

研究报告

具有拮抗空肠弯曲杆菌能力鸡源乳酸菌的筛选及特性

张婷婷^{1,2} 翟齐啸^{1,2} 金星^{1,2} 王刚^{1,2} 张秋香^{1,2} 刘小鸣^{1,2} 赵建新^{1,2}

田丰伟^{1,2*} 张灏^{1,2} 陈卫^{1,2}

(1. 江南大学食品学院 江苏 无锡 214122)

(2. 食品安全与质量控制协同创新中心 江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】从鸡粪中筛选具有拮抗空肠弯曲杆菌能力的乳酸菌,研究其肠道益生特性,探讨其对空肠弯曲杆菌鞭毛毒力因子的影响。【方法】利用牛津杯法测定40株鸡粪源乳酸菌菌株的抑菌活性以确定抑菌性能好的菌株,利用16S rRNA基因分析进行菌株鉴定,采用HT-29细胞测定菌株的细胞粘附能力,通过模拟胃肠液实验分析菌株对胃肠道环境的耐受性,利用扫描电镜分析乳酸菌无细胞提取物对空肠弯曲杆菌鞭毛毒力因子的影响。【结果】从鸡粪中分离得到40株菌株,进一步筛选得到X13、X14和G20等3株拮抗空肠弯曲杆菌能力较强的菌株,经16S rRNA基因序列分析分别鉴定为罗伊氏乳杆菌、唾液乳杆菌和鸡乳杆菌;HT-29细胞粘附实验表明X13、X14及G20的粘附指数分别为11.5、20.3和14.3个/细胞,均具有良好的粘附能力;3株乳酸菌对人工胃肠液均具有良好的耐受性;扫描电镜观察表明,与对照组相比,3株纯培养乳酸菌无细胞提取物均能抑制空肠弯曲杆菌鞭毛毒力因子的合成。【结论】从鸡粪中筛选得到了3株能有效抑制空肠弯曲杆菌生长并能抑制其鞭毛合成的乳酸菌,有望作为拮抗性饲用益生菌用于控制禽畜的空肠弯曲杆菌感染。

关键词: 鸡源乳酸菌, 空肠弯曲杆菌, 拮抗, 扫描电子显微镜

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31371721, 31470161, 31301407, 31530056); Development Program in Collaborative Innovation Center for Food Safety and Quality Control of Jiangsu Province; Self-determined Research Program of Jiangnan University (No. JUSRP115A23); Key Technologies R&D Program of China (No. 2013BAD18B01)

***Corresponding author:** Tel/Fax: 86-510-85912155; E-mail: fwtian@jiangnan.edu.cn

Received: January 15, 2016; **Accepted:** April 26, 2016; **Published online** (www.cnki.net): May 04, 2016

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31371721, 31470161, 31301407, 31530056); 江苏省“食品安全与质量控制协同创新中心”项目; 江南大学自主科研基金(No. JUSRP115A23); 国家科技支撑计划项目(No. 2013BAD18B01)

***通讯作者:** Tel/Fax: 86-510-85912155; E-mail: fwtian@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2016-01-15; **接受日期:** 2016-04-26; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-05-04

Screening and characterization of lactic acid bacteria with antagonistic activities against *Campylobacter jejuni* from chicken manure

ZHANG Ting-Ting^{1,2} ZHAI Qi-Xiao^{1,2} JIN Xing^{1,2} WANG Gang^{1,2} ZHANG Qiu-Xiang^{1,2}
LIU Xiao-Ming^{1,2} ZHAO Jian-Xin^{1,2} TIAN Feng-Wei^{1,2*} ZHANG Hao^{1,2} CHEN Wei^{1,2}

