

论著

市售即食食品中非致病菌的耐药性及耐药基因转移的研究

韩蓓^{1,2}, 梁欢¹, 付桂明³, 张瑞娟^{1,2}

- (1. 西安交通大学医学院公共卫生系, 陕西 西安 710061;
2. 陕西省营养与食品安全工程研究中心, 陕西 西安 710061;
3. 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047)

摘要:目的 了解西安市即食食品中的非致病菌的耐药性分布、耐药程度及耐药基因的转移情况, 分析潜在的食品安全问题。方法 对西安市的几家大型超市零售的熟肉、果盘、凉拌菜3大类即食食品样品进行食源性非致病菌的红霉素和氨苄青霉素耐药性分析、耐药基因转移、菌株16S rRNA序列测序鉴定等。结果 42.5%的分离株具有不同程度的红霉素耐药性, 47.5%的分离株具有不同程度的氨苄青霉素耐药性, 21.2%的分离株同时具有2种抗生素耐药性; 11.3%的红霉素耐药株耐药性高达160 mg/L, 6.3%的氨苄青霉素耐药株耐药性高达500 mg/L。随机挑选的部分耐药株在无抗生素培养基中连续传代1000代以后, 60%的氨苄青霉素耐药株和45%的红霉素耐药株的耐药性消失。部分耐药株的耐药基因可水平转移至非耐药株中。这些耐药株多为肠球菌、葡萄球菌、芽孢杆菌、假单胞菌等。结论 即食食品中的非致病菌有潜在的风险, 耐药基因在细菌间的转移可能对人体敏感肠道菌群和致病菌有一定影响。

关键词: 即食食品; 非致病菌; 细菌耐药性; 基因转移; 食品安全

中图分类号: R155.5; Q933 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2012)05-0412-05

Antibiotic resistance analysis and the AR gene transfer in non-pathogens isolated from ready-to-eat food

Han Bei, Liang Huan, Fu Guiming, Zhang Ruijuan

(Department of Public Health, School of Medicine of Xi'an Jiaotong University, Shanxi Xi'an 710061, China)

Abstract: Objective To elucidate the antibiotic-resistance (AR) distribution, AR level and the transfer of AR genes in non-pathogens isolated from ready-to-eat food in Xi'an, and evaluate the potential food safety risk. **Methods** The erythromycin and ampicillin resistance, the AR gene transfer, 16S rRNA gene sequence analysis were performed on the bacteria from ready-to-eat food samples collected from supermarkets of Xi'an, including cooked meat, fruit slices and Chinese salads. **Results** 42.5% of the isolates were erythromycin resistant, 47.5% were ampicillin resistant, while 21.2% were resistant to both antibiotics. 11.3% of *Erm^r* strains could grow under 160mg/L *Erm*thromycin, 6.3% of *Amp^r* strains could grow under 500mg/L ampicillin. After 1000 generations on medium without antibiotic, 60% and 45% of randomly selected *Amp^r* and *Erm^r* strains lost their antibiotic resistance. Within these strains, the *Erm^r* and *Amp^r* fragments could be transferred from the antibiotic-resistant strains into the negative strains. Most antibiotic-resistant strains belonged to *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus* and *Pseudomonas*. **Conclusion** There was a potential food safety risk of non-pathogens in ready-to-eat food, and the transfer of AR genes might have some impact on the human intestinal flora and pathogenic bacteria.

Key words: Ready-to-eat food; non-pathogens; antibiotic resistance; gene transfer; food safety

由于抗生素种类的增加和不恰当使用, 耐药细菌的种类和数量不断增加, 造成了严重的环境生物

污染, 食品也不可避免地受到了影响, 尤其是市售即食食品, 其食用时不需再加工, 消费者在食用该类食物时会面临着耐药性食源微生物污染带来的某些风险^[1]。

近年来, 多数研究集中在对细菌耐药性在临床环境中的传播途径及机制, 且以病原菌的耐药性研究为主, 并且发现在一定的环境选择压力下, 食源

收稿日期: 2012-06-02

基金项目: 卫生部公益性行业科研专项重点项目(200902009-09)

作者简介: 韩蓓 女 博士 讲师 研究方向为食品安全与微生物代谢途径

通信作者: 张瑞娟 女 教授 研究方向为食品安全、分子毒理学

E-mail: zhangrj@mail.xjtu.edu.cn

性耐药菌的生长代谢可能影响到人体健康^[2-4],因此,推测在生产加工过程中,食品中存在的细菌可能是联系耐药基因在环境和人体之间频繁转移的一个重要纽带^[5-6]。

