

乳球菌属对抗生素最小抑菌浓度的分析

潘琳, 陈霞, 邵玉宇, 郭慧玲, 张和平, 孟和毕力格

(内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室, 内蒙古呼和浩特 010018)

摘要: 抗生素与乳酸菌一直被人们所关注, 乳酸菌作为功能性发酵剂以及益生菌应用于发酵食品和饲料中并且安全性使用史的时间很自中国不同地区不同乳源的明串珠球菌属、乳球菌属、肠球菌属及嗜热链球菌属等 4 个种属的 26 株乳球菌为研究对象, 采用 16S rRNA 对其进行基因序列的分析鉴定; 用最小抑菌浓度(MIC, Minimum Inhibitory Concentration)法对其进行 10 种分别属于氨基糖苷类、四环素类、氟喹诺酮类、糖肽类、大环内酯类、苯丙醇类和安莎霉素类 7 类常见抗生素耐药性以及敏感性的解析, 探讨不同抗生素对不同乳酸菌菌株的耐药性。结果表明, 属于 4 个种属的 26 株乳球菌菌株对属于 7 类的 10 种常见抗生素的耐药性均有不同。本实验结果可以为人们在使用抗生素与乳酸菌时提供一定的参考, 并在其共同应用过程中更合理化和安全化。

关键词: 乳球菌属; 抗生素; 最小抑菌浓度; 肠道菌群

文章编号: 1673-9078(2016)12-125-132

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.12.020

Analysis of Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics against *Lactococcus* strains

PAN Lin, CHEN Xia, SHAO Yu-yu, GUO Hui-ling, ZHANG He-ping, MENG HE Bi-li-ge

(Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Bioengineer, Education Ministry of China, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

Abstract: Antibiotics and lactic acid bacteria are of great importance for the public. Lactic acid bacteria are functional fermentation agents and are used as probiotics in fermented foods and animal feeds. Safe use of 26 different strains of the four lactic acid bacteria (*Streptococcus mutans*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, and *Streptococcus thermophiles*), isolated from milk obtained from different regions of China, were identified and investigated using 16S rRNA gene sequencing analysis. The minimum inhibitory concentration (MIC) method was used to analyze lactic acid bacterial resistance to ten different kinds of antibiotics. These antibiotics belong to seven groups (aminoglycosides, tetracyclines, quinolones, glycopeptides, macrolides, phenicol, and ansamycins), to which resistance and sensitivity are commonly found. The results showed that the 26 *Lactococcus* strains exhibited different degrees of sensitivity and resistance to the ten antibiotics used. The results of this experiment can provide a reference for the use of antibiotics and lactic acid bacteria, and ensure the safe and rational use of antibiotics.

Key words: *Lactococcus*; antibiotic; minimum inhibitory concentration; gut microbiota

在 20 世纪 60 年代的美国, 去医院看医生, 都会被注射青霉素, 人们都在用抗生素来“以防万一”, 同时, 不论需要与否, 养牛场和养猪场也会定期给动物们注射抗生素。这也能解释为什么我们今天会面临抗生素耐药性这个严重的问题了^[1]。在人类、动物和植物当中广泛的使用抗生素来治疗微生物的感染并且在饲料中作为生长促进剂能增加食物链中非致病菌的抗生素耐药性。Borriello 等^[2]报道, 抗生素的耐药性

收稿日期: 2016-01-12

基金项目: 内蒙古自治区科技重大专项 (20140125); “863” 计划课题 (2011AA100902)

作者简介: 潘琳 (1988-), 女, 博士, 研究方向: 乳制品生物技术与工程
通讯作者: 孟和毕力格 (1965-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品加工与生物技术

可以被认为是一个评估在食品和饲料中菌株安全性的一个标准; 原因是, 在理论上微生物可以把耐药基因转移到受体上。为了区分微生物从野生型菌株转移耐药基因, FEEDAP 提出了抗菌药物的临界值 (Breakpoint), 并明确说明用最小抑菌浓度 MIC (Minimum Inhibitory Concentration) 来检测抗生素折点水平, 并用作细菌菌株的耐药性评估方案^[3]。而且, 伴随着人们日益增长的忧虑, 作为人类的益生菌和动物饲料的添加剂, 食品与共生细菌可以作为抗生素耐药基因潜在的储藏库, 但是不应该转移抗生素的耐药基因这件事, 已经成为了人们的共识。

乳酸菌是用来在一些发酵食品和饲料应用中的一种功能性发酵剂或益生菌^[4], 可以利用碳水化合物产生乳酸; 是一类革兰氏阳性, 过氧化氢酶阴性细菌的

统称。乳酸菌作为功能性发酵剂以及益生菌应用于发酵食品和饲料中并且安全性使用史的时间很长,它们几乎没有创造任何安全性问题。由于其自身存在于人类和动物的肠道内,是肠道内的常驻菌群,并且是有益于肠道功能和健康的有益菌,所以现阶段引起了人们对乳酸菌安全性评价的极大兴趣^[5]。其中,乳球菌属、明串珠球菌属、链球菌属和肠球菌属是乳酸菌分类中的一类,并且四个种属对抗生素的敏感性都有相应的报道。

抗生素与乳酸菌一直被人们所关注,但是抗生素与乳酸菌菌株之间也会发生耐药基因的转移。所以,现今在食物中应用乳酸菌最重要的是确保其不携带可转移的耐药性基因。然而,如果乳酸菌中藏匿了这些抗性基因的话,它们将是传播抗性基因给人类病原体的有效传播媒介。由此,欧洲联盟动物营养科学委员会建议,所有进入食物链的乳酸菌都不允许含有可转移的抗性基因。

