

• 论 著 •

德氏乳杆菌保加利亚亚种发酵产物对常见病原菌的抑制作用

陈 华¹, 彭 浩², 胡方兴¹, 梁 伟¹, 张 稼¹, 魏 莎¹, 鄢国军^{3△}

(1. 湖南省长沙市第三医院检验科, 湖南长沙 410015; 2. 中南大学湘雅三医院烧伤整形外科, 湖南长沙 410006; 3. 中南大学基础医学院微生物学系, 湖南长沙 410078)

摘 要:目的 探究德氏乳杆菌保加利亚亚种的发酵产物对常见病原菌的抑制作用。方法 采用细菌共培养法及牛津杯药物敏感试验, 分别探究德氏乳杆菌保加利亚亚种及其发酵产物对 11 种常见病原菌的抑制作用, 并通过乙醇沉淀、透析、超滤离心及饱和硫酸铵盐析法, 对德氏乳杆菌保加利亚亚种发酵产物中抑菌物成分进行了初步研究。结果 德氏乳杆菌保加利亚亚种发酵产物对多种临床常见病原菌均有较强的抑菌活性, 抑菌活性与该菌代谢产生的乳酸无关, 且该抑菌活性具有良好的热稳定性; 发酵产物的乙醇沉淀物及 80% 饱和硫酸铵盐析沉淀物均无抑菌活性, 以相对分子质量 3×10^3 及 10×10^3 超滤离心管将发酵液进行超滤离心后进行抑菌试验, 显示滤出液及上层液均具有良好的抑菌活性, 发酵产物经截留相对分子质量为 0.5×10^3 的透析袋透析后失去抑菌活性。结论 德氏乳杆菌保加利亚亚种发酵产物对于临床常见的多种革兰阳性、革兰阴性病原菌均具有较强的抑菌活性, 其抑菌活性物质可能是相对分子质量 0.5×10^3 左右或以下的小分子物质。

关键词:微生物敏感试验; 德氏乳杆菌; 抗药性; 细菌

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2020.23.018

中图法分类号: R446.5

文章编号: 1673-4130(2020)23-2898-07

文献标识码: A

Inhibitory effect of fermentation products of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* on common pathogens

CHEN Hua¹, PENG Hao², HU Fangxing¹, LIANG Wei¹, ZHANG Jia¹, WEI Sha¹, WU Guojun^{3△}

(1. Department of Clinical Laboratory, the Third Hospital of Changsha, Changsha, Hunan 410015, China; 2. Department of Burns and Plastic Surgery, the Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, Hunan 410006, China; 3. Department of Microbiology, School of Basic Medical Sciences, Central South University, Changsha, Hunan 410078, China)

Abstract: **Objective** To explore the inhibitory effects of fermentation products of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* on common pathogens. **Methods** The inhibitory effect of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and its fermentation products on 11 common pathogens were investigated by bacterial co-cultivation method and Oxford cup drug sensitivity test. The active ingredients of inhibitory effect in the fermentation products of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* were studied by way of ethanol precipitation, dialysis, ultrafiltration centrifugation and salting out with ammonium sulfate. **Results** The fermentation products of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* had strong antibacterial activity against a variety of clinical common pathogens. The antibacterial activity was not related to the lactic acid produced by the strain, and the antibacterial activity had good thermal stability. The ethanol precipitate and 80% saturated ammonium sulfate precipitate of fermentation products had no antibacterial activity. The fermentation products was ultrafiltrated and centrifuged with a relative molecular weight of 3×10^3 and 10×10^3 ultrafiltration centrifuge tubes. The results showed that both the filtrate and the upper liquid had good antibacterial activity. The fermentation broth lost the antibacterial activity after dialyzing the retention phase to the dialysis bag with molecular weight of 0.5×10^3 . **Conclusion** The fermentation product of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* has strong bacteriostatic activity against a variety of clinically common gram-positive and gram-negative pathogens, and its bacteriostatic active substance may be small molecular substances with relative molecular weight of 0.5×10^3 or less.

作者简介: 陈华, 女, 主任技师, 主要从事临床微生物检测相关研究。△ 通信作者, E-mail: wuguojun@csu.edu.cn.

本文引用格式: 陈华, 彭浩, 胡方兴, 等. 德氏乳杆菌保加利亚亚种发酵产物对常见病原菌的抑制作用[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(23): 2898-2903.

Key words: microbial sensitivity tests; *Lactobacillus delbrueckii*; drug resistance; bacterial

临床研究表明,许多常见病原菌(如铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌等)的耐药性正随着抗菌药物的广泛应用而逐年升高^[1-3]。同时,抗菌药物的大量使用,甚至滥用,导致了多重耐药菌的产生,从而严重地破坏机体微生态环境。因此,寻找新的抗菌治疗方法一直是抗微生物感染治疗研究的重点和热点。近年来,采用以菌治菌理念的微生态疗法(微生态移植)治疗相关感染性疾病已取得了一定的成果,但目前的研究主要集中在肠道感染性疾病,特别是难治性或复发性艰难梭菌性肠炎的治疗上^[4]。然而常规的微生态移植特别是肠道微生态移植也有一定的不良反应,如可能导致菌血症等^[5-6],故将益生菌用于以菌治菌将具有更大的应用前景。乳酸菌类由于其独特的生物学特性进入了研究者的视野。已有报道乳酸菌用于感染性疾病的治疗,并取得了很好的疗效,其治疗的原理主要涉及该类细菌能产生具有抗菌作用的细菌素等^[7-8]。德氏乳杆菌保加利亚亚种俗称保加利亚乳杆菌,广泛应用于发酵乳制品工业^[9],其发酵乳糖产生乳酸,可以有效缓解乳糖不耐症,促进营养成分的利用和吸收,并且能够改善产品的风味。有研究表明,德氏乳杆菌保加利亚亚种可产生细菌素等非抗菌药物的杀菌物质^[10]。实验室研究发现,德氏乳杆菌保加利亚亚种对大肠埃希菌具有较强的抑菌和抗黏附作用^[11],对幽门螺杆菌亦具有一定的抑菌活性^[12];而且,目前少有从人类感染性标本中分离出该菌的报道,故该菌可能是抗细菌感染较好的候选细菌。

