌分别被鉴定为 *Leu. mesenteroide* 和 *Leu. holzapfelii*。

CT218 群属于 *Lactococcus* 属,抽检菌株的 16S rRNA 序列与 *Lac. lactis* NCDO 604^T 的 16S rRNA 序列相似性为 99%。对糖和醇的利用,CT218 群中的菌株与 NCDO 604^T 表现一致。因此,CT218 群中的乳酸菌被鉴定为 *Lac. lactis*。

表 3 发酵用的鲜辣椒中乳酸菌基于 16S rRNA 的分类学地位

Table 3 Microbial classification of LABs on the fresh hot pepper used for fermentation by 16S rRNA

属	群	数量	相似菌株	相似性	GeneBank 接受号
<i>Weissella</i>	CT002	135	<i>W. cibaria</i> LMG 17699T	100%	KP662073
<i>Enterococcus</i>	CT081	12	<i>E. mundtii</i> ATCC 43186T	99%	KP662074
	CT110	8	<i>E. faecalis</i> JCM 5803T	99%	KP662075
	CT142	8	<i>E. hirae</i> DSM 20160T	99%	KP662076
	CT147	15	<i>Leu. mesenteroide</i> ATCC 8293T	100%	KP662077
<i>Leuconostoc</i>	CT217	5	<i>Leu. holzapfelii</i> LMG 23990T	100%	KP662078
	CT218	35	<i>Lac. lactis</i> NCDO 604T	99%	KP662079

2.3 抗生素耐药分析

依据欧洲微生物药物敏感委员会关于上述乳酸菌对 STR、TET 和 ERY 的阈值 X, 比较分离株相应的 MIC, 见表 4。发现 218 株乳酸菌中有 30 株具有被检抗生素的耐药性, 耐药菌株比例为 13.76%。其中,STR 单一耐药菌株 16 株 (7.34%),TET 和

STR 二重耐药菌株 14 株(6.42%),无菌株表现 ERY 耐药性。在 30 株 STR 和 TET 的单一或二重耐药菌株中, 同种的不同乳酸菌株对 TET 或 STR 的 MIC 值不同, 表现出了耐药性差异。*W. cibaria* CT032、CT065 对 STR 的耐药性最强,二者的 MIC 值是相应的敏感阈值(64 μg/mL)的 16 倍,达1 024 μg/mL。

在 135 株 *W. cibaria* 中,有 19 株(8.70%)表现出了被检抗生素的耐药性。其中,有 10 株(4.59%)STR 单一耐药,9 株 (4.13%)TET 和 STR 的二重耐药;在 35 株 *Lac. lactis* 中,有 4 株(1.83%)表现出了被检抗生素的耐药性。其中,2 株 (0.92%)TET 和 STR 二重耐药,2 株(0.92%)STR 耐药;在 12 株 *E. mundtii*、8 株 *E. faecalis* 和 8 株 *E. hirae* 中,分别有 1 株(0.46%)STR 耐药、1 株(0.46%)TET 和 STR

二重耐药和 2 株 (0.92%)TET 和 STR 二重耐药;在 15 株 *Leu. mesenteroide* 和 5 株 *Leu. holzapfelii* 中,分别有 2 株(0.92%)和 1 株(0.46%)STR 单一耐药。

2.4 抗生素耐药基因分析

在 30 株 STR 和 TET 单一或二重耐药菌株中,除 STR 和 TET 二重耐药菌株 *W.cibaria* CT024 中未检出 TET 被检耐药基因外,其它耐药菌株都有相应一个或多个被检基因被检出。*W.cibaria* CT024 未检

表 4 发酵用的鲜辣椒中 STR、TET 和 ERY 耐药乳酸菌的 MIC 和抗生素耐药性

Table 4 MICs and antibiotic resistance of the STR,TET and ERY resistant LABs on the fresh hot pepper used to fermentation

