

猪肠道中抑制大肠杆菌的乳酸菌的分离与筛选

陈世琼* 李平兰 张 箴

(中国农业大学 食品学院, 北京 100094)

摘 要 采用平板稀释法,用MRS 和M17 培养基从 12 头猪的新鲜粪便中分离出 200 个菌株,进而初筛得 38 株对普通大肠杆菌有抑制作用,复筛得 10 株对猪源弱毒型大肠杆菌有较强抑制作用,再选出其中抑菌活性最强的 3 株 R-21-1、R-17-3 和 R-21-3。生理生化特性试验表明这 3 株均为乳酸菌,以多粘菌素 B 对弱毒型大肠杆菌抑制作用所得的标准曲线作为参照,测得这 3 株菌的抑菌活性分别相当于 12 800、13 500 和 3 020 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的多粘菌素 B。蛋白酶试验、排除酸等试验判断其产生的抑菌物质中含有细菌素;通过抑菌谱试验证明 3 株菌不仅对革兰氏阳性的单核细胞增生利斯特氏菌和金黄色葡萄球菌有明显的抑制作用,而且对革兰氏阴性菌的猪霍乱沙门氏菌和鸡白痢沙门氏菌有明显的抑制作用;其中对革兰氏阴性菌的抑制作用国内外未见报道。

关键词 乳酸菌; 筛选; 大肠杆菌

中图分类号 Q 939.97; Q 939.117; Q 939.121

Isolation and Screening of Lactic Acid Bacteria from Feces of Pigs

Chen Shiqiong Li Pinglan Zhang Chi

(College of Food Science and Engineering, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract Two hundred strains of microorganism were isolated from fresh feces of 12 pigs of different ages. Thirty eight strains can inhibit the growth of *Escherichia coli*. Ten strains can inhibit the growth of enterotoxigenic *E. coli* (C83917). Three of them are most effective (Test proved that they are all lactic acid bacteria and were named R-21-1, R-21-3 and R-17-3). A standard curve was established by using polymyxin B which can also inhibit the growth of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Referring to this curve, the bacteriostatic activity of R-21-1, R-17-3 and R-21-3 are 12 800, 10 350, 3 020 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ respectively. Their bacteriostatic products were improved to contain bacteriocin. The test of bacterial inhibition zone proved that the three LAB can inhibit not only positive bacteria (Gram stain) such as staphylococcus aureus and *Listeria monocytogenes*, but also negative bacteria as *E. coli*, *Salmonella* (C500) and *Salmonella* (C97-13).

Key words lactic acid bacteria; screening; *Escherichia coli*

大肠杆菌是人和动物肠道的正常菌群。在正常情况下,大肠杆菌能合成维生素 B 和 K,并产生大肠杆菌素,对人和动物有利^[1]。但当机体抵抗力下降或大肠杆菌异位时又有可能成为条件致病菌^[1,2]。在养猪业中,断奶仔猪腹泻综合症一直是困扰养猪业发展的难题,仔猪从断奶转入育肥舍期间,死亡率约为 2.4%^[3],其中 70% 被认为是大肠杆菌的原因。

乳酸菌益生菌在治疗和预防大肠杆菌引起的疾病及促进畜禽生长方面有较好的应用前

收稿日期: 2002-01-18

* 陈世琼,工程师,博士生,研究方向为农产品贮藏与加工工程。北京圆明园西路 2 号



景。据资料报道,仔猪出生后1~2 d开始直接饲喂益生菌,断奶仔猪成活率可提高4%~5%^[4],添加益生菌可提高仔猪成活率7%,使下痢率减少20%^[5];从猪肠道中筛选的对猪源弱毒型大肠杆菌有抑制作用性能优良的乳酸菌,是研究开发治疗和预防仔猪腹泻乳酸菌益生菌的重要环节。本研究从健康猪的新鲜粪便中筛选能够抑制弱毒型大肠杆菌的乳酸菌,为乳酸菌益生菌的研究开发打下基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

大肠杆菌(*Escherichia coli*)为中国农业大学生物学院微生物系提供,猪源弱毒型大肠杆菌(*E. coli* C83917)血清型O₉:K₁₀₃,987P:NM 购自中国兽药监察所,产细菌素乳酸菌分离自猪粪便,配制MRS液、固体培养基,M17液、固体培养基,LB液、固、半固体培养基。

1.2 试验方法

1.2.1 样品采集 从北京顺义猪场采集12头不同月龄猪的新鲜粪便(其中乳猪3头,分别为出生后9,12,21 d;断乳猪5头,分别为出生后1~4个月,体重为20~35 kg;肥育猪4头,分别为出生后5~8个月,体重为60~90 kg),装入灭菌塑料盒中,冷冻保存备用。

1.2.2 稀释液的制备 取上述样品各1 g,用无菌的生理盐水10倍系列稀释至 10^{-10} ,备用。

1.2.3 分离 取 10^{-10} ~ 10^{-8} 三个稀释度的稀释液各0.1 mL于平皿中,分别注入融化并冷却至50℃的M17、MRS固体培养基15 mL,37℃ 48 h培养;挑取可疑单菌落接种于对应的M17、MRS液体培养基中,37℃ 24 h培养,G染色,光镜观察菌体形态和纯度。