1 材料与方法

1.1 标本来源 德氏乳杆菌保加利亚亚种为中南大学基础医学院微生物学系保存;大肠埃希菌(6株)、铜绿假单胞菌(5株)、肺炎克雷伯菌(6株)、居泉沙雷菌(4株)、产气肠杆菌(5株)、鲍曼不动杆菌(7株)、枸橼酸杆菌(4株)、黏质沙雷菌(5株)、嗜麦芽假单胞菌(6株)、金黄色葡萄球菌(8株,其中有3株为耐甲氧西林金黄色葡萄球菌)、表皮葡萄球菌(6株)等均自长沙市第三医院检验科微生物室分离并保存。

1.2 仪器与试剂 相对分子质量 3×10^3 及 10×10^3 超滤离心管为美国 Millipore 公司产品;截留相对分子质量 0.5×10^3 透析袋为美国 Viskase 公司产品;Infinite F50 酶标仪为瑞士 Tecan 公司产品,营养肉汤培养基及营养琼脂培养基均为杭州微生物试剂有限公司产品;MRS 肉汤培养基及 MRS 琼脂培养基均为杭州百思生物技术有限公司产品;乳酸由日本东芝 TBA2000FR 全自动生化分析仪测定,试剂盒为北京利德曼生化股份有限公司生产。

1.3 方法

1.3.1 德氏乳杆菌保加利亚亚种与常见病原菌的共培养试验

1.3.1.1 筛选适合德氏乳杆菌保加利亚亚种与常见病原菌混合培养的培养基 德氏乳杆菌保加利亚亚种的最适培养基为 MRS 肉汤培养基,该培养基 pH 值较低,一般常见病原菌在该培养基中不能很好地生长。常见病原菌的培养基基本为中性或略偏碱性的培养基,在此条件下德氏乳杆菌保加利亚亚种生长不良,为方便对德氏乳杆菌保加利亚亚种和常见病原菌进行共培养以研究前者对后者的抑制作用,本研究首先将营养肉汤培养基及 MRS 肉汤培养基按不同比例混合,配制混合培养基,以金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌及德氏乳杆菌保加利亚亚种为指示菌,测定这 3 种细菌在这些培养基中的生长曲线,以确定适合常见病原菌及德氏乳杆菌保加利亚亚种混合培养的最适比混合培养基。具体方法为:将金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌接种于营养肉汤培养基后进行普通培养,将德氏乳杆菌保加利亚亚种接种于 MRS 肉汤培养基后进行厌氧培养,18~24 h 后将菌液作 100 倍稀释后备用。将 MRS 肉汤培养基与营养肉汤培养基分别按照 0% : 100% (即营养肉汤培养基)、10% : 90%、20% : 80%、30% : 70%、40% : 60%、50% : 50%、60% : 40%、70% : 30%、80% : 20%、90% : 10%、100% : 0% (即 MRS 肉汤培养基)的比例配制成混合培养基。生长曲线测定在 96 孔细胞培养板中进行,每孔中加入 200 μ L 混合培养基,然后接种相应细菌 5 μ L,重复 4 孔,培养,在培养后的 4、8、12、16、20、24、48 h 各取出一块培养板,微量振荡器振荡混匀后在酶标仪中读取 600 nm 处的吸光度值,最后以时间为横坐标,吸光度值为纵坐标作细菌生长曲线图。

1.3.1.2 德氏乳杆菌保加利亚亚种对铜绿假单胞菌的抑制作用 分别培养铜绿假单胞菌及德氏乳杆菌保加利亚亚种,于对数生长期时收获细菌细胞并计数,然后将铜绿假单胞菌与德氏乳杆菌保加利亚亚种按 1 : 1、1 : 2、1 : 3、1 : 4、1 : 5 的数量比例混合,编为 1~5 号,分别接种于 1.3.1.1 步骤中确定的最适配比混合培养基中,分别在需氧或厌氧培养条件下于 37 $^{\circ}$ C 培养 18~24 h 后,挑菌液划线接种营养琼脂平板或 MRS 琼脂培养基,再分别于需氧或厌氧条件下培养,以探讨德氏乳杆菌保加利亚亚种对铜绿假单胞菌的抑制作用及其最适抑制比。

1.3.1.3 德氏乳杆菌保加利亚亚种对常见病原菌的抑制作用 将处于对数生长期的待测菌及德氏乳杆菌保加利亚亚种按 1.3.1.2 确定的最适抑制比混合,再培养于最适比混合培养基中,分别进行普通培养及厌氧培养;同时将待测菌接种于含最适配比混合培养基中,普通培养。第 2 天取菌液接种于营养琼脂平板,于普通有氧条件下培养,研究德氏乳杆菌保加利亚亚种对常见病原菌的抑制作用。

