



植物乳杆菌培养上清对不同血清型沙门氏菌的抑制效果及作用机理

李东昱¹, 胡爱心¹, 黄雯霞¹, 舒鑫¹, 刘金松², 张瑞强¹, 许英蕾¹, 杨彩梅¹, 吴艳萍^{1*}

1 浙江农林大学动物科技学院 动物医学院, 浙江 杭州 311300

2 浙江惠嘉生物科技股份有限公司, 浙江 湖州 313307

李东昱, 胡爱心, 黄雯霞, 舒鑫, 刘金松, 张瑞强, 许英蕾, 杨彩梅, 吴艳萍. 植物乳杆菌培养上清对不同血清型沙门氏菌的抑制效果及作用机理[J]. 微生物学报, 2023, 63(1): 220-232.

LI Dongyu, HU Aixin, HUANG Wenxia, SHU Xin, LIU Jinsong, ZHANG Ruiqiang, XU Yinglei, YANG Caimei, WU Yanping. Inhibitory mechanism of *Lactobacillus plantarum* culture supernatant on *Salmonella* of different serotypes[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(1): 220-232.

摘要:【目的】探究植物乳杆菌培养上清(*Lactobacillus plantarum* culture supernatant, LPC)对3种血清型沙门氏菌猪霍乱(*Salmonella cholerae*, SC)、肠炎(*Salmonella enteritidis*, SE)和鸡白痢(*Salmonella pullorum*, SP)的生长和致病性的抑制作用效果及机理。【方法】将2% LPC与3种沙门氏菌分别共培养后,采用比浊法及牛津杯抑菌圈试验检测沙门氏菌生长情况及LPC中的主要抑菌物质,使用实时荧光定量PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)探究沙门氏菌致病性相关基因表达水平,最后通过结晶紫染色法检测沙门氏菌的生物被膜。【结果】2% LPC能够显著抑制3种沙门氏菌的生长,其作用效果与庆大霉素(gentamicin, GM)相近且对SE的生长抑制效果优于GM,其主要抑菌物质为有机酸;2% LPC对3株沙门氏菌SPI-1编码的主要毒力基因(*InvA*、*InvF*、*SopE*、*SopB*、*SipB*、*HilA*和*SipA*)、SPI-2毒力基因(*SopD2*)、菌毛相关基因(*FliF*、*LpfA*、*SefA*和*FimF*)和鞭毛相关基因(*FlhD*、*FliC*和*FliD*)表达均有显著抑制效果且抑制效果与GM相近;2% LPC对3株沙门氏菌的生物被膜形成均有显著抑制效果,抑菌率12 h为40%–50%、24 h

资助项目: 国家自然科学基金(32002212); 浙江省自然科学基金(LQ21C170001); 浙江农林大学科研发展项目(2020FR003); 浙江省领军型创新创业团队项目(2020R01015); 浙江农林大学学生科研训练项目(2021KX0114)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32002212), the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LQ21C170001), the Research and Development Project of Zhejiang Agricultural and Forestry University (2020FR003), the Zhejiang Leading Innovation and Entrepreneurship Team Project (2020R01015), and the Student Research Training Programs of Zhejiang Agricultural and Forestry University (2021KX0114).

*Corresponding author. E-mail: ypwu@zafu.edu.cn

Received: 2022-04-16; Accepted: 2022-05-20; Published online: 2022-07-25

为 60%–80%，且作用效果与 GM 相似；对比发现，2% LPC 对 SE 的生长及致病性的抑制效果优于 SC 与 SP。【结论】2% LPC 对 3 种血清型沙门氏菌的生长性能及致病性均有显著抑制效果，且对肠炎沙门氏菌抑制效果最佳。

关键词：植物乳杆菌培养上清；沙门氏菌；抑制生长；致病性

Inhibitory mechanism of *Lactobacillus plantarum* culture supernatant on *Salmonella* of different serotypes