本文从乳球菌对抗生素的耐药性和敏感性角度,通过四个乳球菌种属 26 株菌株的 MIC 测试,分析了其对 10 种抗生素的耐药性,结果表明这些菌株表现出了不同的耐药差异。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株来源

试验所用 26 株乳球菌均见表 1,来自于内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室乳酸菌菌种保藏库。

表 1 实验所用菌株编号及来源

Table 1 Numbers and sources of strains used in this study

菌株编号	采样地	来源
IMAU60052	西藏	酸黄牛奶
IMAU50090	青海	酸牦牛奶
IMAU60011	西藏	酸黄牛奶
IMAU60122	西藏	酸牦牛奶
IMAU60036	西藏	酸黄牛奶
IMAU50152	云南省	乳饼
IMAU60037	西藏	酸黄牛奶
IMAU60050	西藏	酸黄牛奶
IMAU60065	西藏	酸牦牛奶
IMAU60020	西藏	酸黄牛奶
IMAU60044	西藏	酸黄牛奶
IMAU60069	西藏	酸牦牛奶
IMAU60084	西藏	酸牦牛奶

IMAU60118	西藏	酸牦牛奶
IMAU60133	西藏	酸牦牛奶
IMAU40164	青海省	混合酸奶
IMAU40075	青海省	酸牦牛奶
IMAU40026	青海省	酸牦牛奶
IMAU50100	云南省	山羊乳饼
IMAU50160	云南省	乳饼
IMAU50101	云南省	乳饼
IMAU40140	青海省	酸山羊奶
IMAU40017	青海省	酸牦牛奶
IMAU40145	青海省	酸山羊奶
IMAU40138	青海省	酸山羊奶
IMAU50157	云南省	乳饼

1.1.2 实验试剂

实验所用抗生素:四环素、新霉素、红霉素、卡那霉素、环丙沙星、链霉素、利福平、庆大霉素、氯霉素和万古霉素,购置于英国 Sigma 公司。

实验所用培养基:IST(ISO-SENSITEST)液体培养基、TPY(Trypticase Peptone Yeast broth)液体培养基、脱脂乳培养基、LSM:90% IST(ISO-SENSITEST)、10% MRS Broth(Man Rogosa Sharpe broth)和 M17 培养基等购置于英国 OXOID 公司。

实验所用 PCR 反应试剂:1 M CaCl₂、5×TBE 电泳缓冲液、TE 缓冲液、0.5 M EDTA、1%的琼脂糖、10%SDS 及 RNaseA、rTaqE、蛋白酶 K、dNTP 均购置于 TaKaRa 公司,引物由上海桑尼生物科技有限公司设计合成。

1.1.3 实验仪器

日本 TOMY SX-500 高压灭菌锅、KS-1300L-U 苏净安泰 I 类 B 型超净工作台、NO.G560E 振荡器、DHP-9727 型电热恒温培养箱、KCD-60H 干热灭菌锅、海尔超低温保存箱、U-2000 型 HITACHI 紫外可见分光光度计和 DYY-C 型电泳仪。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株活化

将安瓿管中真空冷冻干燥保存的菌株活化于脱脂乳中,37 °C 恒温,培养 24 h。活化 24 h 的菌株按接种量 1%接种于 TPY 培养基中,继续 37 °C 恒温培养 24 h。培养后的菌株可挑取少量进行革兰氏染色检测纯度。

1.2.2 提取菌株基因组总 DNA

提取菌株基因组总 DNA 采用 CTAB 液氮冻融法。将活化的菌株取 1 mL 的菌体于 EP 管,加入 500 μL pH 8.0 的 TE 缓冲液,充分振荡;震荡后放入液氮中冻融,

取出后在 60 °C 水浴中保温至融化, 重复此步骤 3~4 次; 在 EP 管中加入 200 μL 的蛋白酶 K 10 μL 和 10% 的 SDS 80 μL 在 37 °C 摇床中培养 3 h; 摇床 3 h 后, 加入 100 μL 浓度为 5 mol/L 的 NaCl 和 80 μL、10 mol/L 的 CTAB 溶液, 65 °C 水浴 30 min, 再加入等体积的酚-氯仿-异戊醇抽提, 混匀静置 2 min, 离心取上清, 重复抽提一次; 取上清, 加入 50 μL、3 mol/L 的乙酸钠, 混匀, 冰上静置 30 min 后离心, 用 70% 乙醇洗涤沉淀, 离心, 自然干燥, 干燥后加入 30 μL TE 缓冲液溶解, -20 °C 保存备用。

1.2.3 DNA 浓度的检测

将提取出的基因组 DNA 2 μL 用微量紫外分光光度计进行 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值检测, 检测值在 1.8 至 2.0 之间, 说明 DNA 浓度较纯, 可做后续 PCR 扩增反应的模板。再进行琼脂糖凝胶电泳检测, 若无明显特异性条带, 则 DNA 较纯。

1.2.4 PCR 的扩增

根据基因组 DNA 的浓度, 用 TE 缓冲液将 DNA 原液稀释到 100 ng/μL 左右, 以其为 PCR 扩增的模板进行扩增, 并扩增菌株 16S rDNA 的 V3 区。本实验采用 50 μL 的反应体系对乳球菌的基因进行 PCR 扩增, 反应体系如下表:

表 2 PCR 扩增体系

Table 2 PCR amplification system

试剂	反应浓度	体积/μL
10×PCR buffer (含 Mg ²⁺)	1×	5.0
dNTP MIX (2.5 mM each)	0.2 mM	4.0
Primer F (10 pmol/μL)	0.4 pmol/μL	1.5
Primer R (10 pmol/μL)	0.4 pmol/μL	1.5
Template (100 ng/μL)	3.0 ng/μL	2.0
Easy Taq (5 U/μL)	2.0 U	0.5
ddH ₂ O		35.5

PCR 反应仪程序参数设定如下:

预变性: 94 °C、5 min; (变性: 94 °C、1 min; 退火: 58 °C、1 min; 延伸: 72 °C、2 min) 30 个循环; 末端延伸: 72 °C、10 min。

1.2.5 PCR 产物检测

吸取 2 μL PCR 产物与 Loading Buffer 混合, 加样于预先制备的 1.0% 琼脂糖凝胶孔中, 电压 5 V/cm, 1 h 后置于溴化乙锭染色 20~30 min, 紫外灯下观察。若 PCR 成功, 则可出现清晰、明亮的条带。

1.2.6 基因组测序

基因组测序由上海美吉生物医药科技有限公司完成。

1.2.7 序列基因的同源性比对

将基因组测序结果在 NCBI 上进行 Blast 序列相似性比对, 鉴别菌种。

1.2.8 抗生素的溶解与溶液的配制

不同抗生素的溶剂见表 3。

表 3 不同抗生素的溶剂

Table 3 Solvents for the different antibiotics

抗生素	溶剂
四环素	LSM
新霉素	LSM
链霉素	LSM
环丙沙星	LSM
卡那霉素	LSM
庆大霉素	LSM
万古霉素	LSM
红霉素	95% 乙醇
氯霉素	95% 乙醇
利福平	甲醇

根据 EFSA^[6] 标准, 及不同抗生素所需浓度范围, 一般将抗生素配制成 8 mg/mL, 用 0.22 μm 的滤菌膜滤菌之后, 置于 -20 °C 保存待用。

1.2.9 乳球菌属的 MIC 实验

将保藏的球菌菌株活化至第三代, 以 2% 的接种量接种于 MRS 培养基中, 37 °C 培养 24 h, 根据 McFarland 标准, 用灭菌的生理盐水将 OD_{600nm} 调节至 0.5 待用。分装配置灭菌的 MRS 培养基在试管中, 每管 5 mL, 待用。

表 4 不同乳球菌属抗生素折点的判定 (μg/mL)

Table 4 Cut-off values for different *Lactococcus* strains (μg/mL)

抗生素	明串珠球菌	乳球菌	嗜热链球菌	肠球菌
庆大霉素	16 ^a	32 ^a	32 ^a	512 ^c
卡那霉素	16 ^a	64 ^a	64 ^a	1024 ^c
链霉素	64 ^a	32 ^a	64 ^a	1024 ^c
新霉素	8 ^c	8 ^c	8 ^c	1024 ^c
利福平	n.r ^d	4 ^c	4 ^d	4 ^b
环丙沙星	n.r ^d	4 ^c	n.r ^e	4 ^b
红霉素	1 ^a	1 ^a	2 ^a	4 ^c
万古霉素	n.r ^a	4 ^a	4 ^a	8 ^c
氯霉素	4 ^a	8 ^a	4 ^a	8 ^c
四环素	8 ^a	4 ^a	4 ^a	16 ^c

注: a, 参考文献 7; b, 参考文献 8; c, 参考文献 9; d, 参考文献 10; e, 参考文献 11; n.r., not required.

将购置的抗生素根据效价, 配制成 8 mg/mL; 根据需要的最终质量浓度 0.625、1.25、2.5、5、10、20、40、80、160、320、640 和 1280 μg/mL 分别吸取不同毫升的抗生素至含有 5 mL MRS 的试管中。再吸取 50

μL 菌液至试管中。每种菌不同抗生素分别做 3 组平行, 37 °C 培养 18~24 h 后观察并记录结果。同时做对照, 即未含抗生素的培养基接种菌进行培养。记录结果时, 参照表 4 对乳球菌属的耐药性进行相关判定。

2 结果与分析

2.1 16S rRNA 测序结果

根据测序结果及在 NCBI 上进行 Blast 序列相似性比对, 可以把 26 株乳球菌株分类为 4 个种的水平, 见表 5。

表 5 鉴定的实验所用球菌种类

Table 5 Bacterial species used in the experiment

菌种	菌株编号	
明串珠球菌	IMAU60052	
	IMAU50090	
乳球菌	IMAU60011	
	IMAU60122	
	IMAU60036	
	IMAU50152	
	IMAU60037	
	IMAU60050	
	IMAU60065	
	IMAU50160	
	IMAU50101	
	IMAU50157	
肠球菌	IMAU60020	
	IMAU60069	
	IMAU60084	
	IMAU60118	
	IMAU60133	
	IMAU40164	
	IMAU40075	
	嗜热链球菌	IMAU40026
		IMAU50100
		IMAU60044
		IMAU40145
IMAU40138		
IMAU40140		
IMAU40017		

2.2 26 株乳球菌的 MIC 检测

2.2.1 最小抑菌浓度(MIC)

最小抑菌浓度 (MIC, Minimum Inhibitory Concentration) 是指在规定的时间内, 能抑制细菌生

长的最低抑制浓度, 单位为 mg/L。在实验室中所做的抗生素药敏试验, 测定的既是不同浓度抗生素对菌体的最低抑菌浓度; 而折点即是用来区分敏感 (S)、中介 (I) 和耐药 (R) 的临界值。

