

微生态制剂中常用乳酸菌对抗生素的药敏性研究

李平兰 潘伟好 吕艳妮 江志杰 马长伟 张 箴

(中国农业大学 食品科学与营养工程学院,北京 100083)

摘 要 为微生态制剂生产选育无耐药因子的菌株提供参考,采用纸片琼脂扩散法(K-B法),以金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 为质控菌,长双歧杆菌、嗜酸乳杆菌、植物乳杆菌、干酪乳杆菌和粪肠球菌为试验菌,研究了其对 8 大类(青霉素类,-内酰胺酶抑制剂的复合物、头孢素类,大环内酯类,四环素类,氨基糖苷类,糖肽类及其他类)共 30 种常用抗生素的耐药性。结果显示:1)长双歧杆菌对大环内酯类、头孢素类、青霉素类、-内酰胺酶抑制剂的复合物及氯霉素、呋喃妥因、利福平抗生素均敏感;对氨基糖苷类抗生素均耐药,对糖肽类、四环素类抗生素表现不同的药敏性。2)嗜酸乳杆菌、干酪乳杆菌及植物乳杆菌对大环内酯类多数、四环素类及氯霉素、呋喃妥因、利福平抗生素敏感,对氨基糖苷类多数表现出耐药,对头孢素类、青霉素类、-内酰胺酶抑制剂的复合物、糖肽类抗生素有不同的药敏性。3)粪肠球菌对大环内酯类、四环素类及氯霉素、呋喃妥因、利福平抗生素敏感,对氨基糖苷类、糖肽类抗生素耐药,对青霉素类、-内酰胺酶抑制剂的复合物、头孢素类抗生素有不同的药敏性。

关键词 微生态制剂;乳酸菌;抗生素;药敏性

中图分类号 Q 939.117;R 978.1

文章编号 1007-4333(2004)01-0016-05

文献标识码 A

Antibiotic susceptibility of lactic acid bacteria commonly used in microecologies

Li Pinglan, Pan Weihao, Lü Yanni, Jiang Zhijie, Ma Changwei, Zhang Chi

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract Lactic acid bacteria are often used as microecologies. To detect the antibiotic susceptibility and provide information for selecting the bacteria without resistant to the antibiotics, a series experiments were made. Thirty antibiotics of penicillin, -lactamases, cephalosporin, macrolide, tetracycline, aminoglycoside, peptide and others were used in the test. Five strains of the lactic acid producing bacteria including *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei* and *Enterococcus faecalis* were detected in an agar diffusion technique (K-B method) with *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 as an indicator bacterium. The results showed that *B. longum* was sensitive to macrolide, cephalosporin, penicillin, -lactamases, chloramphenicol, nitrofurantoin and rifampin, and resistant to aminoglycoside. It also had different susceptibilities to peptides and tetracycline. The bacteria of *L. acidophilus*, *L. casei* and *L. plantarum* were sensitive to most of the macrolides and tetracyclines, chloramphenicols, nitrofurantoin and rifampins. They were resistant to most of the aminoglycosides as well had different susceptibilities to cephalosporins, penicillins, -lactamases and peptides. The *S. faecalis* was sensitive to macrolides, tetracyclines, chloramphenicols, nitrofurantoin and rifampins. It was resistant to aminoglycosides and peptides, and had different susceptibilities to penicillins, -lactamases inhibitors and cephalosporins.

Key words microecologies; lactic acid bacteria; antibiotic; antibiotic susceptibility

微生态制剂^[1]是以正常菌群为主体的有益微生物群研制而成的一类生态制剂或生物制剂。目前,微生态制剂用菌株对不同抗菌药物耐药性的问

题已越来越引起关注。而市场上用于微生态制剂的菌种(包括乳酸菌)基本上都是野生菌株,绝大多数没有用分子生物学方法检查其是否有抗药性因子。

收稿日期:2003-06-18 修回日期:2003-12-05

基金项目:国家高技术研究发展计划资助项目(2002AA248041);国家“十五”攻关资助项目(2001BA501A11)