LI Dongyu¹, HU Aixin¹, HUANG Wenxia¹, SHU Xin¹, LIU Jinsong², ZHANG Ruiqiang¹, XU Yinglei¹, YANG Caimei¹, WU Yanping^{1*}

1 College of Veterinary Medicine, College of Animal Science and Technology, Zhejiang Agricultural and Forestry University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China

2 Zhejiang Huijia Bio-Technology Co., Ltd, Huzhou 313307, Zhejiang, China

Abstract: [Objective] Our study investigated the inhibitory effect and pathogenicity of *Lactobacillus plantarum* culture supernatant (LPC) on *Salmonella cholerae* (SC), *Salmonella enteritidis* (SE) and *Salmonella pullorum* (SP). [Methods] Three serotypes of *Salmonella enterica* were co-cultured with 2% LPC. *Salmonella* growth and antibacterial compounds were identified using turbidimetry and the Oxford cup antimicrobial zone. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the expression levels of pathogenicity-related genes in *Salmonella*, and crystal violet staining was used to identify the biofilm of *Salmonella*. [Results] 2% LPC reduced the development of three *Salmonella* strains considerably, with an efficacy comparable to gentamicin (GM) and even better than SE. Additionally, the main antibacterial substance was organic acids. 2% LPC markedly suppressed the expressions of the main virulence genes encoded by SPI-1 (*InvA*, *InvF*, *SopE*, *SopB*, *SipB*, *HilA* and *SipA*), SPI-2 (*SopD2*), pili related genes (*FliF*, *LpfA*, *SefA* and *FimF*) and flagellum related genes (*FlhD*, *FlhC* and *FliD*) and the inhibitory effect was similar to GM. 2% LPC had significant inhibitory effect on biofilm formation of the three *Salmonella* strains, the inhibition rate was 40%–50% at 12 h and 60%–80% at 24 h. Compared with SC and SP, 2% LPC was superior to inhibit SE. [Conclusion] 2% LPC has significant inhibitory effects on the growth and pathogenicity of *Salmonella* serotypes, particularly SE.

Keywords: *Lactobacillus plantarum* culture supernatant; *Salmonella*; inhibit growth; pathogenicity

益生菌作为绿色安全的抗生素替代品及生态制剂已广泛应用于动物生产和提高人体健康，以及显著提高动物生产性能和畜产品品质、改善机体肠道健康及增强免疫力等^[1-2]。据报道，益生菌发挥作用的主要途径是抑制肠道病原

菌^[3]。沙门氏菌是影响机体健康及畜产品品质的重要病原菌之一，其可引起动物顽固性下痢、败血症和坏死性肠炎^[4-5]，当人食入沙门氏菌污染的畜产品后将引发肠胃炎、菌血症和腹泻等疾病，严重危害人类健康^[6]。目前的防控措施主要为抗

生素治疗, 而由细菌耐药性和抗生素残留等引发的问题日益严重。已有研究表明, 益生菌对沙门氏菌具有很好的抑制作用, 其可通过分泌抗菌物质抑制沙门氏菌生长繁殖^[7-9], 但其具体抑菌成分有待探究, 且目前研究集中在对沙门氏菌生长的抑制, 而对沙门氏菌致病性影响的研究较少。