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. Collaborative Innovation Center for Food Safety and Quality Control, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] This study is aimed to screen and identify new lactic acid bacteria (LAB) with antagonistic activities against *Campylobacter jejuni* from chicken manure, to understand their intestinal probiotic properties, and to probe the effects of LAB's cell-free extracts on the virulence factor, flagella formation of *C. jejuni*. [Methods] The inhibition activities of 40 strains isolated from chicken manure were analyzed based on an oxford cup method to screen the strains with excellent antagonistic inhibitory effects on the indicator bacteria *C. jejuni*. The 16S rRNA gene-based technique was used to identify the selected strains. The adherence abilities of LAB strains to human intestinal epithelial cell (HT-29) were evaluated. The tolerance of LAB strains to artificial gastrointestinal juices was tested. Scanning electron microscopy was used to observe the effects of LAB's cell-free extract on the flagella formation of *C. jejuni*. [Results] Forty LAB strains were isolated from chicken manure, among which X13, X14 and G20 strain showed the strongest antagonistic activities against *C. jejuni*. The 16S rRNA gene sequence analysis showed that X13, X14, and G20 strain were respectively identified as *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus gallinarum*. HT-29 cell adhesion tests showed that the adhesion index of X13, X14, and G20 were respectively 11.5, 20.3, and 14.3 cells per HT-29 cell, such results suggests that all these three strains showed strong adhesion abilities to HT-29 cell. Tolerance tests to artificial gastrointestinal juices showed that all these three strains showed good capabilities. SEM observation showed that the cell-free extracts of these three strains were able to inhibit the flagella formation of *C. jejuni*. [Conclusion] Three selected LAB strains from chicken manure have inhibit the growth and the flagella formation of *C. jejuni* in vitro effectively, which suggested that such three LAB strains could be used as potential animal protective probiotics for the control of *C. jejuni* infection in vivo.

Keywords: Lactobacillus from chicken, *Campylobacter jejuni*, Antagonism, Scanning electron microscopy

空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*, *C. jejuni*)是一种广泛存在于温血动物肠道、以单端或双端生鞭毛运动的革兰氏阴性细菌^[1]。鸡是空肠弯曲杆菌带菌率最高的动物(最高可达 100%)^[2], 空肠弯曲杆菌可通过禽类产品感染人类, 从而导致细菌性腹泻的发生^[3], 空肠弯曲杆菌腹泻已成为重要的食源性疾病之一^[4]。

目前主要采用抗生素来进行空肠弯曲杆菌感染的治疗, 但也面临着日益严重的耐药性问题^[5-7]。近年来, 利用乳酸菌生物拮抗来控制空肠弯杆菌和

保障禽类食品安全受到广泛的关注。乳酸菌生物拮抗 *C. jejuni* 的机理包括产生抑菌物质如有机酸、过氧化氢及细菌素^[8-11]以及乳酸菌的空间占位效应等^[12]。研究表明给肉鸡饲喂乳酸菌能降低 *C. jejuni* 的定殖量^[13]。鞭毛是 *C. jejuni* 的重要毒力因子, 能帮助其穿透肠粘液层, 进而粘附并侵入肠上皮细胞而引起感染。一些乳酸菌如 *L. acidophilus* La-5 和 *B. longum* NCC2705 能够抑制鞭毛蛋白编码基因 *flaA* 的表达^[14], 从而影响鞭毛合成。然而发生鞭毛缺失和缩短的突变株已不能感染幼龄仔鸡^[15]。

基于此,本研究从鸡粪来源中分离筛选并鉴定生物拮抗性突出的乳酸菌,考察其对 HT-29 细胞的粘附情况,测定分离菌株对模拟胃肠条件的耐受能力及对空肠弯曲杆菌鞭毛合成的影响,为饲用益生乳酸菌的开发和应用提供指导。

1 材料与方法

1.1 样品和菌种

鸡粪:采集自江苏省无锡市滨湖区贡湖大道的农家。

实验菌株及细胞株:空肠弯曲杆菌 NCTC11168 购自美国模式培养物研究所;人结肠癌细胞株 HT-29 购自中国科学院保藏委员会细胞库;

1.2 主要试剂和仪器

胃蛋白酶、胰蛋白酶,美国 Sigma-Aldrich-Fluka-Supelco 公司;脑心浸液肉汤培养基、哥伦比亚血琼脂培养基,美国 Oxoid 公司;牛胆盐,国药集团化学试剂有限公司;诺氟沙星(Noroxin),石家庄制药集团欧意药业有限公司。Leica DM2000 显微镜,日本徕卡光学仪器公司;牛津杯内径 6.0 ± 0.1 mm,外径 7.8 ± 0.1 mm,高 10.0 ± 0.1 mm,上海申源科学仪器有限公司;S-4700 冷场发射扫描电镜,日本日立公司;冷冻干燥系统,美国 LABCONCO 公司。

1.3 鸡粪采集

鸡粪采集于江苏省无锡市滨湖区贡湖大道的农家母鸡,用无菌小勺将分离自隔离空间的母鸡的粪便快速装入 30% 的无菌甘油管中,置于采样箱中,冰浴状态下带回实验室, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.4 细菌分离

