

# 酪酸梭菌和婴儿型双歧杆菌对霍乱弧菌的拮抗试验

陆 俭 张雪平

孟筱琦

(卫生部兰州生物制品研究所 兰州 730046)

**摘要:** 了解酪酸梭菌和婴儿型双歧杆菌单独及混合培养时对霍乱弧菌的拮抗作用。将酪酸梭菌 LCL166 和婴儿型双歧杆菌 LCL172 分别与霍乱弧菌 O1、O139 单独和混合培养,定时对霍乱弧菌计数,并对菌数的对数进行 t 检验。两株菌混合培养时对霍乱弧菌的抑制效果基本相同,单独和混合培养时对霍乱弧菌的拮抗作用主要由酪酸梭菌引起,酪酸梭菌具有抑制霍乱弧菌的作用。

**关键词:** 酪酸梭菌, 婴儿型双歧杆菌, 霍乱弧菌, 拮抗作用

**中图分类号:** R378.8    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0253-2654(2000)05-0338-04

## THE ANTAGONISM OF *CLOSTRIDIUM BUTYRICUM* AND *BIFIDOBACTERIUM INFANTS* TO *V. CHOLERA*

LU Jian ZHANG Xue-Ping

MENG Xiao-Qi

(Lanzhou Institute of Biological Products, Lanzhou 730046)

**Abstract:** To understand the antagonism of *Clostridium butyricum* and *Bifidobacterium infants* to *V. cholera*. Either *Clostridium butyricum* LCL166 or *Bifidobacterium infants* LCL172 or both of them co-cultured with *V. cholera* O1, O139, counting the number of *V. cholera* in constant intervals and performing statistics analysis. The inhibition results are probably same when combination of LCL166 and LCL172 were compared with LCL166 alone. The antagonism to *V. cholera* results mainly from *Clostridium butyricum* LCL166 which has the inhibition effect to *V. cholera*.

**Key words:** *Clostridium butyricum*, *Bifidobacterium infants*, *V. cholera*, Antagonism

霍乱是一种急性传染病,从 19 世纪以来已发生 7 次世界性大流行。现虽有疫苗,但经现场考核发现传统疫苗仅有中等程度(50%~70%)的保护效应,为期也仅有 3~6 个月,且不能有效防止非典型感染,可见有效地防治霍乱是个很迫切的问题。本实验用本室保藏的酪酸

梭菌和婴儿型双歧杆菌菌株分别与两株霍乱弧菌在试管内共同培养,检测培养后的霍乱弧菌数,由此探讨了前者对后者的拮抗作用,从而为霍乱的防治提供了一条新思路。

收稿日期: 1999-04-05, 修回日期: 1999-08-30

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

# 1 材料与方法

## 1.1 菌种

酪酸梭菌 LCL166 株 (*Clostridium butyricum* LCL166), 由兰州生物制品研究所第五研究室提供; 双歧杆菌 LCL172 株 (*Bifidobacterium infantis* LCL172), 由兰州生物制品研究所第五研究室提供; 霍乱弧菌 O1、O139 (*V. cholera* O1, O139), 由兰州生物制品研究所诊断一室提供。

## 1.2 培养基

GAM 液体培养基 (日本制药株式会社), 麦康凯琼脂 (上海市医学化验所试剂厂)。

## 1.3 培养物制备

分别将酪酸梭菌 LCL166、双歧杆菌 LCL172、霍乱弧菌 O1 和 O139 接种于 GAM 液体培养基中, 酪酸梭菌 LCL166 置厌氧培养罐培养 8h, 婴儿型双歧杆菌 LCL172 置厌氧培养罐培养 14h, 霍乱弧菌普通培养 8h。