危害畜禽生产从而影响动物源食品安全的沙门氏菌主要血清型包括猪霍乱沙门氏菌、肠炎沙门氏菌和鸡白痢沙门氏菌等^[3-4], 其能通过口腔进入胃肠道后感染肠上皮细胞, 通过菌毛、鞭毛、生物被膜、致病岛(*Salmonella* pathogenicity islands, SPI)及其编码的 III 型分泌系统(type III secretion systems, T3SSs)^[10]发挥致病性。沙门氏菌首先通过鞭毛^[11]靠近细胞及菌毛, 与细胞受体结合黏附细胞^[12], 同时, 其产生的生物被膜可降低沙门氏菌对杀菌物质及环境变化的敏感性^[13], 随后其 T3SSs 中由 SPI-1 编码的毒力因子(如 *Inv*、*Sip*、*Spv* 及 *Hil* 等)粘附素定殖在肠上皮细胞; 在 SPI-2 编码的效应蛋白(如 *Sop*)的作用下, 沙门氏菌以包裹入囊泡(*Salmonella* containing vacuoles, SCVs)的形式进入细胞, 并在 SCVs 内进行复制^[14]; 最后随着 SCVs 破裂, 部分细菌暴露在细胞质中被泛素化, 此时细胞会启动防御系统来清除病原菌^[15]。因此, 抑制沙门氏菌致病性相关基因的表达是降低其感染性的重要策略。

植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)是一种应用广泛的益生菌, 已有研究表明, 植物乳杆菌可抑制机体肠道沙门氏菌感染^[16-18]。目前尚未有研究比较植物乳杆菌对不同血清型沙门氏菌的抑制作用效果, 且其抑菌机制有待进一步阐明。本研究采用前期筛选出的一株具较好抑菌功能的植物乳杆菌, 探究其培养上清对 3 种主要血清型沙门氏菌(猪霍乱沙门氏菌、肠炎沙门氏菌和鸡白痢沙门氏菌)的生长和致病性的抑制效果, 并探究培养上清的抑菌成分。

1 材料与方 法

1.1 菌株

植物乳杆菌 HJZW08 (LP, CGMCC: No. 23777)由浙江惠嘉生物科技股份有限公司提供, 猪霍乱沙门氏菌(SC, ATCC 10708)、肠炎沙门氏菌(SE, ATCC 13076)和鸡白痢沙门氏菌(SP, CVCC 22221401)分别购自菌种保藏中心。

1.2 主要试剂及配制

磷酸缓冲盐溶液(phosphate-buffered saline, PBS)、NaOH 溶液、无菌 H₂O、过氧化氢酶、胰蛋白酶、蛋白酶 K、Trizol、氯仿、异丙醇、焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)水、结晶紫染液、庆大霉素(gentamicin, GM)、NaCl、胰蛋白胨、酵母浸粉、75%乙醇。

1.2.1 培养基

LB 液体培养基由 10 g NaCl、10 g 胰蛋白胨、5 g 酵母浸粉和 1 L 蒸馏水制成; 在此基础上添加 20 g 琼脂粉制成 LB 固体培养基。MRS 液体培养基由 52.25 g MRS 肉汤培养基和 1 L 蒸馏水制成。

1.2.2 LPC 制备

将植物乳杆菌复苏、扩培得到 7×10^9 CFU/mL 的 LP 菌液, 分装于 50 mL 离心管中, 8 000×g 离心 10 min, 上清用 0.22 μm 的滤过滤器过滤, 得到无菌的 LPC, 分装至 1.5 mL 离心管中存于 -80 °C 备用。利用 0.1 mol/L NaOH 将 LPC 的 pH 调节至 6.5 得到 NaOH-LPC; 用过氧化氢酶(1 mg/mL)在 25 °C 孵育 1 h 去除 H₂O₂ 得到 Catalase-LPC; 用胰蛋白酶(200 mg/mL)和蛋白酶 K (1 mg/mL)在 37 °C 处理 1 h 去除细菌素得到 Protease-LPC; LPC 在 100 °C 处理 15 min 得到 Heat-LPC。工作浓度为 2% (体积分数)。

1.3 方 法

分组: 对照组(MRS)、GM (25 μg/mL)组、沙门氏菌组、LPC (2%)+沙门氏菌组。

1.3.1 沙门氏菌培养

取少量 3 种血清型沙门氏菌菌种分别接种至 3 个含 LB 液体培养基的试管中, 于 37 °C 恒温摇床中培养过夜, 随后扩培, 试验时根据其标准生长曲线调整至 2.5×10^8 CFU/mL。