将保存于 30% 甘油中的鸡粪均质后梯度稀释涂布于 MRS^[16] 平板上, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后观察菌落形态。根据菌落形态挑取疑似乳酸菌菌落于 MRS 培养基上划线培养两代,染色镜检,进行纯培养,并对分离获得的 40 株菌株分别编号 X1-X20 和 G1-G20。

1.5 细菌的培养

将分离得到的菌株按 2% (体积比)接种于 MRS 液体培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置培养 18 h,转接 3 代,

于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 8 min,收集菌体及纯培养上清液,用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 无菌微孔滤膜过滤纯培养上清液, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,得到菌株纯培养的无细胞提取物(CFSM);菌体用 PBS 清洗 3 次,重悬于磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.2)中,调整菌体浓度至 1×10^8 CFU/mL 备用。

1.6 空肠弯曲杆菌的培养

空肠弯曲杆菌 NCTC11168 菌株在脑心浸液肉汤培养基(底层为布氏琼脂)中于温度 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% O_2 、10% CO_2 和 85% N_2 的气体环境中培养 40 h,按照 2% (体积分数)传代培养 3 代后,在 2 800 r/min 下离心 6 min,使用 PBS 重悬,再次离心后,调整该菌浓度至 1×10^8 CFU/mL 备用。

1.7 抑菌活性的测定

根据牛津杯抑菌试验^[17] 将 $250\text{ }\mu\text{L}$ 1×10^5 CFU/mL 的空肠弯曲杆菌菌液均匀涂布于哥伦比亚血琼脂平板上,放置灭菌后的牛津杯,向牛津杯中加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 备好的细菌纯培养后的无细胞提取物,在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 扩散 4 h 后放入含 5% O_2 、10% CO_2 和 85% N_2 三气培养箱培养,40 h 后观测抑菌结果。本实验以 pH 3.8 的 MRS 为阴性对照,以 0.28 g/L 谱抗生素诺氟沙星为阳性对照。每次实验重复 3 次,取平均值。

1.8 抑制空肠弯曲杆菌菌株的鉴定

提取通过牛津杯抑菌实验考察发现的空肠弯曲杆菌抑菌效果较好菌株的 DNA,以提取的基因组 DNA 为模板,使用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTACCTTGTACGACTT-3') 进行 PCR 扩增。反应体系: $10\times Taq$ buffer $5.0\text{ }\mu\text{L}$, dNTP mixer (2.5 mmol/L) $5.0\text{ }\mu\text{L}$, Primer 27F (10 $\mu\text{mol/L}$) $0.5\text{ }\mu\text{L}$, Primer 1492R (10 $\mu\text{mol/L}$) $0.5\text{ }\mu\text{L}$, 模板(DNA) $1.5\text{ }\mu\text{L}$, Taq 酶(5 U/ μL) $0.5\text{ }\mu\text{L}$, ddH₂O $37\text{ }\mu\text{L}$ 。反应条件: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 min; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, 30 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min。所得 PCR 产物送至上海桑尼生物科技有限公司进行纯化测序,将得到的基因序列通过 BLAST 在 GenBank 中进行同源

比对, 初步确定拮抗菌种属。

1.9 乳酸菌粘附能力的测定

将生长融合至 70%–80% 的 HT-29 细胞进行消化, 调整浓度至 2×10^5 个/mL, 将无菌盖玻片放置在 6 孔细胞培养板中, 每孔加入 2 mL 细胞培养悬液, 于 5% CO₂ 培养箱中 37 °C 培养, 待细胞长至单层时, 用 PBS 清洗 3 次, 每孔加入 1 mL 乳酸菌悬液(1×10^8 CFU/mL), 补加 R/MINI-1640 细胞培养液(不含血清及抗生素)至 2 mL, 孵育 2 h。孵育结束后, 用 PBS 清洗 3 次以除去未粘附的乳酸菌, 然后用甲醇固定 20 min, PBS 清洗 3 次后进行革兰氏染色, 于 100 倍油镜下镜检。随机选取 20 个视野计算每 100 个细胞所粘附的细菌数, 作为粘附指数。

1.10 人工模拟胃、肠液耐受能力测定

人工胃液为含 3 g/L 胃蛋白酶的生理盐水, pH 2.0; 人工肠液为含 1 g/L 胰蛋白酶和 0.3 g/L 牛胆盐的生理盐水, pH 8.0; 离心收集、清洗对数生长期的乳酸菌并用 PBS 重悬, 加入等体积的模拟人工胃液或人工肠液, 37 °C 水浴 2 h, 采用梯度稀释法稀释涂布后进行平板菌落计数。

