原料乳中产β-内酰胺酶菌株的快速筛选和鉴定

谢鲲昊[1,2]，满朝新[1]，卢 雁[1]，刘珊珊[2]，房玉国[1]，杨士芹[2]，董馨悦[2]，姜毓君[1,2,*]
(1.东北农业大学 国家乳业工程技术研究中心，黑龙江 哈尔滨 150030；
2.东北农业大学食品学院，乳品科学教育部重点实验室，黑龙江 哈尔滨 150086)

摘 要：利用青霉素-藤黄微球菌-TSA培养基建立一种快速筛选原料乳中产β-内酰胺酶细菌的方法，该筛选方法比常规方法更加便捷，易于观察，并且具有很高的特异性分离鉴别能力，同时通过细菌16S rDNA序列比对方法来鉴定所分离的产酶菌的种属。结果表明，原料乳中存在产β-内酰胺酶的菌株，主要产酶菌为大肠杆菌。

关键词：β-内酰胺酶；原料乳；菌株分离；菌株鉴定

Rapid Isolation and Identification of β-Lactamase-Producing Strains in Raw Milk

XIE Kun-hao[1,2]，MAN Chao-xin[1]，LU Yan[1]，LIU Shan-shan[2]，FANG Yu-guo[1]，YANG Shi-qin[2]，DONG Xin-yue[2]，JIANG Yu-jun[1,2,*]
(1. National Research Center of Dairy Engineering and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China；
2. Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150086, China)

Abstract：Penicillin-*Micrococcus luteus*-TSA medium plates were used to establish a method for the rapid isolation of β-lactamase-producing bacteria in raw milk. This method revealed a more convenient and simpler observation than conventional methods, and could provide highly specific isolation. 16S rRNA gene sequence analysis allowed the assignment of the β-lactamase-producing bacterial isolates obtained in this study. As a result, *Escherichia coli* was the dominant β-lactamase-producing strain in raw milk.

Key words：β-lactamase；raw milk；isolation；identification
中图分类号：TS252.2；TS207.4 文献标志码：A 文章编号：1002-6630(2013)07-0162-04

随着人们生活质量的逐渐提高，食品的安全问题备受关注，其中由于抗菌药物的广泛使用，细菌出现耐药性并不断加强，导致很多细菌甚至由单药耐药发展到多重耐药[1]。抗菌药物残留于动物性食品(例如乳或乳制品[2])中，同样使人也长期与药物接触，导致人体内耐药菌的增加[3]。当人体发生疾病时，就给临床上细菌感染疾病的治疗带来困难，耐药菌株会延误正常的治疗过程。

细菌获得耐药性的最重要机制之一是产生β-内酰胺酶[4]。β-内酰胺酶能够水解β-内酰胺环抗生素(如青霉素类)的酶[5]，它的种类和数量现已超过了400种[6]。β-内酰胺酶作为一种非法的添加剂，食用安全性未被评估，并且其水解青霉素类抗生素的产物青霉噻唑酸容易引起人体过敏反应[7]。同时常规的加工灭菌方法只能杀灭菌体，而由耐药菌产生的β-内酰胺酶却具有较强的耐热性[8]，不易被灭活，给食品安全带来巨大隐患。

目前，在产β-内酰胺酶菌株分离鉴定研究中，相关技术比较单一且针对性差。只能采用抗性平板对产酶菌(金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、蜡样芽孢杆菌等)进行初步筛选[9-12]，这样方法只能筛选出耐药菌，而不能区别是否产β-内酰胺酶，所以必须再通过杯碟法检测鉴定是否产酶[13-14]。整个分离鉴定操作过程繁琐费时费力且特异性不强。

本研究拟建立一种分离鉴定产β-内酰胺酶细菌的准确快速方法，通过该方法来分析原料乳中内源性β-内酰胺酶及产酶菌的情况，以期对原料乳食用安全性进行相关评价，并提供数据参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

50份原料乳来自黑龙江省北安市，样品采集后保存于4℃条件下，24h内检测。

收稿日期：2011-12-21
基金项目：“十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAK17B04)；国家“863”计划项目(2011AA100902)；
国家自然科学基金项目(31171718)；黑龙江省教育厅科学技术研究重点项目(12511z005)
作者简介：谢鲲昊(1984—)，男，硕士研究生，研究方向为食品安全与质量控制。E-mail：xiekunhao66@163.com
*通信作者：姜毓君(1971—)，男，教授，博士，研究方向为食品科学。E-mail：yujun_jiang@163.com