1.3.2 比浊法测定沙门氏菌生长曲线

将沙门氏菌菌液与 LPC 在 37 °C、180 r/min 的摇床中共培养, 并在 0、2、4、6、8、10、12 h 时测量各组 OD_{600} 吸光度, 绘制时间- OD 曲线。

1.3.3 牛津杯法测定抑菌圈

玻璃平皿中倒入 LB 固体培养基(5%琼脂), 凝固后, 倒入含 1%浓度沙门氏菌菌液的 LB 固体培养基, 菌液凝固后向平皿中放置牛津杯, 分别加入 600 μ L MRS、GM 及 LPC 后盖上陶瓦盖, 37 °C 培养过夜。用细菌测定仪拍照, 测定抑菌圈直径。

1.3.4 牛津杯法鉴定 LPC 抑菌成分

向含菌培养基的牛津杯中分别加入 NaOH-LPC、Protease-LPC、Catalase-LPC、Heat-LPC 及 MRS 和 GM, 培养过夜后用细菌测定仪拍照, 测定抑菌圈直径。

1.3.5 qRT-PCR 检测沙门氏菌毒力基因、菌毛及鞭毛 mRNA 相对表达量

LPC 与沙门氏菌共培养 8 h 后收集菌体, 按 Trizol 试剂盒(TaKaRa)说明书提取总 RNA 后, 进行反转录得到 cDNA。cDNA 的合成按照 TaKaRa PrimeScriptTMRT reagent Kit with gDNA Eraser 操作说明书进行, 反应结束后置于 -80 °C 保存备用。引物如表 1 所示, 均由杭州擎科生物有限公司合成。

实时荧光定量 PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR): 采用 TB Green I 染料法, 按照 TB Premix EX TaqTM II 操作说明书在 CFX96 荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad) 进行定量分析。反应体系为: 5 μ L TB Green Premix, 1 μ L 稀释后的 cDNA 模板, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 0.3 μ L, DEPC 水 3.4 μ L。反应程序为: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40 个循环; 熔解曲线从 60 °C 至 95 °C 逐步上升(每 5 s 增加 0.5 °C)获得。16S rRNA 基因为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行目的基因的相对表达量计算。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences used in real-time quantitative PCR

Gene names	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
<i>InvA</i>	GCTTGGCTATGTGTTGCGGAAC	CGTGGCATGTCTGAGCACTTCT
<i>InvF</i>	TTTGCTGAGTCCTGAGTTTCGC	TCATCGTGTTGCCGCTGGTT
<i>SopE</i>	GCCAGACCCGTGAAGCTATACT	TCGCTGCTTCGCCAATTTCTCT
<i>SopB</i>	GATGCCCGTTATGCGTGAGTGT	TCAGCAGCAGGATGGCTTACCT
<i>SipB</i>	GCTGATTGGCAAGGCGATTACC	CGACAACCTGCGACCACCACAAT
<i>HilA</i>	AATCGTCCGGTTCGTAGTGGTGT	TGCGGCAGTTCTTCGTAATGGT
<i>SipA</i>	CAACGCCACCAGTGATTCTCTCT	GCTTCGCTTCCGCTTTCTTTGT
<i>SopD2</i>	AGCCCGTTTGATGAGTCCTG	ACCTCCAGCACCTCTTGTTT
<i>FliF</i>	GAAGCCATTCTGTGCGCTAT	TGTAGTGCTCTTCCGCTCTGC
<i>LpfA</i>	TTTGCTCTGTCTGCTCTCGC	CTGACCCAGCACAACTTCTCT
<i>SefA</i>	CTGTCCCGTTCGTTGATGGA	CTGCTGGCAGGGTCGATTTA
<i>FimF</i>	CCATTGCCGTATCAGCAAGC	ACAAAACAGCTTACGTCGCG
<i>FlhD</i>	CGCCTCGGTATCAACGAAGA	GCGCGAATCCTGAGTCAAAC
<i>FliC</i>	TCTGTCTCTGGTCTGCGTA	TCATTACAGCGCACCTTCAGT
<i>FliD</i>	GCCAATTACCAAACAGCAGAG	GACGCCACGGTAGACTTAAATA
16S rRNA	CGATGTCTACTTGGAGGTTGTG	CTCTGGAAAGTTCTGTGGATGTC