其中, MIC50 和 MIC90 是两个反应细菌 MIC 值总体分布的指标。MIC50 又称半抑制浓度, 是指在一批实验中, 累计 50% 的受试菌株得到抑制所需抗生素的最低抑菌浓度, 即为 MIC50; 累计使 90% 的受试菌株受到抑制, 所需要抗生素最低抑菌浓度, 即 MIC90。

据 Charles MAP Franz 等人报道^[12], 存在于乳酸菌类的抗生素耐药性的 MIC 折点值, 通常会受到培养基的影响较大; Danielsen M 等^[13]在做乳杆菌属对抗生素敏感性试验时发现, MIC 折点值表现出了种的特异性, 同一属之间的不同种变化也较大。

2.2.2 明串珠球菌对不同抗生素 MIC 值的结果分析

从表 6 中看出, 明串珠球菌对不同抗生素的 MIC 之间, 表现出了不同的耐药性差异; 并且范围较广, 从 $<0.625 \mu\text{g/mL}$ ~ $>1280 \mu\text{g/mL}$ 不等。明串珠球菌对新霉素、链霉素、万古霉素的最大 MIC 都表现为 1280 $\mu\text{g/mL}$; 对红霉素、利福平、万古霉素的最小 MIC 值都相同, 同为 1.25 $\mu\text{g/mL}$ 。由于明串珠球菌数量只有两株, 所以形成规律证据不足, 只可看出 MIC 值得差异较大。但是, 根据 Klein G 等^[14]的研究表明, 一些乳酸杆菌、乳酸片球菌和多数明串珠球菌对万古霉素的耐药性是固有的。

在 Clark J 等^[15]的实验中, 用含有 5% 脱纤维蛋白绵羊血的 MHA (Mueller-Hinton agar) 培养基, 培养明串珠球菌。在培养过程中, 明串珠球菌在 35 °C 时需氧培养 (含有 CO_2 5%) 48 h, 明串珠球菌对万古霉素的 MIC 值为 $>128 \mu\text{g/mL}$, 对青霉素的 MIC 值为 1 $\mu\text{g/mL}$, 对亚胺培南的 MIC 值为 0.25~8 $\mu\text{g/mL}$, 对氨噻肟头孢菌素的 MIC 值为 4 $\mu\text{g/mL}$ ~64 $\mu\text{g/mL}$ 。这与我们的实验结果在 $<0.625 \mu\text{g/mL}$ ~ $>1280 \mu\text{g/mL}$ 不等以及明串珠球菌对不同抗生素的 MIC 值不等相符。

2.2.3 肠球菌对不同抗生素 MIC 值得结果分析

不同肠球菌对不同抗生素的敏感性、耐药性也不尽相同。肠球菌对四环素、红霉素、利福平和氯霉素的最小 MIC 值都相同, 同为 0.625 $\mu\text{g/mL}$; 但是最大 MIC 值四环素与利福平相同, 同为 80 $\mu\text{g/mL}$; 红霉素最大 MIC 值为 40 $\mu\text{g/mL}$; 氯霉素最大 MIC 值为 210 $\mu\text{g/mL}$; 范围分布较广。肠球菌对万古霉素、链霉素和以及卡那霉素的最大 MIC 值同为 $>1280 \mu\text{g/mL}$; 但是最小 MIC 值不等, 分别为 1.25 $\mu\text{g/mL}$ 、40 $\mu\text{g/mL}$

和 160 μg/mL。不同肠球菌对新霉素的 MIC 值范围在 40 μg/mL~1280 μg/mL。从结果可以看出四环素、红霉素利福平和氯霉素的 MIC 值与万古霉素、链霉素、卡那霉素和新霉素相比都分布在较小的范围内。肠球菌对环丙沙星的 MIC 值范围在 1.25 μg/mL~20μg/mL；对庆大霉素的 MIC 值范围在 5 μg/mL~320 μg/mL。

在 GE 等^[16]的关于零售发酵食品中乳酸菌的鉴定及药敏性分析中研究报道, 提高的庆大霉素的 MIC 值在所有分离的屎肠球菌中被检测到, 可能是由于自然敏感性的降低。此外, 用于测试乳酸菌的低 pH 的 MRS 培养基可能是使庆大霉素活力降低的部分原因^[17]。

在过去的二十年中, 其它重要的革兰氏阳性菌, 特别是肺炎链球菌和肠球菌, 已经对药物产生了耐药

性来对抗药物本身。而且, 肠球菌株对青霉素的耐药性往往是多重耐药; 17%从血液中分离的肠球菌对万古霉素都有耐药性^[18]。在 Clark J 等^[15]的研究中表明, 屎肠球菌对万古霉素的 MIC 值为>128 μg/mL, 粪肠球菌对万古霉素的 MIC 值为在 16~>64 μg/mL 之间。根据表 4 对抗生素折点的判定, 定义肠球菌对万古霉素 MIC 值大于 8 μg/mL 为具有万古霉素抗性, 而 Clark J 的实验结果也进一步证明部分的肠球菌对万古霉素具有耐药性。

2.2.4 嗜热链球菌对不同抗生素 MIC 的结果分析

表 6 26 株乳球菌对 10 种抗生素的 MIC 值(μg/mL) 分布结果

Table 6 MIC (μg/mL) ranges of the ten antibiotics against 26 *Lactococcus* strains