1.3.2 德氏乳杆菌保加利亚亚种 48 h 发酵产物的抑菌作用 培养目的菌后,将目的菌用营养肉汤培养基稀释为 1.5×10^8 CFU/mL 的菌液,取 100 μ L 菌液涂布于营养琼脂培平板表面,然后在平板上放置 5 个牛津杯,向 1 号杯中加入德氏乳杆菌保加利亚亚种 48 h 发酵产物混悬液(含德氏乳杆菌保加利亚亚种菌体),第 2 号杯中加入德氏乳杆菌保加利亚亚种 48 h 发酵产物上清液,第 3 号杯中加入调整 pH 值至 7.2 的德氏乳杆菌保加利亚亚种 48 h 发酵产物上清液,第 4 号杯加入 pH 值 4.0 乳酸溶液,第 5 号杯加入 MRS 肉汤培养基对照,每杯 200 μ L,37 $^{\circ}$ C 培养 18~24 h 观察结果。

1.3.3 德氏乳杆菌保加利亚亚种 24 h 及 48 h 发酵上清液对常见病原菌抑制作用的比较 以金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、表皮葡萄球菌、大肠埃希菌及产气肠杆菌为试验菌株。培养目的菌,配成 1.5×10^8 CFU/mL 的菌液后取 100 μ L 涂布于营养琼脂平板,然后在平板上放置牛津杯,并向牛津杯中加入德氏乳杆菌保加利亚亚种 24 h 及 48 h 发酵产物上清液,每菌每种发酵产物重复 4 次,每杯 200 μ L,37 $^{\circ}$ C 培养 18~24 h 后测量抑菌圈直径,研究德氏乳杆菌保加利亚亚种 24 h 及 48 h 发酵产物上清液对试验菌株抑制作用的差异。

1.3.4 温度对德氏乳杆菌保加利亚亚种发酵产物抑菌作用的影响 将德氏乳杆菌保加利亚亚种 48 h 发酵产物分装后,分别经 60 $^{\circ}$ C 2 h、80 $^{\circ}$ C 2 h、100 $^{\circ}$ C 30 min 及 120 $^{\circ}$ C 30 min 处理,然后以大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌、产气肠杆菌、鲍曼不动杆菌为检测菌,研究经不同温度处理后的德氏乳杆菌保加利亚亚种 48 h 发酵产物对这些细菌的抑制作用。

1.3.5 德氏乳杆菌保加利亚亚种发酵产物抑菌作用成分的初步研究

1.3.5.1 配制 pH 值为 3.0、4.0、5.0、6.0 的磷酸盐缓冲液(PBS)。

1.3.5.2 德氏乳杆菌保加利亚亚种 48 h 发酵产物乙醇沉淀物及乙醇沉淀后的上清液的抑菌作用 向 8.0 mL 德氏乳杆菌保加利亚亚种 48 h 发酵产物中加入无水乙醇使其终浓度达 75%, -20° C 冰箱过夜后 12 000 r/min 离心 10 min,分离上清液并于室温下放置 24 h 以使乙醇挥发,然后再冷冻干燥,干燥物经 8.0 mL 蒸馏水复溶后备用。沉淀物用 75%乙醇洗涤 2 次后,除尽上清,并敞开管盖以使乙醇挥发。待沉淀物中乙醇挥发完毕,用不同 pH 值的 PBS 溶解,并以大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、枸橼酸杆菌、产气肠杆菌及黏质沙雷菌为指示菌,利用牛津杯药物敏感试验方法研究德氏乳杆菌保加利亚亚种 48 h 发酵产物的乙醇沉淀物及乙醇沉淀后的上清液的抑菌活性。

1.3.5.3 德氏乳杆菌保加利亚亚种 48 h 发酵产物中乳酸浓度测定及该浓度乳酸溶液对铜绿假单胞菌的抑制作用 以酶比色法检测德氏乳杆菌保加利亚亚种 48 h 发酵产物中乳酸浓度,然后以 0.01 mol/L pH 值 4.0 的 PBS 配制该浓度的乳酸溶液,用牛津杯法检测该浓度乳酸溶液对铜绿假单胞菌的抑制作用。

1.3.5.4 德氏乳杆菌保加利亚亚种 48 h 发酵产物 80%饱和度硫酸铵盐析物对铜绿假单胞菌的抑制作用 向 8.0 mL 德氏乳杆菌保加利亚亚种 48 h 发酵产物加入 32 mL 饱和硫酸铵溶液,充分混匀后置 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜,10 000 r/min 离心 10 min 后,去上清液,沉淀以 2 mL 0.01 mol/L pH 值 4.0 PBS 溶解,将溶解物中置于截留相对分子质量为 0.5×10^3 的透析袋中,用 0.01 mol/L pH 值 4.0 PBS 透析 72 h,每 24 h 换透析液一次,最后将透析后的溶液以 0.01 mol/L pH 值 4.0 PBS 补足体积至 8.0 mL。以铜绿假单胞菌为指示菌用牛津杯实验检测德氏乳杆菌保加利亚亚种 48 h 发酵产物经 80%饱和度硫酸铵盐析沉淀物对铜绿假单胞菌的抑制作用。

