

益生乳酸菌的纸片扩散法药敏性试验评价

冯大伟 周家春*

(华东理工大学 生物工程学院食品科学与工程系 上海 200237)

摘要: 乳酸菌菌株的药敏性评价是目前国际上益生乳酸菌安全性评价的首要内容, 然而用于乳酸菌药敏性测试的相关国际通引标准还未出台。本文就药敏试验使用的培养基进行了探讨, 并从中选取了合适的商品化培养基——RCA 用于乳酸菌的药敏性测试。选取的培养基适合目前市场上常用益生菌的生长, 经方法优化后可得到满意的结果, 为今后制定针对乳酸菌的抗菌药物敏感性试验执行标准提供了一定依据。随后采用纸片扩散法对分属于 4 个属的 9 株乳酸菌进行了 19 类 51 种抗生素的敏感性测定, 较全面地了解了这些菌株的药敏谱。

关键词: 益生菌, 乳酸菌, 药敏性, RCA 培养基, 纸片扩散法

Evaluation of Agar Disc Diffusion Method for Determining Antibiotic Susceptibility of Lactic Acid Bacteria Strains by a Selected Culture Medium

FENG Da-Wei ZHOU Jia-Chun*

(Department of Food Science and Technology, College of Biotechnology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: The evaluation of antibiotic susceptibility of lactic acid bacteria (LAB) is a major part of the safety of probiotic foods. However, there is no international standard method of the susceptibility testing of LAB till now. We investigated 6 culture media and selected a proper commercial one from them. We optimized the agar disc diffusion method and assayed 9 strains of LAB encompassing the genera *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* and *Lactococcus* for susceptibility to 51 antibiotics on RCA agar. The optimized method proved to be an applicable technique for antibiotic susceptibility testing of LAB. This contributes to the establishment of a standardized procedure for antibiotic susceptibility testing of LAB.

Keywords: Probiotic, Lactic acid bacteria, Antibiotic susceptibility, RCA culture medium, Agar disc diffusion

益生乳酸菌是一类具有生理性作用并提高免疫力的微生物制剂, 经口服或其他途径摄入, 可改善小肠粘膜表面微生物种群和酶的平衡, 或刺激机体产生特异性或非特异性免疫机制。迄今为止已发现

的益生菌大体上可分成 3 大类, 包括: 乳杆菌类(如嗜酸乳杆菌、干酪乳杆菌、罗伊氏乳杆菌、鼠李糖乳杆菌等)、双歧杆菌类(如长双歧杆菌、短双歧杆菌、两歧双歧杆菌、青春双歧杆菌等)、革兰氏阳性

* 通讯作者: Tel: 86-21-64253064; ✉: jczhou@ecust.edu.cn
收稿日期: 2009-09-22; 接受日期: 2009-11-05

球菌(如粪链球菌、乳球菌、嗜热链球菌等)^[1]。

伴随着抗生素的广泛使用, 细菌的耐药性问题已日益凸显且备受关注。细菌耐药性的广泛传播和多重耐药菌株的出现已成为严重的公共卫生问题。乳酸菌菌株的耐药性评价是目前国际上益生乳酸菌安全性评价的首要内容。益生菌菌株的耐药性有其有利的一面, 例如和抗生素同时服用, 能使益生菌存活于肠道, 以帮助宿主恢复肠道菌群平衡^[2], 缓解由抗生素引起的胃肠道症状^[3]。这些研究成果使得益生菌被广泛用于发酵乳制品的生产中。另一方面, 对于进入人和动物有机体的外源性活菌在肠道内生长、定殖、繁殖, 其耐药基因可能以各种方式在肠道内微生物菌群之间相互传递^[4], 从而导致某些致病菌也获得了耐药性, 基于此种原因, 耐药性益生菌的安全性受到关注。此外, 益生菌在极少数情况下可能致病, 进入血液引起人体全身性感染(菌血症和感染性心内膜炎)^[5]。因此, 对益生菌进行全面的药敏测试, 以了解各菌株的药敏谱是非常有必要的。

益生菌有较长的使用历史及安全性, 因此被美国 FDA 认为是“GRAS” (Generally recognized as safe, 通常认为是安全的)。国外从上世纪末开始关注益生菌的药敏性, 并开始对其进行了一系列的研究。相比之下, 国内的相关研究较少, 研究方法也较单一。潘伟好等^[6]利用药敏纸片琼脂扩散法检测了 10 株具有粘附性的双歧杆菌对临床常用的 12 大类 38 种抗菌药物的药敏性。徐进等^[7]采用肉汤稀释法, 对中国益生菌保健品行业常用的 9 株双歧杆菌和 22 株乳杆菌、共计 31 株益生菌进行了 24 种抗生素的药敏性检测。但是, 这些工作基本参照国外的报道, 所用培养基多为只适于乳杆菌生长的 MRS 培养基, 这对乳酸菌的药敏性测定有一定的局限性, 而该问题已在国际上引起关注^[8]。

本文就药敏纸片琼脂扩散法使用的培养基进行了探讨, 并从中选取了合适的培养基用于乳酸菌的药敏性测试, 优化了试验参数, 为今后制定针对乳酸菌的抗菌药物敏感性试验执行标准提供了一定依据; 并对 9 株乳酸菌菌株的药敏性进行了全面的检测及分析, 为乳酸菌药敏性的深入研究提供一定的参考, 并建立了相应的数据库, 为今后菌株的开发应用提供支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株:嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*, LA)、保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus bulgaricus*, LB)、干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*, LC) 2 株、鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*, LR)、双歧杆菌(*Bifidobacterium*, BB)、嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*, ST) 2 株、乳酸乳球菌乳脂亚种(*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, LL)均由华东理工大学食品科学与工程系提供。

1.1.2 培养基:MRS 琼脂(MERCK)、APT 琼脂(BD)、M17 琼脂(OXOID)、RCA 琼脂(OXOID)、MHA 琼脂(中科, 上海)、BL 琼脂(陆桥, 北京)。

1.1.3 药敏试纸:使用的药敏试纸种类及含量见表 3-6(天和微生物试剂有限公司, 杭州), 试纸参照美国 NCCLS (临床实验室标准化研究所) 2005 版的规定制备而成, 与国际要求一致。

1.1.4 主要设备:厌氧罐、厌氧包、微需氧包(三菱)、恒温培养箱(MMM)、全自动菌落/显微图象分析多功能一体机(用于抑菌圈直径测量, Shineso)、自动漩涡振荡混合器(Stuart)、高压灭菌器(Zealway)、生物安全柜(Airtech)、电子天平(Denver)。

1.2 方法

1.2.1 菌液的制备:取经过分装的高浓缩冷冻菌种 1 瓶(各试验菌种活菌数分别为 $1 \times 10^9 - 5 \times 10^{11}$ CFU/g), 自然冷却至室温, 用无菌生理盐水逐级稀释至实验所需的浓度($1 \times 10^7 - 1 \times 10^9$ CFU/mL), 混匀, 所得菌液用于药敏实验。

