

嗜酸乳杆菌和婴儿双歧杆菌对肠道致病菌的抑制性

张英春,张兰威*,李妍

(东北农业大学食品学院 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:通过实验菌株发酵液对三种肠道致病菌生长抑制的研究,得出嗜酸乳杆菌 PB1、A878 和婴儿双歧杆菌 Pba 对致病菌的抑制性较强,形成明显的抑菌圈。PB1、A878、Pba 的抑菌机理主要是有机酸,其他抗菌类物质作用不明显。

关键词:乳杆菌;双歧杆菌;致病菌;抑制性

中图分类号:Q939.11⁺7; Q939.1; R378 **文献标识码** A

益生菌是指能通过改善其寄主肠道微生物平衡而有益于寄主的一类微生物^[1]。目前研究最多的是乳酸菌,双歧杆菌等。研究表明,双歧杆菌和乳酸菌作为人体内最多、最常见的生理性细菌,对人体生理功能的调节是通过生物屏障与化学屏障来阻止和抑制各种致病菌与条件致病菌在肠道的定植、入侵和生长繁殖^[2]。对于乳酸菌和双歧杆菌的生理功能研究很多,其中促进润肠通便,改善肠道菌群失调,调节肠道微生态平衡是其最直接和最根本的保健作用。本实验对分离的 3 株益生菌在体外对 3 种肠道致病菌的抑制性和抑制机理进行了研究。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 实验菌株 嗜酸乳杆菌 PB1、A878;双歧杆菌 Pba,均由本实验室分离。

1.1.2 致病菌 副伤寒甲沙门氏菌 2005;志贺氏痢疾杆菌 2002-2;埃希氏大肠杆菌 ATCC25922。均购于黑龙江省临床检测中心。

1.1.3 培养基 TPY 培养基;MRS 培养基;普通营养琼脂培养基。

1.2 实验方法

1.2.1 乳杆菌和双歧杆菌发酵液的制备 将 PB1、A878、Pba 活化 2~3 代后,按 2% 的接菌量接至各培养基中,37℃ 恒温培养 24 h(Pba 厌氧培养),测定其抑菌活性。

1.2.2 致病菌悬液的制备 无菌条件下挑取活化好的菌种接至普通肉汤蛋白胨试管中,37℃ 恒温培养 18 h,使其菌浓度达到 10^8 cfu · mL⁻¹ 左右备用。

1.2.3 嗜酸乳杆菌和婴儿双歧杆菌对 3 种致病菌的抑制性

牛津小杯法^[3]将三种致病菌悬液分别用无菌吸管吸取 0.10 mL 于凝固的营养琼脂平板涂布,平衡 30 min。在无菌条件下将无菌的牛津小杯(外径 8 mm)放在平板上,然后吸取 200 μL 发酵液于杯中,对照组加未接菌的培养基。平放 37℃ 恒温培养 24 h,测定 PB1、A878、Pba 对 3 种致病菌形成的抑菌圈大小,照相记录。

1.2.4 PB1、A878、Pba 上清液对致病菌的抑制作用 将实验菌株按 2% 的接菌量接至 TPY 或 MRS 培养基中至对数生长期末期(24 h 左右)取出培养物,在 17 000 g,离心 30 min,取 1/2 保持原 pH,另 1/2 用高浓度的 NaOH 调至中性备用,5 mL 的上清液加到 10 mL 的 MRS 或 TPY 培养基中,然后将 1 mL 的致病菌悬液加入到上述培养基中,37℃ 培养 24 h,每隔 2 h 测其 OD₆₅₀,以不加上清液的 TPY 或 MRS 培养基作为对照。同时测上清液对致病菌产生抑菌圈大小^[4]。

收稿日期:2003-06-03

基金项目:黑龙江省教育厅重大项目功能性乳酸菌发酵剂(含微生态制剂)及相应发酵食品产业化开发。2002-2004 项目编号:10511Z003

作者简介:张英春(1975-),女,东北农业大学食品学院 2000 级研究生,硕士。

* 通讯作者

2 结果与讨论

PB1、A878、Pba 对大肠杆菌、痢疾杆菌、沙门氏菌的形成的抑菌圈见表 1 和图 1~3。

2.1 三株实验菌株对致病菌的抑制作用

表 1 实验菌株对三种致病菌的抑制作用($\bar{x} \pm s$ mm)

Table 1 The growth inhibition of three pathogens by the fermented liquor of probiotic bacteria($\bar{x} \pm s$ mm)