除了致病菌的耐药性传播,益生菌、非致病菌等携带的耐药基因及其水平转移也不容忽视。水产养殖^[7-8]、乳品加工等过程中均有相关研究报告^[9]。Li等^[10]对从即食食品中分离出的900余株四环素耐药株及其耐药基因的转移情况进行了检测,其分离的多数菌株,包括肠球菌 *Enterococcus*, 乳球菌 *Lactococcus*, 葡萄球菌 *Staphylococcus*, 索丝菌 *Brochothrix*, 肉杆菌 *Carnobacterium*, *Stenotrophomonas* (黄色单胞菌科,属名未定),假单胞菌 *Pseudomonas*,鞘脂杆菌 *Sphingobacterium* 等均具有高耐药性,并且耐药基因易发生自然水平转移。研究者提出食源性非致病菌可能是耐药基因的一个重要宿主,并随之传播。目前国内对非致病菌耐药性的相关研究报告较少。

本研究选择常用的氨苄青霉素和红霉素作为筛选抗生素,通过对西安市市售3大类即食食品(熟肉、果盘、凉拌菜)中分离的食源性非致病菌进行耐药性筛查、菌株鉴定和耐药基因转移分析,旨在为制定、补充完善相应的食品安全地方标准的微生物限量提供数据,同时也为研究食品风险和靶标控制细菌耐药性研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样品

从西安市城区6家大型超市采样,包括熟肉(卤肉、油炸带鱼、酱肉、炸鸡腿等)、果盘(不同的水果拼盘)、凉拌菜(蔬菜类、豆制品、粉丝等)3大类。样品采集后立即放入冰盒中,1 h内送实验室,2 h内进行前处理。称取15 g固体样品放入无菌研钵

中,并加入15 ml 0.1% 无菌蛋白胨溶液,研匀。

1.2 细菌的分离与耐药性细菌的抗生素 MIC 值测定

将样品匀浆液进行梯度稀释,取1 ml 混合物与15 ml 营养琼脂混匀,并加入50 mg/L 氨苄青霉素或者16 mg/L 红霉素,35 °C 培养48 h,计数相应的耐药性细菌,不加抗生素的培养物进行总菌落计数。观察相应的抗生素固体培养基上的细菌生长情况,并计数。为了防止假阳性,将单菌落再接种至相应的抗生素试管 LB 培养基中,35 °C 通气培养。

MIC(抗生素最小抑菌浓度)值的测定方法参照 macrobroth 测试法^[11]。挑选具有相应耐药性的菌株,用浓度梯度为500,300,200,100,50,25,10,1,0.5 mg/L 的氨苄青霉素,浓度梯度为320,160,100,50,25,16,1.6,0.16 mg/L 的红霉素,在 LB 试管培养基中,35 °C 通气培养过夜,检测细菌的耐药性程度。*E. coli* DH5 α 作为氨苄青霉素耐药性阴性对照,*E. coli* 含有质粒 pUC19 作为氨苄青霉素耐药性阳性对照,蜡状芽孢杆菌 *Bacillus cereus* ATCC33018 作为红霉素耐药性阴性对照,*B. cereus* ATCC33018 含有 pBU4 作为红霉素耐药性阳性对照。本研究所用菌株见表1。

1.3 细菌耐药性的稳定性检验

为了检测细菌的耐药基因稳定性,及分析其是否位于可发生水平转移的质粒中或者稳定存在于基因组 DNA 上,将1.2中分离出的高耐药性细菌(500 mg/L 氨苄青霉素,160 mg/L 红霉素)中各随机挑出50株,进行无选择压力的连续传代培养,1% 转接量,每12 h 转接1次,连续培养16 d。

将最终的传代培养物梯度稀释,涂布至含有500 mg/L 氨苄青霉素或160 mg/L 红霉素的 LB 固体培养基中,35 °C 培养12~18 h,观察细菌生长情况。