1.2.2 乳酸菌药敏试验用培养基及培养环境的选择:吸取 1 mL 菌悬液(1×10^8 CFU/mL)加入到 15 mL 灭菌并融化后的 6 种培养基(50°C)中, 于漩涡振荡混合器上混和均匀后迅速倾注到 100 mm \times H20 mm 无菌平皿(Greiner, 底盘直径为 87.26 mm)中, 摇匀, 凝固后分别在有氧、微需氧、厌氧条件下, 37°C 恒温培养箱中倒置培养, 48 h 后观察乳酸菌在培养基上的生长情况, 据此选择药敏试验用培养基。

1.2.3 菌液浓度, 培养时间对抑菌圈直径的影响:吸取 1 mL 经过生理盐水稀释至不同浓度(1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 CFU/mL)的菌悬液分别加入到 15 mL 灭菌并融化后的 RCA 培养基(50°C)中, 混和均匀后倾注到平皿中, 待琼

脂表面凝固后用已灭菌的镊子取药敏纸片贴于琼脂表面,微需氧条件下 37°C 培养,于 1、2、5 d 后用抑菌圈测量仪分别测量并记录抑菌圈直径(抑菌圈直径为 100% 抑菌所产生的环的直径)。为便于讨论,本研究中规定抑菌圈直径大于 20 mm 为菌株对该抗生素敏感。

1.2.4 接种方式对抑菌圈直径的影响:用生理盐水将菌种稀释至浓度为 1×10^8 CFU/mL,接种方法采用以下 2 种:(1) 菌液用无菌棉签直接涂布在已凝固的培养基上,待菌液干燥。(2) 将菌液与融化的培养基混匀后倾注,待琼脂凝固。取药敏纸片贴于琼脂表面,微需氧条件下 37°C 培养,于 2 d 后测量并记录抑菌圈的直径。

1.2.5 药物敏感性测定:采用纸片扩散法,吸取 1 mL 浓度为 1×10^8 CFU/mL 的菌悬液于 15 mL RCA 培养基(50°C)中,混和均匀后倾注到平皿中,待琼脂表面凝固后取药敏纸片贴于琼脂表面,每个培养皿贴 3 张间隔均匀适中的同种药物纸片,静置 5 min 后翻转平皿,微需氧条件下 37°C 恒温培养,48 h 后测量并记录抑菌圈的直径。针对嗜热链球菌的生长特点将 RCA 培养基进行如下改良:于 15 mL 灭菌并融化后的 RCA 培养基(50°C)中,加入 500 μ L 浓度为 10% 的乳糖溶液(已灭菌),与随后加入的菌液混和均匀后倾注到平皿中,摇匀待凝固。

2 结果与讨论

2.1 乳酸菌药敏试验用培养基的选择及培养环境的优化

药敏试验用培养基应提供测试菌良好生长所需营养,并且尽可能减少培养基成分对抗生素药效的干扰。6 种不同的生长培养基被用于考察其在药敏试验中的适用性。由表 1 可见,无论在有氧、微需氧还是厌氧的条件下,乳酸菌几乎不能在 Mueller-Hinton (NCCLS 推荐)培养基上生长。这是由于乳酸菌生长需要的营养成分复杂,而药敏试验通用型的 MH 培养基营养成分过于简单,只含有肉浸液、水解酪蛋白以及淀粉,不能完全提供乳酸菌生长所需的营养。这与国外一些学者^[8-10]的研究结果一致。

乳酸菌生长需要的营养素较为复杂,我们对 5 种商品化的乳酸菌培养基进行了培养效果比较。其中 MRS 培养基由于是适合于乳杆菌培养的培养基,

被广泛用于乳杆菌的药敏测试。而添加有盐酸半胱氨酸的 MRS 培养基被认为适合双歧杆菌的生长。由表 1 可见,在 3 种氧环境下,乳杆菌各菌株的生长表现良好。在厌氧环境下,双歧杆菌亦能生长良好。因此,国内学者基本采用该培养基进行乳酸菌的相关药敏性测定。但是药敏试验用的培养基应最大程度降低检验用抗生素与培养基组成成分之间的相互作用。如钙、镁离子能降低氨基糖苷类药物的抗菌活性,胸腺嘧啶核苷和对氨基甲酸(PABA)能拮抗磺胺药和甲氧苄啶(TMP)的活性。MRS 的成分中含有额外添加的镁离子,且 Klare 等^[11]认为 MRS 含有胸腺嘧啶核苷和对氨基甲酸,影响了测定磺胺药和甲氧苄啶实验结果的准确性。MRS 培养基 pH 较低,也

表 1 分属于 7 个种的乳酸菌在不同培养基及培养环境下的生长情况

Table 1 Growth of strains of 7 species in different agar media

| 培养基 Medium | 菌株 Strain | | | | | | |
|--------------------|-----------|----|----|----|----|----|----|
| | LA | LB | BB | LC | LR | LL | ST |
| 有氧环境 Aerobic | | | | | | | |
| MHA | - | - | - | - | - | - | ± |
| RCA | - | + | ± | ± | + | ± | ± |
| BL | + | + | + | + | + | + | + |
| APT | - | + | ± | + | + | ± | - |
| MRS | + | + | ± | + | + | ± | ± |
| M17 | - | ± | ± | ± | + | + | ± |
| 微需氧环境 Microaerobic | | | | | | | |
| MHA | - | ± | - | - | - | - | + |
| RCA | + | + | + | + | + | + | ± |
| BL | + | + | + | + | + | + | + |
| APT | ± | + | + | + | + | ± | ± |
| MRS | + | + | ± | + | + | ± | ± |
| M17 | ± | ± | ± | ± | + | + | + |
| 厌氧环境 Anaerobic | | | | | | | |
| MHA | - | - | + | - | - | - | - |
| RCA | + | + | + | + | + | - | ± |
| BL | + | + | + | + | + | + | + |
| APT | + | + | + | + | + | ± | - |
| MRS | + | + | + | + | + | ± | ± |
| M17 | + | ± | + | + | + | + | + |

注: +: 生长良好, 菌落密集; ±: 可生长, 菌落稀疏或难以辨认; -: 不生长。

Note: +: Growth; ±: Weak growth; -: No growth; LA: *Lactobacillus acidophilus*; LB: *Lactobacillus bulgaricus*; BB: *Bifidobacterium*; LC: *Lactobacillus casei*; LR: *Lactobacillus rhamnosus*; LL: *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*; ST: *Streptococcus thermophilus*.

