

乳杆菌对致病性大肠杆菌 K88 和 O138 体外存活抑制的动力学研究

林 勇 姚 文 朱伟云*

(南京农业大学消化道微生物研究室 南京 210095)

摘 要: 研究了一株分离自断奶仔猪小肠黏膜的肠乳杆菌 *L₁* (*Lactobacillus intestinalis*) 体外发酵特性, 及其代谢产物对病原性大肠杆菌 *Escherichia coli* K88 和 O138 存活的影响。体外发酵结果表明: 发酵 12 h 后, *L₁* 菌液 pH 值迅速降至 3.90, 并产生大量乳酸, 为 104.08 mmol/L。 *L₁* 菌株代谢产物对 K88 和 O138 体外生长抑制的动力学研究表明: *L₁* 菌株代谢产物对 K88 和 O138 存活具有很强的抑制作用; *L₁* 菌株发酵液与含相同浓度乳酸的自制培养液比较结果表明: 乳酸在 *L₁* 菌株代谢物对 K88 和 O138 存活抑制中发挥了主要作用; K88 和 O138 对 pH 4.5 的 MRS 培养液具有一定的耐受能力。

关键词: 肠乳杆菌, K88, O138, 生长抑制

Kinetic Analysis of the Inhibition of *in vitro* Growth of Pathogenic *Escherichia coli* K88 and O138 by *Lactobacillus* Isolates from Porcine Intestine

LIN Yong YAO Wen ZHU Wei-Yun *

(Laboratory of Gastrointestinal Microbiology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract: Fermentation property and kinetic analysis of the inhibition of *in vitro* growth of pathogenic *Escherichia coli* K88, O138 by *Lactobacillus intestinalis* isolated from porcine intestine mucus were investigated. The results of fermentation showed that *L₁* result in a pH of 3.90 within 12 h and a large amount of lactic acid production, with the concentration of 104.08 mmol/L. Kinetic analysis of the antibacterial activity of *L₁* metabolic product toward K88, O138 showed that CFUS display strong antibacterial activity toward K88, O138; the antibacterial activity of *L₁* CFUS was higher than the lactic acid control samples and was mainly due to the production of lactic acid; K88, O138 had the tolerance property toward pH 4.5.

Keywords: *Lactobacillus intestinalis*, K88, O138, Antibacterial activity

乳杆菌作为益生菌中应用最广的菌种, 能有效调控宿主胃肠道微生物区系平衡, 进而提高宿主日

粮消化率和促进营养物质的吸收, 并且能预防及早期治疗一些由特定病原菌感染引起的疾病^[1]。竞争

性排斥病原菌的粘附、产生多种抑菌物质是乳杆菌的主要益生作用^[2]。乳酸是乳杆菌的主要代谢产物,但高浓度的乳酸不一定产生高效的抑菌效果,而未解离的乳酸对宿主肠道中特定病原性大肠杆菌却具有很强的抑菌作用^[3,4]。目前,国外关于仔猪肠道微生物区系的研究多集中在乳酸菌与致病性大肠杆菌的相互作用上,而国内关于未解离乳酸对特定致病性大肠杆菌抑制作用的研究未见报道。

本实验通过分离自水肿病康复断奶仔猪小肠黏膜的肠乳杆菌体外发酵及其代谢产物对 K88 和 O138 体外存活抑制的动力学研究,旨在探讨酸效应、未解离乳酸对 K88 和 O138 体外存活的抑制效果,并研究该菌株代谢产物中是否还存在其他有抑菌作用的物质。

1 材料与方法

1.1 菌株

肠乳杆菌 L₁ 由本实验室分离自水肿病康复断奶仔猪小肠黏膜,且对酸、胆盐和热处理具有很好的耐受能力。致断奶仔猪水肿病大肠杆菌 O138 分离自泰州饲养户水肿病死猪肠系膜淋巴结,由南京农业大学农业部动物疾病诊断与免疫重点开放实验室进行鉴定。致断奶仔猪腹泻大肠杆菌产 K88 菌毛菌株由南京农业大学农业部动物疾病诊断与免疫重点开放实验室惠赠。

