

酸奶中保加利亚乳杆菌药物敏感性分析

周 宁, 张建新, 樊明涛, 王 静, 李子龙, 魏新元*

(西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100)

摘 要: 从酸奶中分离保加利亚乳杆菌, 对其遗传多样性和药物敏感性进行分析, 并进一步对耐药菌株的抗性基因进行检测。利用改良MRS培养基, 从国内不同品牌酸奶中分离获得18株保加利亚乳杆菌。18株分离菌先经RAPD分型后采用琼脂稀释法测定其对11种抗生素的药敏性, 并通过PCR对耐药菌株中可能存在的抗性基因进行检测。结果显示, 18株受试菌具有明显的遗传多样性和耐药表型多样性。18株菌全部对罗红霉素敏感, 而全部对卡那霉素耐药; 对氨苄青霉素、青霉素G、金霉素、氯霉素、四环素、林克霉素、链霉素、新霉素及庆大霉素等9种抗生素均表现出不同程度的耐药性。通过检测耐药菌株的抗性基因, 从1株菌(B-8)中检出四环素抗性基因 $tet(M)$, 从2株菌(B-8和B-41)中检出链霉素抗性基因 $ant(6)$, 从4株菌(B-43、B-47、B-49和B-51)中检出卡那霉素抗性基因 $aph(3')$ -IIIa。结果表明, 供试18株保加利亚乳杆菌多重耐药现象比较严重。

关键词: 保加利亚乳杆菌; 遗传多样性; 药敏性; RAPD分型; 抗性基因

Antibiotic Susceptibility of *Lactobacillus bulgaricus* Isolated from Yoghurt

ZHOU Ning, ZHANG Jian-xin, FAN Ming-tao, WANG Jing, LI Zi-long, WEI Xin-yuan*

(College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: *Lactobacillus bulgaricus* strains were isolated from different yoghurt brands produced in different regions in China and analyzed for genetic diversity and antibiotic susceptibility. Further, antibiotic-resistant isolates were subjected to genetic analysis. A total of 18 *Lactobacillus bulgaricus* strains were obtained using modified MRS medium. They were subjected to RAPD typing and analyzed for susceptibility to 11 different antibiotics. Besides, their potential antibiotic-resistance genes were detected by PCR. The results showed that 18 *Lactobacillus bulgaricus* isolates had considerable genetic diversity and diverse antibiotic-resistance phenotypes. All of them were susceptible to roxithromycin and resistant to kanamycin. Meanwhile, they also could resist ampicillin, penicillin G, chlortetracycline, chloramphenicol, tetracycline, lincomycin, streptomycin, neomycin and gentamycin to different extents. $tet(M)$ gene was detected in isolate B-8, and $ant(6)$ gene in both B-8 and B-41, and $aph(3')$ -IIIa gene in B-43, B-47, B-49 and B-51. These findings suggested that 18 *Lactobacillus bulgaricus* isolates had serious multiple antibiotic resistance.

Key words: *Lactobacillus bulgaricus*; genetic diversity; antibiotic susceptibility; RAPD; resistance genes

中图分类号: TS252.54

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)21-0202-06

作为安全的食用菌种, 乳酸菌用于食品工业已有悠久的历史, 因此它们对抗生素的耐药性常被忽视。然而, 近年陆续报道食品中使用的乳酸菌有的也产生了耐药性, 并有增强趋势, 甚至在有些耐药株中已检测到抗性基因^[1-3]。乳酸菌耐药性包括固有耐药性和获得性耐药性。固有耐药性是指细菌天生对抗生素不敏感, 是细胞固有的稳定的遗传特性。获得性耐药性是指细菌在抗菌药物的选择性压力下经过基因突变、潜伏基因的表达,