可能影响氨基糖苷类药物的活性^[12]。另外, 我们研究证实 MRS 培养基并不适合嗜热链球菌(嗜热链球菌、乳酸乳球菌)的生长, 李平兰等^[13]使用 M17 培养基测定粪肠球菌的药敏性。因此, MRS 培养基作为测定乳酸菌药物敏感性的通用培养基显然不妥。

由表 1 可见, M17 培养基确实适合中温乳酸乳球菌的培养和计数, 且被 IDF (The international dairy federation) 推荐为酸奶中嗜热链球菌选择性计数培养基。实验发现, M17 也适合部分乳杆菌的生长, 如鼠李糖乳杆菌。BL 培养基由于其营养的丰富性, 不仅适用于双歧杆菌的计数和培养, 各菌株均能生长, 即使在有氧环境下, 乳酸菌也能良好生长; 但是正由于其营养的丰富性, 可能与某些药敏试纸中的抗生素发生相互作用, 对药敏实验的测定结果产生很大的干扰, 因此也不作考虑。

最近 Klare 等^[12]提出了一种添加或不添加有半胱氨酸的乳酸菌药敏测试培养基——LSM (Lactic acid bacteria susceptibility test medium), 该培养基是由 90% IST (Iso-Sensitest) 培养基和 10% MRS 培养基调节 pH 至 6.7 所制成。LSM 弥补了 MRS 含有拮抗成分的不足, 被认为是 MRS 培养基的良好替代。可是仍存在一些问题, 如 Iso-Sensitest 培养基本身就含有干扰抗生素作用的钙、镁离子, 且目前还没有商品化。

综合以上诸因素, 我们选择 RCA 培养基作为乳酸菌药敏性试验的通用培养基。该培养基成分相对于其他 4 种而言较为简单, 干扰因素较少, 且 pH 值偏中性。在微需氧条件下, 除嗜热链球菌之外, 都能良好生长。

2.2 菌液浓度、培养时间对抑菌圈直径的影响

由于嗜热链球菌在 RCA 培养基上生长不良, 因此针对其营养特性进行如下改良, 在灭菌并融化后的 15 mL 培养基中加入 500 μ L 浓度为 10% 的乳糖溶液。改良后嗜热链球菌在微需氧条件下生长良好, 形成的抑菌圈清晰。

菌液浓度的变化对形成的抑菌圈的清晰度及直径的大小都会产生一定影响。由图 1 可知, 随着菌液浓度的增大, 抑菌圈的直径减小。大部分抑菌圈直径可以在菌液浓度为 1×10^8 CFU/mL 趋于稳定。嗜热链球菌抑菌圈直径随菌液浓度的变化较为明显, 而双歧杆菌抑菌圈直径的变化较为平稳。这可

能是由于不同菌种对培养基的适应性不同的缘故, RCA 培养基添加有盐酸半胱氨酸, 适用于厌氧菌培养, 因此双歧杆菌较为稳定而嗜热链球菌较为敏感。

培养基内试验菌的菌量过少时, 抑菌圈边缘模糊不清, 且抑菌圈直径过大; 反之则抑菌圈太小, 影响试验的灵敏度, 而且因菌种稀释的倍数小, 菌种保护剂的浓度较高, 使得培养基较为浑浊, 对抑菌圈直径大小的判定形成障碍。在培养基中加入 1 mL 浓度为 1×10^8 CFU/mL 的菌液时, 形成的抑菌圈大小适中且形成的抑菌圈明显完整, 因此菌液浓度选择为 1×10^8 CFU/mL。

实验考察了培养时间对抑菌圈直径大小的影响, 结果表明培养 1、2、5 d 后, 所考察的 4 种抗生素产生的抑菌圈直径变化不明显, 差值几乎都在 2 mm 以内, 最大差值也在 3 mm 以内, 这意味着培养时间的波动对抑菌圈直径的影响很小, 培养时间大于 1 d 即可。

2.3 接种方式对抑菌圈直径的影响

涂布的接种方法是 NCCLS 推荐的方法, 实验考查了两种常用接种方式对抑菌圈直径的影响。由表 2 可知, 涂布方法形成的抑菌圈直径普遍大于倾注法。由于涂布操作的问题, 使得有 3 个数据未能得到结果。

倾注法优于无菌棉签涂布法, 接种量可以控制, 重复性强, 避免了氧气对厌氧菌的毒害作用, 使厌氧菌得到了保护。而涂布法受个人操作的影响较大, 具体如下: (1) 每次接入的菌液量很难控制使其恒定, 以致抑菌圈直径的测量结果波动大; (2) 涂布不易均匀, 造成抑菌圈边缘不规整, 直径较难测量; (3) 易刮伤琼脂表面, 使得药敏纸片的扩散作用受到影响; (4) 当菌液干透的时候, 易使菌体直接接触到环境氧。

2.4 药物敏感性测定

本次试验建立了分属于 4 个属的 9 株乳酸菌对 51 种抗生素的药敏谱, 实验表明, 不同的益生菌菌种具有各自复杂而特有的药物敏感性, 且种内不同菌株间也有差异, 结果如表 3-6 所示。按抗生素的作用机制进行如下讨论。

2.4.1 抑制细胞壁的合成类抗生素的敏感性: 对于青霉素类抗生素, 9 株乳酸菌普遍敏感, BB 菌株最为敏感。人的细胞无细胞壁, 有效抗菌浓度的青

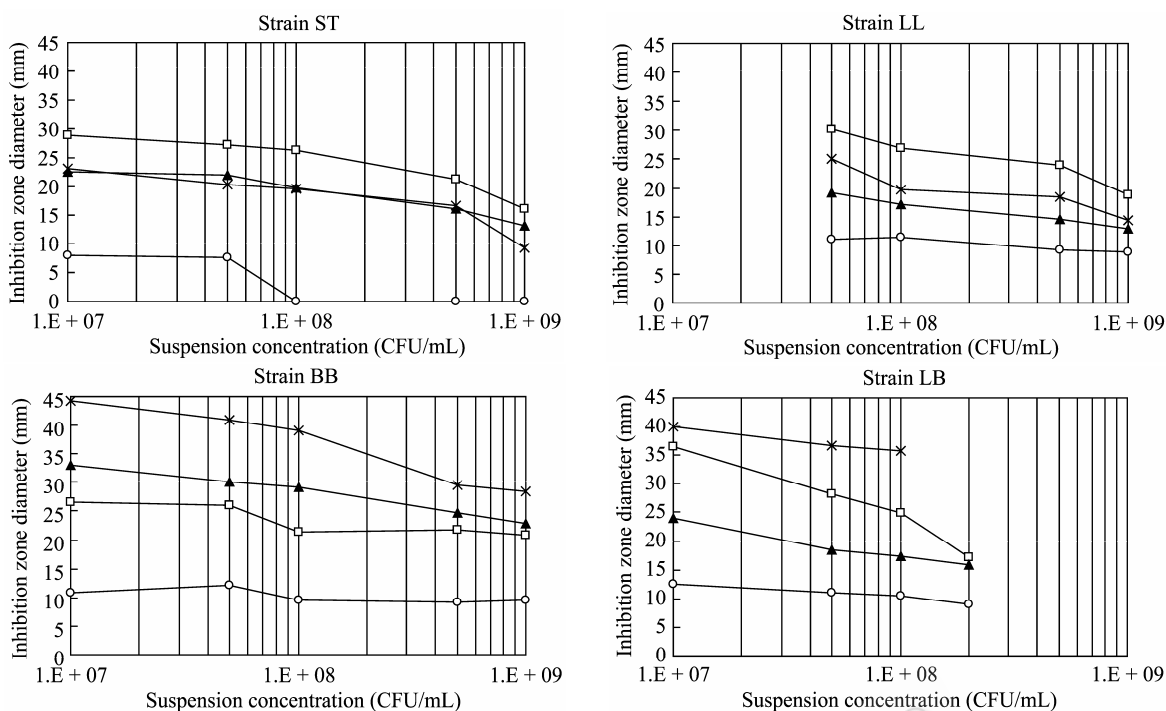


图 1 菌液浓度对抑菌圈直径的影响

Fig. 1 Effect of culture suspension concentration on inhibition zone diameter

注: □: 四环素; ×: 林可霉素; ○: 庆大霉素 10; ▲: 万古霉素。表中数据为培养 2 d 后测量所得, 正负误差在 1.5 mm 以内; 庆大霉素纸片含量为 10 μg/片; 嗜热链球菌测定培养基为改良后的 RCA 培养基。

