

4株乳酸杆菌体外拮抗3种常见致病菌的研究

杨小进, 张华菲, 何希宏, 刘浩* (天津科技大学生物工程学院, 工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津 300457)

摘要 [目的]研究4株乳酸杆菌在体外对3种常见致病菌的拮抗作用。[方法]将4株乳酸杆菌(L1、L2、L3、L4)分别与3种致病菌(大肠杆菌、白色念珠菌和金黄色葡萄球菌)共培养,观察拮抗结果。[结果]4株乳酸杆菌对3种致病菌都有显著的拮抗作用,其中L1的拮抗作用强于其他3株乳酸杆菌;当将致病菌的菌落数提高一个数量级时,L1仍可将3种致病菌杀死,拮抗作用仍十分显著。[结论]该研究为今后用乳酸杆菌直接进行微生态治疗提供了一定的理论基础。

关键词 乳酸杆菌;致病菌;拮抗作用

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)08-03314-02

Study on Antagonism of Four Lactobacillus Strains on Three Common Pathogens *in vitro*

YANG Xiao-jin et al (Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology of Ministry of Education, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457)

Abstract [Objective] The paper was to study the antagonism of four lactobacillus strains on three common pathogens *in vitro*. [Method] Four lactobacillus strains (L1, L2, L3, L4) were cultured with three pathogens (*Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*) respectively, and the antagonistic results were observed. [Result] Four lactobacillus strains had significant antagonism on three pathogens, and the antagonism of L1 was stronger than the other three strains; when the number of colonies was increased by one order of magnitude, L1 could still kill the three pathogens, and the antagonism was still very significant. [Conclusion] The study provided a certain theoretical basis for the future use of lactobacillus directly in microecologies treatment.

Key words Lactobacillus; Pathogens; Antagonism

乳酸杆菌是一类(属)能分解多种糖类产生大量乳酸的革兰氏阳性杆菌,它们广泛分布于动植物体表、发酵食品、乳品或饮料中。在人体中,乳酸杆菌主要存在于肠道、口腔和妇女阴道内,在维护肠道和泌尿生殖道的微生态平衡方面起重要作用。乳酸杆菌是健康妇女阴道内的优势菌,近些年已确定的从阴道内分离出来的乳酸杆菌有16种^[1],它们通过产生乳酸、过氧化氢、细菌素及其他的抗微生物物质来抑制阴道中的致病微生物,从而维护阴道的正常生理环境^[2]。近年来,随着医学新技术、各种抗生素免疫制剂的不断出现,也带来了致病菌耐药性、疾病复发率高、双重感染及引起菌群失调及毒性反应等诸多弊端^[3],该试验通过研究4株乳酸杆菌对3种常见致病菌的拮抗作用,旨在为以后的“以菌治疗”代替“抗菌治疗”的微生态治疗提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种。大肠杆菌(*Escherichia coli*, 简称为 *E. c*) 0090 株、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, 简称为 *S. a*) 2155 株、白色念珠菌(*Candida albicans*, 简称为 *C. a*) 2186 株,均购于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC);乳酸杆菌 L1、L2、L3、L4 为天津科技大学工业发酵微生物教育部重点实验室保藏菌株。

1.1.2 培养基。乳酸杆菌培养基-MRS 肉汤:葡萄糖 20 g/L,胰蛋白胨 10 g/L,酵母提取物 5 g/L,牛肉膏 10 g/L,吐温 80 1 ml/L,柠檬酸铵 2 g/L,乙酸钠 5 g/L, K_2HPO_4 2 g/L, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.25 g/L, $MgSO_4 \cdot H_2O$ 0.58 g/L,调 pH 至 6.2

~6.4, 115 °C 灭菌 20 min;乳酸杆菌选择性培养基:pH 为 5 的 MRS 培养基。大肠杆菌、金黄色葡萄球菌培养-02 号营养肉汁培养基:蛋白胨 10 g/L,牛肉浸出物 3 g/L,氯化钠 5 g/L,调 pH 至 7.0, 121 °C 灭菌 15 min。白色念珠培养基-13 号液体培养基:蛋白胨 10 g/L,牛肉浸出物 3 g/L,氯化钠 5 g/L,调 pH 至 7.0, 121 °C 灭菌 15 min。大肠杆菌选择性培养基-曙红亚甲基蓝琼脂培养基:曙红亚甲基蓝培养基 65 g/L, 121 °C 灭菌 15 min。白色念珠菌选择性培养基-沙氏葡萄糖琼脂培养基:沙氏葡萄糖琼脂培养基 65 g/L, 121 °C 灭菌 15 min。金黄色葡萄球菌选择性培养基-甘露醇氯化钠琼脂培养基:甘露醇氯化钠培养基 110 g/L, 121 °C 灭菌 15 min。