1.2 体外发酵

活化后的肠乳杆菌 L₁ 菌株经 MRS 液体厌氧培养基活化 24 h 后,并接种至 MRS 液体厌氧培养基,设 3 个重复,37℃ 厌氧培养。于 0 h、3 h、6 h、12 h、24 h 接种后测定培养基的 pH 值、OD₆₀₀ 值和乳酸浓度,并且计算出未解离的乳酸浓度,公式:未解离乳酸浓度 (mmol/L) = 0.8 (乳酸浓度 (mmol/L)) / (1 + 10^{pH-pK_a})^[3,4]。

1.3 K88, O138 存活影响动力学

1.3.1 菌种复活: 肠乳杆菌 L₁ 菌株活化同上,接种 MRS 液体厌氧培养基,37℃ 条件下厌氧培养。活化后的 K88 和 O138 经普通营养肉汤厌氧培养基发酵 24 h 后取得新鲜菌液,并接种于普通营养肉汤厌氧培养基,37℃ 条件下厌氧培养 24 h。

1.3.2 乳酸对照液的制备: 依据肠乳杆菌 L₁ 0 h、3 h、6 h、12 h、24 h 发酵液的乳酸含量,配置含相同乳酸浓度的 MRS 液体厌氧培养基,1 × 10⁵ Pa

20 min 高压灭菌。

1.3.3 存活影响试验: 取 0 h、3 h、6 h、12 h、24 h 肠乳杆菌 L₁ 发酵菌液,浓盐酸调 pH 值至 4.5,4℃ 下 10000 r/min 离心 30 min 后,提取其无菌上清液 (CFUS) 按 80% (V/V) 接种于发酵 24 h 的 K88 和 O138 普通营养肉汤厌氧培养基,以无菌 MRS、pH 值 4.5 的无菌 MRS 液体厌氧培养基和 pH 值 4.5 的无菌乳酸对照液为对照,37℃ 下培养 2 h 后,取样进行平板菌落计数。

1.4 代谢产物中 VFA 的测定

采用高效气相色谱方法,测定肠乳杆菌 L₁ 0 h、3 h、6 h、12 h、24 h MRS 发酵液中挥发性脂肪酸 (VFA) 浓度^[5]。

1.5 统计分析

实验数据均为 3 个重复的平均值,数据经 Microsoft Excel 初步处理后,利用 SPSS10.0 单因子多重比较中 LSD 法进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 肠乳杆菌 L₁ 体外发酵结果分析

肠乳杆菌 L₁ 培养液 pH 值、OD₆₀₀ 随时间变化见图 1a, 0 h~6 h 内 pH 值迅速下降, 12 h~24 h 下降缓慢, 24 h 基本趋于稳定, 终末 pH 值为 3.69; 0 h~12 h 生长较快, 12 h 后趋缓。

肠乳杆菌 L₁ 产乳酸能力见图 1b, 乳酸浓度在 0 h~12 h 期间迅速上升, 12 h 时达到 104.08 mmol/L, 12 h~24 h 时缓慢上升, 24 h 时达到 129.76 mmol/L; 加入到 K88 和 O138 普通营养肉汤培养基中的未解

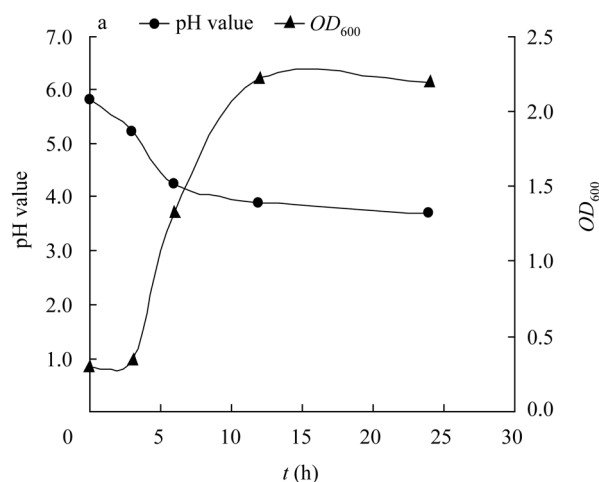


图 1a 肠乳杆菌 L₁ 培养液 pH 值、OD 值随时间变化图
Fig. 1a Variation of pH, OD value at different time