作者简介:李平兰,博士,副教授,主要从事乳酸菌生物学特性及应用研究。

这些菌株中抗药性基因如果是质粒或转座子编码,那么随着生态制剂的使用,其耐药因子将有可能在菌群中相互传递而发生扩散,抗生素对患病者将无效^[2]。贾士芳等指出,目前生产的活菌制剂对耐药性因子未作检测,提醒人们谨防活菌制剂携带耐药性因子对经济、社会和生态造成潜在的危害^[3]。

自 1929 年 Fleming 发现青霉素以来,已发现 9 000 余种抗生素。抗生素的应用,使大多数细菌性疾病得以控制,也正是由于长期大量使用抗生素,而产生不少副作用。滥用抗生素引起微生物的耐药性是一个重要的问题,耐药性的存在不仅影响抗生素效果,而且可能产生出一批新的对人类危害更大的致病性微生物。由此可见,选用不带抗药因子,至少是所带抗药因子甚少的有益菌株作为微生态制剂的生产用菌株,应作为一个重要指标。

本试验研究了微生态制剂生产中常见的几种乳酸菌对 8 大类 30 种常用抗生素的药敏性,目的在于为选育不含耐药因子的菌株用于活菌制剂的生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1) 菌种。试验菌长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum*)、嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*)、干酪乳杆菌 (*L. casei*)、植物乳杆菌 (*L. plantarum*) 及粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) 和质控菌金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) 均由中国农业大学食品与营养工程学院微生物教研室提供。

2) 培养基^[4]。MRS 培养基用于嗜酸乳杆菌、干酪乳杆菌、植物乳杆菌的培养;M17 培养基用于粪肠球菌的培养;PTYG 培养基用于长双歧杆菌的培养。

3) 标准药敏纸片。8 类 30 种抗生素药敏纸片购于北京天坛药物生物技术开发公司,纸片直径 6 mm,质量完全符合 WHO 标准规定(表 1)。

1.2 试验方法

1) 培养基的制备。按配方准确称量各成分放于烧杯中,加蒸馏水并搅匀,同时加热至溶解,调节 pH 到所需范围,液体培养基用滤纸过滤,固体培养基用多层纱布过滤,103.43 kPa 15 min 灭菌。

2) 菌液的制备。取少量试验菌冻干菌粉于各液体培养基中活化 2~3 代,待活力恢复后以 1%接

种量接种于各液体培养基中 37℃ 培养 24 h,菌液用于药敏试验。

3) 药敏试验^[5]。分别取含量为 $(1.5 \sim 3.0) \times 10^8$ cfu \cdot mL⁻¹ 的 5 种试验菌菌液 1 mL 于灭菌平皿中,采用倾注法加入相应的培养基 15 mL,待平板凝固后贴放标准药物纸片,而后置 37℃ 下培养 24~48 h 后测量并记录抑菌圈直径。其中双歧杆菌置于厌氧罐中培养。

4) 敏感或耐药的判断标准^[6]。用标准敏感菌株金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) 作为质控菌,试验菌株对 30 种抗生素的药敏性参照 WHO 提供的 NCCLS 最新版本的标准进行(抑菌圈直径判断标准见表 1)。

2 结果与分析

根据 WHO 提供的 NCCLS 最新版本对敏感或耐药的判断标准,得出 5 种受试菌对 8 大类 30 种抗生素的药敏结果(表 2)。

表 2 结果表明,长双歧杆菌对大环内酯类、头孢素类、青霉素类、-内酰胺酶抑制剂的复合物及其他类的氯霉素、呋喃妥因、利福平抗生素均敏感;对氨基糖苷类抗生素均耐药;对糖肽类、四环素类抗生素表现出不同的药敏性。

嗜酸乳杆菌、干酪乳杆菌及植物乳杆菌对大环内酯类多数、四环素类及其他类的氯霉素、呋喃妥因、利福平抗生素敏感;对氨基糖苷类多数表现出耐药;对头孢素类、青霉素类、-内酰胺酶抑制剂的复合物、糖肽类抗生素表现出不同的药敏性。

粪肠球菌对大环内酯类、四环素类及其他类的氯霉素、呋喃妥因、利福平抗生素敏感;对氨基糖苷类、糖肽类抗生素耐药;对青霉素类、-内酰胺酶抑制剂的复合物、头孢素类抗生素表现出不同的药敏性。