1.3.5.5 德氏乳杆菌保加利亚亚种发酵产物中抑菌物质相对分子质量的初步确定 将德氏乳杆菌保加利亚亚种 48 h 发酵产物经相对分子质量 3×10^3 及 10×10^3 的超滤离心管过滤后,以铜绿假单胞菌为指示菌,以牛津杯法检测滤出液及上层液(离心后留在滤膜上的液体)的抑菌活性。另外,将德氏乳杆菌保加利亚亚种 48 h 发酵产物直接置于截留相对分子质量为 0.5×10^3 的透析袋中,用 0.01 mol/L pH 值为 4.0 PBS 透析 72 h,每 24 h 换透析液一次,最后以铜绿假单胞菌为指示菌,利用牛津杯法检测透析后的发酵产物对其抑制作用,以研究该发酵产物中抑菌活性成分的相对相对分子质量大小。

1.4 统计学处理 抑菌圈直径大小以 mm 表示,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 t 检验;计数资料以频数表示。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 德氏乳杆菌保加利亚亚种与常见病原菌的共培养试验

2.1.1 确定适合德氏乳杆菌保加利亚亚种与常见病原菌共培养的培养基 研究结果显示,德氏乳杆菌保加利亚亚种在 MRS 肉汤培养基配比低的混合培养基中生长略差,MRS 肉汤培养基配比越高,该菌生长越好,在 MRS 肉汤培养基配比为 20%时,该菌生长速度约相当于纯 MRS 肉汤培养基中的一半左右;金黄色葡萄球菌在 MRS 肉汤培养基不同配比的混合培养基中均能生长,但在 MRS 肉汤培养基配比高的混合培养基中生长略差;铜绿假单胞菌在 MRS 肉汤培养基配比为 50%及以上的混合培养基中几乎不能生长,而在 MRS 肉汤培养基配比为 30%及以下的混合培养基中生长与在营养肉汤培养基中的生长速度相差不大。

故后续试验选用 MRS 肉汤培养基配比为 20% 的混合培养基作为德氏乳杆菌保加利亚亚种与临床常见病原菌共培养的最适比混合培养基。

2.1.2 德氏乳杆菌保加利亚亚种对铜绿假单胞菌的抑制作用及最适抑制比的确定 共培养试验显示当铜绿假单胞菌与德氏乳杆菌保加利亚亚种数量比在 1:3 以上时,混合培养基中均分离不出铜绿假单胞菌,但全部混合培养基中均可分离出德氏乳杆菌保加利亚亚种,表明德氏乳杆菌保加利亚亚种 3 倍于铜绿假单胞菌及以上时对该菌的生长具有显著抑制作用。

2.1.3 德氏乳杆菌保加利亚亚种对常见病原菌的抑制作用 将临床常见病原菌分别与德氏乳杆菌保加利亚亚种按 1:3 的数量比混合培养于 MRS 肉汤培养基配比为 20% 的混合培养基中,结果表明,德氏乳杆菌保加利亚亚种比例 3 倍于目标菌时对这些病原菌均有明显的抑制作用。

2.2 德氏乳杆菌保加利亚亚种 48 h 发酵产物的抑菌作用 利用牛津杯法研究德氏乳杆菌保加利亚亚种 48 h 发酵产物混悬液(含德氏乳杆菌保加利亚亚种菌

体)及 48 h 发酵产物上清液对常见病原菌的抑制作用,结果显示,牛津杯中加入调整 pH 值至 7.2 的发酵产物、pH 值为 4.0 乳酸溶液及 MRS 肉汤培养基对照的周围均无抑菌圈出现,而牛津杯中加入德氏乳杆菌保加利亚亚种发酵产物混悬液及上清液的周围有明显的抑菌圈,其中 48 h 发酵产物混悬液对金黄色葡萄球菌、鲍曼不动杆菌、黏质沙雷菌、肺炎克雷伯菌的抑制作用强于 48 h 发酵产物上清液($P<0.05$),表明德氏乳杆菌保加利亚亚种发酵产物对多种常见的革兰阴性杆菌、革兰阳性球菌均具有较强的抑制作用。见表 1。

2.3 德氏乳杆菌保加利亚亚种 24 h 及 48 h 发酵上清液对常见病原菌的抑制作用 利用牛津杯抑菌试验研究德氏乳杆菌保加利亚亚种 24 h 及 48 h 发酵产物上清液对临床常见病原菌的抑制作用,结果显示,48 h 发酵产物上清液对表皮葡萄球菌、肺炎克雷伯菌及金黄色葡萄球菌的抑制作用略强于 24 h 发酵产物上清液($P<0.05$),而对大肠埃希菌、铜绿假单胞菌及鲍曼不动杆菌的抑制作用与 24 h 发酵产物上清液相比差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

表 1 德氏乳杆菌保加利亚亚种 48 h 发酵产物混悬液及上清液对常见病原菌的抑制作用($\bar{x}\pm s$,mm)