菌株编号	四环素	新霉素	红霉素	卡那霉素	环丙沙星	链霉素	利福平	庆大霉素	氯霉素	万古霉素
IMAU60052	<0.625 ^S	1280 ^R	1.25 ^R	160 ^R	2.5	1280 ^R	1.25	320 ^R	10 ^R	1.25
IMAU50090	1.25 ^S	40 ^R	10 ^R	320 ^R	20	320 ^R	1.25	10 ^S	20 ^R	>1280
IMAU60011	20 ^R	640 ^R	<0.625 ^S	320 ^R	20 ^R	160 ^R	<0.625 ^S	40 ^R	5 ^S	1280 ^R
IMAU60122	1.25 ^S	80 ^R	<0.625 ^S	160 ^R	5 ^R	40 ^R	<0.625 ^S	10 ^S	40 ^R	>1280 ^R
IMAU60036	<0.625 ^S	80 ^R	<0.625 ^S	160 ^R	5 ^R	80 ^R	40 ^R	10 ^S	5 ^S	1280 ^R
IMAU50152	320 ^R	40 ^R	5 ^R	>1280 ^R	10 ^R	>1280 ^R	20 ^R	>1280 ^R	20 ^R	40 ^R
IMAU60037	<0.625 ^S	10 ^R	<0.625 ^S	10 ^S	2.5 ^S	10 ^S	5 ^R	20 ^S	5 ^S	5 ^R
IMAU60050	1.25 ^S	10 ^R	<0.625 ^S	10 ^S	10 ^R	10 ^S	5 ^R	10 ^S	20 ^R	5 ^R
IMAU60065	1.25 ^S	20 ^R	<0.625 ^S	20 ^S	10 ^R	20 ^S	80 ^R	40 ^R	20 ^R	20 ^R
IMAU50160	<0.625 ^S	40 ^R	1.25 ^R	20 ^S	10 ^R	40 ^R	20 ^R	10 ^S	5 ^S	40 ^R
IMAU50101	1.25 ^S	160 ^R	<0.625 ^S	80 ^R	10 ^R	160 ^R	40 ^R	40 ^R	10 ^R	20 ^R
IMAU50157	1.25 ^S	160 ^R	2.5 ^R	40 ^S	2.5 ^S	160 ^R	40 ^R	20 ^S	20 ^R	1.25 ^R
IMAU60020	20 ^R	640 ^S	<0.625 ^S	320 ^S	1.25 ^S	320 ^S	1.25 ^S	160 ^S	1.25 ^S	1.25 ^S
IMAU60069	20 ^R	640 ^S	<0.625 ^S	160 ^S	1.25 ^S	640 ^S	40 ^R	160 ^S	20 ^R	1.25 ^S
IMAU60084	1.25 ^S	640 ^S	1.25 ^S	640 ^S	5 ^R	1280 ^R	2.5 ^S	320 ^S	210 ^R	80 ^R
IMAU60118	1.25 ^S	1280 ^R	10 ^R	640 ^S	20 ^R	1280 ^R	1.25 ^S	320 ^S	20 ^R	80 ^R
IMAU60133	<0.625 ^S	640 ^S	<0.625 ^S	640 ^S	2.5 ^S	>1280 ^R	10 ^R	160 ^S	80 ^R	20 ^R
IMAU40164	<0.625 ^S	1280 ^R	40 ^R	>1280 ^R	10 ^R	1280 ^R	40 ^R	5 ^S	20 ^R	40 ^R
IMAU40075	5 ^S	320 ^S	10 ^R	320 ^S	20 ^R	640 ^S	80 ^R	160 ^S	20 ^R	>1280 ^R
IMAU40026	80 ^R	40 ^S	1.25 ^S	160 ^S	320 ^R	40 ^S	<0.625 ^S	10 ^S	<0.625 ^S	>1280 ^R
IMAU50100	<0.625 ^S	160 ^S	2.5 ^S	160 ^S	10 ^R	80 ^S	<0.625 ^S	40 ^S	10 ^R	40 ^R
IMAU60044	80 ^R	320 ^S	<0.625 ^S	160 ^S	40 ^R	640 ^S	<0.625 ^S	80 ^S	10 ^R	80 ^R
IMAU40145	2.5 ^S	1280 ^R	2.5 ^R	160 ^R	20	160 ^R	<0.625 ^S	40 ^R	10 ^R	2.5 ^S
IMAU40138	<0.625 ^S	160 ^R	<0.625 ^S	640 ^R	20	160 ^R	20 ^R	80 ^R	20 ^R	1.25 ^S
IMAU40140	<0.625 ^S	640 ^R	<0.625 ^S	160 ^R	2.5	80 ^R	40 ^R	40 ^R	5 ^R	20 ^R
IMAU40017	<0.625 ^S	320 ^R	2.5 ^R	160 ^R	5	160 ^R	1.25 ^S	40 ^R	10 ^R	2.5 ^S

嗜热链球菌对四环素、红霉素和利福平的最小 MIC 值同为<0.625 μg/mL, 这说明四环素、红霉素以及利福平对嗜热链球菌有一定的抑制性。其对四环素

与红霉素的 MIC 值也相同, 同为 2.5 μg/mL; 而对利福平的最小 MIC 值为 40 μg/mL。嗜热链球菌对卡那霉素和链霉素的最小 MIC 值分别为 160 μg/mL 和

