

不同酸化剂对常见致病菌的体外抑菌效果研究

朱晓萍, 庄智威, 崔英杰, 陈冠何, 尚秀国* (佛山科学技术学院生命科学与工程学院, 广东佛山 528231)

摘要 采用琼脂平板打孔法、试管二倍稀释法和平板培养法,进行了8种单一酸化剂对3种标准菌和1株临床分离菌(大肠杆菌)的体外抑菌效果观察。结果表明,8种单一酸化剂对标准大肠杆菌、金色葡萄球菌、沙门氏菌及临床分离大肠杆菌菌株具有不同程度的抑菌作用,其中甲酸、富马酸和酒石酸抑菌活性最强,乳酸、苹果酸和柠檬酸相对最弱。

关键词 酸化剂;有害菌;最小抑菌浓度;最小杀菌浓度

中图分类号 S816.7 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)04-0078-03

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2020.04.023



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Study on the Antibacterial Effects of Different Acidifying Agents on Common Pathogenic Bacteria *in vitro*

ZHU Xiao-ping, ZHUANG Zhi-wei, CUI Ying-jie et al (School of Life Science and Engineering, Foshan University, Foshan, Guangdong 528231)

Abstract The antibacterial effects of eight kinds of single acidifying agents on three standard strains, one clinical isolation of *E. coli in vitro* were observed by using agar diffusion plate method, test tube double dilution method and plating culture method. The results showed that eight kinds of acidifying agents had different antimicrobial effects on standard *E. coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella*, and clinical isolation of *E. coli*. The antibacterial activity of formic acid, fumaric acid and tartaric acid were the strongest, and the antibacterial activity of lactic acid, malic acid and citric acid were the weakest.

Key words Acidifying agents; Harmful bacteria; Minimal inhibitory concentration; Minimal bactericidal concentration

酸化剂作为一种无残留、无抗药性、无毒害作用的环保型添加剂,不仅具有抑菌作用,而且还能有效降低饲料在消化道内的pH,提高营养物质的消化利用率,增强机体生物免疫力,缓解应激反应,同时具有改善动物饲料的适口性,增加畜禽的采食量,促进机体生长等功能^[1-6]。笔者采用琼脂平板打孔法和二倍稀释法,研究8种酸化剂对3种标准菌株(大肠杆菌、金色葡萄球菌和沙门氏菌)和1株临床分离菌(大肠杆菌)的抑菌效果,旨在了解不同单一酸化剂对致病细菌的抑菌效果,将酸化剂作为抗生素替代品应用于饲料添加剂生产提供一定的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 甲酸、二甲酸钾、乳酸、苹果酸、酒石酸、富马酸、柠檬酸和磷酸。

1.2 试验菌种 大肠杆菌 ATCC 25922、金黄色葡萄球菌 ATCC 6538、肠沙门氏菌 ATCC9120,购于广东环凯微生物科技有限公司。猪大肠杆菌临床株来自佛山科学技术学院动物科学实验室。

1.3 主要仪器和试剂 主要仪器有立式灭菌锅(YXQ-LS-50S II)、超净工作台(SW-CJ-2D)、恒温振荡器(MX-F)、恒温鼓风干燥箱、恒温培养箱等;主要试剂有LB营养肉汤培养基、MH营养固体琼脂、无菌生理盐水。

1.4 菌悬液的制备 取活化好的菌株,挑取单菌落接种到3 mL的无菌生理盐水中,制备菌体悬浮液,使悬浮液中细菌数为 1×10^7 CFU/mL。

1.5 抑菌圈直径的测定 在无菌条件下取200 μ L菌悬液涂

布均匀在培养基平板上,用无菌的打孔器在每个平板上均匀打4个孔,用移液器将100 μ L酸化剂液注入孔内。然后,将平板置于37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中培养24 h,培养好后取出并测定其抑菌圈直径。