菌种	<i>n</i>	48 h 发酵产物悬液抑菌圈直径	48 h 发酵产物上清液抑菌圈直径	<i>t</i>	<i>P</i>
表皮葡萄球菌	4	22.5±4.8	22.6±4.0	0.032 0	>0.05
耐甲氧西林金黄色葡萄球菌	3	24.3±5.3	21.5±5.0	0.768 6	>0.05
大肠埃希菌	4	16.5±3.6	16.1±3.4	0.161 6	>0.05
铜绿假单胞菌	4	22.7±4.3	20.3±4.9	0.736 3	>0.05
弗劳弟枸橼酸杆菌	4	23.4±4.0	21.1±6.1	0.630 6	>0.05
产气肠杆菌	4	23.6±4.1	20.5±5.9	0.862 9	>0.05
嗜麦芽假单胞菌	4	16.3±5.1	13.1±4.2	0.968 7	>0.05
金黄色葡萄球菌	4	15.2±2.1	11.4±2.2	2.498 9	<0.05
鲍曼不动杆菌	4	19.7±2.9	14.1±2.7	2.826 6	<0.05
黏质沙雷菌	4	15.4±1.9	11.2±1.6	3.381 7	<0.05
肺炎克雷伯菌	4	17.3±1.9	13.9±1.5	2.809 1	<0.05

表 2 德氏乳杆菌保加利亚亚种 24 h 及 48 h 发酵产物上清液对常见病原菌的抑制作用($\bar{x}\pm s$,mm)

菌种	<i>n</i>	24 h 发酵产物上清液抑菌圈直径	48 h 发酵产物上清液抑菌圈直径	<i>t</i>	<i>P</i>
表皮葡萄球菌	4	22.3±1.2	26.0±1.3	4.182 7	<0.05
肺炎克雷伯菌	4	15.0±1.7	17.9±1.3	2.710 2	<0.05
金黄色葡萄球菌	4	18.2±1.1	20.8±1.5	2.795 5	<0.05
大肠埃希菌	4	15.0±1.9	14.0±2.5	0.636 9	>0.05
铜绿假单胞菌	4	19.5±2.0	20.0±3.0	0.277 4	>0.05
鲍曼不动杆菌	4	18.3±1.6	17.5±1.8	0.664 4	>0.05

2.4 德氏乳杆菌保加利亚亚种 48 h 发酵产物抑菌活性的热稳定性测定 结果显示,德氏乳杆菌保加利亚亚种 48 h 发酵产物经分别经 60 ℃ 2 h、80 ℃ 2 h、100 ℃ 30 min 及 120 ℃ 30 min 处理后,对大肠埃希

菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌、产气肠杆菌及鲍曼不动杆菌的抑菌活性几乎无影响,表明德氏乳杆菌保加利亚亚种发酵产物中的抑菌成份具有良好的热稳定性。

2.5 德氏乳杆菌保加利亚亚种发酵产物抑菌作用成分的初步研究

2.5.1 德氏乳杆菌保加利亚亚种 48 h 发酵产物的乙醇沉淀物及乙醇沉淀后的上清液的抑菌作用 结果显示,德氏乳杆菌保加利亚亚种发酵产物的乙醇沉淀物对表中的测试菌均失去了抑菌活性,而乙醇沉淀后

的上清液对测试菌仍具备良好的抑菌作用,但抑菌活性均略低于德氏乳杆菌保加利亚亚种 48 h 发酵产物 ($P<0.05$)。表明德氏乳杆菌保加利亚亚种发酵产物中的抑菌物质不能被 75%乙醇沉淀,但发酵产物中的抑菌活性物质可能会被 75%乙醇部分灭活。见表 3。

表 3 德氏乳杆菌保加利亚亚种 48 h 发酵产物及乙醇沉淀上清液的抑菌活性($\bar{x}\pm s$, mm)

菌种	<i>n</i>	乙醇沉淀上清液抑菌圈直径	48 h 发酵产物抑菌圈直径	<i>t</i>	<i>P</i>
大肠埃希菌	4	12.0±1.7	17.5±1.2	5.286 3	<0.05
铜绿假单胞菌	4	17.0±1.7	24.0±1.7	5.823 2	<0.05
肺炎克雷伯菌	4	13.0±1.8	16.8±2.0	2.824 5	<0.05
金黄色葡萄球菌	4	11.8±1.1	18.0±1.7	6.123 9	<0.05
产气肠杆菌	4	10.5±1.3	15.8±2.0	4.443 8	<0.05
鲍曼不动杆菌	4	11.8±1.1	16.0±1.6	4.326 2	<0.05

2.5.2 德氏乳杆菌保加利亚亚种 48 h 发酵产物中乳酸对铜绿假单胞菌的抑制作用 利用乳酸测定试剂盒对德氏乳杆菌保加利亚亚种 48 h 发酵产物中的乳酸浓度进行测定,结果该发酵产物中乳酸浓度为 20 mmol/L。配制 20 mmol/L 乳酸溶液,利用牛津杯法检测该溶液对铜绿假单胞菌的抑制作用。结果在加有 20 mmol/L 乳酸溶液的牛津杯周围无抑菌圈出现,表明 20 mmol/L 的乳酸溶液不具备对铜绿假单胞菌的抑制作用。

2.5.3 德氏乳杆菌保加利亚亚种发酵产物 80%饱和度和硫酸铵盐析沉淀物对铜绿假单胞菌的抑制作用 将德氏乳杆菌保加利亚亚种 48 h 发酵产物经 80%饱和度和硫酸铵盐析,盐析沉淀物以 0.01 mol/L pH 值为 4.0 PBS 溶解并对该缓冲液进行透析,以牛津杯法检测盐析沉淀物对铜绿假单胞菌的抑制作用,结果显示,在加有该菌 48 h 发酵产物 80%饱和度和硫酸铵盐析沉淀物的牛津杯周围无抑菌圈出现,表明德氏乳杆菌保加利亚亚种 48 h 发酵产物的 80%盐析沉淀物对铜绿假单胞菌无抑制作用。