## 1.4 试验分组

将酪酸梭菌 LCL166、双歧杆菌 LCL172 单株菌及两株菌以一定比例混合后的培养物分别与霍乱弧菌 O1 和 O139 混合于含 50mL GAM 液体的大管中, 构成 4 组单联试验组和 2 组双联试验组: LCL166 + 霍乱弧菌 O1、LCL166 + 霍乱弧菌 O139、LCL172 + 霍乱弧菌 O1、LCL172 + 霍乱弧菌 O139、LCL166 + LCL172 + 霍乱弧菌 O1、LCL166 + LCL172 + 霍乱弧菌 O139。同时将等量的霍乱弧菌培养物单独接种于 GAM 液体培养基中, 作为对照组。试验组及对照组均置厌氧罐中 37℃ 培养。

## 1.5 菌落计数

对于酪酸梭菌 LCL166 单株菌分别于厌氧培养的起始点 (0h)、2h、4h、6h、8h、10h、12h、24h; 对于双歧杆菌 LCL172 单株菌分别于厌氧培养的起始点 (0h)、12h、24h、28h、32h、36h、48h; 对于酪酸梭菌 LCL166 和双歧杆菌 LCL172 两株菌以一定比例混合后的培养物分别于厌氧培养的起始点 (0h)、2h、4h、6h、8h、10h、12h、24h、28h、32h、36h、48h 取各组培养物样本, 检测试验组及对照组中各菌的数量 (CFU/mL)。菌数的检测采用稀释滴注培养法。霍乱弧菌的计数培养基采用麦康凯琼脂, 置普通孵箱培养, 37℃ 24h。计数平板上平均每滴稀释标本液的菌落数, 计算出原培养液中每 mL 所含菌落数。计算公式为:  $CFU/mL = \text{平均每滴菌落数} \times 50 \times \text{稀释倍数}$ 。

# 2 结果

将不同时间各组的菌落数以对数值的方式表示, 即  $\lg(CFU/mL)$ 。统计学处理采用 t 检验。

## 2.1 酪酸梭菌 LCL166 对霍乱弧菌的拮抗试验结果

霍乱弧菌 O1 和 O139 分别与酪酸梭菌 LCL166 混合培养一段时间后其数量明显低于 O1 和 O139 单独培养时的生长数量, 说明酪酸梭菌 LCL166 株在试管内具有明显的拮抗霍乱弧菌的作用。在 10h 稀释度为  $10^1$  时霍乱弧菌 O1 的菌落数降为 0, 而霍乱弧菌 O139 在 8h 菌落数即降为 0。见表 1、2, 图 1。

表1 酪酸梭菌和婴儿型双歧杆菌单独和混合培养后对霍乱弧菌O1的拮抗试验结果

组	菌落数 (lg)											
	0h	2h	4h	6h	8h	10h	12h	24h	28h	32h	36h	48h
LCL166+O1	5.10	5.10	5.35	6.86	5.35	1.00	1.00	1.00	—	—	—	—
LCL172+O1	5.18	—	—	—	—	—	9.08	6.70	6.30	6.00	5.50	4.95
LCL166+LCL172+O1	5.63	5.63	5.79	7.05	5.35	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>V. cholera</i> O1	5.57	5.60	5.88	6.70	9.22	9.48	9.14	7.89	7.17	6.76	6.57	6.18

双联试验组 LCL166 + LCL172 + O1 与对照组霍乱弧菌 O1 数量相比较,  $t = 4.27, 0.001 < p < 0.002$

双联试验组 LCL166 + LCL172 + O1 与单联试验组 LCL166 + O1 霍乱弧菌 O1 数量相比较, 无显著性差异

双联试验组 LCL166 + LCL172 + O1 与单联试验组 LCL172 + O1 霍乱弧菌 O1 数量相比较,  $t = 4.70, 0.002 < p < 0.005$