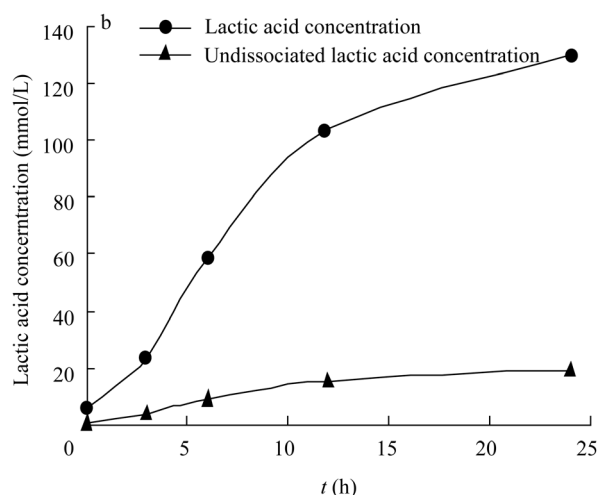


图 1b 肠乳杆菌 L_1 产乳酸能力随时间变化图

Fig. 1b Variation of lactic acid concentration according to time

离乳酸浓度 0 h~12 h 期间缓慢上升, 12 h 时达到 15.52 mmol/L, 12 h~24 h 趋于平稳, 24 h 时达到

19.35 mmol/L。

2.2 O138 存活影响动力学试验

不同处理对 O138 存活影响见图 2a。CFUS 对 O138 存活影响最大, 存活数由 $10^{6.8}/\text{mL}$ 降为 $10^{6.1}/\text{mL}$, 与对照相比下降了 87%; 其次为 pH 值 4.5 的乳酸对照液, 存活数由 $10^{6.9}/\text{mL}$ 降为 $10^{6.3}/\text{mL}$, 与对照相比下降了 76%; 并且 6 h、12 h、24 h CFUS 与含相同乳酸浓度的乳酸对照液抑菌效果均显著优于 pH 值 4.5 无菌 MRS ($P<0.05$), 而 pH 值 4.5 无菌 MRS 对 O138 存活影响小, 存活数变化范围小。

不同未解离乳酸浓度对 O138 存活影响见图 2b。CFUS、pH 值 4.5 的乳酸对照液对 O138 存活均有抑制作用, 并且随着未解离乳酸浓度的升高, 抑制效果增强; CFUS、pH 值 4.5 的乳酸对照液对 O138 存活抑制效果接近, 并且 CFUS 抑菌效果要略好于含相同未解离乳酸浓度的 pH 值 4.5 的乳酸对照液处理组, 但差异不显著。

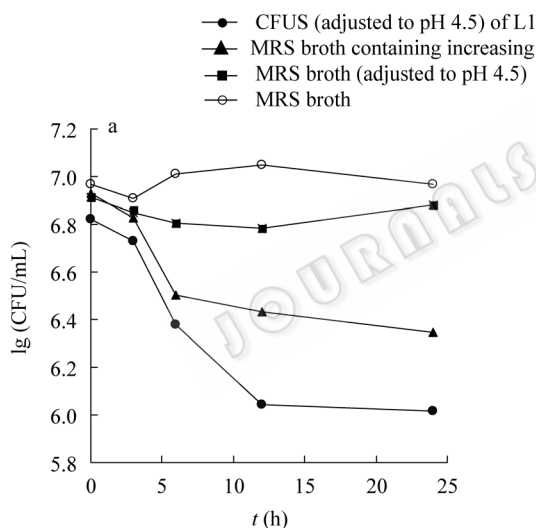


图 2a 不同处理对 O138 存活数的影响

Fig. 2a Antibacterial activity of different treatment against O138

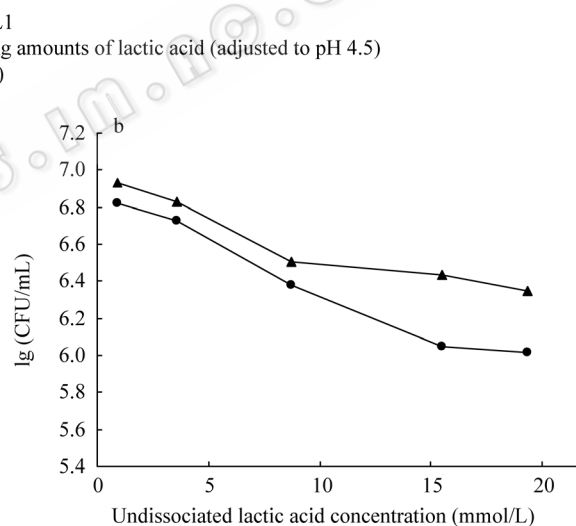


图 2b O138 在不同未解离乳酸浓度下的存活数

Fig. 2b Survival of O138 under different concentration of undissociated lactic acid