种	耐药株	STR			TET			ERY			耐药比例
		阈值	MIC	R 或 S	阈值	MIC	R 或 S	阈值	MIC	R 或 S	
<i>W. cibaria</i>	CT002	64	256-512	R	8	>16	R	1.0	<0.5	S	19/218
	CT003		512-1024	R		>16	R		<0.5	S	
	CT023		256-512	R		>16	R		<0.5	S	
	CT024		256-512	R		>16	R		<0.5	S	
	CT030		512-1024	R		<4	S		<0.5	S	
	CT032		>1024	R		<8	S		0.5-1.0	S	
	CT033		512-1024	R		<4	S		<0.5	S	
	CT037		256-512	R		<8	S		<0.5	S	
	CT040		256-512	R		<8	S		0.5-1.0	S	
	CT057		256-512	R		<4	S		<0.5	S	
	CT067		>1024	R		>16	R		<0.5	S	
	CT090		512-1024	R		>16	R		<0.5	S	
	CT096		512-1024	R		<8	S		0.5-1.0	S	
	CT097		256-512	R		>16	R		<0.5	S	
	CT104		>1024	R		>16	R		<0.5	S	
	CT109		256-512	R		<8	S		<0.5	S	
	CT136		256-512	R		<8	S		<0.5	S	
	CT201		512-1024	R		>16	R		0.5-1.0	S	
	CT203		256-512	R		<8	S		0.5-1.0	S	
<i>Lac. lactis</i>	CT005	64	>512	R	4	4-8	S	2	<0.5	S	4/218
	CT047		>512	R		>8	R		<0.5	S	
	CT148		256-512	R		>8	R		<0.5	S	
	CT218		128-256	R		<2	S		<0.5	S	
<i>E. mundtii</i>	CT081	128	>256	R	2	<1	S	4	<1	S	1/218
<i>E. faecalis</i>	CT110	128	>512	R	2	>8	R	4	<0.5	S	1/218
<i>E. hirae</i>	CT044	128	>256	R	2	>8	R	4	<1	S	2/218
	CT142		>256	R		4-8	R		<0.5	S	
<i>Leu. mesenteroide</i>	CT137	64	>256	R	8	<8	S	1	<0.5	S	2/218
	CT147		128-256	R		<2	S		<0.5	S	
<i>Leu. holzapfelii</i>	CT217	8	>64	R	2	1-2	S	1	<0.5	S	1/218

注:“R”代表耐药,“S”代表敏感

出当前的 TET 被检耐药基因,表明 CT024 中有其它 TET 耐药基因存在。在 STR 耐药菌株,*strB* 的检出率最高,达 60.00%,其次是 *aph*(3')-IIIa,检出率为 53.30%。其它 STR 耐药基因 *strA*、*aadA* 和 *aad6* 的检出率分别为 36.67%、20.00%和 16.67%。TET 耐药菌株中,*tetB* 和 *tetC* 检出率最高,达到 85.71%;*tetS*、*tetX*、*tetK*、*tetT*、*tetH*、*tetM*、*tetD* 和 *tetZ* 的检出率分别为 62.29%、57.14%、50.00%、21.43%、21.43%、21.43%、14.29%和 7.14%。*W. cibaria* CT003 是当前耐药基因检测种类出最多的菌株,包括 5 种 STR 基因,4 种 TET 耐药基因;*W. cibaria* CT024、*W. cibaria* CT030、*W. cibaria* CT032、*W. cibaria* CT096、*W. cibaria* CT203、*Leu. holzapfelii* CT217、*E. hirae* CT142、*E. mundtii*

CT081、*E. faecalis* CT110 和 *Lac. lactis* CT218 分别仅有一种 STR 耐药基因。

在 TET 耐药 *W. cibaria* 菌株中,11 种 TET 被检基因皆被部分检出,但不同株的被检基因种类不尽相同。在具有同样 MIC 的 STR 耐药 *W. cibaria* 菌株中,除 CT03 中 5 种被检基因全部检出外,其它菌株中皆被部分检出,检出基因的类型也不尽相同。*Lac. lactis*、*E. hirae* 和 *Leu. mesenteroide* 中的不同耐药菌株对 STR 和 TET 的耐药基因分布也表现出了与 *W. cibaria* 类似的情况。上述结果表明:当前被检菌株中,同种内的不同菌株对 STR 或 TET 的耐药性的高低与相应耐药基因的种类和数量多少无相关性,见图 2。