1.3.6 结晶紫染色法测定沙门氏菌生物被膜

LPC 或 GM 与沙门氏菌共培养 12 h 及 24 h 后, 用 PBS 洗涤并晾干, 用 0.1% 结晶紫染色液染色 30 min, PBS 洗涤 3 次后, 用 1 mL 95% 乙醇溶液进行洗脱, 分别取 200 μ L 的洗脱液加入 96 孔板中, 在 545 nm 读取 OD 值, 即为生物被膜生成量。生物被膜抑制量按如下公式计算:

$$\text{生物被膜抑制率(\%)} = \frac{OD_{\text{沙门氏菌}} - OD_{\text{试验组}}}{OD_{\text{沙门氏菌}}} \times 100^{[19]}$$

式中: $OD_{\text{沙门氏菌}}$: 仅含沙门氏菌的 OD 值; $OD_{\text{试验组}}$:

LPC+沙门氏菌或 GM+沙门氏菌的 OD 值。

1.4 数据处理及分析

实验数据采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析。试验各组之间的差异采用单因素方差分析, Tukey 检验法进行多重比较, 结果用 $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 2% LPC 对 3 种血清型沙门氏菌生长的影响

结果如图 1 所示。由图 1A 可知, 与沙门氏

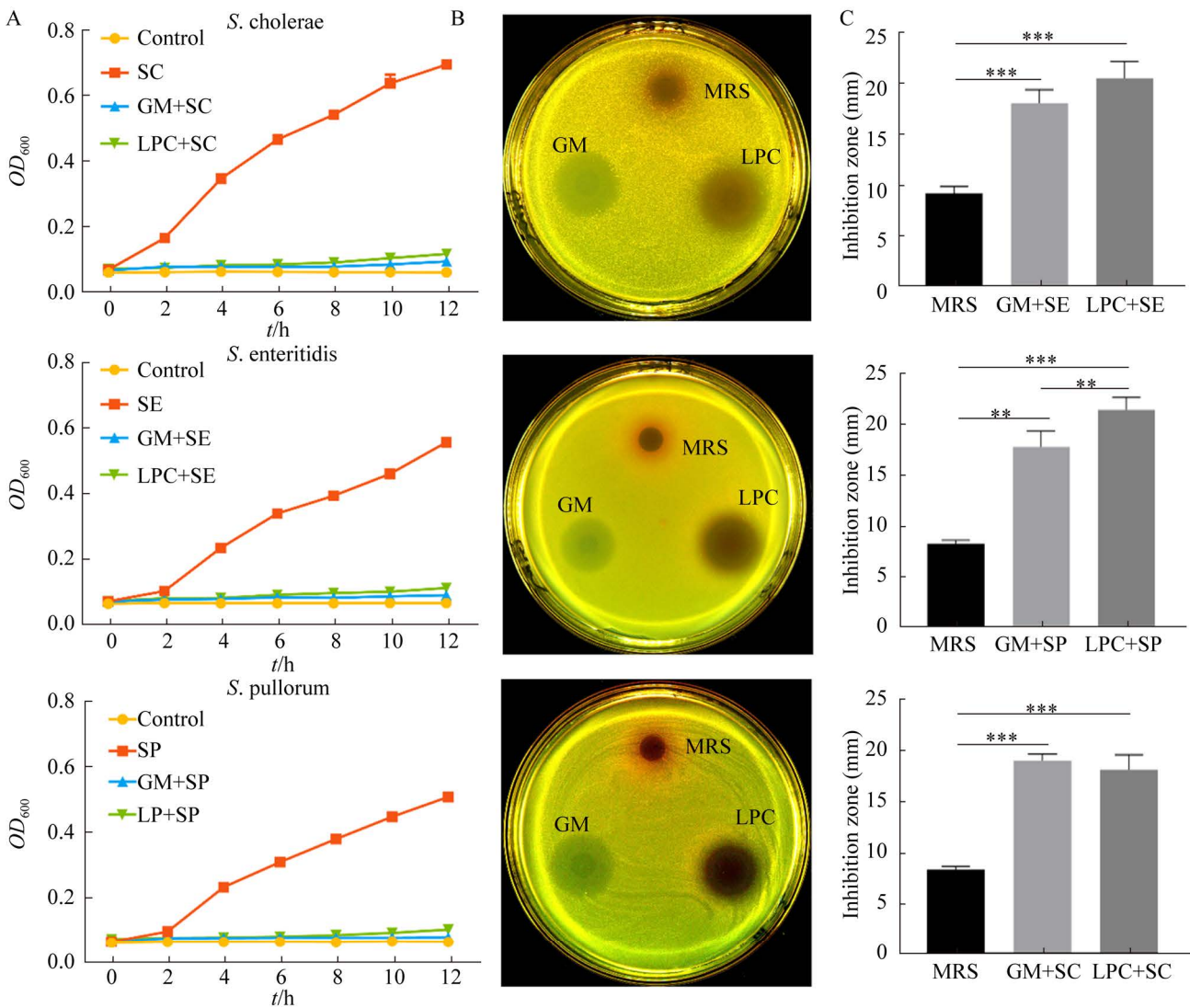


图 1 2% LPC 对 3 种血清型沙门氏菌生长的影响