菌株 Bacteria	pH	检测项目 Estimation content		
		埃希氏大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	志贺氏痢疾杆菌 <i>Shigellosis</i>	副伤寒甲沙门氏菌 <i>Salmonell</i>
对照 Control	6.11	8.00±0.00 ^c	8.00±0.00 ^d	8.00±0.00 ^d
PB1	3.75	11.75±1.35 ^{aA}	13.63±1.80 ^{aA}	22.38±1.10 ^{aA}
A878	3.90	11.13±0.41 ^{aBC}	12.50±1.29 ^{bb}	19.75±2.75 ^{bA}
Pba	4.02	9.25±0.29 ^{bBC}	9.88±0.85 ^{cb}	12.63±0.75 ^{cA}

* 大写表示 PB1、A878、Pba 分别对三种致病菌的抑制性比较;小写为 PB1、A878、Pba 对同一种致病菌抑制性的比较。

* A, B, C means the comparison of the growth inhibition of three pathogens by the fermented liquid of PB1, A878 and Pba; a, b, c means the comparison of the same pathogens inhibition by PB1, A878 and Pba

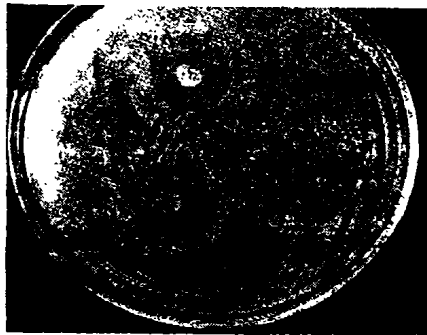


图 1 PB1(1)、A878(2)、Pba(3)
对痢疾杆菌形成的抑菌圈

Fig. 1 The growth inhibition of *Shigellosis*
by PB1(1)、A878(2)、Pba(3)

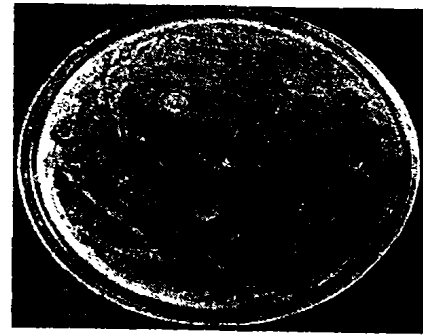


图 2 PB1(1)、A878(2)、Pba(3)
对沙门氏菌形成的抑菌圈

Fig. 2 The growth inhibition of *Salmonella*
by PB1(1)、A878(2)、Pba(3)

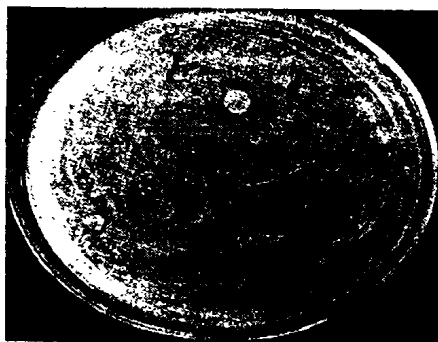


图 3 PB1(1)、A878(2)、Pba(3)
对大肠杆菌形成的抑菌圈

Fig. 3 The growth inhibition of *Escherichia coli*
by PB1(1)、A878(2)、Pba(3)

从表 1 的统计分析表明 PB1、A878、Pba 对 3 种

致菌的抑制能力不同,差异极显著($P < 0.01$),其中对沙门氏菌的抑菌能力最强,其次为痢疾杆菌和大肠杆菌。PB1、A878、Pba 的发酵液对同一致病菌的抑制能力也不同($P < 0.05$),其中 PB1 的抑菌能力最强,对沙门氏菌形成的抑菌圈直径在 20 mm 左右,而且清晰,对大肠杆菌和痢疾杆菌形成抑菌圈的直径超过 11 mm。其次为 A878 和 Pba。但是 PB1、A878、Pba 都能对这 3 种致病菌产生不同程度的抑制性,从图 1~3 也可看出 PB1、A878、Pba 对三种致病菌的抑菌效果。乳酸菌 PB1、A878 和双歧杆菌 Pba 发酵碳水化合物产生大量的乙酸和醋酸使培养基中 pH 大大降低,是其发挥抑菌作用的主要原因。当发酵至 24 h 时, PB1、A878、Pba 分别为 3.75, 3.90, 4.02;而肠道致病菌的最适 pH 6.8~7.0,显然在较强的酸性环境下,对这些致病菌的生长是不利的,抑制其生长是不可避免的。同时可见因为他们产