表2 酪酸梭菌和婴儿型双歧杆菌单独和混合培养后对霍乱弧菌O139的拮抗试验结果

组	菌落数(Ig)											
	0h	2h	4h	6h	8h	10h	12h	24h	28h	32h	36h	48h
LCL166+O139	5.51	5.51	6.33	7.88	1.00	1.00	1.00	1.00	—	—	—	—
LCL172+O139	5.44	—	—	—	—	—	7.43	6.50	1.00	1.00	1.00	1.00
LCL166+LCL172+O139	5.38	5.40	6.48	7.94	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>V. cholera</i> O139	5.40	5.44	7.00	8.95	9.41	9.06	8.93	6.36	5.51	4.51	4.35	4.10

双联试验组 LCL166 + LCL172 + O139 与对照组霍乱弧菌 O139 数量相比较,  $t = 4.24, p < 0.001$ 。  
单联试验组 LCL166 + O139 与对照组霍乱弧菌 O139 数量相比较,  $t = 2.84, 0.02 < p < 0.05$ 。  
单联试验组 LCL172 + O139 与对照组霍乱弧菌 O139 数量相比较,  $t = 3.26, 0.01 < p < 0.02$ 。

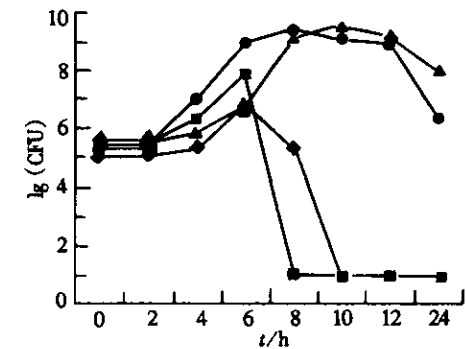


图1 霍乱弧菌O1、O139与酪酸梭菌 LCL166混合培养及单独培养的生长曲线  
—◆— LCL166+O1, —■— LCL166+O139,  
—▲— *V. cholera* O1, —●— *V. cholera* O139

2.2 婴儿型双歧杆菌 LCL172 对霍乱弧菌的拮抗试验结果

霍乱弧菌 O1 和 O139 分别与婴儿型双歧杆菌 LCL172 混合培养一段时间后其数量明显低于 O1 和 O139 单独培养时的生长数量,说明婴

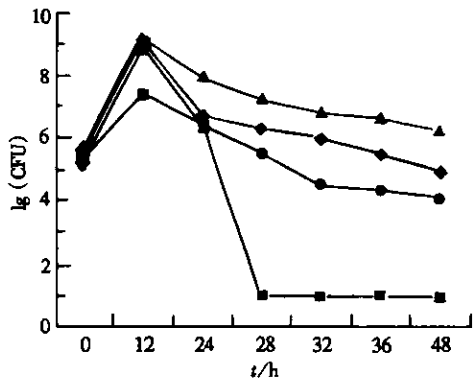


图2 霍乱弧菌O1、O139与婴儿型双歧杆菌 LCL172混合培养及单独培养的生长曲线  
—◆— LCL172+O1, —■— LCL172+O139,  
—▲— *V. cholera* O1, —●— *V. cholera* O139

儿型双歧杆菌 LCL172 株在试管内具有明显的拮抗霍乱弧菌的作用。见表 1、2, 图 2。

2.3 酪酸梭菌 LCL166 和婴儿型双歧杆菌 LCL172 混合培养后对霍乱弧菌的拮抗试验结果

酪酸梭菌 LCL166 和婴儿型双歧杆菌 LCL172 混合培养后对霍乱弧菌的拮抗试验结果

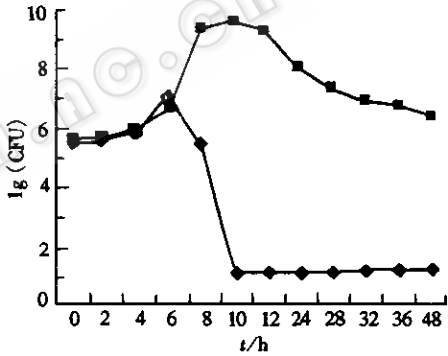


图3 霍乱弧菌O1与酪酸梭菌LCL166和婴儿型双歧杆菌LCL172混合培养及单独培养的生长曲线  
—◆— LCL166+LCL172+O1, —■— *V. cholera* O1