或细菌通过转化、转导或接合等基因水平转移方式获得外源抗性基因并表达, 从而表现耐药特性^[4]。乳酸菌可能或已经成为抗性基因的受体或作为供体向其他细菌转移抗性基因的中介体^[5]。酸奶作为日常食用的奶制品, 其良好的口感以及所含乳酸菌的益生功能深受人们喜爱, 因此在人体胃肠道内, 食用乳酸菌有可能通过基因水平转移方式获得其他细菌的抗性基因, 或者将携带的抗性基因转移给胃肠道内的致病菌, 使致病菌获得耐药性或导

收稿日期: 2011-09-07

基金项目: 高等学校博士点科研基金项目(20090204120028); 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-30);

西北农林科技大学基本科研业务费专项(QN2011138)

作者简介: 周宁(1986—), 男, 硕士, 研究方向为食品微生物及分子生物学。E-mail: zhouning87330@126.com

*通信作者: 魏新元(1971—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为食品微生物及分子生物学。E-mail: wheixinyuan@126.com

致病菌抗性增强,给疾病的治疗带来困难。因此,食用乳酸菌在应用前应检测其耐药性,尽量选择敏感性的乳酸菌,减少和避免带来安全隐患。

保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus bulgaricus*),又名德氏乳杆菌保加利亚亚种,是典型的来自于乳品的乳酸菌,最初由自然发酵乳酪中分离,已有100多年的使用历史,它在酸奶发酵过程中能产酸产香,是酸奶发酵的主要菌种之一^[6]。本研究分析分离自不同品牌酸奶中保加利亚乳杆菌的遗传多样性,检测它们的耐药性,并对耐药菌株可能含有的抗性基因进行检测,以期对保加利亚乳杆菌在食品工业中的安全使用提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株与培养基

菌株:18株保加利亚乳杆菌,分离自各地不同品牌市售酸奶(包装上注明发酵菌种仅为保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌两种菌)。

培养基:MRS琼脂培养基、改良MRS琼脂培养基(含0.75% CaCO₃)、MRS液体培养基和脱脂乳培养基均按参考文献[7]配制。

1.2 试剂与仪器

氨苄青霉素(ampicillin, AMP)、青霉素G(penicillin G, PEN)、四环素(tetracycline, TET)、链霉素(streptomycin, STR)、氯霉素(chloramphenicol, CHL)、庆大霉素(gentamycin, GEN)、林可霉素(lincomycin, LIN)、卡那霉素(kanamycin, KAN)、罗红霉素(roxithromycin, ROX)、金霉素(chlortetracycline, CHT)和新霉素(neomycin, NEO) 加拿大BBI公司;PCR反应试剂盒 宝生物工程(大连)有限公司;引物由生工生物工程(上海)有限公司合成;DNA凝胶回收试剂盒购自爱思进生物技术(杭州)有限公司。

CX31显微镜 奥林巴斯(中国)有限公司;PTC-200 PCR扩增仪 美国MJ Research公司;凝胶成像分析系统 美国伯乐公司。

1.3 方法

1.3.1 保加利亚乳杆菌的分离与鉴定

采用混菌法将适当稀释度的酸奶与改良MRS琼脂培养基混匀倒平板,凝固后37℃培养48h,挑取有明显溶钙圈的菌落于MRS琼脂平板上进一步划线分离纯化2次。然后利用革兰氏染色试剂盒对纯化菌株进行革兰氏染色鉴定,观察其形态和革兰氏染色特征,确定菌株种类。同时将各对应菌株接种于灭菌的脱脂乳试管培养基中,37℃培养48h,进行凝乳实验鉴定。

革兰氏染色阳性、杆状且具有凝乳效果的分离菌进一步通过测定16S rDNA进行确证。16S rDNA-

PCR以通用引物27f(AGAGTTTGATCCTGGCTCAG)和1495R(CTACGGCTACCTTGTACGA)为上下游引物,扩增条件参考文献[8]进行。扩增产物经琼脂糖凝胶试剂盒回收纯化后进行克隆测序。