2.3 K88 存活影响动力学试验

不同处理对 K88 存活影响见图 3a。CFUS 对 O138 存活影响最大, 存活数由 $10^7/\text{mL}$ 降为 $10^{6.5}/\text{mL}$, 与对照相比下降了 91%; 其次为 pH 值 4.5 的乳酸对照液, 存活数由 $10^{7.3}/\text{mL}$ 降为 $10^{6.7}/\text{mL}$, 与对照相比下降了 87%; 并且 6 h、12 h、24 h CFUS 与含相同乳酸浓度的乳酸对照液抑菌效果均显著优于 pH 值 4.5 无菌 MRS ($P<0.05$), 而 pH 值 4.5 无菌 MRS 对

O138 存活影响小, 存活数变化范围小。

不同未解离乳酸浓度对 K88 存活影响见图 3b。CFUS、pH 值 4.5 的乳酸对照液对 K88 存活均有抑制作用, 并且随着未解离乳酸浓度的升高, 抑制效果增强; CFUS、pH 值 4.5 的乳酸对照液对 K88 存活抑制效果接近, 并且 CFUS 抑菌效果要略好于含相同未解离乳酸浓度的 pH 值 4.5 的乳酸对照液处理组, 但差异不显著。

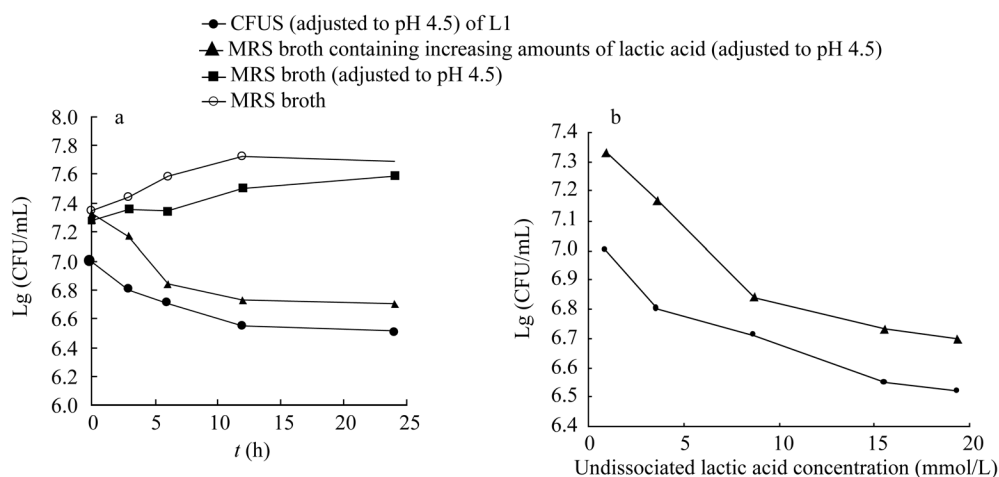


图 3a 不同处理对 K88 存活数的影响
Fig. 3a Antibacterial activity of different treatment against K88

图 3b K88 在不同未解理乳酸浓度下的存活数
Fig. 3b Survival of K88 under different concentration of undissociated lactic acid

2.4 代谢产物中 VFA 浓度

肠乳杆菌 L_1 24 h 发酵液中 VFA 浓度变化见图 4a、4b: 乙酸浓度在 0 h~3 h 期间迅速上升, 3 h 浓度极显著高于 0 h 浓度 ($P<0.01$), 3 h、6 h、12 h 浓度趋于稳定, 并于 6 h 浓度达到最大 (49.61 mmol/L), 24 h 浓度降低至 44.89 mmol/L 并且显著低于 12 h 浓度。丁酸浓度在 0 h~3 h 期间迅速上升, 3 h 浓度极显著高于 0 h 浓度 ($P<0.01$), 3 h、6 h、12 h、24 h 浓度趋于稳定, 并于 24 h 浓度达到最大 (1.925 mmol/L)。肠乳杆菌 L_1 24 h 发酵产物中丙酸含量较低 (数据未显示)。