表1 实验所用菌株

Table 1 Bacteria used in this study

菌株	来源	耐药性	备注
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	实验室保存 ^a	无	无
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	实验室保存 ^a	Amp ^r	含质粒 pBU4
<i>Pantoea ananatis</i> g14	食物样品分离	Amp ^r	含质粒,耐药性易丢失
<i>Staphylococcus pasteurii</i> g215	食物样品分离	Amp ^r	含质粒,耐药性易丢失
<i>Psychrobacter pulmonis</i> c107	食物样品分离	Erm ^r	含质粒,耐药性易丢失
<i>Psychrobacter pulmonis</i> r194	食物样品分离	Erm ^r	含质粒,耐药性易丢失
g26	食物样品分离	无	
A ⁺ 26	重组菌株	Amp ^r	<i>P. ananatis</i> g14 质粒转移至 g26
g58	食物样品分离	无	
A ⁺ 58	重组菌株	Amp ^r	<i>P. ananatis</i> g14 质粒转移至 g58
g106	食物样品分离	无	
A ⁺ 106	重组菌株	Amp ^r	<i>P. ananatis</i> g14 质粒转移至 g106

注:a为陕西省营养与食品安全工程研究中心微生物实验室。Amp^r:氨苄青霉素耐药性(ampicillin resistance)。Erm^r:红霉素耐药性(erythromycin resistance)。

1.3.1 耐药菌与非耐药菌的联合培养介导的耐药基因水平转移

选择1.3中经过连续无选择压力培养后耐药性丢失的菌株作为耐药基因质粒的供体菌株,挑选的从食品中分离的敏感菌株为受体菌株。为了便于鉴定观察,受体菌和供体菌在显微镜下的形态和菌落生长形态有明显差别。将供体菌和受体菌分别过夜培养,至 OD_{600} 达到1.6~1.8,然后分别取30 μ l供体菌培养物和30 μ l受体菌培养物转移至3 ml LB试管培养基中,35 $^{\circ}$ C通气培养24 h,取50 μ l的24 h培养物与20~25 ml加有50 mg/L氨苄青霉素LB琼脂培养基混匀,倾倒入平板,做3个重复,然后将平板置于35 $^{\circ}$ C培养箱培养18~24 h,筛选获得氨苄青霉素抗性的受体菌株。

1.3.2 耐药质粒的自然转移介导的耐药基因转移

取供体菌的新鲜培养液10 ml,离心收集细胞,采用裂解法粗提大质粒。依次加入380 μ l溶液1(6.7%蔗糖,50 mmol/L Tris,1 mmol/L EDTA,pH 8.0),100 μ l溶菌酶(10 mg/ml,pH 8.0),50 μ l溶液2(50 mmol/L Tris,0.25 mmol/L EDTA),28 μ l溶液3(20% SDS,50 mmol/L Tris,20 mmol/L EDTA),28 μ l NaOH(3 mol/L),50 μ l Tris-HCl(2 mol/L,pH 7.0),700 μ l NaCl,10 000 r/min离心5 min后转移上清液,加入700 μ l的氯仿:异戊醇溶液混匀除蛋白,10 000 r/min离心5 min后转移上清液,加入2倍体积于上清液的冷冻无水乙醇,放入-20 $^{\circ}$ C冰箱静置30 min后取出,10 000 r/min离心5 min,倒掉上清液,充分晾干后加入20 μ l溶液4(10 mmol/L Tris,1 mmol/L EDTA,pH 7.5),混合均匀。

挑选对氨苄青霉素敏感的受体菌,接种至LB液体培养基培养12 h,各取1 ml加入EP管,在每管中加入5 μ g供体菌质粒,放入35 $^{\circ}$ C培养箱中培养3 h。然后取样涂布于50 mg/L氨苄青霉素的LB固体培养基上。

1.3.3 耐药基因转移的重组菌株的鉴定

在显微镜下观察含氨苄青霉素的LB固体培养基上长出的单菌落,与受体菌形态一致的菌落被初步定位为耐药基因转移阳性重组菌株;再利用PCR方法扩增 β -内酰胺酶基因片段,验证重组菌株。设计引物为Amp-F:5' CCA GAA ACG CTG GTG AAA GT3',Amp-R:5' GAT ACG GGA GGG C TT ACC AT3'。

具有受体菌特征,可以在含氨苄青霉素的LB固体培养基上正常生长,经PCR验证可以扩增出 β -内酰胺酶基因DNA片段的重组菌株认为是耐药基因转移的阳性重组菌株。

1.4 耐药性细菌的16S rRNA片段扩增与测序

为了准确鉴定具有高耐药性的分离菌株,对代表菌株进行16S rRNA序列的PCR扩增、回收纯化、序列测定,以及序列的比对分析。16S rRNA的PCR引物为16S-F:5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG3',16S-R:5' GGT ACC T TG TTA CGA CTT3',扩增程序参见文献[10];扩增产物DNA片段采用OMEGA公司PCR纯化试剂盒进行回收纯化;纯化片段送上海桑尼生物科技有限公司测序;测定序列通过NCBI Blast软件进行序列分析比对,方法见文献[12]。