Note: □: Tetracycline; ×: Lincomycin; ○: Gentamicin 10; ▲: Vancomycin. Data were obtained after two days' incubation, data error is within 1.5 mm. The concentration of gentamicin used was 10 μg/disc. Susceptibility testing for *Streptococcus thermophilus* was based on Reinforced Clostridial agar with slight modification. 500 μL of 10% lactose solution was added into the test tube containing 15 mL melted agar (cooled to 50°C). Then 1 mL culture suspension was added into the test tube, mixed and the agar poured into the petri dish.

表 2 两种接种方式对抑菌圈直径的影响
Table 2 Effect of two inoculation methods on inhibition zone diameter

| 抗生素 Antibiotic | 抑菌圈直径 Inhibition zone diameter (mm) | | | | | | | |
|--------------------|-------------------------------------|------------|--------------|------------|--------------|------------|--------------|------------|
| | LB | | LL | | BB | | LC | |
| | 涂布 Spread | 倾注 Pour | 涂布 Spread | 倾注 Pour | 涂布 Spread | 倾注 Pour | 涂布 Spread | 倾注 Pour |
| 青霉素 G Penicillin G | — | 32.4 | — | 28.8 | 49.0 | 40.4 | 46.6 | 36.0 |
| 红霉素 Erythromycin | 36.6 | 28.6 | 24.6 | 24.0 | 46.4 | 37.1 | 34.1 | 25.5 |
| 克林霉素 Clindamycin | — | 24.6 | 25.7 | 24.8 | 48.3 | 39.6 | 40.9 | 33.5 |
| 万古霉素 Vancomycin | 22.1 | 16.9 | 18.2 | 17.1 | 34.7 | 28.7 | 0 | 0 |

注: —: 难以辨认。

Note: —: Hard to distinguish.

霉素对人体细胞几乎无影响, 因而对人体副作用较少。青霉素类抗生素在临床的应用较早, 使用范围较广, 所以对其产生耐药性的细菌也较普遍。值得宽慰的是, 试验发现乳酸细菌并未对青霉素类抗生素产生普遍耐药, 乳酸菌一般不产生耐青霉素酶, 对于青霉素类抗生素表现敏感。实验发现, 有 6 株乳酸菌对耐青霉素酶青霉素苯唑西林耐药, 只有双歧杆菌和 2 株乳杆菌对其敏感。头孢类抗生素自 20

世纪 60 年代应用于临床以来, 发展迅速, 应用日益广泛。由表 3 可知, 除了乳杆菌中的 LR 菌株, 大部分乳酸菌对该类抗生素基本表现为敏感。与对青霉素类抗生素的表现一样, BB 菌株尤为敏感。LB 菌株对该类抗生素也非常敏感, 而各株乳杆菌的药敏性各不相同, LR 菌株对试验用的 7 种头孢类抗生素的 5 种表现为耐药, Coppola 等^[4]认为鼠李糖乳杆菌对于头孢类抗生素的药敏表现是菌株自身的特性而非

表 3 纸片扩散法得到的抑制细胞壁合成类抗生素的乳酸菌株药敏谱
Table 3 Susceptibility to inhibitors of cell wall synthesis using the disc diffusion method on Reinforced Clostridial Agar (RCA)

| 抗菌药物种类 Group | 药物名称 Name | Name | μg 药物/片 Potency | 抑菌圈直径 (mm) Inhibition zone diameter (mm) | | | | | | | | | |
|---|--------------|-----------------------------|--------------------|---|-------|--------------|------|------|------|------|------|------|------|
| | | | | ST1 | ST2 | LL | LB | LC1 | LC2 | LR | LA | BB | |
| | | | | β-内酰胺类 β-Lactams 青霉素类 Penicillins | 青霉素 G | Penicillin G | 10* | 28.9 | 26.6 | 29.9 | 32.9 | 35.5 | 30.8 |
| | 阿莫西林 | Amoxicillin | 10 | 28.1 | 25.9 | 33.3 | 31.1 | 34.0 | 24.0 | 23.9 | 29.0 | 43.7 | |
| | 氨苄西林 | Ampicillin | 10 | 25.3 | 24.8 | 18.7 | 34.4 | 22.1 | 22.2 | 21.3 | 32.5 | 35.3 | |
| | 哌拉西林 | Piperacillin | 100 | 24.7 | 22.6 | 26.9 | 43.3 | 32.2 | 28.7 | 31.1 | 32.4 | 42.1 | |
| | 羧苄西林 | Carbenicillin | 100 | 24.4 | 22.3 | 22.5 | 44.6 | 29.6 | 26.3 | 27.9 | 41.0 | 41.0 | |
| | 苯唑西林 | Oxacillin | 1 | 15.7 | 14.6 | 15.0 | 35.1 | 13.7 | 12.1 | 15.0 | 24.4 | 21.2 | |
| β-内酰胺/β-内酰胺酶抑制剂复合物 β-lactam/β-lactamase-inhibitor combinations | 阿莫西林/克拉维酸 | Amoxicillin/Clavulanic acid | 20/10 | 30.1 | 33.5 | 29.4 | 32.0 | 32.2 | 31.2 | 31.5 | 36.3 | 46.0 | |
| | 氨苄西林/舒巴坦 | Ampicillin/Sulbactam | 10/10 | 30.0 | 32.6 | 29.0 | 32.9 | 31.2 | 25.0 | 28.8 | 35.9 | 49.1 | |
| | 哌拉西林/他唑巴坦 | Piperacillin/Tazobactam | 100/10 | 28.5 | 31.6 | 25.7 | 31.9 | 30.2 | 26.2 | 31.2 | 32.2 | 46.1 | |
| | 替卡西林/克拉维酸 | Ticarcillin/Clavulanic acid | 75/10 | 23.5 | 24.8 | 28.2 | 33.3 | 22.9 | 20.4 | 18.4 | 36.1 | 35.7 | |
| 头孢类 Cephems | 头孢唑啉 | Cefazolin | 30 | 22.7 | 19.7 | 25.7 | 42.3 | 21.6 | 21.6 | 19.7 | 27.1 | 31.8 | |
| | 头孢孟多 | Cefamandole | 30 | 28.3 | 21.0 | 27.0 | 41.4 | 22.9 | 21.9 | 19.5 | 31.6 | 39.6 | |
| | 头孢哌酮 | Cefoperazone | 75 | 22.8 | 21.6 | 24.8 | 39.3 | 26.6 | 25.5 | 23.5 | 30.1 | 40.8 | |
| | 头孢噻肟 | Cefotaxime | 30 | 30.5 | 30.9 | 25.8 | 37.9 | 23.2 | 23.9 | 22.0 | 26.4 | 41.3 | |
| | 头孢吡肟 | Cefepime | 30 | 22.8 | 18.6 | 23.5 | 42.3 | 15.3 | 14.1 | 9.5 | 14.8 | 41.0 | |
| | 头孢西丁 | Cefoxitin | 30 | 22.8 | 16.3 | 13.5 | 29.7 | 0 | 0 | 0 | 21.3 | 31.2 | |
| | 头孢克洛 | Cefaclor | 30 | 20.6 | 13.2 | 23.1 | 36.3 | 22.4 | 9.8 | 0 | 14.0 | 45.0 | |
| 单环内酰胺类 Monobactams | 氨曲南 | Aztreonam | 35 | 9.8 | 10.2 | 0 | 15.0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 青霉烯类 Penems | 亚胺培南 | Imipenem | 10 | 26.1 | 25.9 | 0 | 41.6 | 37.9 | 35.8 | 31.3 | 42.4 | 51.3 | |
| 非β-内酰胺类 Non-β-lactams | | | | | | | | | | | | | |
| 糖肽类 Glycopeptides | 万古霉素 | Vancomycin | 30 | 21.0 | 19.9 | 18.0 | 17.0 | 0 | 0 | 0 | 26.4 | 29.7 | |
| | 替考拉宁 | Teicoplanin | 30 | 20.0 | 18.5 | 17.9 | 16.1 | 19.4 | 21.1 | 0 | 24.7 | 28.6 | |
| 多肽类 Polypeptides | 杆菌肽 | Bacitracin | 0.04 | 16.0 | 14.6 | 11.1 | 12.5 | 0 | 15.7 | 0 | 10.6 | 9.8 | |
| 磷霉素 Fosfomycins | 磷霉素 | Phosphonomycin | 200 | 28.2 | 26.4 | 17.8 | 9.4 | 0 | 33.4 | 0 | 0 | 28.0 | |