3 讨论

1) 不同类抗生素的抗菌机理。头孢素类、青霉素类、-内酰胺酶抑制剂复合物是一类在化学结构中均具有内酰胺环的抗生素。其抗菌机理主要是通过干扰细菌细胞壁的合成,使细菌形成丝状体或球形体来抑制细菌的生长繁殖和伸长从而使细菌逐步溶解死亡。由于这类抗生素临床应用较早,使用也最广泛,所以对其产生的耐药性细菌也较普遍,如常见的革兰氏阳性球菌均对青霉素 G 耐药,且耐药菌

表 1 试验用抗生素的种类、药敏纸片含药量及抑菌圈直径判断标准

Table 1 Antibiotics, Sensi-Discs and criterion for inhibitory result

抗菌药物类别	抗菌药名及代号	纸片含药量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{片}^{-1}$)	抑菌圈直径判断标准 / mm		
			R	M	S
青霉素类	青霉素 G(penicillin) P	10	28		29
	苯唑西林 (Oxacillin) OX	1	18		19
	氨苄西林 (ampicillin) AM	10	28		29
	甲氧西林 (methicillin) ME	5	9	10 ~ 13	14
-内酰胺酶抑	哌拉西林/他唑巴坦 PIP/TA (piperacillin/ subactam)	100/10	17		18
制剂的复合物	阿莫西林/克拉维酸 AMX/AC (amoxicillin/ clavulanic Acid)	20/10	19		20
头孢素类	头孢克罗 (cefaclor) CEC	30	14	15 ~ 17	18
	头孢美唑 (cefmeazon) CMZ	30	12	13 ~ 15	16
	头孢哌酮 (cefoperazone) CFP	75	15	16 ~ 20	21
	头孢噻吩 (cephalothin) CF	30	14	15 ~ 17	18
	头孢唑肟 (ceftizoxime) CTZ	30	14	15 ~ 19	20
	头孢他啶 (ceftazidime) CAZ	30	14	15 ~ 17	18
大环内酯类	交沙霉素 (josamycin) J	15		参照本表红霉素指标	
	麦迪霉素 (midecamycin) M	15		参照本表红霉素指标	
	阿奇霉素 (azithromycin) ZI	30	13	14 ~ 17	18
	柱晶白霉素 (leucomycin) LE	15		参照本表红霉素指标	
	乙酰螺旋霉素 (acetyspiramycin) ACE	1		参照本表红霉素指标	
氨基糖苷类	红霉素 (erythromycin) E	15	13	14 ~ 22	23
	卡那霉素 (kanamycin) K	30	13	14 ~ 17	18
	链霉素 (streptomycin) S	10	11	12 ~ 14	15
	新霉素 (neomycin) N	30		参照本表卡那霉素指标	
四环素类	庆大霉素 (gentamycin) GM	10	12	13 ~ 14	15
	四环素 (tetracycline) TC	30	14	15 ~ 18	19
	多西环素 (doxycycline) DOX	30	12	13 ~ 15	16
糖肽类	米诺环素 (minocycline) MNO	30	14	15 ~ 18	19
	万古霉素 (vancomycin) VA	30			15
其他	替考拉宁 (teicoplanin) TCL	30	10	11 ~ 13	14
	呋喃妥因 (nitrofurantoin) FT	300	14	15 ~ 16	17
	氯霉素 (chloramphenicol)	30	12	13 ~ 17	18
	利福平 (rifampin) RA	5	16	17 ~ 19	20

注: R 为耐药, M 为中度敏感, S 为敏感。下同。

株还在不断增加^[7]。本试验也证明,除了长双歧杆菌外,其他 4 种乳酸菌对头孢素类、青霉素类、-内酰胺酶抑制剂复合物中的某些抗生素表现一定的耐药性,尤其是粪肠球菌,则表现出较明显的耐药性,应引起足够的重视。