2 结果与分析

2.1 即食食品样品的总菌落计数

本次即食食品采样进行细菌分离过程中的菌落总数为:凉拌菜类6 570 CFU/g,卤肉、熟肉制品类70 600 CFU/g,水果果盘类5 840 CFU/g,采样平均值符合凉拌菜质量安全要求(DB 13/889—2007,以非肉类为主材的凉拌菜中菌落总数不超过8 000 CFU/g)和熟肉制品卫生标准(GB 2726—2005,菌落总数不超过80 000 CFU/g)。在同一块固体培养基上肉眼观察菌落外观,具有相似颜色、形态等的单菌落被认为可能是同种细菌,并随机挑选形态有差别的菌落进行下一步实验,使结果更可靠。

2.2 耐药性细菌的筛选结果

统计在含抗生素的固体培养基上分离出的菌落数,以及氨苄青霉素、红霉素的LB液体试管培养基培养二次验证,结合总菌落计数结果,本次即食食品样品中耐药性细菌的分离结果为:50 μ g/ml氨苄青霉素耐药性阳性率为47.5%,16 μ g/ml红霉素耐药性阳性率为42.5%,均接近菌落总数的50%,其中21.2%的菌株同时具有氨苄青霉素耐药性和红霉素耐药性(图1A)。随着抗生素浓度的提高,细菌的耐药阳性率随之降低,当培养基中氨苄青霉素浓度达到500 μ g/ml时,细菌的耐药阳性率为6.3%;当培养基中红霉素浓度达到160 μ g/ml时,细菌的阳性率为11.3%(图1B)。其中蔬菜类的耐药菌多为红霉素耐药性,而水果类的耐药菌多为氨苄青霉素耐药性。

2.3 细菌耐药性的稳定性检验

在随机挑选的50株氨苄青霉素耐药株和50株红霉素耐药株连续无抗生素选择压力培养1 000代后,对其进行抗生素MIC值测定,结果显示约有60%的氨苄青霉素耐药株的MIC值低于0.5 mg/L,45%的红霉素耐药株的MIC值低于0.16 mg/L,说明这些菌株失去了相应的耐药性,其耐药性丢失的原因很可能是由于位于质粒上的耐药基因随着质

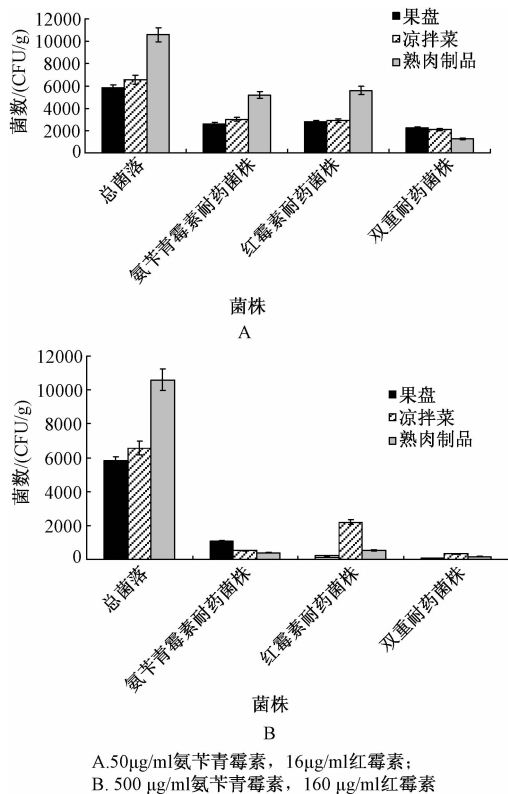


图1 即食食品中耐药菌分离株的筛选结果
Figure 1 Prevalence of AR (antibiotic resistance) bacteria in food samples

粒的丢失而丢失,这些菌株有 g14、g215、c107、r194。其他仍具有耐药性的菌株则可能是耐药基因位于基因组 DNA 上而未发生耐药基因的丢失。

2.4 耐药性基因的水平转移

受体菌 g26 (Amp^r)、g58 (Amp^r)、g106 (Amp^r) 分离于果盘样品,氨苄青霉素敏感菌株,杆菌,菌落分别呈白色、透明、淡黄色;受体菌 r18 (Erm^r)、r90 (Erm^r)、r353 (Erm^r) 分离于熟肉制品。红霉素敏感菌株,球菌,菌落分别呈白色、透明、淡黄色。选择的供体菌有 g14 (氨苄青霉素耐药菌株、黄色、球菌)、r194 (红霉素耐药菌株、白色、杆菌)。