80 $\mu\text{g/mL}$, 最大 MIC 值相同, 同为 160 $\mu\text{g/mL}$ 。嗜热链球菌对新霉素的 MIC 值范围为 320 $\mu\text{g/mL}$ ~1280 $\mu\text{g/mL}$, 可以看出 MIC 值分布在较大的范围内。嗜热链球菌对环丙沙星的 MIC 值范围在 2.5 $\mu\text{g/mL}$ ~20 $\mu\text{g/mL}$ 之间。嗜热链球菌对庆大霉素、氯霉素和万古霉素的分布跨度都较小, 分别在 40 $\mu\text{g/mL}$ ~80 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ ~20 $\mu\text{g/mL}$ 以及 1.25 $\mu\text{g/mL}$ ~20 $\mu\text{g/mL}$ 。从表 6 的结果中可以看出, 嗜热链球菌对新霉素、卡那霉素、链霉素、庆大霉素以及氯霉素都具有耐药性。Aslim B 等^[19]在研究嗜热链球菌的耐药性过程中也证实, 嗜热链球菌对多种抗生素都具有耐药性。在 Iyer R 等^[20]的关于嗜热链球菌益生特性研究中, 嗜热链球菌对环丙沙星敏感, 对卡那霉素具有耐药性与本实验结果相同。

2.2.5 乳球菌对不同抗生素的 MIC 比较

乳球菌对四环素、红霉素和利福平的最小 MIC 值同为 <0.625 $\mu\text{g/mL}$, 最大 MIC 值分别为 20 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 和 80 $\mu\text{g/mL}$ 。乳球菌对新霉素、卡那霉素、链霉素及庆大霉素的最小 MIC 值为 10 $\mu\text{g/mL}$, 乳球菌对新霉素的 MIC 值为 640 $\mu\text{g/mL}$; 对卡那霉素、链霉素和庆大霉素的 MIC 值相同, 同为 >1280 $\mu\text{g/mL}$ 。乳球菌对环丙沙星的 MIC 值范围为 2.5 $\mu\text{g/mL}$ ~20 $\mu\text{g/mL}$, 对氯霉素的 MIC 值范围为 5 $\mu\text{g/mL}$ ~40 $\mu\text{g/mL}$; 对万古霉素的 MIC 值跨度较大, 在 1.25 $\mu\text{g/mL}$ ~>1280 $\mu\text{g/mL}$ 。

根据抗生素的结构不同, 一般抗生素分为两大类, 即 β -内酰胺类和非 β -内酰胺类。这两类抗生素下又分有许多不同的子类, 如: 常见的青霉素属于 β -内酰胺类抗生素的青霉素类; 阿莫西林属于 β -内酰胺类抗生素的氨基青霉素类等等。

本研究中所使用的 10 种抗生素全部属于非 β -内酰胺类抗生素, 其中, 庆大霉素、卡那霉素和链霉素属于氨基糖苷类; 四环素属于四环素类, 虽然氨基糖苷类与四环素类抗生素的作用机制同为通过限制 30S 核糖体亚基从而抑制蛋白质的合成, 但是对菌株的 MIC 值差异较大。四环素对所有菌株的 MIC 值都较小, 范围在 <0.625 $\mu\text{g/mL}$ ~80 $\mu\text{g/mL}$ 之间; 菌株最小 MIC 值为 <0.625 $\mu\text{g/mL}$, 在明串珠球菌、乳球菌、肠球菌以及嗜热链球菌中都有出现; 在四株嗜热链球菌中有三株最小 MIC 值都为 <0.625 $\mu\text{g/mL}$, 表明嗜热链球菌对四环素类抗生素有一定的敏感性; 最大 MIC 仅在肠球菌中出现了 80 $\mu\text{g/mL}$ 。而氨基糖苷类抗生素对菌株的 MIC 值都分布在较大的范围内, 最小的 MIC 值在明串珠球菌、乳球菌以及肠球菌中出现, 为 10 $\mu\text{g/mL}$; 最大的 MIC 值为 >1280 $\mu\text{g/mL}$, 同样在明串珠球菌、乳球菌及肠球菌中出现; 在嗜热链球菌中,

此类抗生素的 MIC 值范围在 40 $\mu\text{g/mL}$ ~640 $\mu\text{g/mL}$ 之间, 相比于四环素类 MIC 值范围较大。这说明菌株对氨基糖苷类抗生素的耐药性远大于四环素类。

利福平属于安莎霉素类, 可以抑制 mRNA 的合成从而抑制核酸的合成。利福平对菌株的最小 MIC 值为 <0.625 $\mu\text{g/mL}$, 在乳球菌、肠球菌和嗜热链球菌中都有出现; 最大 MIC 值为 80 $\mu\text{g/mL}$, 在肠球菌和乳球菌中出现; 从表中数据, 可以看出乳球菌对抗生素的耐受性大于肠球菌、嗜热链球菌。

环丙沙星属于喹诺酮类, 其作用机制是抑制 DNA 促旋酶和拓扑异构酶来抑制核酸的合成。环丙沙星的 MIC 值范围在 1.25 $\mu\text{g/mL}$ ~320 $\mu\text{g/mL}$ 之间, 但是最小浓度 MIC 值 1.25 $\mu\text{g/mL}$ 和最大浓度 MIC 值 320 $\mu\text{g/mL}$ 都出现在肠球菌中。在乳球菌对环丙沙星的耐药性结果检测中, 有 80% 的乳球菌对环丙沙星都表现出了耐药性。在乳酸菌中, 环丙沙星耐药性的出现是非常普遍的, 这可能是与菌株的固有耐药性有关^[21]。最近, 德国的一项研究表明, 在乳酸菌中的环丙沙星耐药性的基因基础, 但是不能验证点的突变作用在整个耐药性中的作用, 这是细菌对环丙沙星耐药性的一种普遍机制^[22]。然而, 确凿的区分固有耐药性和获得性耐药性通常需要比较不同来源乳酸菌种类的抗性基因模式, 也因此需要更系统的数据。此外, 在讨论乳酸菌抗性基因之前, 乳酸菌之间的属或种特异性的固有耐药性, 突出了适应形态的重要性。