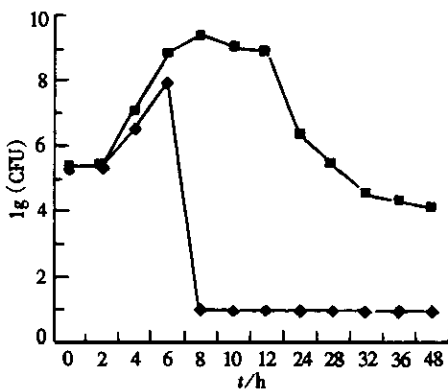


图4 霍乱弧菌O139与酪酸梭菌LCL166和婴儿型双歧杆菌LCL172混合培养及单独培养的生长曲线  
—◆— LCL166+LCL172+O139, —■— *V. cholera* O139

172 两株菌以一定比例混合后与霍乱弧菌 O1 和 O139 混合培养一段时间后, 霍乱弧菌的数量明显低于其单独培养时的生长数量。但双联试验组与单联试验组相比较, 结果无显著性差异。见表 1、2, 图 3、4。

### 3 讨论

婴儿型双歧杆菌是自母乳喂养的婴儿粪便中分离成功并命名的, 它属于婴儿肠道中定植较早的双歧杆菌。而酪酸梭菌则存在于土壤、动物和人的肠道内, 与婴儿型双歧杆菌同属于人体肠道的正常菌群, 对于维持肠道的微生态平衡起着重要作用。目前国内的微生态制剂尚未见到酪酸梭菌制剂, 同时我们已经实验证实当婴儿型双歧杆菌和酪酸梭菌混合培养时, 酪酸梭菌对婴儿型双歧杆菌的生长具有刺激作用, 所以本实验增加了双联试验组。

由前述结果可见, 酪酸梭菌和婴儿型双歧杆菌混合培养时对霍乱弧菌的抑制效果与酪酸梭菌单株菌的抑制效果基本相同。这主要是由于酪酸梭菌的生长繁殖速度明显快于婴儿型双歧杆菌, 并产生酪酸、醋酸和乳酸等代谢产物, 使培养基的 pH 值降低。而霍乱弧菌是嗜碱性需氧菌, 最适 pH 值为 8.2~9.0, 当酪酸梭菌与霍乱弧菌混合培养时, 霍乱弧菌能消耗培养基

中残存的氧气, 降低 pH 值, 故反而有利于酪酸梭菌的生长, 而霍乱弧菌由于培养基的 pH 值降低, 氧气减少, 因此生长逐渐缓慢, 直到最后死亡。

本实验通过试管内试验初步证明了酪酸梭菌和婴儿型双歧杆菌具有抑制霍乱弧菌的作用, 双联试验组对霍乱弧菌的拮抗作用主要是由酪酸梭菌引起。在机体内部, 正常肠道菌群对致病菌的抗定植作用主要来自于肠道优势厌氧菌群, 其中双歧杆菌能够和乳杆菌等共同占据肠粘膜表面, 形成生物学屏障, 阻止致病菌的入侵和定植。而酪酸梭菌在肠道内发挥何种作用, 尚需进一步的实验研究来加以阐明。

### 参 考 文 献

- [1] 黑岩丰秋, 小张一峰, 岩永正明. 感染症学杂志, 1990, 64(3): 257~263.
- [2] Iwanaga M, Tomori T, Kuroiwa T. 5th CJICM, aug. 1993, 66~69.
- [3] 田口信洋, 阿部章彦, 三上襄. 日本细菌学杂志, 1988, 43(4): 829~835.
- [4] 袁佩娜, 董思恩, 罗建辉等. 微生物学免疫学进展, 1997, 25(1): 6~12.
- [5] 卢锦汉, 章以浩, 赵铠主编. 医学生物制品学. 北京: 人民卫生出版社, 1995, 337.