1.3.2 保加利亚乳杆菌的RAPD分型

采用CTAB法提取保加利亚乳杆菌各分离菌株的基因组DNA^[9],然后以基因组DNA为模板,利用随机引物CRA23(5'-GCGATCCCCA-3')进行PCR扩增^[10-11]。扩增条件为94℃预变性4min;94℃变性30s,36℃退火1min,72℃延伸2min,35个循环;72℃延伸7min。反应结束后扩增产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳分离,EB染色后在凝胶成像系统上成像,实验重复3次。将电泳图谱上清晰且可重复出现的条带赋值为“1”,同一位置无条带的赋值为“0”,由此生成“0”和“1”数据矩阵。数据用NTSYS2软件进行UPGMA(unweighted pair group method with arithmetic mean)聚类分析,建立分离株的亲缘关系聚类树型图。

1.3.3 保加利亚乳杆菌的药物敏感性实验

参照美国临床实验室标准化协会(clinical and laboratory standards institute, CLSI)公布的琼脂稀释法进行药敏性实验^[12]。首先将氨苄青霉素、青霉素G、四环素、链霉素、氯霉素、庆大霉素、林可霉素、卡那霉素、罗红霉素、金霉素和新霉素等11种抗生素分别使用合适的溶剂配制成5120μg/mL的贮存液。使用时将贮存液用无菌去离子水进行2倍系列稀释,使抗生素溶液的系列质量浓度依次为5120、2560、1280、640、320、160、80、40、20、10、5、2.5、1.25μg/mL,然后将上述稀释的抗生素溶液2mL与18mL融化的MRS培养基混匀后倒平板,则平板中抗生素终质量浓度依次为512、256、128、64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25、0.125μg/mL,将5μL菌体浓度为0.5麦氏浊度的各分离菌株悬液点种在含药平板上,每个抗生素质量浓度各菌株重复两次,同时设无抗生素平板对照。37℃培养24h,观察和记录各菌株的最低抑菌质量浓度(minimal inhibitory concentration, MIC),即肉眼观察能抑制菌株生长的最低抗生素质量浓度,并根据不同抗生素针对保加利亚乳杆菌的耐药折点(breakpoint, BP)对其进行分析。

1.3.4 抗性基因检测

根据耐药性分析结果,采用PCR对可能的抗性基因进行检测。根据已报道的各抗性基因设计引物,所检测的抗性基因有:四环素抗性基因tet(M)、tet(W)、tet(S)、tet(K)、tet(L)和tet(O),链霉素抗性基因str(A)、str(B)和ant(6),氯霉素抗性基因cat(A),庆大霉素抗性基因aac(6')-aph(2'')以及卡那霉素抗性基因aph(3')-IIIa,所用引物序列及PCR扩增条件见表1。扩增产物以1.5%琼脂糖凝胶进行电泳分离,目标条带经DNA凝胶回收试剂盒纯化后进行测序分析。