Figure 1 Effect of 2% LPC on the growth of three serotypes of *Salmonella*. **: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$.

菌组相比, LPC 在 0–12 h 能够显著抑制 SC、SE、SP 的生长, 且其抑制效果与 GM 接近。由图 1B 可知, 与 MRS 组相比, LPC 组的 SC、SE、SP 的抑菌圈直径显著增大, 其中 LPC 对 SE 的抑制效果显著优于 GM ($P < 0.01$), 而对 SC 和 SP 的抑制效果与 GM 的抑制效果无显著差异 ($P > 0.05$)。

2.2 探究 2% LPC 的具体抑菌成分

LPC 中的有机酸、细菌素、过氧化氢及 LPC 热稳定性对 3 种血清型沙门氏菌的抑制效果如图 2 所示。由图 2A 可知, NaOH-LPC 组抑菌圈直径与 MRS 组无显著差异 ($P > 0.05$), 与 LPC 组及 GM 组差异极显著 ($P < 0.001$); 由图 2B 可知, Protease-LPC 抑菌圈直径组与 MRS 组差异极显著 ($P < 0.001$), 与 LPC 组无显著差异 ($P > 0.05$); 由图 2C 可知, Catalase-LPC 组抑菌圈直径与空白 MRS 组差异极显著 ($P < 0.001$), 与 LPC 组无显著差异 ($P > 0.05$); 由图 2D 可知, Heat-LPC 组抑菌圈直径与 MRS 组差异极显著 ($P < 0.001$), 与 LPC 组无显著差异 ($P > 0.05$)。结果表明, 在除去 LPC 中有机酸后抑菌能力显著下降, 而去除 LPC 中过氧化氢、细菌素和热处理后抑菌能力与 LPC 组无显著差异。