1.2 方法

1.2.1 菌种活化。从甘油管中将4株乳酸杆菌 L1、L2、L3、L4 接入 MRS 液体培养基的试管中 37 °C 静置培养 24 h,按 5% 接种量转接到 50 ml MRS 液体培养基的三角瓶中,静置培养 12 h;致病菌活化:从甘油中将致病菌大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌分别接入装有 13 号液体培养基和 2 号营养肉汤培养基的试管中,37 °C 静置培养 24 h,按 5% 接种量再将大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌转接入 50 ml 13 号液体培养基和 2 号营养肉汤的三角瓶中,37 °C 静置培养 12 h。

测量上述培养 12 h 的乳酸杆菌 L1、L2、L3、L4、致病大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌在紫外分光光度计上 OD_{600} 的吸光值后,分别用 MRS 液体培养基将乳酸杆菌 L1、L2、L3 和 L4 稀释至 10^7 CFU/ml,致病大肠杆菌、金黄色葡萄球菌稀释至 10^6 CFU/ml,白色念珠菌稀释至 10^4 CFU/ml,然后将 4 种乳酸杆菌和 3 种致病菌各按 5% 接种量接入 150 ml MRS 液体培养基中(7.5 ml + 7.5 ml)构成实验组,同时用与每种菌液等量的 MRS 液体培养基(7.5 ml + 7.5 ml)作为对

作者简介 杨小进(1985-),男,河南鹤壁人,硕士研究生,研究方向:微生物功能基因与代谢研究。* 通讯作者,教授,博士生导师,从事微生物功能基因与代谢研究, E-mail: liuhao1227@tust.edu.cn。

收稿日期 2013-03-12

照组。实验组和对照组菌均置于 37℃ 静置培养至致病菌全部被杀死。

1.2.2 活菌计数方法。将上述实验组和对照组在培养起始 0、3、6、9、12、15、18、24、30、36、48 h 各取样 100 μl , 用无菌水稀释为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} , 用滴注法分别取 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 4 个梯度点滴到乳酸杆菌的选择性平板上, 取 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 4 个梯度点滴到致病大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌的选择性培养基上, 每次滴加 20 μl , 每个稀释梯度做 2 个平行, 37℃ 培养 24 h, 分别计数实验组和对照组的乳酸杆菌 L1、L2、L3、L4、致病大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌的菌落数。

2 结果与分析

2.1 乳酸杆菌 L1、L2、L3、L4 对大肠杆菌的拮抗作用 由图 1 可看出, 对照组的大肠杆菌在前 18 h 处于增殖期, 18 h 后处于平台期, 而实验组的大肠杆菌从与乳酸杆菌 L1、L2、L3、L4 混合培养的 0 h 起, 就己不再增殖, 从 10 h 起菌落数开始急剧下降, 至 18 h 时大肠杆菌被全部杀死, 说明这 4 株乳酸杆菌对大肠杆菌都有显著的拮抗作用。相对而言, 乳酸杆菌 L2、L3 对大肠杆菌的拮抗作用略微强于乳酸杆菌 L1 和 L4。

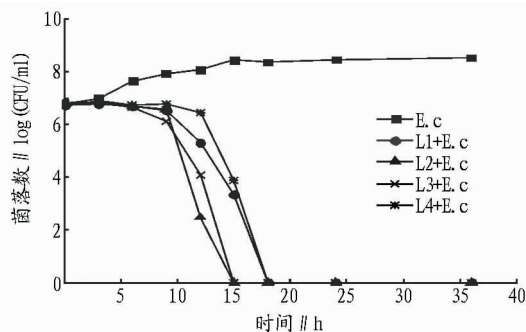


图 1 4 株乳酸杆菌对大肠杆菌的拮抗作用

2.2 乳酸杆菌 L1、L2、L3、L4 对白色念珠菌的拮抗作用 由图 2 可看出, 无论是实验组还是对照组在前 10 h, 白色念珠菌都处于增殖期, 对照组白色念珠菌的增殖期一直持续到 15 h, 之后进入平台期, 而实验组的白色念珠菌从 10 h 到 30 h 时处于平台期, 从 30 h 后白色念珠菌的菌落数开始出现不同程度的大幅下降, 说明这 4 株乳酸杆菌对白色念珠菌也有较强的拮抗作用。由于乳酸杆菌 L1、L2 在 48 h 时可将白色念珠菌全部杀死, 所以相对而言乳酸杆菌 L1、L2 对白色念珠菌的拮抗作用要显著高于乳酸杆菌 L3、L4。