经过联合培养,发生耐药基因水平转移的菌株为供体菌 g14 与受体菌 g58 (Amp^r)、供体菌 g14 与受体菌 g106 (Amp^r);红霉素供体菌 r194 与受体菌之间未发生基因水平转移。

提取供体菌 g14 质粒,并进行质粒与受体菌的自然转移,受体菌 g26 (Amp^r)、g58 (Amp^r)、g106 (Amp^r) 均获得氨苄青霉素耐药性,表现出和供体菌 g14 同样的氨苄青霉素耐药性,其重组菌株命名为 A⁺26、A⁺58、A⁺106。提取 A⁺26、A⁺58、A⁺106 质粒进行 β -内酰胺酶基因 PCR 扩增,均可扩增出 696 bp 的阳性片段,进一步证实了供体菌 A⁺14 的氨苄青霉素耐药基因位于质粒上,该质粒经过天然水平

转移使得氨苄青霉素敏感菌株 g26、g58、g106 获得了质粒,并正常表达了 β -内酰胺酶,这些菌株成为了氨苄青霉素耐药株,见图 2。

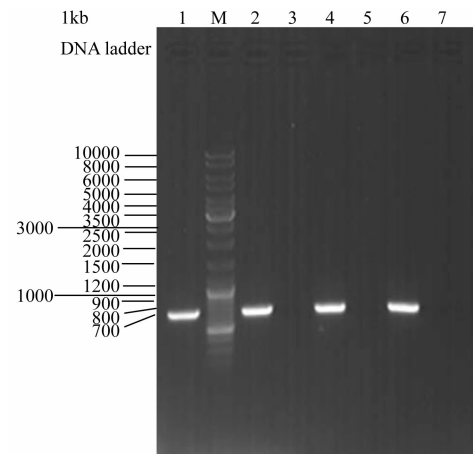


图2 耐药质粒转移后的重组菌株 β -内酰胺酶 PCR 检测
Figure 2 The ampicillin resistance gene PCR amplification gel electrophoresis results

2.5 耐药性细菌的 16S rRNA 片段扩增与测序

g14、g215、c107、r194 进行 16S rRNA 片段扩增,见图 3,纯化后的 1.5 kb 片段经测序、序列比对,证实 g14 为 *Pantoea ananatis*, g215 为 *Staphylococcus pasteurii*, c107、r194 为 *Psychrobacter pulmonis*。其中 *Pantoea ananatis* g14 GenBank 序列号为 JN974457。

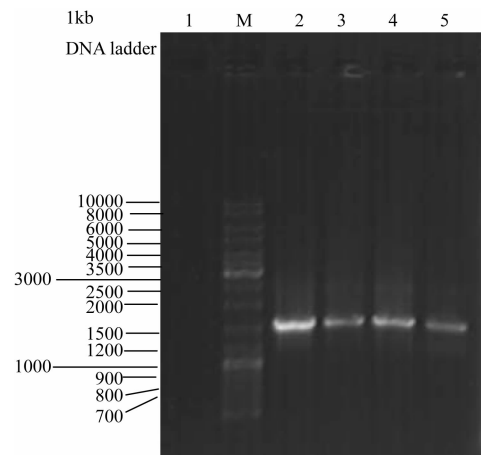


图3 耐药菌的 16S rRNA 序列 PCR 扩增
Figure 3 Gel electrophoresis results of 16S rRNA PCR amplification from antibiotic resistant isolates

3 讨论

对所分离的非致病菌耐药性进行筛查,结果显示,从凉拌菜中分离的细菌总数大于 6 000 CFU/g,

并且其中 57.5% 细菌具有氨基青霉素耐药性,60% 细菌具有红霉素耐药性,35% 的细菌具有双重耐药性。由于样品经过梯度稀释,有可能使得痕量耐药菌、某些不可纯培养或厌氧的耐药菌未被筛选出来,所以本研究中的氨基青霉素和红霉素耐药菌的数量及在菌落总数中的比例可能比实际含量要低。据此推测,长期食用该类食品的人群已经处于高耐药性非致病菌的压力之下,此结果与 Pukatzki 等^[13]的研究结果是一致的。