2.3 探究 2% LPC 对沙门氏菌毒力因子基因表达的影响

SPI-1 编码的主要毒力基因为 *InvA*、*InvF*、*SopE*、*SopB*、*SipB*、*HilA* 和 *SipA*, SPI-2 编码的主要毒力基因为 *SopD2*, LPC 对 3 种血清型沙门氏菌主要毒力基因表达的影响如图 3 所示。与对照组相比, LPC 对 3 种沙门氏菌的 *InvA*、*InvF*、*SopE*、*SopB*、*SipB*、*HilA*、*SipA* 及 *SopD2* 抑制效果极显著 ($P < 0.01$)。其中, LPC 对 SE 的 *InvA*、SP 的 *InvF*、SP 的 *SipA*、SP 的 *SopB* 及 SC 和 SP 的 *SopD2* 抑制效果与 GM 相比差异显著 ($P < 0.05$)。

2.4 探究 2% LPC 对沙门氏菌鞭毛及菌毛基因表达的影响

2% LPC 对沙门氏菌菌毛相关基因 (*FilF*、*SefA*、*LpfA*、*FimF*) 表达影响的结果如图 4A 所示。

结果表明, 与对照组相比, LPC 对 SC 的 *FilF*、*SefA*、*LpfA*、*FimF* 的抑制效果显著 ($P < 0.01$), 且对 *FilF* 的抑制效果与 GM 无差异 ($P > 0.05$); LPC 对 SE 的 *FilF*、*SefA*、*LpfA*、*FimF* 抑制效果显著 ($P < 0.01$), 且抑制效果与 GM 无差异 ($P > 0.05$); LPC 对 SP 的 *FilF*、*SefA*、*LpfA*、*FimF* 抑制效果显著 ($P < 0.01$), 且除 *SefA* 外抑制效果与 GM 无差异 ($P > 0.05$)。

2% LPC 对沙门氏菌的鞭毛相关基因 (*FlhD*、*FliC*、*FliD*) 表达作用结果图 4B 所示。结果表明, 与对照组相比, LPC 对 SC 的 *FlhD*、*FliC* 及 *FliD* 的抑制效果显著 ($P < 0.01$), 且除 *FliD* 外抑制效果与 GM 无差异 ($P > 0.05$); LPC 对 SE 的 *FlhD*、*FliC* 及 *FliD* 抑制效果显著 ($P < 0.01$), 且对 *FliC* 的抑制效果与 GM 无差异 ($P > 0.05$); LPC 对 SP 的 *FlhD*、*FliC* 及 *FliD* 抑制效果显著 ($P < 0.01$), 且其抑制效果与 GM 无差异 ($P > 0.05$)。

2.5 探究 2% LPC 对 3 种血清型沙门氏菌生物被膜形成的影响

LPC 及 GM 处理后, 3 种血清型沙门氏菌生物被膜形成量如图 5 所示, 表明 LPC 及 GM 对 3 种血清型沙门氏菌生物被膜抑制率。与对照组相比, LPC 对 3 种血清型沙门氏菌生物被膜的形成量差异极显著 ($P < 0.001$); 与 GM 组相比, LPC 对 3 种血清型沙门氏菌生物被膜的形成量无显著差异 ($P > 0.05$); 其中, SC 血清型沙门氏菌的生物被膜形成量 24 h 时 12 h 时略低。如表 2 中所示, 12 h 时, LPC 及 GM 对 3 种血清型沙门氏菌生物被膜抑制率可达 40%–60%, 而与 GM 相比, LPC 组抑制率略低但无显著差异 ($P > 0.05$); 24 h 时 LPC 对 SC、SP 的生物被膜抑制率可达 60%–75%, 略高于 GM 但无显著差异 ($P > 0.05$), 对 SE 生物被膜抑制率高达 80%–90%, 但效果则相反且无显著差异 ($P > 0.05$)。结果表明, 2% LPC 能够显著抑制 3 种血清型沙门氏菌生物被膜的形成, 且作用效果与 GM 相近。