表 1 抗性基因检测用引物及PCR扩增条件

Table 1 Primers and PCR programs for the detection of selected antibiotic-resistance genes in <i>L. bulgaricus</i> strains					
基因	引物	引物序列	PCR扩增条件	产物大小/bp	参考文献
tet(M)	tetM-F	GTGGACAAAGGTACAACGAG	94℃、30s; 53℃、60s; 72℃、30s; 30个循环	406	[13]
	tetM-R	CGGTAAAGTTCGTCACACAC			
tet(S)	tetS-F	ATCAAGATATTAAGGAC	94℃、30s; 55℃、60s; 72℃、30s; 30个循环	573	[14]
	tetS-R	TTCTCTATGTGGTAATC			
tet(W)	tetW-F	GAGAGCCTGCTATATGCCAGC	94℃、30s; 64℃、60s; 72℃、30s; 30个循环	168	[15]
	tetW-R	GGGCGTATCCACAATGTTAAC			
tet(K)	tetK-F	TTAGGTGAAGGGTTAGGTCC	94℃、30s; 55℃、60s; 72℃、30s; 30个循环	697	[16]
	tetK-R	GCAAACCTCATTCCAGAAGCA			
tet(L)	tetL-F	CATTTGGTCTTATTGGATCG	94℃、30s; 50℃、60s; 72℃、30s; 30个循环	456	[16]
	tetL-R	ATTACACTTCCGATTTCGG			
tet(O)	tetO-F	AACTTAGGCATTCTGGCTCAC	94℃、30s; 55℃、60s; 72℃、30s; 30个循环	515	[13]
	tetO-R	TCCCACTGTTCCATATCGTCA			
str(A)	strA-F	CTTGGTGATAACGGCAATTC	94℃、30s; 55℃、60s; 72℃、30s; 30个循环	548	[17]
	strA-R	CCAATCGCAGATAGAAGGC			
str(B)	strB-F	ATCGTCAAGGGATTGAAACC	94℃、30s; 56℃、60s; 72℃、30s; 30个循环	509	[17]
	strB-R	GGATCGTAGAACATATTGGC			
ant(6)	ant6-F	ACTGGCTTAATCAATTTGGG	94℃、30s; 53℃、60s; 72℃、30s; 30个循环	597	[18]
	ant6-R	GCCTTTCCGCCACCTCACCG			
cat(A)	catA-F	GGATATGAAATTTATCCCTC	94℃、30s; 50℃、60s; 72℃、30s; 30个循环	486	[16]
	catA-R	GGATATGAAATTTATCCCTC			
aac(6')-	aac-F	CCAAGAGCAATAAGGGCATACC	94℃、30s; 58℃、60s; 72℃、30s; 30个循环	675	[19]
aph(2'')	aac-R	ACCCTCAAAAAGTGTGTTGC			
aph(3')-IIIa	aph3'-F	GCCGATGTGGATTGCGAAAA	94℃、30s; 55℃、60s; 72℃、30s; 30个循环	292	[18]
	aph3'-R	GCTTGATCCCCAGTAAGTCA			

2 结果与分析

2.1 酸奶中保加利亚乳杆菌的分离与鉴定

为了便于从不同酸奶中分离获得保加利亚乳杆菌进行进一步研究，本实验从本地超市或从酸奶产地购买市售的仅由保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌进行双菌发酵的不同品牌酸奶，将酸奶进行系列稀释后，选取一定稀释度的稀释液与改良的MRS培养基进行混菌培养分离。由于乳酸菌发酵产生的乳酸可以使培养基中的CaCO₃发生溶解，因此在菌落周围形成溶钙圈，这为乳酸菌的初步筛选提供了依据。挑取溶钙圈明显的单菌落在MRS平板上进一步划线分离，然后将划线分离后形成的单菌落进行革兰氏染色观察，同时将对应菌落进行凝乳实验。油镜下观察菌体呈紫色(革兰氏阳性)、杆状、单一细胞或细胞链状排列、无芽孢并能产生凝乳现象的菌株，将其认定为保加利亚乳杆菌(数据略)，共分离获得18株菌株。进一步对其进行16S rDNA序列分析，最终确定18株菌均为保加利亚乳杆菌。

2.2 保加利亚乳杆菌分离株的RAPD多态性分析

通过对比不同的随机引物，最后选用引物CRA23对18株分离菌株进行PCR随机扩增。扩增产物电泳结果显示，扩增谱带具有明显的多态性，如图1的电泳图。利用NTSYS软件分析系统，经UPGMA法生成反映各菌株间

相似性的系统发育树，如图1的树状图。在49%的相对相似性水平上，18株受试菌才归为一类，说明了18株菌间基因组差异比较大。在18株受试菌株中，B-49和B-52号菌株之间基因型最为接近，其余菌株之间遗传差异各不相同，这表明获得的18株保加利亚乳杆菌具有很明显的遗传多态性。