1.11 乳酸菌对空肠弯曲杆菌鞭毛合成的影响

将 *C. jejuni* 培养 36 h (对数期), 于无菌条件下加入 1 mL 乳酸菌纯培养无细胞提取物, 对照组加入 1 mL MRS 液体培养基, 摇匀后置于含 5% O₂、10% CO₂ 和 85% N₂ 的三气培养箱中培养 4 h, 在 4 °C 下 2 800 r/min 离心 6 min 收集菌体。弃上清, 加入 PBS 溶液重悬去除培养基, 在 4 °C 下 2 800 r/min 离心 6 min 收集菌体; 于 2.5% 戊二醛中固定 4 h, 用 PBS 溶液重悬 3 次; 4 °C、2 800 r/min 离心 6 min 收集菌体, 分别用 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、85%、90%、100% 的乙醇梯度脱水, 离心条件均为 4 °C、2 800 r/min 离心 6 min; 用乙酸异戊酯置换乙醇 2 次; 将样品在 -80 °C 预冻 12 h 后冷冻干燥; 扫描电子显微镜观察(SEM)空肠弯曲杆菌鞭毛。

1.12 数据处理

每组实验重复 3 次, 结果均表示为“平均值±标准

差”, 采用 SPSS 21.0 统计软件, 应用单因素方差分析(ANOVA)进行差异显著性分析, 以 $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 分离菌株对空肠弯曲杆菌的抑菌能力

通过牛津杯法对分离自鸡粪中的 40 株菌株进行抑菌能力检测, 40 株菌株无细胞提取物对空肠弯曲杆菌的平均抑菌圈直径如表 1 所示, 多数菌株的平均抑菌圈直径在 8–13 mm, 筛选得到 3 株拮抗空肠弯曲杆菌能力较强的菌株(图 1), X13、X14 及 G20 的平均抑菌圈直径分别为 15.19、15.65 和 14.51 mm。

2.2 抑制空肠弯曲杆菌菌株的鉴定

通过对菌株 X13、X14 和 G20 的 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增, 得到了长度约 1 500 bp 的基因片段, 在 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对后, 菌株 X13、X14 及 G20 分别被鉴定为罗伊氏乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*)、唾液乳杆菌(*Lactobacillus salivarius*)及鸡乳杆菌(*Lactobacillus gallinarum*), 序列相似度均达到 100%。

2.3 乳酸菌对 HT-29 细胞的粘附能力

体外评价细菌粘附能力一般使用人肠道细胞系, 其中 Caco-2 细胞系和 HT-29 细胞系表现出成熟肠上皮细胞的特性, 可以较好地模拟人体肠道环境, 是目前研究细菌粘附使用最广泛的体外细胞模型^[18]。本研究以 *L. rhamnosus* GG 作为阳性参照, 已有报道证明该菌株对人结肠癌细胞具有较好粘附能力^[19], 以本实验室筛选得到的粘附能力较差的菌株 PC-M5 为阴性参照。检测乳酸菌对 HT-29 细胞的粘附能力, 由表 2 可知, X13、X14 及 G20 的粘附指数均显著大于阴性参照组 PC-M5; 且 X14 的粘附指数显著大于 *L. rhamnosus* GG, G20 的粘附指数与 *L. rhamnosus* GG 无显著差异; X13 的粘附指数仅略小于 *L. rhamnosus* GG。因此从鸡粪中筛选得到的 3 株乳酸菌对 HT-29 细胞均具有良好的粘附能力。

表 1 鸡源菌株的抑菌活性测定

Table 1 Bacteriostatic ability of strains screened from chicken

菌株编号 Strain number	平均抑菌圈直径 Average bacteriostatic ring diameter (mm)	菌株编号 Strain number	平均抑菌圈直径 Average bacteriostatic ring diameter (mm)
X1	12.47±0.31	G1	10.31±0.25
X2	12.04±0.54	G2	11.33±0.63
X3	12.97±0.77	G3	11.31±0.63
X4	12.49±0.21	G4	10.43±0.32
X5	12.09±0.38	G5	11.11±0.42
X6	11.06±0.52	G6	10.42±0.93
X7	10.76±0.43	G7	11.72±0.66
X8	8.90±0.38	G8	8.10±0.31
X9	10.54±0.77	G9	11.91±0.42
X10	11.34±0.48	G10	10.52±0.21
X11	9.30±0.44	G11	8.91±0.33
X12	8.70±0.81	G12	12.13±0.53
X13	15.19±0.74	G13	12.72±0.33
X14	15.65±1.28	G14	10.83±0.32
X15	12.34±0.33	G15	11.91±0.37
X16	11.32±0.21	G16	11.88±0.31
X17	10.54±0.42	G17	10.78±0.64
X18	10.88±0.31	G18	10.13±0.44
X19	12.42±0.53	G19	8.32±0.31
X20	11.66±0.42	G20	14.51±1.65
MRS (pH=3.8)	7.40±0.56	Noroxin	18.57±0.31