2.5.4 德氏乳杆菌保加利亚亚种 48 h 发酵产物中抑菌物质的相对分子质量 将德氏乳杆菌保加利亚亚种 48 h 发酵产物上清液经相对分子质量 3×10^3 及 10×10^3 的超滤离心管过滤后,以铜绿假单胞菌为指示菌,以牛津杯法研究了滤出液及上层液对指示菌的抑菌活性。结果显示,不管是发酵产物经超滤离心管过滤后的上层液、还是滤出液,均显示明显的抑菌活性,表明这些抑菌活性物质的相对分子质量在 3×10^3 左右或以下。

将德氏乳杆菌保加利亚亚种 48 h 发酵产物置于截留相对分子质量为 0.5×10^3 的透析袋中,用 0.01 mol/L pH 值为 4.0 PBS 透析 72 h 后,以铜绿假单胞菌为指示菌,检测透析后的发酵产物对其抑制作用。

结果显示,在加有透析后德氏乳杆菌保加利亚亚种 48 h 发酵产物的牛津杯周围无抑菌圈出现,表明德氏乳杆菌保加利亚亚种发酵产物经相对分子质量 0.5×10^3 透析袋透析后对铜绿假单胞菌的抑菌作用消失。

3 讨论

乳酸菌是一类能够发酵碳水化合物产生大量乳酸的无芽孢、革兰染色阳性细菌的总称,主要有乳杆菌属、乳球菌属、双歧杆菌属等 43 个菌属,广泛存在于人和畜禽肠道及多种发酵食品中^[10,13-14]。乳酸菌的抗微生物活性归因于其在代谢过程中产生多种抗微生物活性物质,如乳酸、苯乳酸、乙酸、过氧化氢、二氧化碳、细菌素及其他低相对分子质量化合物^[15]。由于这些特性,某些乳酸菌如植物乳杆菌已被开发为抗微生物感染的新型生物制剂并应用于临床上烧伤的治疗,显示出良好的临床应用效果^[16]。

本研究对铜绿假单胞菌与德氏乳杆菌保加利亚亚种进行共培养试验,结果显示,铜绿假单胞菌与德氏乳杆菌保加利亚亚种数量比在 1:3 以上时,铜绿假单胞菌的生长受到完全抑制,表明共培养时德氏乳杆菌保加利亚亚种对铜绿假单胞菌有较强的抑制作用。同时,本研究对德氏乳杆菌保加利亚亚种与多种常见病原菌进行共培养实验,结果发现,在普通环境及厌氧环境下德氏乳杆菌保加利亚亚种对包括金黄色葡萄球菌、鲍曼不动杆菌等在内的多种常见病原菌均表现出明显的抑制作用。该研究结果与 JEBUR^[17]探究嗜酸乳杆菌对烧伤感染常见病原菌抑制作用的结果相近。由于德氏乳杆菌保加利亚亚种与嗜酸乳杆菌同为乳杆菌属,因此,JEBUR^[17]的研究结果对本研究起到一定辅证作用。而 BOYANOVA 等^[12]初步探究出德氏乳杆菌保加利亚亚种的抗幽门螺杆菌活性,也对本研究结果起到一定的补充作用。

本研究还对德氏乳杆菌保加利亚亚种发酵产物

的抑菌效果进行探究,通过牛津杯试验观察各组抑菌圈直径大小以评估其抑菌作用。结果发现,德氏乳杆菌保加利亚亚种的发酵产物具有抑菌活性,且发酵产物中德氏乳杆菌保加利亚亚种的存在对抑菌效果的影响不大,但将 48 h 发酵产物的 pH 值调到 7.2 时其抑菌活性基本消失,表明发酵产物中的抑菌活性物质可能只能在酸性环境中发挥其抑菌活性。

ARIEF 等^[18]、RUÍZ 等^[19]的研究结果表明,乳酸菌产生的细菌素能够抑制金黄色葡萄球菌、淋球菌等,即乳酸菌代谢产物中的细菌素具有明显的抑菌作用。为了明确德氏乳杆菌保加利亚亚种发酵产物抑菌成分,本研究对发酵产物中的抑菌活性物质进行了初步探究。德氏乳杆菌保加利亚亚种 48 h 发酵产物中的乳酸与其抑菌作用无关;以 75%乙醇对德氏乳杆菌保加利亚亚种 48 h 发酵产物进行沉淀后检测其抑菌活性,结果表明乙醇沉淀物失去抑菌活性,但乙醇沉淀后的上清液仍具有对病原菌的抑制作用;以 80%饱和度硫酸铵对德氏乳杆菌保加利亚亚种 48 h 发酵产物进行盐析,发现盐析沉淀物亦不具备对病原菌的抑制作用,表明该抑制物质不能被 80%饱和度硫酸铵盐析沉淀。将德氏乳杆菌保加利亚亚种 48 h 发酵产物经相对分子质量 3×10^3 及 10×10^3 的超滤离心管超滤后的滤过液及上层液对铜绿假单胞菌仍具有明显的抑菌活性;利用截留相对分子质量为 0.5×10^3 的透析袋对德氏乳杆菌保加利亚亚种 48 h 发酵产物进行透析,透析袋外液体具有对病原菌的抑制作用,透析袋内的液体对病原菌无抑菌活性,表明德氏乳杆菌保加利亚亚种 48 h 发酵产物中的抑菌活性物质相对分子质量在 0.5×10^3 左右或以下。