注: *: 青霉素 G 药物含量单位为“U”。

Note: *: Potency unit of penicillin G was “U”.

种的特性。两株嗜热链球菌表现出了各自的特性,但差别不大。

所有测定的乳酸菌株都对单环内酰胺类的氨基糖苷类耐药;而除了 LL 乳球菌,其他的乳酸菌株都对青霉素类的亚胺培南表现为敏感,而 BB 菌仍最为敏感。

β -内酰胺类抗生素是目前临床抗感染治疗最普遍应用的一类抗生素,随着这类药物的广泛使用(特别是滥用、误用)和致病菌的变异,产生了病

原菌对药物的耐药性问题,而且耐药发生率相当高。对 β -内酰胺类抗生素的耐药机理有很多,包括 β -内酰胺酶的生成(青霉素酶、头孢菌素酶)以对抗生素进行水解^[15]。LR 菌株能对 β -内酰胺类抗生素中的头孢类抗生素表现为耐药,表明该菌株可能有头孢菌素酶的生成。实验表明,至少对于这 9 株乳酸菌,该类多数抗生素还是对其有作用的。另外, BB 菌显得尤为敏感, Moubareck 等^[16]认为可能是因为双歧杆菌缺少 β -内酰胺酶活性的缘故。

表 4 纸片扩散法得到的抑制蛋白质合成类抗生素的乳酸菌株药敏谱
Table 4 Susceptibility to protein synthesis inhibitors using the disc diffusion method on Reinforced Clostridial Agar (RCA)

| 抗菌药物种类 Group | 药物名称 Name | Name | μg 药物/片 Potency | 抑菌圈直径 (mm) Inhibition zone diameter (mm) | | | | | | | | |
|--------------------------|--------------|------------------|-------------------------------|---|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | | | | ST1 | ST2 | LL | LB | LC1 | LC2 | LR | LA | BB |
| 氨基糖苷类 Aminoglycosides | 阿米卡星 | Amikacin | 30 | 0 | 0 | 13.7 | 8.8 | 9.9 | 9.1 | 12.3 | 9.2 | 10.2 |
| | 庆大霉素 | Gentamicin | 10 | 8.7 | 0 | 11.1 | 10.6 | 12.9 | 11.2 | 14.6 | 10.2 | 10.5 |
| | 庆大霉 120 | Gentamicin 120 | 120 | 13.5 | 12.3 | 17.8 | 24.7 | 19.3 | 19.7 | 21.0 | 19.7 | 15.8 |
| | 卡那霉素 | Kanamycin | 30 | 8.9 | 0 | 13.0 | 10.1 | 10.7 | 11.5 | 12.8 | 10.5 | 9.0 |
| | 奈替米星 | Netilmicin | 30 | 11.1 | 10.5 | 15.5 | 10.7 | 15.1 | 13.5 | 15.4 | 13.1 | 10.1 |
| | 链霉素 | Streptomycin | 10 | 13.6 | 13.2 | 15.6 | 15.2 | 13.4 | 9.7 | 14.0 | 19.0 | 9.4 |
| | 链霉素 300 | Streptomycin 300 | 300 | 19.1 | 18.1 | 20.6 | 23.8 | 20.1 | 21.0 | 22.7 | 26.3 | 19.6 |
| | 妥布霉素 | Tobramycin | 10 | 8.5 | 7.5 | 11.4 | 8.4 | 9.6 | 8.8 | 9.0 | 9.0 | 9.9 |
| | 新霉素 | Neomycin | 30 | 7.9 | 7.5 | 18.5 | 10.0 | 13.8 | 12.3 | 14.6 | 12.4 | 18.2 |
| 四环素类 Tetracyclines | 多西环素 | Doxycycline | 30 | 30.2 | 30.5 | 31.3 | 24.4 | 27.0 | 31.9 | 27.7 | 31.3 | 29.8 |
| | 米诺环素 | Minocycline | 30 | 30.0 | 29.5 | 27.0 | 27.4 | 39.1 | 35.4 | 41.4 | 36.1 | 35.7 |
| | 四环素 | Tetracycline | 30 | 28.7 | 26.2 | 30.9 | 22.7 | 18.7 | 22.5 | 25.4 | 18.5 | 24.2 |
| 大环内酯类 Macrolides | 阿齐霉素 | Azithromycin | 15 | 19.3 | 20.6 | 25.7 | 21.3 | 19.1 | 18.7 | 24.9 | 17.8 | 35.7 |
| | 克拉霉素 | Clarithromycin | 15 | 28.8 | 22.4 | 29.4 | 28.3 | 33.0 | 31.3 | 32.5 | 32.2 | 45.8 |
| | 红霉素 | Erythromycin | 15 | 24.8 | 24.8 | 25.1 | 28.5 | 25.5 | 25.3 | 27.0 | 21.7 | 37.5 |
| | 罗红霉素 | Roxithromycin | 15 | 19.1 | 17.2 | 28.5 | 39.7 | 24.8 | 20.1 | 28.4 | 29.5 | 38.4 |
| 林可酰胺类 Lincosamide | 克林霉素 | Clindamycin | 30 | 27.8 | 25.1 | 26.0 | 23.7 | 33.9 | 32.2 | 22.9 | 17.5 | 40.7 |
| | 林可霉素 | Lincomycin | 2 | 23.7 | 19.0 | 27.1 | 37.8 | 26.5 | 23.3 | 18.6 | 15.0 | 37.9 |
| Phenicols | 氯霉素 | Chloramphenicol | 30 | 24.5 | 24.3 | 18.5 | 24.6 | 22.6 | 20.8 | 22.2 | 26.7 | 34.6 |
| 氨基环醇类 Aminocyclitols | 大观霉素 | Spectinomycin | 100 | 22.3 | 19.0 | 21.4 | 19.5 | 23.1 | 23.6 | 16.0 | 27.1 | 25.9 |