1.2.4 初筛 以普通大肠杆菌作为试验菌,用杯碟法测发酵上清液的抑菌活性,保留具有抑菌活性的菌株。

1.2.5 复筛 以弱毒型大肠杆菌作为试验菌,将初筛菌种的发酵液离心后,取上清液用杯碟法测其抑菌活性;保留具有抑菌活性的菌株,备用。

1.2.6 多粘菌素B抑制弱毒型大肠杆菌的标准曲线的测定 选择适当的培养基,以多粘菌素B为标准品^[6],选择适当的系列浓度,用剂量杯碟法^[7,8]测得不同浓度的标准品对弱毒型大肠杆菌的抑菌圈直径(d),并计算其校正值(d_i)和半径的平方(r_i^2)^[7,8],分别对 $\lg c-d$ 、 $\lg c-r_i^2$ 作图,比较其线性关系,得出活力单位标准曲线;乳酸菌产细菌素的活力单位,可根据其抑菌圈直径的校正值得从多粘菌素B的标准曲线上查得。

1.2.7 抑菌谱的测定 分别以革兰氏阴性菌弱毒型猪霍乱沙门氏菌(*Salmonella* C500)、强毒型鸡白痢沙门氏菌(*Salmonella* C79-13),革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),单核细胞增生利斯特氏菌(*Listeria monocytogenes* 54002),和啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)作为试验菌,用管碟法测定选定菌株R-21-1、R-21-3、R-17-3对上述试验菌的抑菌作用。

1.2.8 选定菌株相对抑菌活性的测定 以多粘菌素B中心浓度溶液为对照,用剂量杯碟法分别测定菌株R-21-1、R-17-3、R-21-3对弱毒型大肠杆菌的相对抑菌活性。

1.2.9 生理生化特性试验

1) 菌体形态观察及G染色 将菌株R-21-1、R-17-3、R-21-3进行G染色后用光镜观察。

2) 其他生理生化特性 按照一般细菌常用鉴定方法^[9],进行接触酶试验;用高效液相色谱法测发酵液中的乳酸含量。

2 结果与分析

2.1 菌种分离与筛选

从 12 头不同月龄猪的新鲜粪便中分离得到 200 个菌株, 初筛得 38 株对普通大肠杆菌有抑制作用; 复筛得 10 株对猪源弱毒型大肠杆菌 (*E. coli*, C83917)O_{9: K103, 987P: NM} 有抑制作用。选择其中抑菌活性最强的 3 个菌株 R-21-1、R-21-3、R-17-3, 并对其生物学特性和抑菌物质的部分理化性质进行研究。

各菌的抑菌圈直径分别为: CK——0 mm; R-21-1——19.62 mm; R-17-3——19.10 mm; R-21-3——13.92 mm。

2.2 标准曲线的测定

在试验考查 LB 培养基、多粘菌素 B 标准培养基^[10]以及改进后的标准培养基(降低部分无机盐含量)对多粘菌素 B、乳酸菌所产生的抑菌物质对弱毒型大肠杆菌的抑制作用测定效果的基础上, 确定采用改进后的 LB 单层培养基, 以多粘菌素 B 为标准品, 以 10 000 U · mL⁻¹ 为中心浓度溶液, 选取 1 000, 2 000, 6 000, 10 000, 14 000, 18 000 和 20 000 U · mL⁻¹ 7 个浓度进行标准曲线的测定。测定符号及计算公式:

$$ID_i(\text{校正}) = ID_i(\text{平均}) + \delta$$

$$\delta = ID_0(\text{总平均}) - ID_0(\text{平均})$$

由图 1 可知, 多粘菌素 B 在本试验所测定的浓度范围内, 浓度的对数与其抑菌圈直径的校正值呈较好的线性关系。可据此确定乳酸菌所产生的抑菌物质的抑菌活性效价。

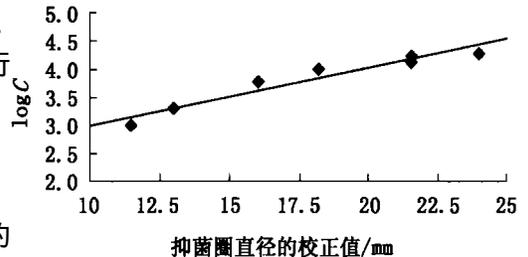


图 1 多粘菌素 B 抑制弱毒型大肠杆菌 (*E. coli* C83917) 的标准曲线

2.3 选定菌株相对抑菌活性效价的测定

由表 1 可以看出, R-21-1、R-17-3 的抑菌活性均大于中心浓度多粘菌素 B 的抑菌活性, R-21-3 的抑菌活性小于中心浓度多粘菌素 B 的抑菌活性, 再次证明选择 10 000 U · mL⁻¹ 为多粘菌素 B 标准曲线中心浓度溶液是可行的。R-21-1、R-17-3、R-21-3 在试验条件下的抑菌活性分别相当于 12 800, 13 500, 3 020 U · mL⁻¹ 的多粘菌素 B。