随着抗菌药物在临床的广泛使用,细菌耐药也变得十分普遍,耐药菌、多重耐药菌及泛耐药菌的感染已成临床十分棘手的问题。微生物组学研究的广泛开展,使科研人员意识到可以利用微生物之间的相互作用开发新的抗感染策略,益生菌特别是乳酸菌由于其独特的性质成为拮抗病原微生物的重要候选菌。本文研究结果为开发抗微生物感染的益生菌制剂提供了有力实验支持。本课题后续在动物水平研究德氏乳杆菌保加利亚亚种发酵产物对烧伤并发铜绿假单胞菌感染的治疗效果研究目前正在进行中,有望为烧伤并发铜绿假单胞菌感染的治疗提供依据和新思路。

4 结 论

本研究结果表明,德氏乳杆菌保加利亚亚种发酵产物对于临床常见的多种革兰阳性、革兰阴性病原菌均具有较强的抑菌活性,其抑菌机制与该菌产生的耐热、非乳酸类小分子抑菌物质有关。

参考文献

[1] EL-SHOUNY W A, ALI S S, SUN J Z, et al. Drug resist-

ance profile and molecular characterization of extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn wound infections. Essential oils and their potential for utilization[J]. Microb Pathog, 2018, 116: 301-312.

- [2] GHOLAMREZAZADEH M, SHAKIBAIE M R, MONIRZADEH F, et al. Effect of nano-silver, nano-copper, decanex and benzalkonium chloride on biofilm formation and expression of transcription regulatory quorum sensing gene (rhIR) in drug-resistance *Pseudomonas aeruginosa* burn isolates[J]. Burns, 2018, 44(3): 700-708.
- [3] KHORSI K, MESSAI Y, HAMIDI M, et al. High prevalence of multidrug-resistance in *Acinetobacter baumannii* and dissemination of carbapenemase-encoding genes blaOXA-23-like, blaOXA-24-like and blaNDM-1 in Algiers hospitals[J]. Asian Pac J Trop Med, 2015, 8(6): 438-446.
- [4] HIRTEN R P, GRINSPAN A, FU S C, et al. Microbial engraftment and efficacy of fecal microbiota transplant for *Clostridium Difficile* in patients with and without inflammatory bowel disease[J]. Inflamm Bowel Dis, 2019, 25(6): 969-979.
- [5] BAXTER M, COLVILLE A. Adverse events in faecal microbiota transplant: a review of the literature[J]. J Hosp Infect, 2016, 92(2): 117-127.
- [6] WEIL A A, HOHMANN E L. Fecal microbiota transplant: benefits and risks[J]. Open Forum Infect Dis, 2015, 2(1): ofv005.
- [7] EFRATI C, NICOLINI G, CANNAVIELLO C., et al. *Helicobacter pylori* eradication: sequential therapy and *Lactobacillus reuteri* supplementation[J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(43): 6250-6254.
- [8] MUKHERJEE S, RAMESH A. Bacteriocin-producing strains of *Lactobacillus plantarum* inhibit adhesion of *Staphylococcus aureus* to extracellular matrix: quantitative insight and implications in antibacterial therapy[J]. J Med Microbiol, 2015, 64(12): 1514-1526.
- [9] ISHINO Y, MORGENTHAUER P, HOTTINGER H, et al. Organization and nucleotide sequence of the glutamine synthetase (glnA) gene from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* [J]. Appl Environ Microbiol, 1992, 58(9): 3165-3169.
- [10] TUFALI M, HUSSAIN S, MALIK F, et al. Isolation and evaluation of antibacterial activity of bacteriocin produced by *Lactobacillus bulgaricus* from yogurt[J]. Afr J Microbiol Res, 2011, 5(22): 3842-3847.
- [11] ABEDI D, FEIZIZADEH S, AKBARI V, et al. In vitro anti-bacterial and anti-adherence effects of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* on *Escherichia coli* [J]. Res Pharm Sci, 2013, 8(4): 260-268.
- [12] BOYANOVA L, GERGOVA G, MARKOVSKA R, et al. Bacteriocin-like inhibitory activities of seven *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains against antibiotic susceptible and resistant *Helicobacter pylori* strains [J]. Lett Appl Microbiol, 2017, 65(6): 469-474. (下转第 2907 页)

由 mRNA 决定的,同时 LIG3 的表达水平与病情有一定的相关性。LIG3 可以作为一个判定 MM 病理情况的一个指标。

miRNA 是一种基因组编码长度约 20~23 个核苷酸的非编码 mRNA,在生物体内不编码蛋白,它有多种靶基因,参与了基因的转录水平的调控,可能是骨髓瘤的致病因子。生物体内的 miRNA 具有多种负性调控基因表达的作用,与靶基因的 mRNA 的 3'端(非编码区)UTR 区不完全配对,改变了 mRNA 的表达水平^[15]。miRNA 参与了细胞生长发育不同阶段的时序调控、细胞增殖、细胞分化和代谢等多方面。近年来有研究发现,miRNA 和肿瘤的发生有一定的相关性^[8],已有研究发现乳腺癌患者的 miR-21 水平与乳癌转移密切相关^[12],说明 miRNA 的表达量与生物体癌症的发生有着密切的关系。本研究发现,MM 细胞中,抑制了 miR-22 的表达量,从而促进 LIG3 的表达翻译,保证了 MM 细胞基因组的稳定性,有利于其分裂生长。MM 组织中 miR-22、miR-156 的表达量与病理分级呈负相关,而 miR-22 能够结合 LIG3 的启动子降低 LIG3 的表达;低表达量的 miR-22 确保了骨髓瘤细胞中 LIG3 的表达量,有利于 MM 的增殖。由此可见,miR-22 能够结合 LIG3 的启动子调控 LIG3 的转录,从而影响骨髓瘤的发展。