注: 庆大霉素 120、链霉素 300: 实验测定了高水平剂量下庆大霉素和链霉素对各菌株的作用。

Note: Gentamicin 120 and Streptomycin 300: High concentrations of gentamicin (120 $\mu\text{g}/\text{disc}$) and streptomycin (300 $\mu\text{g}/\text{disc}$) were also tested.

表 5 纸片扩散法得到的抑制核酸合成类抗生素的乳酸菌株药敏谱
Table 5 Susceptibility to inhibitors of nucleic acid synthesis using the disc diffusion method on Reinforced Clostridial Agar (RCA)

| 抗菌药物种类 Group | 药物名称 | Name | μg 药物/片 Potency | 抑菌圈直径 (mm) Inhibition zone diameter (mm) | | | | | | | | | |
|--|----------------|-----------------------------------|--------------------|---|------|------|------|------|------|------|------|------|--|
| | | | | ST1 | ST2 | LL | LB | LC1 | LC2 | LR | LA | BB | |
| 喹诺酮 Quinolones | 萘啶酸 | Nalidixic acid | 30 | 13.7 | 11.9 | 15.5 | 17.3 | 10.0 | 10.3 | 9.1 | 15.8 | 20.4 | |
| | 环丙沙星 | Ciprofloxacin | 5 | 16.5 | 15.8 | 11.4 | 0 | 18.5 | 15.4 | 14.9 | 0 | 12.0 | |
| | 依诺沙星 | Enoxacin | 10 | 11.2 | 9.9 | 10.3 | 8.2 | 10.9 | 9.6 | 10.1 | 0 | 0 | |
| | 左氧氟沙星 | Levofloxacin | 5 | 17.5 | 15.3 | 22.5 | 0 | 18.8 | 18.2 | 16.1 | 12.2 | 17.6 | |
| | 氧氟沙星 | Ofloxacin | 5 | 17.6 | 17.9 | 13.9 | 0 | 19.6 | 18.2 | 18.0 | 9.7 | 14.4 | |
| 叶酸代谢途径抑制剂 Folate pathway inhibitors | 甲氧苄啶 | Trimethoprim | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9.5 | 13.0 | 25.0 | 27.2 | 50.0 | |
| | 磺胺甲恶唑/ 甲氧苄啶 | Sulfamethoxazole/ Trimethoprim | 23.75/1.25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 12.1 | 43.0 | |
| 安沙霉素类 Ansamycins | 利福平 | Rifampicin | 5 | 28.4 | 23.2 | 14.6 | 28.2 | 25.3 | 24.3 | 27.9 | 37.0 | 36.9 | |

表 6 纸片扩散法得到的抑制细胞质膜的功能及干扰细菌的氧化还原酶、阻断细菌的正常代谢类抗生素的乳酸菌株药敏谱

Table 6 Susceptibility to inhibitor of cytoplasmic membrane function and inhibitor of interference with bacterial redoxase using the disc diffusion method on Reinforced Clostridial Agar (RCA)

| 抗菌药物种类 Group | 药物名称 | Name | μg 药物/片 Potency | 抑菌圈直径 (mm) Inhibition zone diameter (mm) | | | | | | | | | |
|----------------------|--------|----------------|--------------------|---|------|------|------|------|------|------|------|------|--|
| | | | | ST1 | ST2 | LL | LB | LC1 | LC2 | LR | LA | BB | |
| 脂肽类 Lipopeptides | 多粘菌素 B | Polymyxin B | 300 | 9.5 | 8.6 | 8.5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9.2 | |
| 硝基呋喃类 Nitrofurans | 呋喃妥因 | Nitrofurantoin | 300 | 19.5 | 14.8 | 12.9 | 18.5 | 10.9 | 13.1 | 21.9 | 26.9 | 35.3 | |

对于 β-内酰胺/β-内酰胺酶抑制剂复合物, 几乎所有菌株对该类药物均是敏感的, 只有 LR 菌株显示出对一种该类抗生素(替卡西林/克拉维酸)略微耐药。该类抗生素防止了细菌因产生 β-内酰胺酶而对 β-内酰胺类抗生素表现为耐药。

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。隶属于糖肽类的万古霉素尤其受到关注。万古霉素在临床上通常被推荐用来治疗对甲氧西林耐药的金黄色葡萄球菌(MRSA)的感染, 包括败血症、心内膜炎、组织和骨感染, 是通常用于经 β-内酰胺类抗生素或其他抗菌药物治疗失败后而使用的最后手段, 被认为能有效治疗由多重耐药病原菌引起的临床感染, 也通常被认为是抗菌药物的最后一道防线^[17]。但是很多学者^[18-20]发现: 诸多乳杆菌, 如干酪乳杆

菌、鼠李糖乳杆菌等以及双歧杆菌均具有对万古霉素的耐药性, 且被认为是一种天然特性, 这也就表明其耐药基因是由染色体编码, 不可传递的, 由此在安全性上降低了人们的一些顾虑。但是本次试验发现 LA 和 BB 菌株对万古霉素敏感, Masco 等^[21]将其归咎为万古霉素在琼脂上的低扩散性。由于本次试验得到的结果都是基于同一培养基的前提下, 万古霉素对于实验中的其他乳杆菌都是耐药, 唯独 LA 菌株以及双歧杆菌 BB, 因此也不能仅仅将结果判定为敏感归咎于万古霉素在琼脂上的低扩散性, 毕竟同种不同菌株间的药敏特性还是会有一定差别的。另外, 实验表明乳酸菌对替考拉宁和万古霉素表现出的药敏性基本相同。