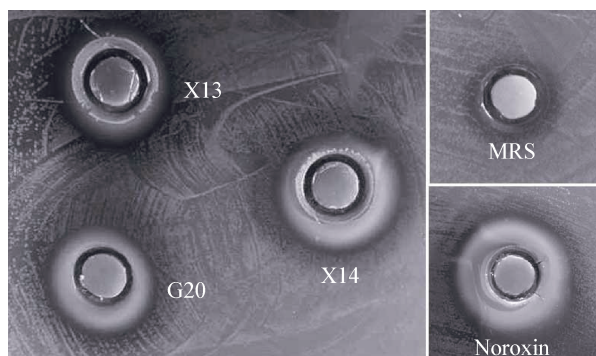


图 1 抑菌试验中产生的抑菌圈效果

Figure 1 The inhibition zone of well diffusion agar assays

2.4 乳酸菌对人工胃肠液的耐受能力

乳酸菌对人工胃肠液的耐受情况见表 3。经过 2 h 人工肠液的处理, 与 PBS 对照组相比筛选得到的 3 株乳酸菌的活菌数均没有显著差异。经过 2 h 人工胃液的处理, 与 PBS 对照组相比 G20 的活菌数并没有显著差异; 而 X13、X14 的活菌数虽差异

表 2 乳酸菌对 HT-29 细胞的粘附指数

Table 2 *Lactobacillus*' sticky effect on HT-29 cells

菌株 Strain	粘附指数 Adhesion index
X13	11.5±2.8 ^c
X14	20.3±3.8 ^a
G20	14.3±2.9 ^b
<i>L. rhamnosus</i> GG	14.2±3.1 ^b
PC-M5	1.1±0.3 ^d

注: 不同字母代表组间差异显著 ($P<0.05$).

Note: Different letters means significant difference between groups ($P<0.05$).

显著, 但并没有数量级上的变化。而且经过 2 h 人工胃、肠液处理后的活菌数均在 10^7 CFU/mL 以上, 达到在肠道中定殖的水平。由此推测这 3 株乳酸菌对人工胃肠液具有良好的耐受性。

2.5 乳酸菌对空肠弯曲杆菌鞭毛合成的影响

鞭毛是空肠弯曲杆菌的重要毒力因子, 其介导

的运动使它能穿透肠粘液，粘附并侵入肠道上皮细胞，鞭毛还在毒力蛋白分泌外输过程中起到重要作用。在扫描电子显微镜下观察空肠弯曲杆菌发现，加入 MRS 的对照组空肠弯曲杆菌鞭毛的平均长度(扫描电镜照片中测量 20 个空肠弯曲杆菌鞭毛得到

的平均值)为 2.1 μm ，而加入 X13、X14 和 G20 纯培养无细胞提取物的空肠弯曲杆菌鞭毛的平均长度分别为 1.2、0.6、0.8 μm ，远小于对照组，如图 2 所示。这表明乳酸菌纯培养无细胞提取物会影响空肠弯曲杆菌鞭毛毒力因子的合成。

表 3 乳酸菌对人工胃肠液的耐受情况(2 h, 活菌数, lgCFU/mL)			
Table 3 Tolerance of <i>Lactobacillus</i> to artificial gastrointestinal juices (2 h, viable count, lgCFU/mL)			
菌株 Strain	人工胃液 Artificial gastric juice	人工肠液 Artificial small intestinal juice	PBS 对照 PBS control
X13	9.1±0.4 ^b	9.3±0.3 ^a	9.3±0.4 ^a
X14	8.9±0.1 ^b	9.6±0.2 ^a	9.5±0.3 ^a
G20	7.6±0.4 ^a	7.7±0.1 ^a	7.9±0.4 ^a

注：不同字母代表同株乳酸菌不同处理下活菌数差异显著($P<0.05$).
Note: Different letters means significant difference between the viable count of the *Lactobacillus* under different processing ($P<0.05$).