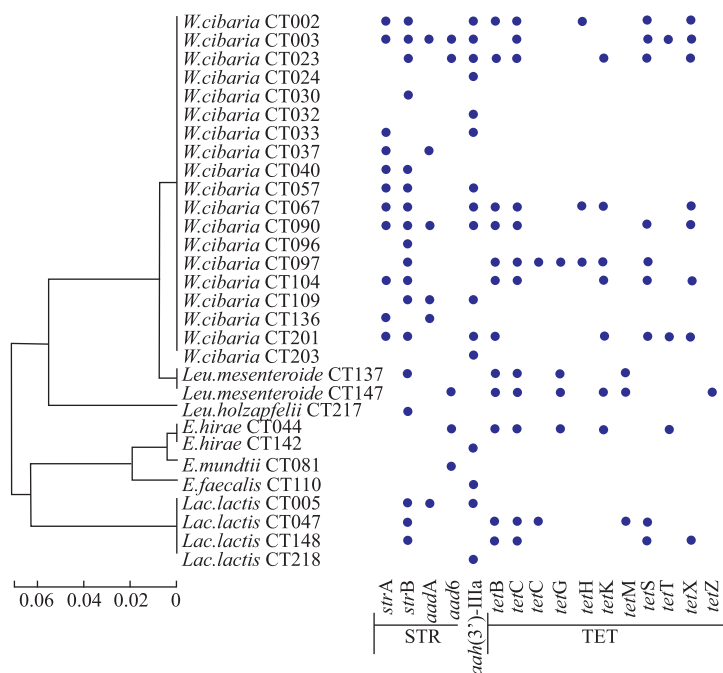


图 2 发酵用的鲜辣椒中 STR 和 TET 耐药乳酸菌的 STR 和 TET 耐药基因分布

Fig. 2 STR and TET resistance gene distribution of STR and TET resistant LABs on the fresh hot pepper used to fermentation

3 结 语

长期以来,人们对蔬菜安全性的关注多集中在蔬菜农残和重金属等一些理化指标上,很少注重其中的微生物指标,特别是微生物抗生素耐药性指标^[2]。蔬菜在其种植过程中接触的水体、土壤、空气及肥料中不可避免存在耐药性菌株,因此,当传统意义上合格的蔬菜作为发酵蔬菜原料时,其安全性是值得讨论的。当前的研究表明:用于发酵的鲜辣

椒原料中,乳酸菌的含量约为 2.18×10^4 CFU/g,主要属于 *W. cibaria* (61.93%)、*Lac. lactis* (16.06%)、*E. mundtii* (5.50%)、*E. faecalis* (3.67%)、*E. hirae* (3.67%)、*Leu. mesenteroide* (6.88%) 和 *Leu. holzapfelii* (2.29%)。所有 218 株乳酸菌分离株均无 ERY 耐药性,但有 30 株表现出了 TET 和 STR 耐药,约占分离株的 13.76%。其中,STR 单一耐药菌株 16 株 (7.34%),STR 和 TET 二重耐药菌株 14 株 (6.42%),在这些耐药菌株中,同种内的不同菌株对

STR 或 TET 的 MIC 值不同, 表现出了耐药性差异。同时, 同种内的不同菌株对 STR 或 TET 的耐药性高低与耐药基因的种类和数量多少无相关性。

Leu. mesenteroide、*Lac. lactis* 和 *W. cibaria* 是发酵蔬菜中常见的乳酸菌。在用于发酵的辣椒原料

中, 这些菌中 STR 和 TET 单一或二重耐药的发现为发酵辣椒的原料安全敲响了警钟。因此, 需建立抗生素耐药性乳酸菌的检测与防控体系, 确保未经二次灭菌即可直接食用的发酵辣椒的食品安全, 维护广大消费者的健康权益。

参考文献:

- [1] PRUDEN A, PEI R T, STORTEBOOM H, et al. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants; studies in northern Colorado[J]. **Environmental science and technology**, 2006, 40(23): 7445-7450.
- [2] Martínez J L. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments[J]. **Science**, 2008, 321(5887): 365-367.
- [3] SU J Q, WEI B, XU C Y, et al. Functional metagenomic characterization of antibiotic resistance genes in agricultural soils from China[J]. **Environment International**, 2014, 65: 9-15.
- [4] SHARMA P, TOMAR S K, GOSWAMI P, et al. Antibiotic resistance among commercially available probiotics[J]. **Food Research International**, 2014, 57: 176-195.
- [5] Fernández Fuentes M A, Morente E O, Abriouel H, et al. Antimicrobial resistance determinants in antibiotic and biocide resistant gram-negative bacteria from organic foods[J]. **Food Control**, 2014, 37: 9-14.
- [6] 陈飞平. 微生物发酵对蔬菜腌制品品质的影响[J]. 中国食物与营养, 2009(9): 28-30.
CHEN Feiping. Effects of microbial fermentation on the quality of salted vegetable[J]. **Food and Nutrition in China**, 2009(9): 28-30. (in Chinese)
- [7] Sauri-Duch E, Pino J, Marbot R. Changes in volatile compounds of *Habanero chile* pepper (*Capsicum chinense* Jack. CV. Habanero) at two ripening stages[J]. **Food Chemistry**, 2006, 94: 394-398.
- [8] 张宏梅, 黄绍松, 周汉基, 等. 酸奶中乳酸菌对 2 种抗生素耐药性分析[J]. 中国公共卫生, 2010, 26(4): 117-120.
ZHANG Hongmei, HUANG Shaosong, ZHOU Hanji, et al. Two kinds of antibiotics resistance of lactic acid bacteria isolated from yogurt[J]. **Chinese Journal of Public Health**, 2010, 26(4): 117-120. (in Chinese)
- [9] 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: 1316-1321.
- [10] SONG F F, XU G R, CAI T, et al. Detection of streptomycin resistance and resistance genes in lactic acid bacteria from Sichuan Pickle of China[J]. **Journal of Food Safety and Quality**, 2014, 5(12): 4032-4039.
- [11] 周启星, 罗义, 王美娥. 抗生素的环境残留生态毒性及抗性基因污染[J]. 生态毒理学报, 2007, 2(3): 243-251.
ZHOU Qixing, LUO Yi, WANG Meie. Environmental residues and ecotoxicity of antibiotics and their resistance gene pollution: a review[J]. **Asian Journal of Ecotoxicology**, 2007, 2(3): 243-251. (in Chinese)
- [12] MATHUR S, SINGH R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria-a review [J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2005, 105(3): 281-295.
- [13] 凌代文. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 85-86.
- [14] XIANG W L, LIANG H Z, LIU S, et al. Isolation and performance evaluation of halotolerant phosphate solubilizing bacteria from the rhizospheric soils of historic Dagong Brine Well in China[J]. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2011, 27(11): 2629-2637.
- [15] CYTRYNytryn E, RIJN J V, SCHRAMM A, et al. Identification of bacteria potentially responsible for oxic and anoxic sulfide oxidation in biofilters of a recirculating mariculture system[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2005, 71(10): 6134-6141.
- [16] NAYAK S, PRASANNA R, PRASANNA B M, et al. Analysing diversity among Indian isolates of *Anabaena* (*Nostocales*, *Cyanophyta*) using morphological, physiological and biochemical characters[J]. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, 2007, 23(11): 1575-1584.
- [17] XIANG W L, GUO J H, FENG W, et al. Community of extremely halophilic bacteria in historic Dagong Brine Well in southwestern China[J]. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2008, 24(10): 2297-2305.
- [18] KLARE I, KONSTSBEL C, Muller-bertling S, et al. Evaluation of new broth media for microdilution antibiotic susceptibility

- testing of *Lactobacilli*, *Pediococci*, *Lactococci*, and *Bifidobacteria*[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2005, 71(12): 8982-8986.
- [19] OUOBA L, LEI V. 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]. **Food Microbiol**, 2008, 121: 217-224.
- [20] NIAMH T, DECLAN B, SEAMUS F, et al. Characterisation and transferability of antibiotic resistance genes from lactic acid bacteria isolated from Irish pork and beef abattoirs[J]. **Research in Microbiology**, 2010, 161: 127-135.
- [21] Rojo-bezare B, Saenz Y, Poeta P, et al. Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolated from wine [J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2006, 111: 234-240.
- [22] BRENCIANI A, BACCIAGLIA A, VECCHI M, et al. Genetic elements carrying erm (B) in *Streptococcus pyogenes* and association with tet(M) tetracycline resistance gene[J]. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2007, 51(4): 1209-1216.
- [23] VAN Hoek A H, MAYRHOFFER S, DOMIG K J, et al. Mosaic tetracycline resistance genes and their flanking regions in *Bifidobacterium thermophilum* and *Lactobacillus johnsonii*[J]. **Antimicrob Agents Chemother**, 2008, 52(1): 248-252.
- [24] SUTCLIFFE J, GREBE T, Tait-Kamradt A, et al. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR[J]. **Antimicrob Agents Chemother**, 2006, 40: 2562-2566.

会 议 信 息

会议名称(中文):第十三届国际工业微生物遗传学大会

会议名称(英文):13th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms (GIM2016)

所属学科:动植物微生物学,生物物理学、生物化学及分子生物学,遗传与发育生物学

开始日期:2016-10-16

结束日期:2016-10-20

所在城市:湖北省 武汉市

具体地点:武汉东湖国际会议中心

主办单位:武汉大学、中国科学院上海生物工程研究中心

会议主席:邓子新 武汉大学、武汉生物技术研究院

E-MAIL:GIM2016@163.com

会议网站:<http://gim2016.cn>

会议背景介绍:第十三届国际工业微生物遗传学大会(GIM2016)将于2016年10月16-20日在武汉东湖国际会议中心举行。本届大会将为全世界微生物遗传学领域的科研工作者们提供一个促进交流、加强合作的高端平台,会议为所有与会者精心安排了涵盖微生物遗传基础研究与应用研究前沿的主题分会以及墙报展示。会议真诚地邀请相关领域的国内外专家学者在此汇聚一堂,展示最新科研成果。