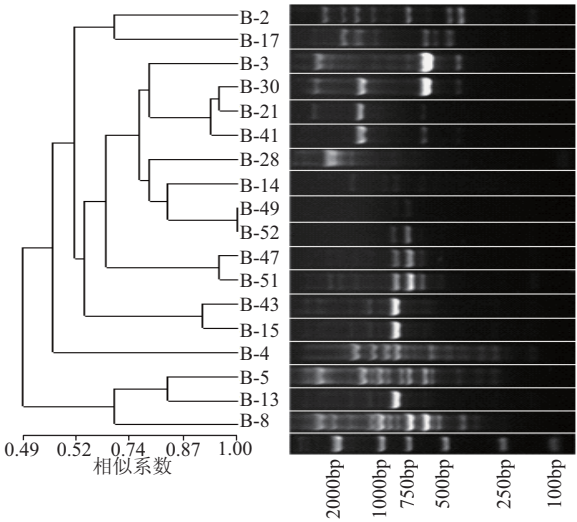


图 1 18株保加利亚乳杆菌RAPD分型及聚类分析
Fig.1 RAPD typing and cluster analysis of 18 *L. bulgaricus* isolates

2.3 保加利亚乳杆菌的耐药性分析

2.3.1 耐药性分析

利用琼脂稀释法测定6大类中的11种抗生素对18株保加利亚乳杆菌的MIC值, 然后根据文献[17,20-22]推荐的保加利亚乳杆菌的耐药折点BP, 将MIC值与各BP值进行比较判定菌株耐药或敏感, MIC值低于或等于BP值的判定为敏感, 高于BP值即为耐药, 统计结果见表2。18株菌株对不同的抗生素具有不同的药物敏感性。对抑制细胞壁合成类抗生素, 大部分菌株对本实验用的两种青霉素类抗生素敏感, 11.1%的受试菌株分别对氨苄青霉素和青霉素G耐药, 而耐药株菌的MIC值为2 μ g/mL, 仅高出耐药折点1 μ g/mL一倍。

对抑制蛋白质合成类抗生素, 大环内酯类抗生素罗红霉素对保加利亚乳杆菌具有较强的抑制作用, 18株(100%)受试菌全部对罗红霉素敏感, 而且耐药折点也很低, 仅为1 μ g/mL。33.3%和55.6%的受试菌株分别对氯霉素及林可霉素耐药, 这两种抗生素分别属于氯霉素类和林可霉素类抗生素。对于四环素类抗生素, 相比对金霉素16.7%的耐药率, 50%的菌株对四环素耐药, 且金霉素的耐药折点(1 μ g/mL)也低于四环素的耐药折点(4 μ g/mL)。氨基糖苷类抗生素对保加利亚乳杆菌具有较低的抑制作用, 耐药折点也较高。18株受试菌全部对卡那霉素耐药(BP=16 μ g/mL), 88.9%的菌株对链霉素耐药(BP=16 μ g/mL), 77.8%的菌株分别对新霉素(BP=32 μ g/mL)和庆大霉素(BP=16 μ g/mL)耐药。

2.3.2 耐药表型的多态性分析

在对18株保加利亚乳杆菌的耐药性进行分析的基础上, 本实验也利用NTSYS软件系统, 采用UPGMA法对各菌株的耐药表型的多态性进行了聚类分析, 见图2。结果发现, 18株受试菌中每株菌至少耐两种或两种以上抗生素, 且94.4%的菌株可耐4~8种抗生素, 多重耐药现象严重。

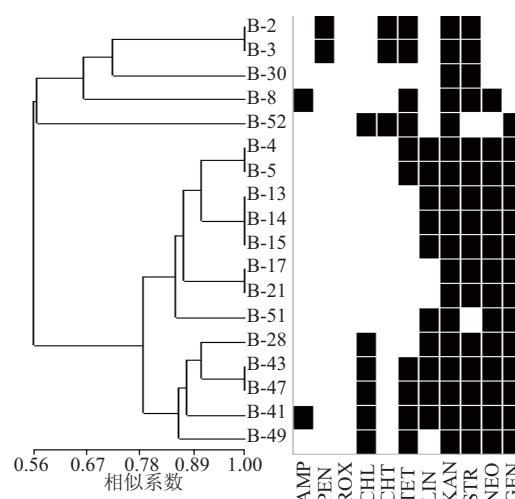


图2 18株保加利亚乳杆菌耐药表型聚类分析

Fig.2 Cluster analysis for antibiotic-resistance phenotype classification of 18 *L. bulgaricus* isolates