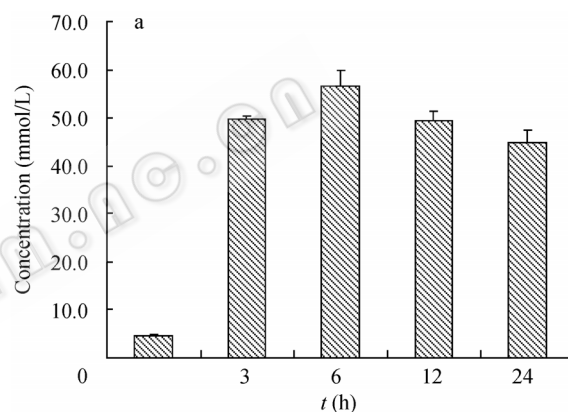


图 4a 发酵液中乙酸浓度图 (mmol/L)
Fig. 4a The concentration of acetate in the culture

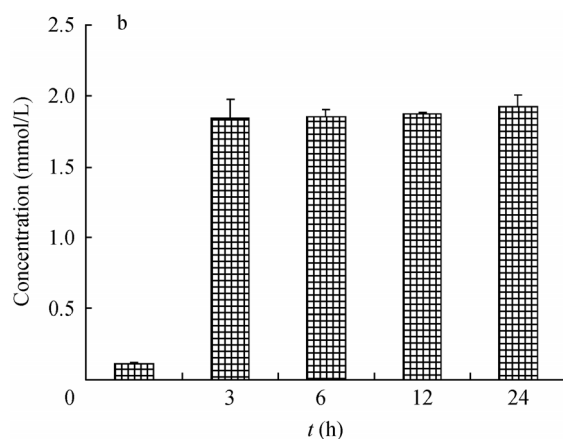


图 4b 发酵液中丁酸浓度图 (mmol/L)
Fig. 4b The concentration of Butyrate in the culture

3 讨论

断奶尤其是早期断奶给仔猪带来很大的应激, 仔猪从吮乳转向采食日粮成分相差很大的固态饲料, 同时早期断奶仔猪胃肠道结构和机能发育的不完全, 致使仔猪肠道中优势菌组成及功能发生了显著的变化, 尤其是一些有益的乳杆菌在数目上由于日粮的影响受到明显地抑制, 而一些病原性大肠杆菌 (ex ETEC、STEC) 在蛋白质丰富的环境中迅速增殖, 分别引起断奶仔猪腹泻、水肿病, 给养猪业造成很大的危害^[6]。

在饲料中添加来自同种动物肠道的益生菌, 是一种直接调控宿主胃肠道微生物区系平衡的有效方法^[7]。本实验从水肿病康复仔猪的小肠黏膜上分离出 1 株肠乳杆菌, 对酸、胆盐和热处理具有很好的耐受能力, 并且产乳酸能力较强, 具有良好的开发

前景。

对特定肠道致病菌的抑制、杀灭作用是筛选益

生菌的另一重要指标^[8]。STEC 具有较强的耐酸特性,单纯的低酸环境即较高的 H^+ 浓度不能有效抑制 STEC 存活^[9,10]。本实验所用 O138、K88 菌株在 pH 4.5 条件下,细菌数与空白处理比较,并无显著变化,O138 和 K88 可能具有耐酸系统(ATR),在低酸环境下激活 ATR 并使 O138、K88 适应低酸环境^[3]。

乳酸菌代谢物中未解离乳酸发挥了对特定肠道致病菌的主要抑菌作用。未解离乳酸具有高脂溶性,能融入细胞膜并以未解离乳酸的分子形式渗透入特定肠道致病菌细胞质,酸化细胞质,并破坏细胞膜的底物转运、能量供应、大分子合成,达到抑菌效果,并且在一定的低酸环境下, ΔpH (致病菌细胞膜内外 pH 差值)驱动力能增强未解离有机酸的细胞毒性^[3,10-12]。但 Ogawa 和 Gonzalez 报道,部分 STEC 菌株 ATR 系统具有适应有机酸的渗透作用,对有机酸毒性具有一定的耐受能力^[3,10]。本研究中,肠乳杆菌 L_1 发酵上清液与乳酸对照液均对 O138、K88 存活产生了很大的抑制作用,并且在 pH 值始终保持在 4.5 条件下,随着发酵上清液与乳酸对照液中未解离乳酸浓度的升高,对 O138、K88 存活的抑制作用增强。本实验验证了肠乳杆菌 L_1 发酵上清液对 O138、K88 存活的抑制作用主要来自未解离乳酸。