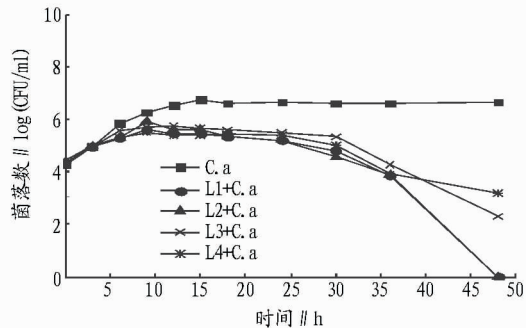


图 2 4 株乳酸杆菌对白色念珠菌的拮抗作用

2.3 乳酸杆菌 L1、L2、L3、L4 对金黄色葡萄球菌的拮抗作用 由图 3 可看出, 对照组的金黄色葡萄球菌在前 18 h 处于增殖期, 从 18 h 后进入平台期就不再变化; 实验组的金黄色葡萄球菌菌落数从 3 h 时就先后出现不同程度的大幅下降, 到 24 h 时 4 组的金黄色葡萄球菌被全部杀死, 说明这 4 株乳酸杆菌对金黄色葡萄球菌都有显著拮抗作用。相对而言, 乳酸杆菌 L1 对金黄色葡萄球菌的拮抗作用要显著高于另外 3 株乳酸杆菌, 因为乳酸杆菌 L1 在 9 h 就己将金黄色葡萄球菌全部杀死。

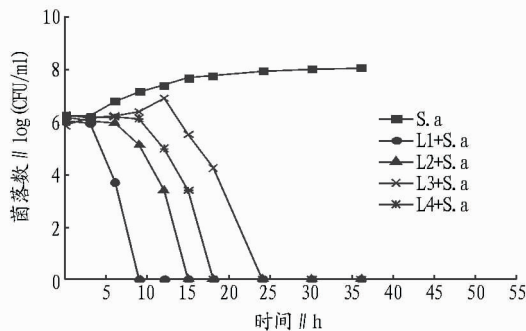


图 3 4 株乳酸杆菌对金黄色葡萄球菌的拮抗作用

2.4 乳酸杆菌 L1 对致病大肠杆菌菌落数为 10^7 CFU/ml 时的拮抗作用 由图 4 可看出, 实验组的大肠杆菌在 18 h 就被全部杀死, 与“2.1”中大肠杆菌菌落数为 10^6 CFU/ml 对被杀死的时间差不多, 说明乳酸杆菌 L1 对大肠杆菌的拮抗作用并没有因为大肠杆菌菌落数的提高而受到影响。

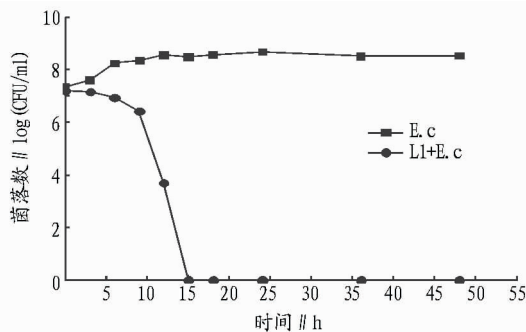


图 4 乳酸杆菌 L1 对菌落数为 10^7 CFU/ml 的大肠杆菌的拮抗作用

2.5 乳酸杆菌 L1 对白色念珠菌菌落数为 10^6 CFU/ml 时的拮抗作用 由图 5 可看出, 实验组的白色念珠菌在 0~25 h 基本处于稳定期, 在 48 h 时被全部杀死, 同“2.2”中菌落数