有研究表明,目前我们食用的即食食品中含有大量耐药性非致病菌,这些耐药性非致病菌经常摄入,在宿主体内定植,并发生基因水平转移,可能会影响体内菌群的耐药谱,或者导致某些敏感致病菌产生耐药性^[13]。本研究发现,从食品中分离出的耐药菌可以将其耐药基因以水平转移的方式转入至非致病菌中,使其具有相应的耐药特性。比如,从凉拌菜中分离的 *P. ananatis* g14 具有高耐药性及高耐药基因转移频率,该菌属于植物病原菌,其对食品的污染可能来自植物原材料、运输、加工等各个环节。乳制品中分离的多重耐药肠球菌、氨基青霉素耐药乳酸菌、即食食品中分离的四环素耐药性非致病菌等的耐药基因转移研究也证实了这一点^[14-15]。出现这种结果的原因可能是这些食品加工过程中没有有效杀灭该类细菌,间接导致了该类细菌作为耐药基因的宿主,并可能通过主动或被动的质粒、转座子等将耐药基因在细菌之间进行转移。国内外一些食品安全研究者一致认为,该类细菌作为耐药传播中间宿主值得深入研究^[9-10,16]。

因此,为了保证即食食品的食用安全,还需控制食源性非致病菌的耐药性以及细菌耐药基因的转移,包括食品加工全过程中的此类微生物的控制,以及在不同条件下进行食品加工时,对此类微生物的菌群分布、菌相变化、细菌耐药性分型、主导细菌等进行全程跟踪,结合 HACCP 进行关键危害点的控制,提高该类食品的整体质量安全。

参考文献

[1] ALLEN H K, DONATO J, WANG H H, et al. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments[J]. Nat Rev Microbiol, 2010, 8: 251-259.

[2] SEGURA PA, FRANCOIS M, GAGNON C, et al. Review of the occurrence of anti-infectives in contaminated wastewaters and natural and drinking waters[J]. Environ Health Perspect, 2009, 117: 675-684.

[3] LEVY S B. The challenge of antibiotic resistance[J]. Sci Am, 1998, 278: 46-53.

[4] THIELE-BRUHN S. Pharmaceutical antibiotic compounds in soil—a review[J]. J Plant Nutr Soil Sci, 2003, 166: 145-167.

[5] 申进玲, 杨保伟, 只帅, 等. 陕西部分地区零售肉中沙门菌耐药的监测分析[J]. 中华预防医学杂志, 2008, 42: 758-761.

[6] 崔玉军, 覃俊杰, 宋亚军, 等. 聚集性出血性大肠杆菌: 2011 年德国疫情大爆发之元凶[J]. 中华预防医学杂志, 2011, 45: 581-582.

[7] RHODES G, HUYS G, SWINGS J, et al. Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between aeromonads in hospital and aquaculture environments: implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant Tet A[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66: 3883-3890.

[8] CABELLO F C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment[J]. Environ Microbiol, 2006, 8: 1137-1144.

[9] HUMMEL A, HOLZAPFEL W H, FRANZ C M. Characterisation and transfer of antibiotic resistance genes from enterococci isolated from food[J]. Syst Appl Microbiol, 2007, 30: 1-7.

[10] LI X J, WANG H H. Tetracycline resistance associated with commensal bacteria from representative ready-to-consume deli and restaurant foods[J]. J Food Prot, 2010, 73: 1841-1848.

[11] ROESCH M, PERRETEN V, DOHERR M G, et al. Comparison of antibiotic resistance of udder pathogens in dairy cows kept on organic and on conventional farms[J]. J Dairy Sci, 2006, 89: 989-997.

[12] HAN B, LIU H Z, HU X M, et al. Preliminary characterization of a thermostable DNA polymerase I from a mesophilic *Bacillus sphaericus* strain C3-41[J]. Arch Microbiol, 2006, 186: 203-209.

[13] PUKATZKI S, MA M T, STURTEVANT D, et al. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the Dictyostelium host model system[J]. Proc Natl Acad Sci, 2006, 103: 1528-1533.

[14] WANG H H, MANUZON M, LEHMAN M, et al. Food commensal microbes as a potentially important avenue in transmitting antibiotic resistance gene[J]. FEMS Microbiol Lett, 2006, 254: 226-231.

[15] VILLEDIEU A, DIAZ-TORRES M L, ROBERTS A P, et al. Genetic basis of Erythromycin resistance in oral bacteria[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48: 2298-2301.

[16] 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: 511-512.