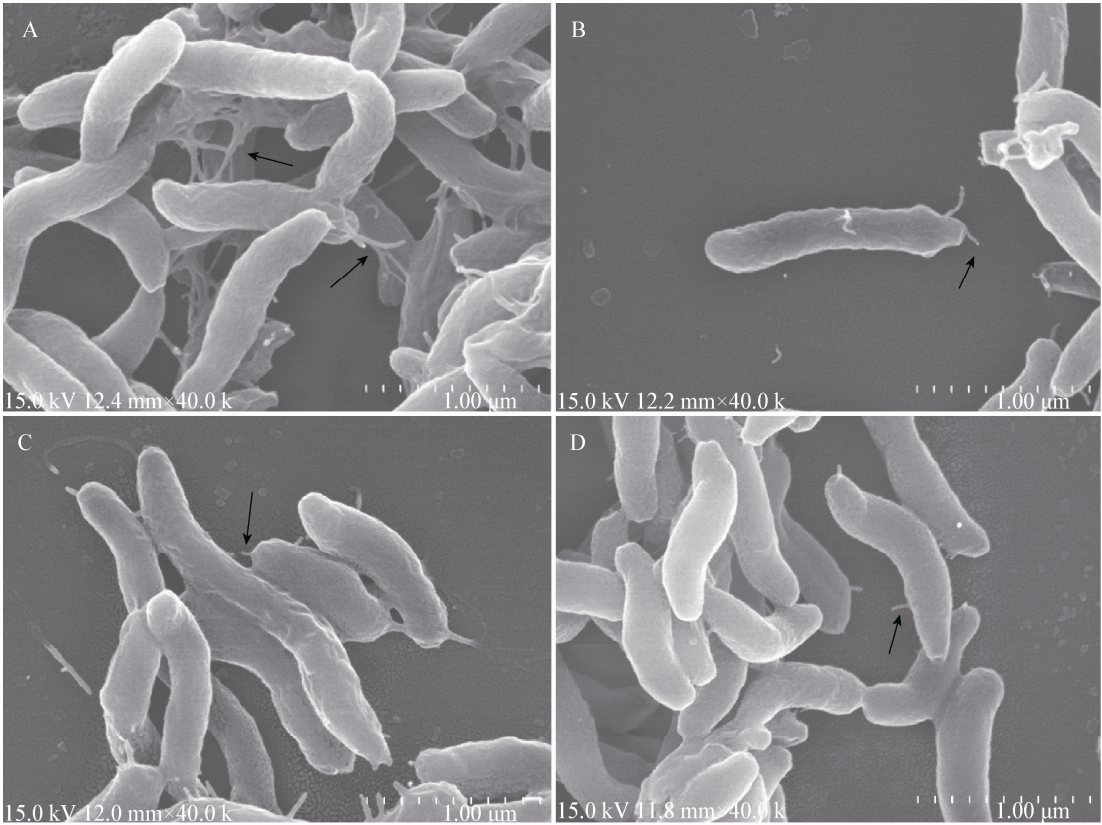


图 2 空肠弯曲杆菌扫描电镜图(40 000×)
Figure 2 SEM of *Campylobacter jejuni* (40,000×)

注：A：对照组(MRS)；B：X13 纯培养无细胞提取物处理组；C：X14 纯培养无细胞提取物处理组；D：G20 纯培养无细胞提取物处理组。
Note: A: Control group (MRS); B: X13 CFM treated group; C: X14 CFM treated group; D: G20 CFM treated group.

3 讨论

空肠弯曲杆菌是常见的腹泻致病菌,研究证明,乳酸菌对致病菌如金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、李斯特菌等的附着、定殖、增长和转移都有一定的抑制作用^[9]。本研究以鸡粪为来源,分离到 40 株菌株,通过抑菌实验及 16S rRNA 基因序列分析筛选鉴定出 3 株拮抗空肠弯曲杆菌能力较强的乳酸菌 X13、X14 和 G20,考察了其肠道细胞的粘附性能,研究了其对模拟胃肠环境的耐受性,探讨了其对空肠弯曲杆菌鞭毛毒力因子的影响。

乳酸菌会产生抑菌类物质,如有机酸类、过氧化氢及细菌素^[8-11]等。本研究中筛选得到的 3 株乳酸菌的无细胞提取物对空肠弯曲杆菌的生长具有较强的抑制作用,提示这 3 株菌可能存在酸拮抗以外的其他抗菌机制,如类似细菌素的拮抗机制^[20-21],这有待进一步鉴定与研究。