1.6 最小抑菌浓度(MIC)的测定 用灭菌的营养肉汤培养基将8种酸化剂按倍比浓度稀释配制成终浓度为16.000、8.000、4.000、2.000、1.000、0.500、0.250和0.125 g/L的溶液,并分装到各试管中,每个试管2.7 mL。然后将300 μ L菌液加入不同浓度的试管中,每个样品做3个重复,同时每个梯度组设不含酸化剂只含等量菌液的阳性对照管1支以及不含酸化剂也不含菌液的阴性对照管1支,置于37 $^{\circ}$ C恒温振荡培养箱中培养16~18 h。肉眼观察证实无菌生长试管中的最低酸化剂浓度即为最小抑菌浓度。使用紫外分光光度计,以空白组作为校准参照,在580~600 nm波长处检测4种菌在不同浓度梯度酸化剂中的生长情况,没有细菌生长的最低稀释浓度即为最小抑菌浓度(MIC)。

1.7 最小杀菌浓度(MBC)的测定 从各种酸化剂的MIC和高于MIC浓度的各试管中,分别吸取75 μ L培养物,接种于琼脂培养基,37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中培养48 h,肉眼观察无菌落生长的最低酸化剂浓度即为最小杀菌浓度。

2 结果与分析

2.1 8种酸化剂对致病菌的抑菌作用 由表1可知,在8种酸化剂浓度均为10 mg/mL时,对标准大肠杆菌和临床分离大肠杆菌的抑菌效果最强的是甲酸,其次是二甲酸钾,最弱的是磷酸。对标准金色葡萄球菌的抑菌效果最强的是二甲酸钾,其次是酒石酸,最弱的是乳酸。对标准沙门氏菌的抑菌作用最强的是甲酸,其次是酒石酸,最弱的是磷酸。

2.2 8种酸化剂对致病菌的最小抑菌浓度 由表2可知,甲酸对大肠杆菌、临床分离大肠杆菌、金色葡萄球菌和沙门氏

基金项目 佛山市科技创新平台项目(佛科2016[107])。

作者简介 朱晓萍(1969—),女,黑龙江虎林人,副教授,博士,从事动物生产与繁育研究。*通信作者,副教授,博士,从事动物营养与饲料研究。

收稿日期 2019-08-03

菌的抑菌作用明显,在 0.31 mg/mL 浓度以下即可起到抑菌效果。乳酸、富马酸和酒石酸对大肠杆菌、金色葡萄球菌和沙门氏菌的最小抑菌浓度为 1.25 mg/mL,同时富马酸对分离大肠杆菌的抑菌浓度也是 1.25 mg/mL。柠檬酸、苹果酸、磷酸和二甲酸钾对 4 种菌的最低抑菌浓度为 2.50 mg/mL。另外,6 种酸化剂对临床分离大肠杆菌的最低抑菌浓度也是 2.50 mg/mL。这说明甲酸的抑菌浓度最低,其次为富马酸,再次为酒石酸和乳酸,其他酸化剂的抑菌浓度较高。

表 1 8 种酸化剂对 3 种标准菌和 1 株分离菌的抑菌圈直径

Table 1 The antibacterial circle diameter of eight kinds of acidifying agents on three standard bacteria and one isolate mm

酸化剂 Acidifying agents	大肠杆菌 ATCC 25922 <i>E. coli</i> ATCC 25922	大肠杆菌 (分离株) <i>E. coli</i> (isolate)	金色葡萄球菌 ATCC 6538 <i>S. aureus</i> ATCC 6538	沙门氏菌 CC9120 <i>Salmonella</i> ATCC9120
甲酸 Formic acid	9.65	5.67	5.53	12.08
二甲酸钾 Potassium diformate	7.51	3.89	9.25	5.91
酒石酸 Tartaric acid	5.89	4.82	7.53	8.51
乳酸 Lactic acid	5.26	3.77	1.25	3.47
富马酸 Fumaric acid	4.98	4.44	6.40	6.71
柠檬酸 Citric acid	5.33	2.13	3.43	3.79
苹果酸 Malic acid	2.49	2.61	2.23	4.09
磷酸 Phosphoric acid	2.37	2.10	1.47	3.03