所有试验菌株对多肽类中的杆菌肽表现为耐药。除了 LC2 菌株以外的乳杆菌都对磷霉素类的磷

霉素耐药,链球菌、乳球菌及双歧杆菌与之相反,显示了不同属之间的差异。

2.4.2 抑制蛋白质的合成类抗生素的敏感性:氨基糖苷类抗生素性质稳定,抗菌谱广,但其治疗指数(治疗剂量/中毒剂量)较其他抗生素为低。由结果可知,所有菌株都对该类抗生素耐药,只有在高水平剂量(链霉素 300 $\mu\text{g}/\text{片}$)下,乳杆菌属各菌株对其表现为敏感。通常,厌氧菌如双歧杆菌由于缺失细胞色素介导的药物转运,因而拥有对氨基糖苷类抗生素的天然抗性;也有人认为是由于双歧杆菌可分泌与糖代谢有关的酶,这些酶可分解氨基糖苷类抗生素,从而使其具有抗药性^[22]。对于氨基糖苷类的普遍耐药性,实验结果与前人的研究结论^[16,21,23]一致。

对于四环素类,包括多西环素、米诺环素以及四环素,测试菌株普遍敏感。结果与 Zhou 等^[24]的研究相近。

大环内酯类抗生素均含有一个 12–16 个碳的大内酯环,适用于轻中度感染,是目前最安全的抗生素之一。红霉素为本类的代表,临床应用广泛,对青霉素过敏者常以本品治疗。实验表明,各菌株对该类抗生素普遍敏感,BB 菌最为敏感。与青霉素类抗生素一样,显示出了其较高的安全性及有效的抑菌性。

林可酰胺类中的克林霉素是用于细菌性阴道病最常用的抗生素之一,研究表明乳杆菌中的 LA 菌株对其耐药,而其他乳酸菌都表现为敏感,表明该菌株可与克林霉素共同使用对细菌性阴道病进行恢复治疗^[10]。林可霉素的作用效果略弱于克林霉素,乳酸菌对其同样普遍敏感。

氯霉素可作用于细菌核糖核蛋白体的 50S 亚基,而阻挠蛋白质的合成,属抑菌性广谱抗生素。研究表明,除了乳酸乳球菌对其略微耐药,其他乳酸菌均对其表现敏感,双歧杆菌 BB 非常敏感。氨基环醇类的大观霉素对淋病奈瑟菌有高度抗菌活性,对产生 β -内酰胺酶的淋病奈瑟菌也有良好的抗菌活性。研究表明,除了鼠李糖乳杆菌 LR 菌株对其略微耐药,其他乳酸菌普遍表现为敏感。鼠李糖乳杆菌株 LGG 是全球最著名的益生菌之一,因具有多种生理功能而被关注,本文研究的 LR 菌株同属于鼠李糖乳杆菌种,其是否可用于抗生素的辅助性治疗,值得进一步研究。

2.4.3 抑制核酸的合成类抗生素的敏感性:喹诺酮类抗菌药物的抗菌机制是通过抑制 DNA 螺旋酶的作用、阻碍 DNA 的合成,而导致细菌死亡,同时也与细菌细胞膜孔蛋白通道的改变或缺失有关。Moubareck 等^[16]表明 50 株双歧杆菌对萘啶酸的耐药性为 100%,Masco 等^[21]表明 100 株双歧杆菌对环丙沙星普遍耐药,Zhou 等^[24]研究发现,乳杆菌和双歧杆菌均对萘啶酸耐药。以上观点与我们研究的结果是基本符合的。

实验发现,双歧杆菌 BB 菌株对叶酸代谢途径抑制剂类抗生素甲氧苄啶(TMP)和磺胺甲噁唑/甲氧苄啶(复方新诺明,SMZ-TMP)非常敏感,而其他属的乳酸菌对其基本耐药。对于抗生素甲氧苄啶的耐药性,这与 Katla 等^[23]的研究报道一致。甲氧苄啶与磺胺甲噁唑联合使用时,并未发现有产生协同增强效应,这与 Coppola 等^[14]的研究结果一致,其研究的 63 株鼠李糖乳杆菌均对磺胺甲噁唑/甲氧苄啶耐药。

对于安沙霉素类抗生素利福平的药敏性,除了乳酸乳球菌 LL 菌株对其耐药,其余分属于 3 个属的 8 株乳酸菌均对其敏感。

2.4.4 其他作用机制抗生素的敏感性:对于抑制细胞质膜的功能的脂肽类抗生素多粘菌素 B,本次试验所有乳酸菌都对其表现为耐药,因为该抗生素主要对革兰阴性杆菌有抑制或杀灭作用,实验研究的菌株均为革兰氏阳性菌。对于干扰细菌的氧化还原酶、阻断细菌的正常代谢硝基咪唑类抗生素咪唑妥因,各菌株显示了菌株本身的药敏特性,药敏结果不尽相同。

由试验结果可知,虽然通常情况下,乳酸菌对各类抗生素的敏感性以种进行划分和区别,但是种内各菌株的药敏特性还是会有差别,因此具体某株乳酸菌的耐药情况还需做药敏试验来确定,表 3–6 仅供参考及比较。

我们可以看到,同为乳杆菌属干酪乳杆菌种,菌株 LC1 和 LC2 对于阿莫西林、头孢克洛、杆菌肽和磷霉素 4 种抗生素的敏感性上显示出了菌株各自的特性。两株嗜热链球菌也显示了两者的些微差别。因此试图通过在培养基中添加抗生素从而实现选择性计数不同种或种内特定菌株,方法是可行的。所以,表 3–6 同时也提供了对乳酸菌选择性计

数的一定依据。

实验中发现, 部分抗生素和特定菌株的组合, 会产生一些特殊的抑菌圈, 如图 2 所示。本实验研究的双歧杆菌易在抑菌圈内出现突变株, 而两株干酪乳杆菌易产生双抑菌圈现象。之所以产生这样的抑菌圈, 可能是因为某些乳酸菌受到抗生素影响自发突变, 实现对该抗生素耐药的原因; 或者是因为, 有些抗生素(如本次实验中的亚胺培南)拥有增加乳酸菌(实验中的乳杆菌)突变率的能力^[25]。

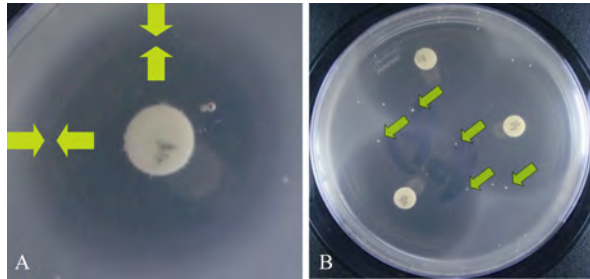


图 2 一些特殊的抑菌圈

Fig. 2 Some special inhibition zones

注: A: 抑菌圈中有连续的耐药菌落; B: 抑菌圈中有单独的耐药菌落。

Note: A: Occurrence of continuous resistant colonies in inhibition zones by the disc diffusion method; B: Ingrowth of isolated resistant colonies in inhibition zones by the disc diffusion method.