2.4 抗性基因检测

根据已经报道的部分抗生素抗性基因设计引物, 然后通过PCR扩增对抗性基因进行了检测, 结果见表3。通过对9株四环素耐药菌株中tet(M)、tet(W)、tet(S)、tet(K)、tet(L)和tet(O)进行PCR检测, 仅检测到菌株B-8含有tet(M)基因; 对16株链霉素耐药菌株的str(A)、str(B)和ant(6)抗性基因进行检测, 检测到2株菌B-8和B-41含有链霉素抗性基因ant(6); 在18株卡那霉素耐药株中也检测到4株菌(B-43、B-47、B-49及B-51)含有aph(3')-IIIa抗性基因; 其他抗性基因如氯霉素抗性基因cat(A)及庆大霉素抗性基因aac(6')-aph(2'')在相关耐药菌株中均未检出。除表3中所列基因在相应的菌株中被检出外, 其他基因在均未检出。

表2 18株保加利亚乳杆菌对11种抗生素的MIC分布结果

Table 2 Distribution of MICs of 11 antibiotics to 18 *L. bulgaricus* isolates

抗生素类别		名称	MIC值/(μg/mL)												耐药折点/ (μg/mL)	耐药率/%	
			≤0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256			≥512
抑制细胞壁合成	青霉素类	AMP	4	2	7	3	2								1 ^a	11.1	
		PEN	5	5	4	2	2								1 ^c	11.1	
	大环内酯类	ROX		2	4	12									1 ^c	0	
		氯霉素类	CHL					2	10	5	1					4 ^a	33.3
		林可霉素类	LIN	1					7	5	5					4 ^c	55.6
抑制蛋白质合成	四环素类	CHT	4	1	4	6	2	1							1 ^c	16.7	
		TET					2	6	8	1					4 ^a	50.0	
	氨基糖苷类	KAN										3	3	12	16 ^a	100	
		STR							1	1	1	5	1	3	6	16 ^a	88.9
		NEO							1			3	1	10	3	32 ^b	77.8
		GEN						1		3	3	5	6			16 ^a	77.8

注: a. 欧洲食品安全局 (EFSA) 推荐耐药折点^[22]; b. 欧盟委员会 (EC) 推荐耐药折点^[21]; c. 参照文献 [17,20] 的耐药折点自定义。

表3 检测含有抗性基因的保加利亚乳杆菌及其MIC值
Table 3 Antibiotic resistance genes detected in *L. bulgaricus* isolates and corresponding MICs

菌株	抗生素(MIC/(μg/mL))	检测到的抗性基因
B-8	四环素(16)	<i>tet(M)</i>
	链霉素(64)	<i>ant(6)</i>
B-41	链霉素(512)	<i>ant(6)</i>
B-43	卡那霉素(≥512)	<i>aph(3')-IIIa</i>
B-47	卡那霉素(512)	<i>aph(3')-IIIa</i>
B-49	卡那霉素(512)	<i>aph(3')-IIIa</i>
B-51	卡那霉素(256)	<i>aph(3')-IIIa</i>

3 讨论

3.1 药物敏感性分析

由于现在国际上尚无测定乳酸菌药敏性的标准文件, 本实验参考了CLSI公布的致病菌药敏性实验方法^[12], 耐药折点的确定参考已有的文献^[17,20]或文件^[21-22]。并选用被称为药敏测定“金标准”的琼脂稀释法进行药敏实验。药敏实验中选用MRS培养基, 这不同于CLSI针对致病菌要求的M-H培养基, 因为保加利亚乳杆菌在M-H培养基上生长不太好, 影响了MIC值的判读, 且研究已发现MRS培养基对抗生素活性并无明显影响^[20]。