作为能够限制 50S 核糖体亚基从而抑制蛋白质的合成的红霉素和氯霉素, 分别属于抗生素中的大环内酯类和苯丙醇类。两种抗生素的作用机制虽然相近, 但是对菌株的 MIC 值却大不相同。根据表 6 结果表明, 大部分菌株对红霉素较为敏感且 MIC 范围较小, 在 <0.625 $\mu\text{g/mL}$ ~0 $\mu\text{g/mL}$ 之间。实验用的 26 株菌株中, 13 株菌株最小抑制浓度值为 <0.625 $\mu\text{g/mL}$, 共 15 株菌株对红霉素具有敏感性, 11 株菌株对红霉素耐受, 耐药率达到了 42.3%。氯霉素的 MIC 值范围跨度较大, 在 <0.625 $\mu\text{g/mL}$ ~210 $\mu\text{g/mL}$ 之间; 其中耐药菌株 20 株, 耐药率达到了 76.9%。

万古霉素属于糖肽类, 其作用位点是 D-丙氨酸-D-丙氨酸, 万古霉素可与 D-ala-D-ala 末端结合并阻止与糖多肽的结合, 从而抑制细胞壁的合成^[23,24]。根据表 3, 在除标准中未明确抗生素折点的两株明串珠球菌外, 其余 24 株中, 有 18 株对万古霉素产生了耐药性, 耐药率达到了 75%, 说明绝大部分的菌株对万古霉素有耐药性。在 Başbülbul G 等^[25]的关于分离自发酵食品中乳酸菌的耐药性研究中, 从样品中分离出 83 株乳酸菌, 随后进行基因比对及 6 种抗生素耐药性

检测;在这 83 株乳酸菌中,万古霉素的耐药率达到了 73.5%,与本实验结果相近。

3 结论

3.1 近几年,肠道菌群的平衡与否进入了科研者以及公众的视线,肠道菌群与人们的健康密切相关。肠道菌群的紊乱,不仅会引起常见的腹泻,而且与代谢性疾病、艾滋病、肿瘤、过敏性疾病、炎症性疾病以及心脑血管疾病密切相关^[26]。最近一些研究应用了宏基因组学测序和功能基因组学来研究健康人群和病人人群的肠道菌群。这些研究表明人体肠道菌群内形成了一个巨大的耐药基因储藏库。Forslund K 等^[27,28]在 252 个粪便宏基因组的 68 个种类中的 50 个样品中发现了耐药基因,平均每 21 个样品中就会有耐药基因的出现。在中国人、丹麦人和西班牙人肠道菌群中存在大量的四环素相关耐药基因 *tetQ*,这种耐药基因在杆菌分离株中也存在率很高,已经从 19 世纪 70 年代的 30% 检出率增加到 21 世纪的 80%^[29]。

3.2 在耐药性转移的过程当中,可能携带耐药基因的裸露 DNA 会被细菌所整合;并且在接合转移的过程当中,耐药基因在两个细胞形成接合桥之后会通过质粒或者接合转座子从供体转移到受体从而进一步扩散。虽然细菌对某些抗生素具有固有的耐药性,但是,通过染色体的基因突变和基因的水平转移也可能获得耐药性。

3.3 最近的研究已经鉴定了许多不同种类抗生素例如 β -内酰胺类、氨基糖苷类以及喹诺酮类的耐药性基因,这可以通过高密度基因组突变库的高通量筛选在细菌中靶向插入或转座子随机突变来获得^[30,31]。

3.4 众所周知,乳酸菌定植于肠道内的特定部位,对维持肠道菌群的平衡有着不可或缺的作用。抗生素的使用在一定程度上缓解了疾病的蔓延,但同时也扰乱了肠道菌群有益菌的特有生存环境,使菌株产生不同程度的耐药性。本文所用的 26 株乳酸球菌,来自不同地域的不同乳源,它们所具有的耐药性是不同的。26 株乳酸菌耐药性不同的原因可能会与饲养的地域环境、饲喂时的养殖模式、分离乳酸菌的动物饮食习性、动物生病时服用抗生素的剂量以及在服用抗生素治愈后的不同程度的残留和富集都有一定的关系。

3.5 细菌对抗生素的耐药性早已被人们所知晓,我们关于所涉及到的相关机制的知识近些年也在显著增加;基因组学、系统生物学和结构生物学的进展也精确描述了耐药性的相关基础并且将继续进一步深度剖析;乳酸菌与抗生素之间的耐药性机理,也会借助前沿的科学知识进一步深入并被人们所了解,本实验结