4 结 论

miR-22、miR-156 的低表达和 MM 的发生有关。miR-22 通过调控 LIG3 的表达影响骨髓瘤的增殖,而 miR156 与 LIG3 之间没有相关性,它可能通过调控其他因子影响骨髓瘤的增殖。本研究对 miRNA 在 MM 中的作用机制研究尚不够深入,但 miR-22 有可能作为治疗 MM 的靶标基因在临床上应用。

参考文献

- [1] 郑海艺,王国栋,张元民. MiR-145 传导通路与肿瘤的研究进展[J]. 中国临床实用医学,2019,10(5):74-77.
- [2] 王强. miR-126、EGF1-7 在婴幼儿血管瘤组织中的表达及意义[D]. 济南:山东大学,2015.
- [3] ROLFE R D. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health[J]. J Nutr,2000,130(2S Suppl):396S-402S.
- [4] GUGLIELMOTTI D M, MARCÓ M B, GOLOWCZYC M, et al. Probiotic potential of *Lactobacillus delbrueckii* strains and their phage resistant mutants[J]. Int Dairy J, 2007,17(8):916-925.
- [5] ŠUŠKOVIC J, KOS B, BEGANOVIC J, et al. Antimicrobial activity-the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria[J]. Food Technol Biotechnol, 2010,48(3):296-307.
- [6] PERAL M C, MARTINEZ M A, VALDEZ J C. Bacteriotherapy with *Lactobacillus plantarum* in burns [J]. Int

- [3] 郑伟,陆捷,郝爱军,等. 5 例双克隆型多发性骨髓瘤的实验室检测结果分析[J]. 检验医学,2019,34(8):710-716.
- [4] 苑冬阳,廖爱军. 老年多发性骨髓瘤治疗研究进展[J]. 中华实用诊断与治疗杂志,2019,33(4):403-405.
- [5] 倪晓博,王焱,朱传升. 多发性骨髓瘤与 DNA 甲基化的研究进展[J]. 国际输血及血液学杂志,2017,40(4):336-339.
- [6] 王晶,周永安,苏丽萍,等. 初发多发性骨髓瘤患者线粒体 DNA 突变情况研究[J]. 白血病·淋巴瘤,2019,28(2):88-90.
- [7] 王欢,李静,刘艳春,等. miR-373 在老年多发性骨髓瘤中的作用机制及其临床意义[J]. 中国实验血液学杂志,2018,26(3):829-835.
- [8] 王健,谷文光,董志伟. microRNA 在癌细胞与肿瘤微环境之间的作用[J]. 中国矫形外科杂志,2016,24(17):1597-1599.
- [9] 冯强,刘涛. miR-184 在肾癌组织中的表达及其对癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. 肿瘤学杂志,2019,25(10):890-895.
- [10] 胡珊珊,宋彦,罗玉明,等. microRNA-191-5 p 靶向 PL-CD1 调控食管癌细胞顺铂耐药机制研究[J]. 东南大学学报(医学版),2019,38(3):477-480.
- [11] 张之南 沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版. 北京:科学出版社,2007:232-235.
- [12] CARACCIOLO D, DI MARTINO M T, AMODIO N, et al. mMiR-22 suppresses DNA ligase III addiction in multiple myeloma[J]. Leukemia,2019,33(2):487-498.
- [13] 崔思远,解荣燕,于丽明,等. 三氧化二砷对人多发性骨髓瘤 KM3 细胞凋亡和染色体区域稳定蛋白 mRNA 表达的影响[J]. 中华中医药杂志,2019,34(6):2407-2411.
- [14] 苟阳,唐永杰,杨程,等. 305 例髓系肿瘤的基因突变图谱比较分析[J]. 第三军医大学学报,2019,41(21):2069-2073.
- [15] 谢飞,曾俊义,张婉,等. 双荧光素酶报告基因技术验证 miR-31 对 LATS2 的靶向调控作用[J]. 检验医学与临床,2019,16(15):2113-2116.

(收稿日期:2020-02-18 修回日期:2020-06-21)

(上接第 2903 页)

- [13] Wound J,2009,6(1):73-81.
- [17] JEBUR M S H. Therapeutic efficacy of *Lactobacillus acidophilus* against bacterial isolates from burn wounds[J]. N Am J Med Sci,2010,2(12):586-591.
- [18] ARIEF I I, BUDIMAN C, JENIE B S L, et al. Plantaricin IIA-1A5 from *Lactobacillus plantarum* IIA-1A5 displays bactericidal activity against *Staphylococcus aureus*[J]. Benef Microbes,2015,6(4):603-613.
- [19] RUÍZ F O, PASCUAL L, GIORDANO W, et al. Bacteriocins and other bioactive substances of probiotic *Lactobacilli* as biological weapons against *Neisseria gonorrhoeae* [J]. Pathog Dis,2015,73(3):1-10.

(收稿日期:2020-02-22 修回日期:2020-09-10)