表 1 选定菌株的相对抑菌活性

菌株编号	抑菌圈直径/mm	相对抑菌活性/U
CC(中心浓度溶液)	18.06	10 000
R-21-1	20.86	12 800
R-17-3	20.77	10 350
R-21-3	14.24	3 020

2.4 菌种鉴定

菌株 R-21-1、R-17-3、R-21-3 G 染色结果均为阳性; 接触酶试验均为阴性; 用高效液相色谱法测发酵液中酸的含量发现主要为乳酸; R-21-1 和 R-17-3 在显微镜下的形态为杆菌, R-21-3 为球菌。由以上特征可以判断, 所筛选出的 3 株均为乳酸菌, 其中, R-21-1 和 R-17-3 为乳酸杆菌, R-21-3 为乳球菌。

2.5 抑菌谱测定

由表 2 可以看出, 3 菌株 R-21-1、R-17-3、R-21-3 对 G⁺ 的金黄色葡萄球菌、单核细胞增生利斯特氏菌以及 G⁻ 的猪霍乱沙门氏菌、鸡白痢沙门氏菌均有明显的抑制作用。对真菌啤酒酵母没有抑制作用。金黄色葡萄球菌、单核细胞增生利斯特氏菌、猪霍乱沙门氏菌、鸡白痢沙门氏

菌是常见的腐败菌和病原菌。

表2 抑菌谱试验的结果

试验菌	抑菌圈直径/mm				特征
	R-21-1	R-17-3	R-21-3	CK	
单核细胞增生利斯特氏菌	23 70	26 11	14 48	促进圈	清晰
金黄色葡萄球菌	18 12	19 37	14 45	0	清晰
猪霍乱沙门氏菌	18 46	19 24	12 76	0	清晰
鸡白痢沙门氏菌	21 00	24 67	16 27	0	模糊
啤酒酵母	0	0	0	0	

3 讨论

1) 本试验分别用普通大肠杆菌、猪源弱毒型大肠杆菌作为对乳酸菌进行初筛和复筛的试验菌,从健康猪的新鲜粪便中筛选得到3株对弱毒型大肠杆菌有明显抑制作用的乳酸菌。并且以浓度为 $10\ 000\ \text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的多粘菌素B为对照,测得3株菌的相对抑菌活性效价分别相当于 $12\ 800$, $13\ 500$, $3\ 020\ \text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的多粘菌素B。

2) 本试验建立了用多粘菌素B作为对照,测定乳酸菌的相对抑菌活性效价的方法,为乳酸菌的抑菌活性测定与比较提供了定量方法。

3) 抑菌谱试验的研究结果表明,3菌株不仅对 G^+ 的金黄色葡萄球菌、单核细胞增生利斯特氏菌,而且对 G^- 的猪霍乱沙门氏菌、鸡白痢沙门氏菌均有明显的抑制作用。其中对 G^- 致病菌的抑制作用国内外未见报道。

4 结论

1) 从12头不同年龄猪的新鲜粪便样品中分离出200个菌株;初筛得38株对普通大肠杆菌有抑制作用,复筛得10株对弱毒型大肠杆菌有抑制作用,其中3株(R-21-1, R-17-3, R-21-3)抑菌活性最强,其抑菌活性分别相当于 $12\ 800$, $13\ 500$ 和 $3\ 020\ \text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的多粘菌素B。

2) 建立了以多粘菌素B为参照的确定乳酸菌活性效价的方法。

3) 3菌株对革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌和单核细胞增生利斯特氏菌、对革兰氏阴性菌猪霍乱沙门氏菌、鸡白痢沙门氏菌均有明显的抑制作用。

参 考 文 献

- 1 杨苏声 细菌分类学 北京: 中国农业大学出版社, 1997. 79
- 2 上海医科大学《实用内科学》编委会 实用内科学(下册). 人民卫生出版社, 1992. 1407
- 3 彭高克 早期断奶仔猪腹泻综合症及综合防治 饲料博览, 1997, 8(6): 40~ 41
- 4 姚建国 熊国远 饲用抗生素的研究进展 粮食与饲料工业, 2000, (5): 28~ 30
- 5 马春全 乳酸链球菌活菌制剂预防肉鸡腹泻及促进增重实验, 养禽与禽病防治, 2000, (6): 20~ 21
- 6 钱存柔 微生物学实验教程 北京: 北京大学出版社, 1999. 176~ 180
- 7 顾觉奋 微生物药品化学与分析 北京: 军事医学科学出版社, 1995. 94
- 8 郑钧镛 药品微生物学及检验技术 北京: 人民卫生出版社, 1989. 364~ 383
- 9 中国科学院微生物所 一般细菌常用鉴定方法 北京: 科学出版社, 1978
- 10 中华人民共和国药典委员会 中华人民共和国药典(1995年版, 二部). 北京: 人民卫生出版社, 化学工业出版社, 1995. 附录 70~ 74