注:酸化剂浓度均为 10 mg/mL

Note: The concentration of each acidifying agent is 10 mg/mL

表 2 8 种酸化剂对 3 种标准菌和 1 株分离菌的最小抑菌浓度

Table 2 Minimum inhibitory concentration of eight kinds of acidifying agents on three standard bacteria and one isolate mg/mL

酸化剂 Acidifying agents	大肠杆菌 ATCC 25922 <i>E. coli</i> ATCC 25922	大肠杆菌 (分离株) <i>E. coli</i> (isolate)	金色葡萄球菌 ATCC 6538 <i>S. aureus</i> ATCC 6538	沙门氏菌 CC9120 <i>Salmonella</i> ATCC9120
甲酸 Formic acid	0.31	0.31	0.31	0.31
富马酸 Fumaric acid	1.25	1.25	1.25	1.25
酒石酸 Tartaric acid	1.25	2.50	1.25	1.25
乳酸 Lactic acid	1.25	2.50	1.25	1.25
柠檬酸 Citric acid	2.50	2.50	2.50	2.50
苹果酸 Malic acid	2.50	2.50	2.50	1.25
磷酸 Phosphoric acid	2.50	2.50	2.50	2.50
二甲酸钾 Potassium diformate	2.50	2.50	2.50	2.50

2.3 8 种酸化剂对致病菌的最小杀菌浓度 由表 3 可知,甲

酸对大肠杆菌的最小杀菌浓度最低,为 1.25 mg/mL;其次是富马酸和酒石酸,最小杀菌浓度为 2.50 mg/mL;其余 5 种酸化剂的最小杀菌浓度均为 5.00 mg/mL。甲酸和富马酸对临床分离大肠杆菌的最小杀菌浓度最低,为 1.25 mg/mL;其次是酒石酸,为 2.50 mg/mL;最弱的是乳酸,最小杀菌浓度为 10.00 mg/mL。甲酸对金色葡萄球菌的最小杀菌浓度最低,为 1.25 mg/mL,其次是富马酸和酒石酸,最弱的是乳酸、柠檬酸和苹果酸。甲酸对沙门氏菌的最小杀菌浓度最低,为 1.25 mg/mL;其次是乳酸、富马酸和酒石酸,最弱的是乳酸和柠檬酸浓度是 10.00 mg/mL。这说明在所有单一酸化剂中甲酸的杀菌浓度最低,其次为富马酸和酒石酸,其他酸化剂的杀菌浓度均较高。

表 3 8 种酸化剂对 3 种标准菌和 1 株分离菌的最小杀菌浓度

Table 3 Minimum bactericidal concentrations of eight kinds of acidifying agents on three standard bacteria and one isolate mg/mL

酸化剂 Acidifying agents	大肠杆菌 ATCC 25922 <i>E. coli</i> ATCC 25922	大肠杆菌 (分离株) <i>E. coli</i> (isolate)	金色葡萄球菌 ATCC 6538 <i>S. aureus</i> ATCC 6538	沙门氏菌 CC9120 <i>Salmonella</i> ATCC9120
甲酸 Formic acid	1.25	1.25	1.25	1.25
富马酸 Fumaric acid	2.50	1.25	2.50	2.50
酒石酸 Tartaric acid	2.50	2.50	2.50	2.50
乳酸 Lactic acid	5.00	10.00	10.00	2.50
柠檬酸 Citric acid	5.00	5.00	10.00	10.00
苹果酸 Malic acid	5.00	5.00	10.00	10.00
磷酸 Phosphoric acid	5.00	5.00	5.00	5.00
二甲酸钾 Potassium diformate	5.00	5.00	5.00	5.00