作为一种有效的方法, 重复性是一个重要考察指标。纸片扩散法药敏试验抑菌圈半径的质控允许范围在 2 mm–3 mm (NCCLS, BSAC), 即抑菌圈直径的可接受范围为 $\pm (2-3)$ mm 的偏差, 此次试验各结果的偏差大都在 ± 2 mm 以内, 最大偏差也在 ± 3 mm 以内。

目前国内药敏实验结果的判定主要参照 NCCLS 提供的抗菌药物敏感性试验执行标准进行, 而临床实验室标准化研究所(Clinical and laboratory standards institute, CLSI, 以前称 NCCLS)只给出了临床致病菌的判断标准, 没有提供针对非致病乳酸细菌的药敏标准^[10,21]。目前各文献对乳酸菌药敏性检测的方法及判断的标准尚未统一, 文献之间研究结果的相互比较性也就比较牵强了。不同的实验方法、不同的培养基、不同的评价标准都会导致结果判断的不一致。由此可见, 尽快制定出评价乳酸菌抗菌药物敏感性标准的重要性。在没有制定出相关标准前, 采用药敏纸片琼脂扩散法, 应将原始数据(抑菌圈直径)保留, 以便其他研究者参考, 不能仅提供药

敏性判定结果。

3 结论

对微生物进行抗生素敏感性测试有多种方法, 包括药物纸片琼脂扩散法(Agar disc diffusion)、肉汤稀释法(Broth macro- and microdilution)以及琼脂稀释法(Agar dilution)。药物纸片琼脂扩散法操作简单, 所费人力、时间和材料较少, 价格便宜, 是目前临床上使用最为广泛的药敏测定法^[8]。本研究采取纸片琼脂扩散法对分属于 4 个属的 9 株乳酸菌进行 19 类 51 种抗生素的敏感性测定, 较全面地了解到这些菌株的药敏谱。

选择得到的商品化 RCA 培养基适用于测定乳酸菌的药物敏感性, 该培养基成分较为简单, pH 值偏中性, 干扰因素较少, 且所有试验菌株生长良好(对测定嗜热链球菌药敏性的培养基进行了部分改良), 是乳酸菌药敏性测定的合适培养基。研究表明, 在 15 mL 灭菌并融化后的 RCA 培养基(50°C)中添加 1 mL 浓度为 1×10^8 CFU/mL 的菌悬液, 混匀后将其倾注到平皿中, 待琼脂凝固后取药敏纸片贴于琼脂表面, 静置 5 min 后翻转平皿, 微需氧条件下 37°C 恒温培养, 可得到满意的结果。培养时间的波动(1–5 d)不会造成抑菌圈直径的很大变化, 培养时间不必严格控制。该法适合目前市场上常用益生菌的药敏性测定。

研究表明乳酸菌中的乳杆菌、双歧杆菌、乳球菌和链球菌都有对某些抗生素的耐药性及对另一些抗生素的敏感性, 这与其他研究者的实验结论一致。通常情况下, 乳酸菌对各类抗生素的敏感性以种进行分类, 但是, 种内各菌株的药敏特性还是会有差别^[14]。试图通过在培养基中添加抗生素从而实现选择性计数不同种或种内特定菌株, 方法是可行的。对乳酸菌各菌株药敏谱的掌握有利于通过添加特定抗生素选择性计数特定乳酸菌。

消费者对益生菌相关产品的消费量逐年上升, 尽快建立对市场上所使用的益生菌各菌株的药敏谱显得尤为必要, 尤其是那些以促进人体健康为目的的益生菌更应建立起菌株全面的药敏谱。

参考文献

[1] 刘清泉. 最具市场竞争力的益生菌发展现状及值得关

- 注的几个问题. 中国食品添加剂, 2006(6): 47-60.
- [2] Madden JAJ, Plummer SF, Tang J, *et al.* Effect of probiotics on preventing disruption of the intestinal microflora following antibiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled pilot study. *International Immunopharmacology*, 2005(5): 1091-1097.
- [3] Sullivan A, Nord CE. Probiotics and gastrointestinal diseases. *Journal of Internal Medicine*, 2005(257): 78-92.
- [4] Saarela M, Mogensen G, Fondén R, *et al.* Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 2000(84): 197-215.
- [5] Jorgensen JH, Hindler JF. New consensus guidelines from the clinical and laboratory standards institute for antimicrobial susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. *Clinical Infectious Diseases*, 2007(44): 280-286.
- [6] 潘伟好, 李平兰, 孙承虎. 双歧杆菌的药敏性及其质粒DNA的检测. 食品科学, 2005, 26(6): 81-86.
- [7] 徐进, 刘秀梅, 杨宝兰, 等. 中国常用益生菌菌种的耐药性研究. 卫生研究, 2008(37): 354-356.
- [8] Huys G, D'haene K, Swings J. Influence of the culture medium on antibiotic susceptibility testing of food-associated lactic acid bacteria with the agar overlay disc diffusion method. *Letters in Applied Microbiology*, 2002(34): 402-406.
- [9] Danielsen M, Wind A. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 82(1): 1-11.
- [10] Ocaña V, Silva C, Nader-Macias ME. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Vaginal Lactobacilli*. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 2006(2006): 1-6.
- [11] Klare I, Konstabel C, Werner G, *et al.* Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2007(59): 900-912.
- [12] 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*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005(71): 8982-8986.
- [13] 李平兰, 潘伟好, 吕艳妮, 等. 微生态制剂中常用乳酸菌对抗生素的药敏性研究. 中国农业大学学报, 2004, 9(1): 16-20.
- [14] Coppola R, Succi M, Tremonte P, *et al.* Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *Lait*, 2005(85): 193-204.
- [15] Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, *et al.* Manual of Clinical Microbiology. 7th ed. Washington DC, USA: American Society for Microbiology, 1999: 1505-1525.
- [16] Moubarek C, Gavini F, Vaugien L, *et al.* Antimicrobial susceptibility of *bifidobacteria*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2005(55): 38-44.
- [17] Woodford N, Johnson AP, Morrison D, *et al.* Current perspective on glycopeptide resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 1995(8): 585-615.
- [18] Swenson JM, Facklamand RR, Thornsberry C. Antimicrobial susceptibility of vancomycin-resistant *Leuconostoc*, *Pediococcus*, and *Lactobacillus* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1990(34): 543-549.
- [19] Cataloluk O, Gogebakan B. Presence of drug resistance in intestinal *Lactobacilli* of dairy and human origin in Turkey. *FEMS Microbiology Letters*, 2004(236): 7-12.
- [20] Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, *et al.* Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Bifidobacterium* isolates from the human gastrointestinal tract. *Letters in Applied Microbiology*, 1998(26): 333-337.
- [21] Masco L, Van Hoorde K, De Brandt E, *et al.* Antimicrobial susceptibility of *Bifidobacterium* strains from humans, animals and probiotic products. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2006, 58(1): 85-94.
- [22] Davies J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance gene. *Science*, 1994(264): 375-382.
- [23] Katla AK, Kruse H, Johnsen G, *et al.* Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 2001(67): 147-152.
- [24] Zhou JS, Pillidge CJ, Gopal PK, *et al.* Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 2005(98): 211-217.
- [25] Mayrhofer S, Domig KJ, Mair C, *et al.* Comparison of broth microdilution, Etest, and agar disk diffusion methods for antimicrobial susceptibility testing of *Lactobacillus acidophilus* group members. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008(74): 3745-3748.