酸能力的不同而导致他们抑菌能力的差异。

2.2 PB1、A878、PBa 上清液对致病菌的抑制作用

乳酸菌和双歧杆菌的抑菌活性是多方面的,不同的乳酸菌产生的原因不同,其主要机制是利用碳水化合物产生乳酸和醋酸、分泌细菌素、产生 H_2O_2 等^[5,6]。益生菌产生的有机酸使肠道内 pH 及 Eh 下降,造成肠内酸性环境,对肠道致病菌如大肠杆菌、

痢疾杆菌、艰难梭菌沙门氏菌有拮抗作用。低 pH 及 Eh 能促进肠道蠕动,有益于肠道中各种细菌间的平稳,调整肠道菌群失调。本研究将 pH 接近于 4 的三株菌 PB1、A878、Pba 的上清液与中和后的上清液以一定比例加入到培养基中,分别对 3 种致病菌进行培养,如图 4~9。

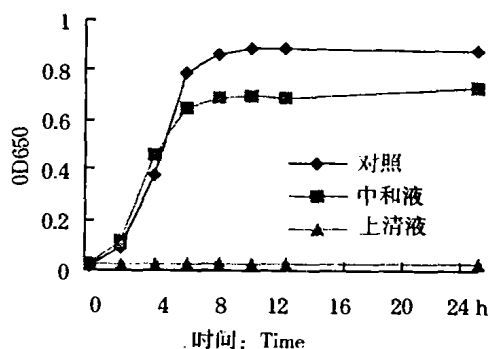


图 4 A878 上清液对大肠杆菌的抑菌效果
Fig. 4 Inhibitory effect of supernatant fluid of A878 on the growth of *Escherichia coli*

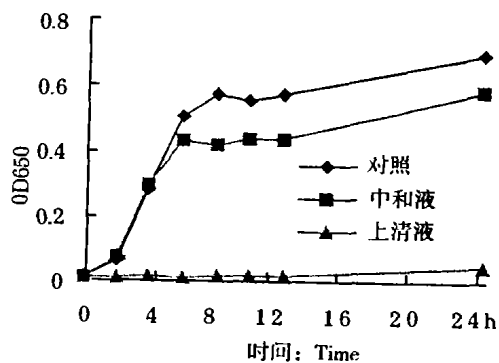


图 5 A878 上清液对痢疾杆菌的抑菌效果
Fig. 5 Inhibitory effect of supernatant fluid of A878 on the growth of *shigellosis*

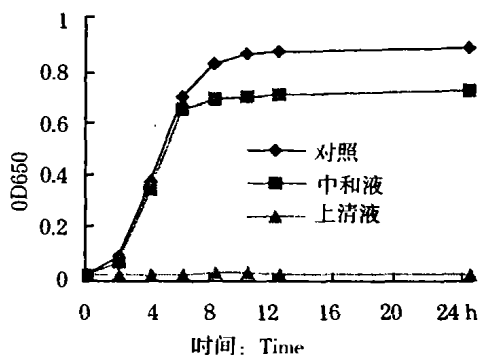


图 6 PB1 上清液对大肠杆菌的抑菌效果
Fig. 6 Inhibitory effect of supernatant fluid of PB1 on the growth of *Escherichia coli*

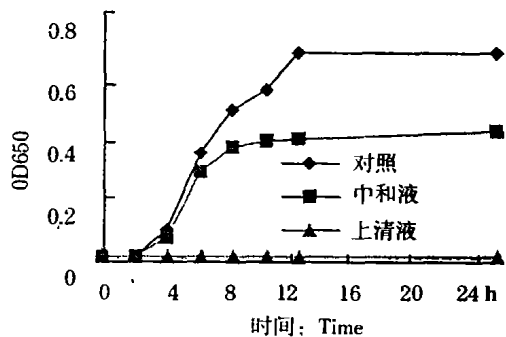


图 7 PB1 上清液对痢疾杆菌的抑菌效果
Fig. 7 Inhibitory effect of supernatant fluid of PB1 on the growth of *shigellosis*

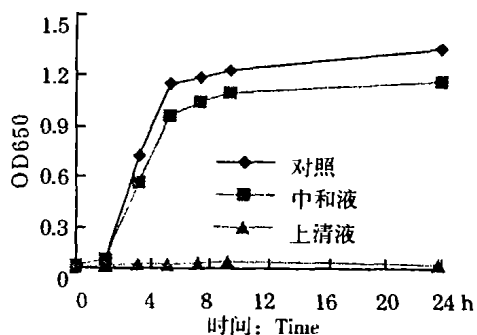


图 8 PBa 上清液对大肠杆菌的抑菌效果
Fig. 8 Inhibitory effect of supernatant fluid of Pba on the growth of *Escherichia coli*