3 讨论

大肠杆菌、金色葡萄球菌和沙门氏菌是引起畜禽的疾病,在生产中流行范围广、发病率和死亡率高,给畜禽的养殖业造成巨大的经济损失。无机酸化剂在体内可完全解离酸根离子和氢离子,而氢离子通过降低病原菌细胞的渗透压体系,抑制病原菌的生长。

该研究结果表明,8 种单一酸化剂对标准大肠杆菌、金色葡萄球菌、沙门氏菌及临床分离大肠杆菌株具有不同程度的抑菌作用,其中甲酸、富马酸和酒石酸抑菌活性最强,乳酸、苹果酸和柠檬酸则相对最弱。马鑫等^[7]研究表明,蛋氨酸羟基类似物和乳酸、甲酸、二甲酸钾对鼠伤寒沙门氏菌、产气荚膜梭菌和空肠弯曲菌都有抑菌作用,与该试验结果相一致。张严等^[8]研究表明苯甲酸、山梨酸、柠檬酸、苹果酸和富马酸等对大肠杆菌和金色葡萄球菌均有抑制效果。Cornowicz^[9]在饲料中添加乳酸、丙酸、苹果酸饲喂肉鸡,发现不同酸化剂均可以降低粪便中嗜温细菌和真菌的数目,显著降低了

垫草中大肠杆菌、产气荚膜梭菌的数量。Brahma^[10]研究表明在饲料中添加乳酸、苹果酸、丙酸可以提高奶牛对疾病的抗耐受能力。

有机酸的抑菌机制可能是一方面解离出氢离子,产生氢离子效应;另一方面,小分子有机酸可透过细胞壁进入病原菌细胞内,抑制DNA和RNA的合成,进而起到抑菌和杀菌作用。但有关这方面的研究较少,尚需进一步研究。

参考文献

- [1] BURNELL T W, CROMWELL G L, STATHLY T S. Effects of dried whey and copper sulfate on the growth responses to organic acid in diets for weanling pigs[J]. *J Anim Sci*, 1988, 66(5): 1100-1108.
- [2] VERSTEEGH H A J, JONGBLOED A W. Lactic acid has a positive effect on broiler performance [J]. *World poultry*, 1999, 15(8): 16-17.
- [3] 石宝明, 单安山. 饲用酸化剂的作用与应用[J]. *饲料工业*, 1999, 20(1):

3-5.

- [4] LUCKST C. Effects of organic acids in animal nutrition: Alternatives for feed safety and animal health[J]. *Kraftfutter feed magazine*, 2003, 88(11/12): 370-372.
- [5] 黄凯. 抗菌型酸化剂的体外筛选及替代抗生素对肉仔鸡饲喂效果的研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2016.
- [6] 雒秋江, 朱文涛, 杨开伦, 等. 添喂四种酸化剂对肉仔鸡生产性能和日粮表现利用率影响的比较[J]. *新疆农业科学*, 2003, 41(1): 1-5.
- [7] 马鑫, 马秋刚, 计成, 等. 蛋氨酸羟基类似物和有机酸化剂对主要肠道病原菌体外抑菌效果的比较[J]. *动物营养学报*, 2008, 20(2): 238-241.
- [8] 张严, 胡松华, 张玲玲, 等. 不同酸化剂的抑菌效果研究[J]. *饲料研究*, 2018(2): 1-4, 21.
- [9] GORNOWICZ E. Microbiological evaluation of poultry house environments as influenced by acidifying preparations added to compound feed[J]. *Medycyna weterynaryjna*, 2004, 60(7): 755-758.
- [10] BRAHMA B. Effect of acidifier supplementation on growth performance and health of crossbred calves[J]. *Indian journal of dairy science*, 2004, 57(4): 279-281.