乳杆菌除乳酸外,还产生其他有机酸、细菌素、抗菌肽等代谢产物,其中乳酸、乙酸对革兰氏阴性菌均有抑菌作用^[4,13,14]。Makras 报道,乳杆菌抑制沙门氏菌的试验中,部分乳酸菌抑菌效果来自乳酸作用;也有部分乳酸菌发酵液中存在其他代谢产物可以有效抑制沙门氏菌存活^[12]。本实验的肠乳杆菌 L_1 在不同时间点的发酵上清液对 O138、K88 的抑制效果均好于乳酸对照液。经检测本实验中使用的肠乳杆菌 L_1 可以产生大量乙酸,在发酵 3 h 可达到 49.61 mmol/L。已有报道表明,在乳酸菌代谢产物中,对致病性大肠杆菌的抑制及杀菌起主要作用的物质是乳酸和乙酸^[4],所以本实验中肠乳杆菌 L_1 发酵上清液抑菌效果优于乳酸对照液可能是源自乙酸及其他代谢产物的抑菌作用,进一步的实验应该针对细菌素、抗菌肽等其他代谢产物作更深入的研究。

综上所述,肠乳杆菌 L_1 不仅产乳酸能力强,对酸、胆盐和温度具有很好的耐受能力,而且对 O138、K88 体外存活有很好的抑制效果,并且肠乳杆菌 L_1 发酵上清液抑菌效果优于乳酸对照液的抑菌效果,存在其他有效的抑菌物质。

参 考 文 献

- [1] Angelis MD, Siragusa S, Berloco M, *et al.* Selection of potential probiotic lactobacilli from pig feces to be used as additives in pelleted feeding. *Res Microbiol*, 2006, **157**: 792–801.
- [2] Muthukumarasamy P, Holley R. A Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in dry fermented sausages containing micro-encapsulated probiotic lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 2007, **24**: 82–88.
- [3] Michinaga O, Kensuke S, Koji N, *et al.* Inhibition of in vitro growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic *Lactobacillus* strains due to production of lactic acid. *Int J Food Microbiol*, 2001, **68**: 135–140.
- [4] Jin LZ, Marquardt RR, Baidoo SK. Inhibition of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88, K99 and 987P by the *Lactobacillus* isolates from porcine intestine. *J Sci Food Agric*, 2000, **80**: 619–624.
- [5] 秦为琳. 应用气相色谱法测定挥发性脂肪酸的改进. 南京农学院学报, 1982, **5**: 110–116
- [6] Lalles JP, Bosi P, Smidt H, *et al.* Weaning — A challenge to gut physiologists. *Livestock Science*, 2007, **108**: 82–93.
- [7] Bauer E, Williams BA, Smidt H, *et al.* Influence of dietary components on development of the microbiota in single-stomached species. *Nutr Res Rev*, 2006, **19**: 1–17.
- [8] Angelis D, Siragusa M, Berloco S, *et al.* Isolation, identification and selection of potential probiotic lactobacilli from pig faeces to be used as additives in pelleted feeding. *Res Microbiol*, 2006, **157**: 792–801.
- [9] Besser RE, Lett SM, Weber JT, *et al.* An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. *J Am Med Assoc*, 1993, **269**: 2217–2220.
- [10] Gonzalez FD, Russell JB. The ability of *Escherichia coli* O157:H7 to decrease its intracellular pH and resist the toxicity of acetic acid. *Microbiology*, 1997, **143**: 1175–1180.
- [11] Trygve E. The antimicrobial effect of dissociated and undissociated sorbic acid at different pH levels. *Journal of Applied Bacteriology*, 1983, **54**: 383–389.
- [12] Cherrington CA, Hinton M, Chopra I. Effect of short chain organic acids on macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *J App Bacterio*, 1990, **68**: 69–74.
- [13] Makras L, Triantafyllou V, Messaoudi DF, *et al.* Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. *Res Microbiol*, 2006, **157**: 241–247.
- [14] Tsioloyiannis VK, Kypiakakis SC, Vlemmas L, *et al.* The effect of organic acids on the control of post-weaning oedema disease of piglets. *Res Vet Sci*, 2001, **70**: 281–285.