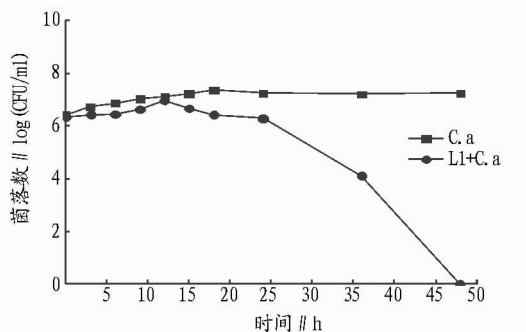


图 5 乳酸杆菌 L1 对白色念珠菌菌落数为 10^6 CFU/ml 时的拮抗作用 (下转第 3326 页)

插入 Linker 后得到的 LCVN 不但保持了原有的活性且毒性也大幅度减小,LCVN 的成功构建有利于进一步在其 N 末端位点特异性修饰,能改善 CVN 的免疫原性和毒性,而不破坏 CVN 原有的活性。LCVN 与 CVN 相比具有更小的细胞毒性,将其做成凝胶以后性质稳定,对流感病毒 A/HK/8/68 (H3N2)有抑制作用。分子试验表明 LCVN 凝胶能与 HIV 包膜蛋白 GP120 在低浓度下高效结合,结合能力与 CVN 凝胶相当,而 CVN 是通过与 HIV 包膜蛋白 GP120 高效结合,从而达到对 HIV 病毒的抑制作用,间接说明了 LCVN 凝胶具有与 CVN 相同的抗 HIV 能力。LCVN 的成功构建表达为 CVN 的进一步修饰奠定了基础,并且 LCVN 本生也是一种有效的抗病毒候选药物,具有进一步研究开发的價值。

参考文献

- [1] ROBERT M J, BENTLEY M D, HARRIS J M. Chemistry for peptide and protein PEGylation[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2002, 54(4): 459-476.
- [2] 吕锐, 于红, 阎博民. 重组蓝藻抗病毒蛋白 N 抗柯萨奇 B₃ 病毒的体外实验研究[J]. 医学研究生报, 2008, 21(12): 1242-1245, 1355.
- [3] BOYD M R, GUSTAFSON K R, MCMAHON J B, et al. Discovery of cyanovirin-N, a novel human immunodeficiency virus-inactivating protein that binds viral surface envelope glycoprotein gp120: potential applications to microbicide development [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1997, 41(7): 1521-1530.
- [4] DEY B, LERNER D L, LUSSO P, et al. Multiple antiviral activities of cyanovirin-N: blocking of human immunodeficiency virus type 1 gp120 interaction with CD4 and coreceptor and inhibition of diverse enveloped viruses [J]. J Virol, 2000, 74(10): 4562-4569.

- [5] 安立冰, 刘宗涛, 于红. 重组蓝藻抗病毒蛋白 N 抗单纯疱疹病毒 2 型作用的实验研究[J]. 社区医学杂志, 2008, 6(13): 7-8.
- [6] SHATTOCK R J, MOORE J P. Inhibiting sexual transmission of HIV-1 infection[J]. Nature Reviews Microbiology, 2003, 1: 25-34.
- [7] AN Q, LEI Y, JIA N, et al. Effect of site-directed PEGylation of trichosanthin on its biological activity, immunogenicity, and pharmacokinetics [J]. Biomed Eng, 2007, 24(6): 643-649.
- [8] GAO X, CHEN W. Soluble cytoplasmic expression, rapid purification, and characterization of cyanovirin-N as a His-SUMO fusion [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009(4): 1051-1060.
- [9] 陆源, 文建凡. 蓝藻抗病毒蛋白 N [J]. 生命的化学, 2004, 24(2): 92-93.
- [10] BEWLEY C A, GUSTAFSON K R, BOYD M R, et al. Solution structure of cyanovirin-N, a potent HIV-inactivating protein [J]. Nat Struct Biol, 1998, 5(7): 571-578.
- [11] BARRIENTOS L G, O'KEEFE B R, BRAY M, et al. Cyanovirin-N binds to the viral surface glycoprotein, GP1, 2 and inhibits infectivity of Ebola virus [J]. Antiviral Res, 2003, 58(1): 47-56.
- [12] O'KEEFE B R, SMEE D F, TURPIN J A, et al. Potent anti-influenza activity of cyanovirin-N and interactions with viral hemagglutinin [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(8): 2518-2525.
- [13] HELLE F, WYCHOWSKI C, VU-DACU N, et al. Cyanovirin-N inhibits hepatitis C virus entry by binding to envelope protein glycans [J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(35): 25177-25183.
- [14] VAN DER MEER F J, DE HAAN C A, SCHUURMAN N M, et al. Antiviral activity of carbohydrate-binding agents against Nidovirales in cell culture [J]. Antiviral Res, 2007, 76(1): 21-29, 245.
- [15] TIWARI V, SHUKLA S Y, SHUKLA D. A sugar binding protein cyanovirin-N blocks herpes simplex virus type-1 entry and cell fusion [J]. Antiviral Res, 2009, 84(1): 67-75.
- [16] 闫璐颖, 陈建华, 张新国. 融合蛋白连接肽的研究进展 [J]. 生物技术, 2008, 18(3): 92-94.