(上接第77页)

同时,可制定合理的生态补偿标准,使其在合理的阈值内浮动。从制度上明确湿地生态产品的服务功能价值以及实施生态补偿的标准,为生态环境建设提供规范长效的资金投入,为湿地生态补偿工作的有序开展提供资金保障。

3.4 协调好湿地保护与开发两者关系,加快湿地自然保护区建设、合理开发生态旅游资源 合理开发和利用,首先要加强保护,在开发中保护,在保护的基础上开发利用,采取多种形式,加快自然湿地的抢救性保护。应在继续完善建设现有湿地自然保护区和湿地公园的基础上,把扩大湿地保护面积作为首要任务。根据《森林河南生态建设规划(2018—2027年)》,确保到2027年湿地面积增加到80万hm²,湿地保护率稳定在50%,全省省级以上湿地公园数量达152个,总面积达11万hm²。《河南省湿地保护修复制度实施方案》明确规定每县(市、区)至少建立1处省级以上湿地保护区或湿地公园。

借鉴国内外先进经验,合理开发利用湿地生态旅游资源,首先湿地资源应在湿地环境承载力范围内适度开发,不影响湿地自然环境,不破坏湿地生态系统,不影响湿地生物生存。同时,注重突出湿地生态系统的生物多样性、候鸟观察、科普教育、地域人文等特点,建成各具特色的观光、休闲、体验的生态旅游典范。

3.5 建立“智慧湿地”综合信息平台,加强科研能力建设,提高湿地保护和管理水平 首先,要建立“智慧湿地”综合信息平台。通过GIS、LBS、计算机网络、物联网、大数据管理和分析等技术,设计、开发数据管理、查询展示、统计分析、实时监

测、辅助决策以及服务发布等功能的信息平台,为湿地保护和合理利用提供技术保障和服务。

同时,要加强科技支撑体系与科研能力建设,要推动湿地科学由单学科向多学科转化,静态向动态研究转化,短期定性向长期定量监测转化。加强湿地生态系统、分布与演替规律、功能和效益评估等湿地基础研究;加强保护技术、湿地恢复与修复技术、污染防治技术和资源监测技术、可持续利用模式等应用技术研究;加强湿地评价指标体系等湿地综合分类技术和标准化研究;加强生态和环境影响评价、补偿机制等管理政策的研究。

参考文献

- [1] 本刊评论员. 人与湿地,息息相关[J]. *河北林业*, 2019(2): 1.
- [2] 张中强. 今年河南将新建14个省级湿地公园[J]. *资源导刊*, 2019(2): 51.
- [3] 王春平. 河南省湿地资源现状调查与分析[J]. *河南林业科技*, 2018, 38(1): 29-33.
- [4] 王春平. 河南省重要湿地生态状况评价[J]. *林业资源管理*, 2016(3): 86-91.
- [5] 厉军, 郑路明, 李智, 等. 陆浑湖湿地保护与恢复技术[J]. *湿地科学与管理*, 2017, 13(1): 21-24.
- [6] 刘占朝, 王团荣, 马喜明. 河南省丹江口库区湿地自然保护区现状与管理对策[J]. *水土保持通报*, 2003, 23(4): 66-68.
- [7] 梁少民, 李成林, 李春发, 等. 3个时期河南省湿地的分布及变化[J]. *湿地科学*, 2011, 9(1): 94-96.
- [8] 王春平. 河南省湿地面积动态变化与保护对策[J]. *河南林业科技*, 2014, 34(1): 31-32, 48.
- [9] 安传艳, 赵鑫. 河南省黄河湿地生态旅游资源的开发与保护研究[J]. *环境科学与管理*, 2007, 32(2): 154-157.
- [10] 郭国杞, 阴三军, 杨智勇, 等. 河南湿地植被类型及其利用与保护[J]. *河南科学*, 2000(4): 415-418.
- [11] 张明祥, 张阳武, 朱文星, 等. 河南省郑州黄河自然保护区湿地恢复模式研究[J]. *湿地科学*, 2010, 8(1): 67-73.