药敏实验结果表明, 18株保加利亚乳杆菌对不同类型的抗生素具有不同的敏感性, 即使对同类的不同种抗生素, 药敏性也存在差异。对于抑制细菌细胞壁合成的青霉素类抗生素, 18株受试菌均具有较高的敏感性(图2), 这与Katla^[23]、Klare^[2]等的研究结果较为一致。对抑制细菌蛋白质合成的抗生素, 18株菌全部对大环内酯类抗生素罗红霉素敏感, 表明罗红霉素对乳杆菌有较强的抑制作用; 对氯霉素类、四环素类和林可霉素类抗生素表现为中度耐药; 对氨基糖苷类抗生素表现为高度耐药。其中, 四环素类抗生素中, 金霉素明显比四环素对乳杆菌的抑制作用强; 氨基糖苷类抗生素中, 卡那霉素、链霉素及新霉素的抑菌效果比庆大霉素明显, 这可能与庆大霉素能较好的通过细胞膜有关。

3.2 遗传多样性及其与耐药多态性的关系

18株受试菌具有丰富的遗传多样性, 这可能是由于受试菌株分离自不同产地的酸奶, 也可能与酸奶的生产加工条件不同有关。18株保加利亚乳杆菌既具有较高的遗传多样性, 也具有较高的耐药表型多态性, 但遗传多样性与耐药多态性之间并无明显相关性。比较图1与图2发现, 基因型相近的菌株, 如B-49与B-52或B-30、B-21与B-41, 它们的耐药谱并不相同; 而耐药谱相近的菌株, 如B-2与B-3, B-4与B-5, B-13与B-14、B-15, B-17与B-21以及B-43与B-47, 它们的基因型也并非最近。

3.3 耐药基因检测

已有文献报道^[14,24-25], 部分耐药乳杆菌中存在不同的

四环素抗性基因(*tet*基因), 其中*tet(M)*最常检出, 在植物乳杆菌、弯曲乳杆菌、干酪乳杆菌、嗜酸乳杆菌、戈氏乳杆菌及耐酸乳杆菌中已检测到*tet(M)*基因。本实验从9株四环素耐药菌株中仅检测到菌株B-8含有*tet(M)*基因, 且B-8对四环素具有最高的耐药性(MIC=16μg/mL); 从16株耐链霉素菌株中仅检出2株菌(B-8和B-41)含有*ant(6)*基因, 但并非此两株菌的MIC最高; 编码卡那霉素抗性的*aph(3')-IIIa*基因从4株耐药菌株中检出, 但它们也并不是耐受卡那霉素最高者(数据未列出), 其他抗性基因在所有菌株中都未被检出。这说明耐药性与抗性基因的检出没有直接关系, 可能还存在其他的耐药机制; 而且, 这些被检出抗性基因是否为细菌特有或是来自外源基因的水平转移, 它们是否会转移给其他细菌, 并将以什么方式进行转移尚待研究。

抗性基因的水平转移是当前面临的非常严肃的食品安全以及生态安全问题。本研究发现, 从不同品牌酸奶中分离的18株保加利亚乳杆菌多重耐药现象严重, 在耐药菌株中可检测到部分抗性基因的存在。这些抗性基因的潜在转移性给食品安全造成了隐患, 因此必须建立乳酸菌耐药性的检测、监测标准方法与体系, 健全评价食品中乳酸菌安全性的机制。

参考文献:

- [1] D'AIMMO M R, MODESTO M, BIAVATI B. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. isolated from dairy and pharmaceutical products[J]. Int J Food Microbiol, 2007, 15(1): 35-42.
- [2] 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[J]. J Antimicrob Chemother, 2007, 59(5): 900-912.
- [3] LIU Chang, ZHANG Zhuoyang, DONG Ke, et al. Antibiotic resistance of probiotic strains of lactic acid bacteria isolated from marketed foods and drugs[J]. Biomed Environ Sci, 2009, 22(5): 401-412.
- [4] TENOVER F C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria[J]. Am J Med, 2006, 119(6A): S3-S10.
- [5] WALTHER C, ROSSANO A, THOMANN A, et al. Antibiotic resistance in *Lactococcus* species from bovine milk: presence of a mutated multidrug transporter *mdt(A)* gene in susceptible *Lactococcus garvieae* strains[J]. Vet Microbiol, 2008, 131(3/4): 348-357.
- [6] 白卫东, 赵文红, 梁桂凤, 等. 保加利亚乳杆菌的特性及其应用[J]. 中国酿造, 2009(8): 10-14.
- [7] 凌代文. 乳酸菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 85-86.
- [8] SCARPELLINI M, MORA D, COLOMBO S, et al. Development of genus/species-specific PCR analysis for identification of *Carnobacterium* strains[J]. Curr Microbiol, 2002, 45(1): 24-29.
- [9] KOWALCHUK G A, de BRUIJN F J, HEAD I M, et al. Molecular microbial ecology manual: simplified protocols for the preparation of genomic DNA from bacterial cultures[M]. 2nd ed. Netherlands: Kluwer Academic Publisher, 2004: 3-18.
- [10] DAUD KHALED A K, NEILAN B A, HENRIKSSON A, et al. Identification and phylogenetic analysis of *Lactobacillus* using multiplex RAPD-PCR[J]. FEMS Microbiol Lett, 1997, 153(1): 191-197.

- [11] SPANO G, BENEDUCE L, TARANTINO D, et al. Characterization of *Lactobacillus plantarum* from wine must by PCR species-specific and RAPD-PCR[J]. Lett Appl Microbiol, 2002, 35(5): 370-374.
- [12] Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically[M]. 8ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009.
- [13] NG L K, MARTIN I, ALFA M, et al. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes[J]. Mol Cell Probes, 2001, 15(4): 209-215.
- [14] GEVERS D, DANIELSEN M, HUYS G, et al. Molecular characterization of *tet(M)* genes in *Lactobacillus* isolates from different types of fermented dry sausage[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(2): 1270-1275.
- [15] AMINOV R I, GARRIGUES-JEANJEAN N, MACKIE R I. Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(1): 22-32.
- [16] AARESTRUP F M, AGERSO Y, GERNER-SMIDT P, et al. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2000, 37(2): 127-137.
- [17] OUOBA L I, LEI V, JENSEN L B. Resistance of potential probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria of African and European origin to antimicrobials: determination and transferability of the resistance genes to other bacteria[J]. Int J Food Microbiol, 2008, 121(2): 217-224.
- [18] ROJO-BEZARES B, SÁENZ Y, POETA P, et al. Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolated from wine[J]. Int J Food Microbiol, 2006, 111(3): 234-240.
- [19] KOBAYASHI N, ALAM M, NISHIMOTO Y, et al. Distribution of aminoglycoside resistance genes in recent clinical isolates of *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus avium*[J]. Epidemiol Infect, 2001, 126(2): 197-204.
- [20] DANIELSEN M, WIND A. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents[J]. Int J Food Microbiol, 2003, 26, 82(1): 1-11.
- [21] EC (European Commission). Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the criteria for assessing the safety of microorganism resistant to antibiotics of human clinical and veterinary importance[C]. Adopted on 3 July 2001, revised on 24 January 2003. http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out108_en.pdf.
- [22] EFSA. Technical guidance prepared by the Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) on the update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance[J]. The EFSA Journal, 2008, 732: 1-15.
- [23] KATLA A K, KRUSE H, JOHNSEN G, et al. Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products[J]. Int J Food Microbiol, 2001, 67(1/2): 147-152.
- [24] DANIELSEN M. Characterization of the tetracycline resistance plasmid pMD5057 from *Lactobacillus plantarum* 5057 reveals a composite structure[J]. Plasmid, 2002, 48(2): 98-103.
- [25] CATALOLUK O, GOGEBAKAN B. Presence of drug resistance in intestinal lactobacilli of dairy and human origin in Turkey[J]. FEMS Microbiol Lett, 2004, 236(1): 7-12.