(上接第 3315 页)

为 10^4 CFU/ml 时被杀死的时间一致,说明乳酸杆菌 L1 对白色念珠菌的拮抗作用并没有因为其菌落数的调高而受到影响,其对白色念珠菌的拮抗作用仍十分显著。

2.6 乳酸杆菌对金黄色葡萄球菌菌落数为 10^7 CFU/ml 时的拮抗作用 由图 6 可看出,实验组的金黄色葡萄球菌在 15 h 时就被全部杀死,说明乳酸杆菌 L1 对金黄色葡萄球菌仍有显著的拮抗作用,尽管金黄色葡萄球菌相对“2.3”中被杀死的时间延后了约 6 h。

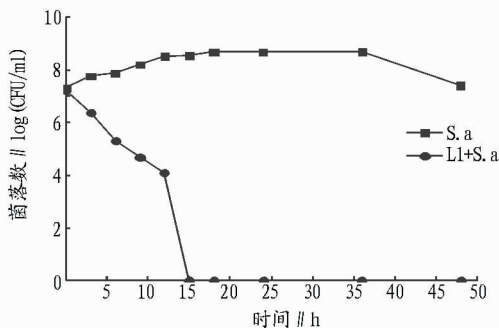


图 6 乳酸杆菌 L1 对金黄色葡萄球菌菌落数为 10^7 CFU/ml 的拮抗作用

3 讨论

(1)从整体上来分析,4 株乳酸杆菌对大肠杆菌、白色念珠菌、金黄色葡萄球菌都有显著的拮抗作用,其中对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的拮抗作用要强于白色念珠菌;同一株

菌对不同的致病菌显示出不同的拮抗效果,这可能和乳酸杆菌对不同致病菌产生拮抗的原理不同以及致病菌本身的生理特性有关,白色念珠菌生长的适宜 pH 为 4.0~4.7,这与大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的适宜 pH 不同。

(2)从 4 株乳酸杆菌的对比分析来看,乳酸杆菌 L1、L2、L3、L4 对大肠杆菌的拮抗效果差别不明显,乳酸杆菌 L1、L2 对白色念珠菌的拮抗效果要明显强于乳酸杆菌 L3、L4,乳酸杆菌对金黄色葡萄球菌的拮抗作用为 L1 > L2 > L4 > L3。不同的乳酸杆菌对同种致病菌显示出不同的拮抗效果,乳酸杆菌 L1 对这 3 种致病菌的拮抗效果要强于另外 3 株乳酸杆菌,这可能是由于乳酸杆菌 L1 产乳酸快,导致培养基的 pH 下降速度快,而培养基 pH 降低越明显,其抑菌效果就越强,这与张辉华等^[4]、Coconnier 等^[5]的报道相一致。乳酸杆菌 L1 也没有因为致病菌菌落数的提高,而对它们的拮抗作用产生太大影响。

参考文献

- [1] 李兰娟. 感染微生物学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- [2] HYERAN N, KYUNGHEE W, YEONHEE L. Analysis of vaginal lactic acid producing bacteria in healthy women [J]. Microbiol, 2007, 45: 515-520.
- [3] 郑晶晶, 宋静慧. 乳酸杆菌及阴道微生态制剂 [J]. 内蒙古医学院学报, 2008, 30(S2): 141-144.
- [4] 张辉华, 曹永长, 毕英佐, 等. 乳酸杆菌体外对大肠埃希菌 O-78 拮抗作用试验 [J]. 中国微生物学杂志, 2002, 14(6): 322-333.
- [5] COCONNIER M H, LIEVIN V, HEMERY E, et al. Antagonistic activity against helicobacter infection in vitro and in vivo by the human lactobacillus acidophilus strain LB [J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64: 4573-4580.