果可以为人们在使用抗生素与乳酸菌时提供一定的参考,使人们在益生菌与抗生素的共同应用过程中更合理化及安全化。

参考文献

- [1] May M. Antibiotics [J]. Nature, 2014, 509(7498): 1
- [2] Borriello S P, Hammes W P, Holzapfel W, et al. Safety of probiotics that contain *Lactobacilli* or *Bifidobacteria* [J]. Clinical Infectious Diseases, 2003, 6(36): 775
- [3] FEEDAP Panel. Option of the scientific panel on additives and products or substances used in animal feed on the updating of the criteria used in the assessment of bacteria for resistance to antimicrobials of human or veterinary importance [J]. The EFSA Journal, 2005, 223, 1-12
- [4] Leroy F, Verluyten J, De Vuyst L. Function meat starter cultures for improved sausage fermentation [J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 106(3): 270-285
- [5] De Angelis M, Siragusa S, Berloco M, et al. Selection of potential probiotic *Lactobacilli* from pig feces to be used as additives in pelleted feeding [J]. Research in Microbiology, 2006, 157(8): 792-801
- [6] European Food Safety Authority (EFSA). Panel on additives and products or substances used in animal feed (FEEDAP); Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance [J]. The EFSA Journal, 2012, 10: 2740-2750
- [7] European Food Safety Authority (EFSA). Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance; EFSA panel on additives and products or substances used in animal feed (FEEDAP) [J]. The EFSA Journal, 2012, 10(6):2740
- [8] Clinical and Laboratory Standards Institute(CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-second informational supplement [J]. The CLSI Document M100-S22, 2012, 31(1): 1-184
- [9] Anadón A, Martínez-Larrañaga M R, Aranzazu Martínez M. Probiotics for animal nutrition in the European union. regulation and safety assessment [J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2006, 45(1): 91-95
- [10] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational supplement [J]. 2007, 27(1): 1-182
- [11] T Eucast, H Mic, E Mic. Et al. European committee on antimicrobial susceptibility testing breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters [J]. 2012

- [12] Charles MAP Franz, Anja Hummel, Wilhelm H Holzapeel. Problems related to the safety assessment of lactic acid bacteria starter cultures and probiotics [J]. *Mitteilungen Aus Lebensmitteluntersuchung Und Hygiene*, 2005, 96(1): 39-65
- [13] Danielsen M, Wind A. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 82(1): 1-11
- [14] Klein G, Hallmann C, Casas I A, et al. Exclusion of vanA, vanB and vanC type glycopeptide resistance in strains of *Lactobacillus Reuteri* and *Lactobacillus Rhamnosus* used as probiotics by polymerase chain reaction and hybridization methods [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, 89(5): 815-824
- [15] Clark J, Funq-Tomc J C, Minassian B, et al. *In vitro* and *in vivo* actives of a novel cephalosporin, BMS-247243, against organisms other than *Staphylococci* [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2002, 46(4): 1108-1111
- [16] Ge B, Jiang P, Han F, et al. Identification and antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria from retail fermented foods [J]. *Journal of Food Protection*, 2007, 70(11): 2606-2612
- [17] Klare I, Konstabel C, Müller-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
- [18] Pfaller M A, Jones R N, Doem G V, et al. Bacterial pathogens isolated from patients with bloodstream infection: frequencies of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns from the SENTRY antimicrobial surveillance program (United States and Canada, 1997) [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1988, 42(7): 1762-1770
- [19] Aslim B, Beyatli Y. Antibiotic resistance and plasmid DNA contents of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from Turkish yogurts [J]. *Turkish Journal of Veterinary Animal Science*, 2004, 28(2): 257-263
- [20] Iyer R, Tomar S K, Kapila S, et al. Properties of folate producing *Streptococcus thermophilus* strains [J]. *Food Research International*, 2010, 43(1): 103-110
- [21] Shalini M, Rameshwar S. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria-a review [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 105(3): 281-295
- [22] Hummel A S, Hertel C, Holzapfel W H, et al. Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria [J]. *Applied Environmental Microbiology*, 2007, 73(3): 730-739
- [23] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards antimicrobial susceptibility testing [J]. M100-S17, 2007, 27(1): 1-177
- [24] Vranakis I, Goniou I, Psaroulaki A, et al. Proteome studies of bacterial antibiotic resistance mechanisms [J]. *Journal of Proteomics*, 2014, 97: 88-99
- [25] Başbülbül G, Özteber M, Halil H H. Antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from fermented dairy products and boza [J]. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2015, 4(6): 550-553
- [26] 潘琳, 邵玉宇, 张和平, 等. 肠道菌群与疾病的关系 [J]. *中国乳品工业*, 2015, 43(5): 32-37
- PAN Lin, SHAO Yu-yu, ZHANG He-ping, et al. Study on the relationship between gut microbiota and disease [J]. *China Dairy Industry*, 2015, 43(5): 32-37
- [27] Forslund K, Sunagawa S, Kultima J R, et al. Country-specific antibiotic use practices impact the human gut resistome [J]. *Genome Research*, 2013, 23(7): 1163-1169
- [28] Hu Y, Yang X, Qin J, et al. Metagenome-wide analysis of antibiotic resistance genes in a large cohort of human gut microbiota [J]. *Nature Communications*, 2013, 4: 2151
- [29] Shoemaker N B, Vlamakis H, Hayes K, et al. Evidence for extensive resistance gene transfer among *Bacteroides* spp. and among bacteroides and other genera in the human colon [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(2): 561-568
- [30] Blake K L, O'Neill A J. Transposon library screening for identification of genetic loci participating in intrinsic susceptibility and acquired resistance to antistaphylococcal agents [J]. *The Journal of Antibiotics Chemotherapy*, 2013, 68(1): 12-16
- [31] Liu A, Tran L, Becket E, et al. Antibiotic sensitivity profiles determined with an *Escherichia coli* gene knockout collection: generating an antibiotic bar code [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2010, 54(4): 1393-140