β-内酰胺酶标准品(1kU)、青霉素G标准品　美国Sigma公司；舒巴坦　德国Dr.Ehrenstorfer实验室，细菌基因组DNA提取试剂盒　北京百泰克公司。

1.2　菌株与培养基

黄微球菌(*Micrococcua luteua*) CMCC(B)28001由国家乳品中心提供。

胰蛋白胨大豆琼脂培养基(TSA)购于青岛海博生物技术有限公司，使用前121℃高压灭菌15min。抗生素检测用培养基Ⅱ号购于青岛海博生物技术有限公司，使用前115℃高压灭菌30min。

1.3　引物合成

委托英潍捷基(上海)贸易有限公司合成16S rDNA通用引物[15]，具体序列为：27f：5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′；1492r：5′-GGTTACCTTGTTACGACTT-3′。

1.4　方法

1.4.1　微球菌菌悬液制备

将传代次数不超过14代的藤黄微球菌接种于TSA斜面培养基上，经(36±1)℃培养18～24h后，用生理盐水洗下菌苔制成菌悬液，4℃保存，贮存期限1周。

1.4.2　检测平板的制备

选取90mm灭菌玻璃培养皿，于培养皿中先加入10mL灭菌的抗生素检定培养基Ⅱ(第一层)，待其凝固后，在第一层上再加入5mL含有浓度约为1.0×10^{8}CFU/mL藤黄微球菌的抗生素检定培养基Ⅱ(第二层)。待第二层培养基凝固后的平板上放置上个牛津杯。平板底部逆时针标明A、B、C、D。完成后备用。

1.4.3　样品的处理

每份样品取4个1.5mL离心管，分别标记为A、B、C、D(与检测平板上标识的A、B、C、D的检测牛津杯相对应)，各加入1mL待检乳样。同时取纯水1mL加入到1.5mL离心管中作为对照。按照表1所列顺序分别将100μg/mL青霉素标准溶液、0.16U/mL β-内酰胺酶标准溶液、1mg/mL舒巴坦标准溶液加入到样品及纯水中。

表1　牛奶样品的处理方法

Table 1　Milk samples with the addition of different materials

编号	牛奶样品的处理方法
A	青霉素G 5μL
B	舒巴坦25μL、青霉素G 5μL
C	β-内酰胺酶25μL、青霉素G 5μL
D	β-内酰胺酶25μL、舒巴坦25μL、青霉素G 5μL

1.4.4　β-内酰胺酶的测定

取制好的平板，吸取样品各200μL分别加人对应编号中，于(36±1)℃培养18～22h后，记录A、B、C、D抑菌圈结果。每份样品做3个重复实验，每次重复实验3组平行。

检测结果的判定，纯水样品结果应为A、B、C、D均产生抑菌圈；A的抑菌圈与B的抑菌圈相比，差异在3mm以内(含3mm)，且重复性良好；C的抑菌圈小于D的抑菌圈，差异在3mm以上(含3mm)，且重复性良好。则系统成立，可以对样品进行如下判定：样品结果中B和D均产生抑菌圈，且C和D抑菌圈差异在3mm以上(含3mm)时，如果A和B的抑菌圈差异在3mm以上(含3mm)，且重复性良好，即判定“阳性”；如果A和B的抑菌圈差异小于3mm，且重复性良好，即判定“阴性”。

1.4.5　阳性奶样中产β-内酰胺酶菌的分离及菌落选取

将灭菌好的TSA培养基却至55℃加入藤黄微球菌菌悬液，使菌液终浓度大于1×10^{8}CFU/mL，然后加入青霉素使培养基中青霉素终质量浓度分别为100、10μg/mL，混匀后倒板备用。

取杯碟法检测为阳性的奶样在不同青霉素质量浓度的平板上进行划线或涂布，(36±1)℃培养24～36h，然后观察菌落形态。分别挑取周围有黄色菌圈，同时可以伴有卫星菌落(于中心菌落周围一些小菌落)的菌落，以及无上述现象的菌液进行扩培，扩培的菌液离心去菌体后，利用杯碟法进行检测。

将具有不同菌落形态的疑似产酶菌进行革兰氏染色后，通过显微镜观察进行初步筛选，从中选择进行下一步鉴定种属的菌株。

1.4.6　产酶菌株基因组DNA的提取及16S rDNA PCR扩增

将分离的产酶菌划线培养后，挑取选定的菌落进行扩培，取适量菌液提取细菌基因组DNA。使用细菌基因组DNA提取试剂盒提取产酶菌基因组DNA。

提取的产酶菌的基因组DNA，使用16S rDNA引物进行PCR，PCR反应体系(50μL)[16]：10×PCR Buffer 5μL，dNTP Mixture (2.5mmol/L) 5μL，上、下游引物(10mmol/L)各2μL，模板4μL，*Taq*酶1μL，其余用双蒸水补足至50μL。PCR扩增程序：采用热启动。95℃预变性5min；94℃变性30s；56℃退火45s；72℃延伸1min；进行35个循环，最后72℃延伸5min。

PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测，用凝胶成像系统记录电泳结果。

1.4.7　PCR产物序列比对

将条带大小约为1500bp的PCR产物联同16S rDNA引物一起送至英潍捷基(上海)贸易有限公司测序，然后在NCBI上通过BLAST比对，得出结果，确定菌株种属。

2 结果与分析

2.1 奶样的检测结果

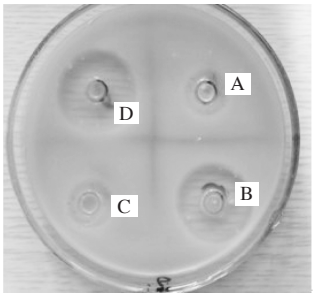
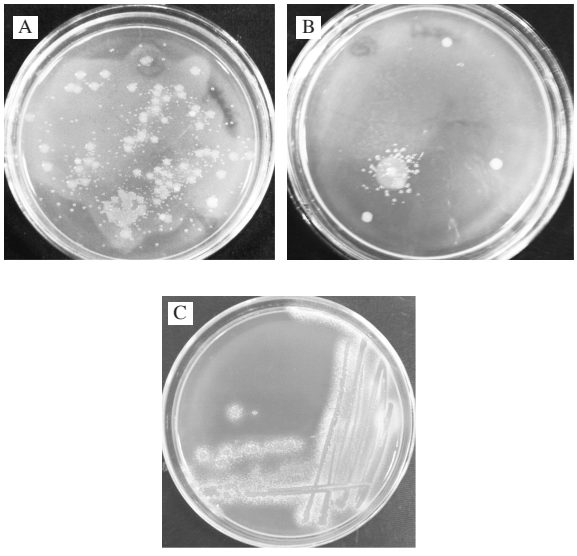


图1 部分阳性奶样的检测结果

Fig.1 Results of detection of β-lactamase-positive milk samples

送检的50份送检奶样经杯碟法检测，有3份奶样的检测结果为阳性，阳性率为6%。由图1可知，A杯抑菌圈直径小于B杯的抑菌圈，且差异大于3mm。同时所有的阳性的检测结果中的A杯均有抑菌圈，且直径与对照组C杯的直径相近。结果说明，所检测的阳性奶样中的含有β-内酰胺酶。

2.2 阳性奶样中产β-内酰胺酶菌的分离及菌落选取



A. 10μg/mL青霉素的分离平板；B. 100μg/mL青霉素的分离平板；C. 产酶菌单菌落划线培养。

图2 产酶菌的平板分离的部分结果

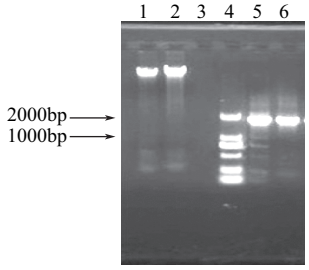
Fig.2 Isolation of β-lactamase-producing strains

由图2可知，当青霉素质量浓度为10μg/mL时，菌落较多，同时卫星菌落也较多不容易分离。当青霉素质量浓度为100μg/mL时，可发现有些菌落周围有明显的黄色藤黄微球菌菌圈，同时伴有许多小的卫星菌落。挑到菌落进行划线培养，菌落周围的黄色菌圈非常明显。有黄色菌圈的菌落形态没有明显差异，用接菌环挑取进行革兰氏染色，然后镜检发现均为革兰氏阴性杆菌，且细菌大小形态比较相似。

将具有黄色菌圈和没有黄色菌圈的菌落同时进行扩培，杯碟法结果显示有黄色菌圈的扩培菌液均为阳性，而没有黄色菌圈的均为阴性。说明本研究中制备的分离平板具有很高的特异性分离能力。

分离平板的原理：平板培养基中含有青霉素，对青霉素敏感的细菌不能在平板上生长，从而分离到耐青霉素的细菌。同时培养基中混入对青霉素敏感的藤黄微球菌，如果耐青霉素的细菌是通过产生β-内酰胺酶来获得耐药性，该菌落周围培养基中的青霉素会被细菌产生的β-内酰胺酶分解，藤黄微球菌及其他不耐药的细菌就能够在其周围生长，分别出现黄色菌圈和卫星菌落。而不产β-内酰胺酶的耐药菌则不出现该现象。