四环素类抗生素抗菌机理主要是同敏感细菌的核糖体 30S 亚基结合,在阻碍氨基酸同核糖体结合的基础上抑制敏感细菌蛋白质的合成^[8]。大环内

酯类抗生素是一类结构中具有 14,15,16 元大环内酯环的抗生素,其抗菌机理主要是作用于核糖体的 50S 亚基,并可能与 P 位结合,从而阻止肽酰基 tRNA 和 mRNA 从 A 位移至 P 位,进而抑制肽链的延长^[7]。四环素类抗生素和大环内酯类抗生素对大多数革兰氏阳性菌敏感。本试验也表明,5 种受试乳酸菌对四环素类抗生素和大环内酯类抗生素均敏感。

表 2 5 种受试菌对常用 8 大类 30 种抗生素的药敏性试验结果

Table 2 Antibiotic resistance patterns for 5 strains tested with 30 antibiotics

抗生素及代号		嗜酸乳杆菌 <i>L. acidophilus</i>	干酪乳杆菌 <i>L. case</i>	植物乳杆菌 <i>L. plantarum</i>	长双歧杆菌 <i>B. longum</i>	粪肠球菌 <i>En. faecalis</i>
青霉素类	P	MS	S	MS	S	R
	OX	R	R	R	S	S
	AM	S	MS	S	S	S
	ME	S	S	S	S	MS
-内酰胺酶抑制剂的复合物	AMX/ AC	S	MS	MS	S	MS
	PIP/ TA	S	MS	MS	S	MS
头孢素类	CEC	S	S	S	S	R
	CMZ	R	R	S	S	R
	CFP	S	S	MS	S	MS
	CF	MS	MS	MS	S	R
	CTZ	R	R	S	S	MS
	CAZ	S	S	S	S	S
大环内脂类	I	S	S	S	S	S
	M	S	S	S	S	S
	AZI	R	S	S	S	S
	LE	S	MS	S	S	S
	ACE	S	S	S	S	S
	E	S	MS	S	MS	S
氨基糖苷类	K	MS	MS	MS	R	R
	S	R	R	R	R	R
	N	R	R	MS	R	R
	GM	R	R	MS	R	R
四环素类	TC	S	S	MS	MS	S
	DOX	S	MS	MS	S	S
	MNO	S	MS	MS	MS	S
糖肽类	VA	R	S	S	R	R
	TCL	MS	S	MS	S	R
其他	FT	R	S	S	S	MS
	C	MS	MS	MS	S	S
	RA	S	S	S	S	S

糖肽类抗生素是通过与细菌细胞壁以 D-Ala-D-Ala 为末端的肽聚糖前体小肽特异性结合来抑制细菌细胞壁肽聚糖的延伸或/和交联,从而阻遏细胞壁的合成,最终导致细菌细胞死亡。糖肽类抗生素对几乎所有的革兰氏阳性菌具有活性,在临床上用于严重的革兰氏阳性菌感染的治疗^[8]。随着 20 世纪 80 年代万古霉素耐药性肠球菌的出现,糖肽类耐药性肠球菌不断增多,近期甚至出现了糖肽耐药基因从肠球菌向其他细菌转移的现象,由于尚缺乏有效治疗糖肽类耐药菌感染的药物,糖肽类耐药性已成

为威胁人类生存和健康的一大难题^[9]。本试验表明,嗜酸乳杆菌对万古霉素耐药,肠球菌对万古霉素、替考拉宁均耐药。

2) 药敏测试方法。药敏测定有扩散、稀释、光密度、电阻抗、放射性测量及固体免疫荧光等多种方法。目前常用的药敏试验测定方法有药敏纸片琼脂扩散法(简称 K-B 法)和稀释法 2 种。K-B 法由于其具有操作简单、易行且人力、时间和材料消耗少等特点已被国内外医药工作者广泛采用,同时它也是指导临床合理用药,细菌耐药性监测及新药验证等的

一种重要手段。K-B 法标准中只给出了临床致病菌的判断标准,本试验参照质控菌金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) 的标准来判断。K-B 法的结果会受到培养基、接种药量、受试菌浓度等因素的影响。影响培养基的因素包括材料组成、pH、含水量等。本试验仍然按培养基配方自己配制。