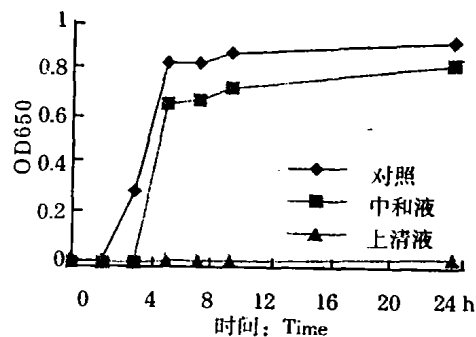


图 9 PBa 上清液对痢疾杆菌的抑菌效果
Fig. 9 Inhibitory effect of supernatant fluid of Pba on the growth of *shigellosis*

结果表明, PB1、A878 和 Pba 的上清液对大肠杆菌、痢疾杆菌还有沙门氏菌(未列出)都具有很强的抑制作用,在监测的 24 h 内 OD₆₅₀几乎没有发生变化,而中和液组中致病菌都有长势,但与对照组相比致病菌的长势也受到了一定的抑制,尤其是 PB1 和 A878,这可推断出,除有机酸外益生菌也会产生其他的抑菌物质如细菌素,但其抑制作用不够强,因此可认为这 3 种益生菌产生的抑菌物质主要是酸类物质,其次是细菌素和 H₂O₂ 等,但这些抑菌物质的抑菌活性较弱,不能完全抑制致病菌的生长,假如细菌素类物质发挥主要作用,则中和液的实验结果应与上清液的结果是一致的^[4],但本实验未能得出这种结果,并且当用上清液和中和液分别对致病菌做抑菌实验时发现中和液不能形成明显的抑菌圈,更进一步证明本研究所筛选的菌株产生抑菌物质主要是酸类物质。方祥等^[7]报道乳酸菌随着 pH 值的升高,抑菌活性呈现下降趋势,乳酸菌的抗菌物质在酸性条件下较稳定;而 Cai 等^[8]认为乳酸菌的抑菌物质为乳酸,而不是细菌素,这与本实验的结果是一致的。

3 结 论

本实验所研究的 3 种潜在益生菌,嗜酸乳杆菌

PB1、A878 和双歧杆菌 Pba 具有较强的抑菌活性,对 3 种致病菌能够形成明显的抑菌圈,其抑菌机理主要是产生酸类物质发挥主要作用。

参 考 文 献

- [1] 杜震宇,刘永坚. 水产动物益生菌进展[J]. 中国微生态杂志, 2002,14(1):56-60.
- [2] 康白. 双歧杆菌[M]. 大连:大连海事大学出版社,1998:12.
- [3] 韩文瑜. 病原细菌检验技术[M]. 长春:吉林出版社,1992:58,78,85.
- [4] Gibson G R, Wang X. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic Bacteria[J]. journal of Applied Bacteriology,1994,(77):412-420.
- [5] Sorrels K M, Speck M L. Inhibition of Salmonella gallinarum by culture filtrates of Leuconostor citrovorum[J]. J Dairy Sci,1970,(53):237-343.
- [6] Fuller P. Probiotics in man and animal[J]. J Appl Bacteri, 1989,(6):365-378.
- [7] 方祥,胡文锋. 乳酸菌的分离、鉴定及生长特性[J]. 中国微生态学杂志,2000,12(5):262-264.
- [8] Cai Y, Benno Y. Specific probiotic characterization of *Weissella hellenica* DS-12 isolated from flounder intestine[J]. J General and Appl Microbiol,1998,44(5):311-316.

Study on the growth inhibition of some pathogens by the *L. acidophilus* and *B. infantis*

ZHANG Ying-Chun, ZHANG Lan-Wei, LI Yan

(College of Food, Northeast Agricultural University, Harbin Heilongjiang 150030, PRC)

Abstract: The growth inhibition of some pathogens by the fermented liquor of probiotic bacteria were tested. The results indicated that growth of three pathogens were strongly inhibited by *L. acidophilus* PB1, A878 and *B. infantis* PBa. The diameter of inhibition zone was clear. The inhibition mechanisms of PB1, A878, PBa were some organic acids and antibacterial substance in fermented liquor was not important.

Key words: lactobacillus; bifidobacteria; pathogens; growth inhibition