2.3 产酶菌的鉴定



1. 产酶菌①基因组DNA；2. 产酶菌②基因组DNA；3.空白样；4. Marker DL2000；5. 产酶菌①16S rDNA PCR产物；6. 产酶菌②16S rDNA PCR产物。

图3 产酶菌基因组DNA和16S rDNA PCR产物电泳结果

Fig.3 Agarose gel electrophoresis of total DNA and 16S rDNA PCR products

将分离得到的两株产酶菌(分别为产酶菌①和产酶菌②)基因组DNA及其PCR产物进行DNA电泳。由图3可知，基因组DNA均有条带出现，说明2株产酶菌基因组DNA提取成功。PCR产物的条带均为1500bp左右，说明产酶菌的16S rDNA扩增成功。将PCR产物送至英潍捷基(上海)贸易有限公司测序，然后在NCBI上通过BLAST比对，与大肠杆菌同源性达到99%，可知2株均为*Escherichia coli*大肠杆菌。说明原料乳中存在产β-内酰胺酶的细菌，并且大肠杆菌是其中主要的一类。

3 结 论

本研究建立快速筛选产β-内酰胺酶细菌的方法来筛选原料乳中产酶菌，利用建立的快速检测方法，从原料乳分离并鉴定出产β-内酰胺酶的大肠杆菌，证明原料乳中存在内源性产β-内酰胺酶的细菌，给原料乳及其乳制品的食用安全性带来很大的隐患。本方法不需要经过前培菌等前处理和杯碟法鉴定过程，就能够快速、便捷、准确地分离出原料乳中产β-内酰胺酶的细菌。非常适合

乳及其他基质中产酶菌分离检测或内源性β-内酰胺酶研究中，具有很大的推广及应用价值。

参考文献：

[1] 李伟华, 袁仲, 张慎举. 兽药残留对动物性食品安全的影响与控制措施[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(19): 5864-5865.

[2] HAMANN J, TOLLE A, HEESCHEN W, et al. Antibiotics and sulphonamides in milk and milk products[J]. International Dairy Federation: Brussels, 1979: 43-56.

[3] JACOBY G A. Beta-lactamase nomenclature[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2006, 50: 1123-1129.

[4] BARRY G H. Evolution of the serine β-lactamases: past, present and future[J]. Drug Resistance Updates, 2004, 7: 111-123.

[5] LI Xianzhi, MANISHA M, SHIVA G, et al. β-Lactam resistance and β-lactamases in bacteria of animal origin[J]. Veterinary Microbiology, 2007, 121: 197-214.

[6] MAJA B, ANDREA M H, ROBERT A B, et al. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases[J]. Drug Resistance Updates, 2006, 9: 142-156.

[7] SULLIVAN T J, WEDNER H J, SHATZ G S, et al. Skin testing to detect penicillin allergy[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 1981, 68: 171-180.

[8] ZHE Xu, WANG Haoyang, HUANG Shixin, et al. Determination of β-lactamase residues in milk using matrix-assisted laser desorption/ionization fourier transform mass spectrometry[J]. Analytical Chemistry, 2010, 82(5): 2113-2118.

[9] 张秀芹, 李欣南, 田颖, 等. 生鲜牛乳中内源性β-内酰胺酶的研究[J]. 中国乳业, 2009(11): 58-59.

[10] ALDO C, ASPAN A, ARTUSSON K, et al. Genotypic variation among *Staphylococcus aureus* isolates from cases of clinical mastitis in Swedish dairy cows[J]. The Veterinary Journal, 2010, 8: 188-192.

[11] BENGTSSON B, UNNERSTAD H E, EKMAN T, et al. Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows[J]. Veterinary Microbiology, 2009, 136: 142-149.

[12] MAMZA S A, EGWU G O, MSHELIA G D. Beta-lactamase *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from chickens in Nigeria[J]. Veterinaria Italian, 2010, 46(2): 155-165.

[13] 米自由, 苏亮, 何义刚, 等. 生鲜牛乳中β-内酰胺酶检测方法: 杯碟法的优化及应用[J]. 中国兽医杂志, 2010, 46(1): 67-69.

[14] CUI Shenghui, LI Jingyun, HU Changqin, et al. Development of a method for the detection of β-lactamase in milk samples[J]. Journal of AOAC International, 2007, 90(4): 1128-1132.

[15] WILLIAM G W, SUSAN M B, PELLETIER D, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. Journal of Bacteriology, 1991, 1: 697-703

[16] 刘红玉, 李岩, 崔洪斌. 肉中4种致病菌的PCR快速检测方法的建立[J]. 食品科学, 2011, 32(6): 213-216.