3) 乳酸菌药敏研究。刘奋^[10]用琼脂纸片扩散法对来自幼儿粪便的 13 株双歧杆菌进行药敏感试验,发现双歧杆菌对红霉素、四环素、氯洁霉素、甲硝唑有不同程度的耐药性。D. Matteuzzi^[11]等对来自人粪便的 15 种、459 株双歧杆菌进行了药敏性试验,发现所有的菌株均对氯霉素和洁霉素敏感;而对新霉素、链霉素和四环素则表现出不同的耐药性;大多数菌株对多粘菌素 B、萘啶酮酸、庆大霉素和甲硝唑表现出耐药性。Morten Danielsen 等^[12]对常作为益生菌的 62 株菌进行了耐药性试验,结果发现不同菌株对抗生素的耐受性具有种间特异性,建议在筛选携带可转移的耐药性因子菌株时应该使用最小抑制浓度(MICs)作为重要指标。R. Temmerman 等^[13]对 55 种来自欧洲益生菌制品中的菌株进行了药敏性试验,经平板扩散试验测得屎肠球菌中的 38%对万古霉素耐药,而肉汤稀释试验及 PCR 化验则清楚地指出所有屎肠球菌菌株对万古霉素耐药。但以往的试验仅检测了乳酸菌对几种抗生素的耐药性,未对抗生素分类作系统检测,所以试验结果只是针对个别抗生素。本试验选用微生态制剂中常用的 5 种乳酸菌为试材,考察了其对 8 类 30 种抗生素的耐药性,比较全面的对这 5 种乳酸菌的药敏性有了初步的了解,但没有在同种细菌中选多株不同的菌株进行试验。当然,同种不同菌株的耐药情况可能并不完全相同,所以微生态制剂选用菌株时,具体菌株的耐药情况还需作药敏试验来确定。

4 小 结

本文就微生态制剂中常用的 5 种乳酸菌对 8 类 30 种常见抗生素的药敏性进行了初步探讨,得出了

它们对哪些抗生素敏感,对哪些抗生素耐药,初步分析了其药敏性的原因,可为微生态制剂生产中不耐药菌株的选育提供参考。但没有对试验菌株进行耐药性质粒有无的提取和消除试验,有关这些菌株的耐药性是自然耐药还是可获得耐药,以及同种不同菌株对常见抗生素的药敏性等方面有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 薛恒平. 微生态制剂浅析[J]. 饲料工业,1996,1(17): 30~35
- [2] 李平兰,张箴,郑海涛. 乳酸菌及其生物工程研究新进展[J]. 中国乳品工业,20002,8(4):50~53
- [3] 贾士芳,郭兴华. 活菌制剂的现状和未来[J]. 生物工程进展,1995,2(16):16~21
- [4] 杨洁彬,郭兴华,张箴,等. 乳酸菌生物学基础及应用[M]. 北京:中国轻工业出版社,1996.256p
- [5] 凌代文,东秀珠. 乳酸细菌分类鉴定及试验方法[M]. 北京:中国轻工业出版社,1999.176p
- [6] 中国药品生物制品鉴定所国家抗菌药物细菌耐药性监测中心. 抗菌药物药敏纸片判断标准[S]. 2000.6
- [7] 陈志辉,俞月琴. 抗菌药物临床应用新论[M]. 上海:同济大学出版社,1994.168p
- [8] 刘汉明. 抗生素的合理应用[M]. 西安:陕西科学技术出版社,1981.250p
- [9] 胡兴戎. 糖肽类抗生素的作用机制及肠球菌的糖肽耐药机制[J]. 国外医药抗生素分册,2001,22(3):116~120
- [10] 刘奋. 双歧杆菌药物敏感试验[J]. 内江师专学报,1994,9(4):46~49
- [11] Matteuzzi D, Crociani F, Brigidi P. Antimicrobial susceptibility of *Bifidobacterium* Annales de l'Institut Pasteur[J]. Microbiologie, 1983,134(3):339~349
- [12] Morten D, Anette W. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents[J]. International Journal of Food Microbiology,2003,(82):1~11
- [13] Temmerman R. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products[J]. International Journal of Food Microbiology,2003,(81):1~10