乳酸菌对肠粘膜的粘附是其在宿主体内定殖并发挥生物屏障作用的先决条件。本研究筛选得到的 3 株乳酸菌对人结肠癌上皮细胞 HT-29 的粘附指数分别达到了 11.5 ± 2.8 、 20.3 ± 3.8 和 14.3 ± 2.9 个/细胞,与阳性对照 *L. rhamnosus* GG (14.2 ± 3.1 个/细胞)及阴性对照 PC-M5 (1.1 ± 0.3 个/细胞)相比具有较好的粘附能力。与现有报道相比,唾液乳杆菌 X14 具有较强的粘附能力,许荣誉等考察唾液乳杆菌的粘附能力时发现其粘附指数为 6.13 ± 5.28 个/细胞^[22]。本研究得到的罗伊氏乳杆菌对细胞的粘附能力与已有文献报道相当,王斌等在体外粘附 HT-29 细胞模型中发现罗伊氏乳杆菌的粘附能力达到 15.28 ± 2.47 个/细胞^[23]。鸡乳杆菌对细胞的粘附能力报道较少,相比于其他乳杆菌本研究得到的鸡乳杆菌对细胞同样具有较高的粘附能力。

胃肠道环境对细菌的抑制因素有低 pH 值和作为表面活性剂的胆盐,食物通过胃及小肠的时间一般为 1–2 h^[24],耐酸和耐胆盐性能是评价益生乳酸菌的重要指标^[25]。本研究的人工模拟胃肠液耐受实验表明,3 株乳酸菌经过 2 h 的人工胃液或人工肠

液处理后,乳酸菌的活菌数仍保持在 10^7 CFU/mL 以上,而研究表明 10^6 CFU/mL 以上的活性乳杆菌就能发挥其功效^[26]。许荣誉等的研究也表明了罗伊氏乳杆菌及唾液乳杆菌对 pH 2.5 的人工胃液及 0.3% 的胆盐环境表现出良好的耐受性^[22]。与有关研究相比,本研究得到的 3 株乳杆菌均具有较好的耐酸耐胆盐能力,在经过胃到达肠道时仍能保证较高的活菌数而发挥作用。

鞭毛是空肠弯曲杆菌的运动构造,影响其穿透肠粘液、粘附并侵入肠道上皮细胞的能力,进而影响空肠弯曲杆菌的致病性^[15]。本研究发现乳酸菌无细胞提取物能影响空肠弯曲杆菌鞭毛的长度,这提示有可能影响了空肠弯曲杆菌鞭毛蛋白 *flaA* 基因的表达,进而影响了鞭毛的合成,与已有研究报道相一致^[14],本实验室对乳酸菌无细胞提取物抑制空肠弯曲杆菌相关毒力基因表达的结果也证实了这一点(数据未公布)。

空肠弯曲杆菌是导致细菌性腹泻的重要致病菌,近年来在世界各地空肠杆菌的感染率呈明显上升态势。本研究不仅为空肠弯曲杆菌的生物控制提供了新的有益菌种,在应用方面有助于开发新型饲用益生乳酸菌,但相关的抑菌机制及对空肠弯曲杆菌毒力的影响则需要进一步的深入研究。

参考文献

- [1] Blaser MJ, Sazie E, Williams LP, Jr. The influence of immunity on raw milk-associated *Campylobacter* infection[J]. JAMA: The Journal of the American Medical Association, 1987, 257(1): 43-46
- [2] Smith MV, Muldoon PJ. *Campylobacter fetus* subspecies *jejuni* (*Vibrio fetus*) from commercially processed poultry[J]. Applied Microbiology, 1974, 27(5): 995-996
- [3] Altekruze SF, Stern NJ, Fields PI, et al. *Campylobacter jejuni*—an emerging foodborne pathogen[J]. Emerging Infectious Diseases, 1999, 5(1): 28-35
- [4] Cox NA, Richardson L, Musgrove M. *Campylobacter jejuni* and other campylobacters[A]//Juneja VK, Sofos JN. Pathogens and Toxins in Food: Challenges and Interventions[M]. Washington, DC: ASM Press, 2010: 20-30
- [5] Moore JE, Barton MD, Blair IS, et al. The epidemiology of antibiotic resistance in *Campylobacter*[J]. Microbes and Infection, 2006, 8(7): 1955-1966
- [6] Hong J, Kim JM, Jung WK, et al. Prevalence and antibiotic resistance of *Campylobacter* spp. isolated from chicken meat, pork and beef in Korea from 2001 to 2006[J]. Journal of Food Protection, 2007, 70(4): 860-866
- [7] Wardak S, Szych J, Zasada AA, et al. Antibiotic resistance of

- Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* clinical isolates from Poland[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2007, 51(3): 1123-1125
- [8] Fukuda S, Toh H, Hase K, et al. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate[J]. Nature, 2011, 469(7331): 543-547
- [9] Sahadeva R, Leong S, Chua K, et al. Survival of commercial probiotic strains to pH and bile[J]. International Food Research Journal, 2011, 18(4): 1515-1522
- [10] Yu J, Wang WH, Menghe BLG, et al. Diversity of lactic acid bacteria associated with traditional fermented dairy products in Mongolia[J]. Journal of Dairy Science, 2011, 94(7): 3229-3241
- [11] Turner DL, Lamosa P, Rodríguez A, et al. Structure and properties of the metastable bacteriocin Lcn972 from *Lactococcus lactis*[J]. Journal of Molecular Structure, 2013, 1031: 207-210
- [12] Burgain J, Gaiani C, Francius G, et al. *In vitro* interactions between probiotic bacteria and milk proteins probed by atomic force microscopy[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2013, 104: 153-162
- [13] Willis WL, Reid L. Investigating the effects of dietary probiotic feeding regimens on broiler chicken production and *Campylobacter jejuni* presence[J]. Poultry Science, 2008, 87(4): 606-611
- [14] Mundi A, Delcenserie V, Amiri-Jami M, et al. Cell-free preparations of *Lactobacillus acidophilus* strain La-5 and *Bifidobacterium longum* strain NCC2705 affect virulence gene expression in *Campylobacter jejuni*[J]. Journal of Food Protection, 2013, 76(10): 1740-1746
- [15] Nachamkin I, Yang XH, Stern NJ. Role of *Campylobacter jejuni* flagella as colonization factors for three-day-old chicks: analysis with flagellar mutants[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(5): 1269-1273
- [16] GB 4789.35-2010. National food safety standards of food microbiological examination of lactic acid bacteria[S][D]. 2010 (in Chinese)
GB 4789.35-2010. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验[S][D]. 2010
- [17] Liu DM, Li L, Yang XQ, et al. Determination of the antimicrobial activity of probiotic by Oxford plate assay system [J]. Food Research and Development, 2006, 27(3): 110-111 (in Chinese)
刘冬梅, 李理, 杨晓泉. 等. 用牛津杯法测定益生菌的抑菌活力[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(3): 110-111
- [18] Adlerberth I, Ahrne S, Johansson ML, et al. A mannose-specific adherence mechanism in *Lactobacillus plantarum* conferring binding to the human colonic cell line HT-29[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(7): 2244-2251
- [19] Tuomola EM, Ouwehand AC, Salminen SJ. The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus[J]. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 1999, 26(2): 137-142
- [20] Chen FY, Lee MT, Huang HW. Sigmoidal concentration dependence of antimicrobial peptide activities: A case study on alamethicin[J]. Biophysical Journal, 2002, 82(2): 908-914
- [21] Chen XF, Wang M, Qin CF. Study of the culture of *Lactobacillus salivarius* and conditions of producing antibacterial material[J]. Science and Technology of Food Industry, 2007, 28(4): 93-96 (in Chinese)
陈晓峰, 王淼, 覃彩凤. *Lactobacillus salivarius* 的培养和产抑菌物质条件的研究[J]. 食品工业科技, 2007, 28(4): 93-96
- [22] Xu RY, Zhuang JL, Zhang HY. Screening of probiotic properties of twelve strains of Lactobacilli by *in vitro* techniques[J]. Journal of Medical Postgraduates, 2008, 21(12): 1246-1249 (in Chinese)
许荣誉, 庄建良, 张海云. 12 株乳杆菌益生特性的研究[J]. 医学研究生学报, 2008, 21(12): 1246-1249
- [23] Wang B, Du D, Zhan YM, et al. Study of the adhesion of *Lactobacillus* to the human intestinal epithelial cell line HT-29 cells[J]. Chinese Journal of Microbiology and Immunology, 2004, 24(11): 858 (in Chinese)
王斌, 牡丹, 战余铭, 等. 乳杆菌对肠上皮样细胞 HT-29 黏附的研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2004, 24(11): 858
- [24] Huang Y, Adams MC. *In vitro* assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria[J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 91(3): 253-260
- [25] Hood SK, Zottola EA. Effect of low pH on the ability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells[J]. Journal of Food Science, 1988, 53(5): 1514-1516
- [26] Gilliland SE. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria[J]. FEMS Microbiology Letters, 1990, 87(1/2): 175-188