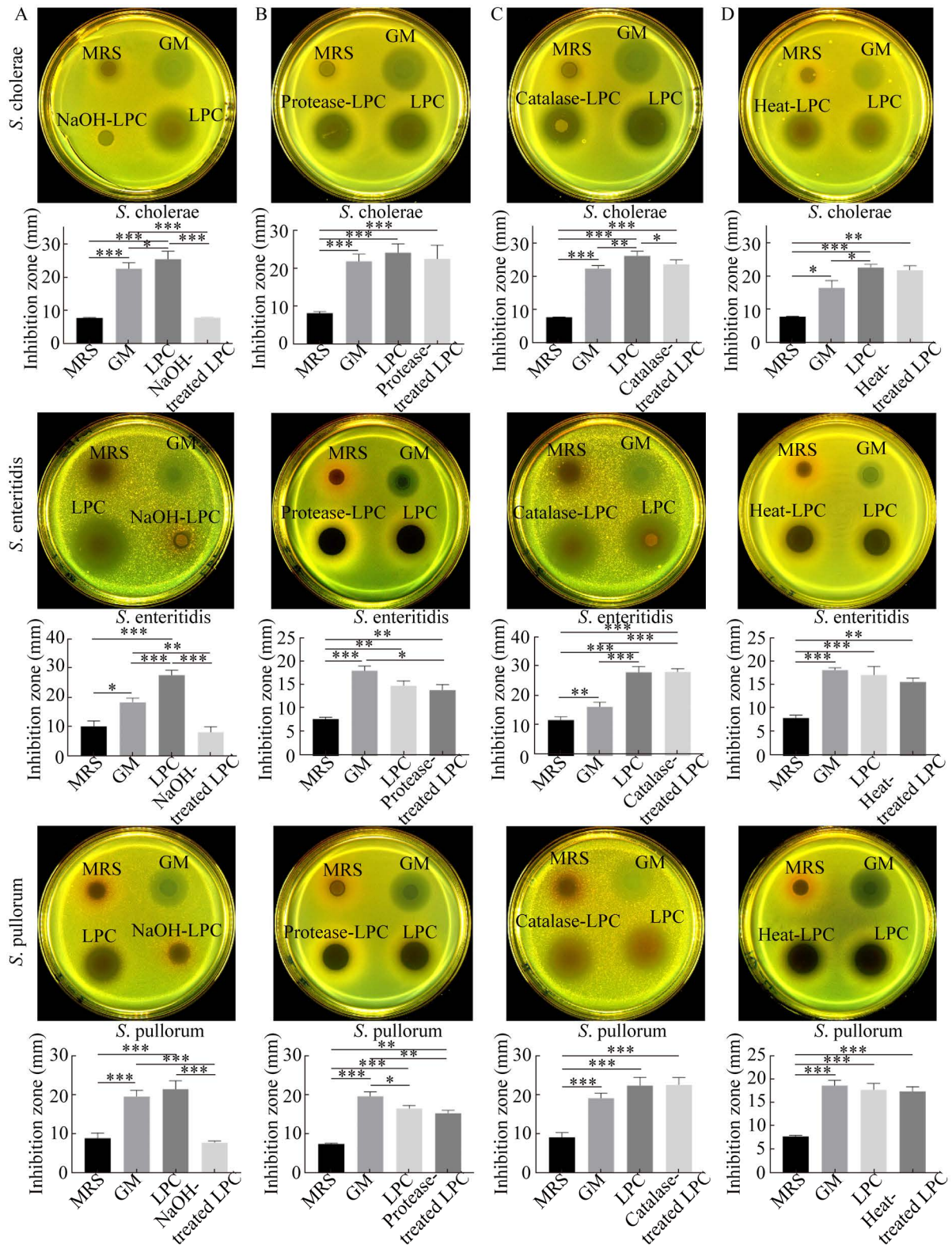


图 2 2% LPC 的抑菌成分对沙门氏菌生长的影响

Figure 2 Effects of the antibacterial components of 2% LPC on the growth of *Salmonella*. *: $0.01 < P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

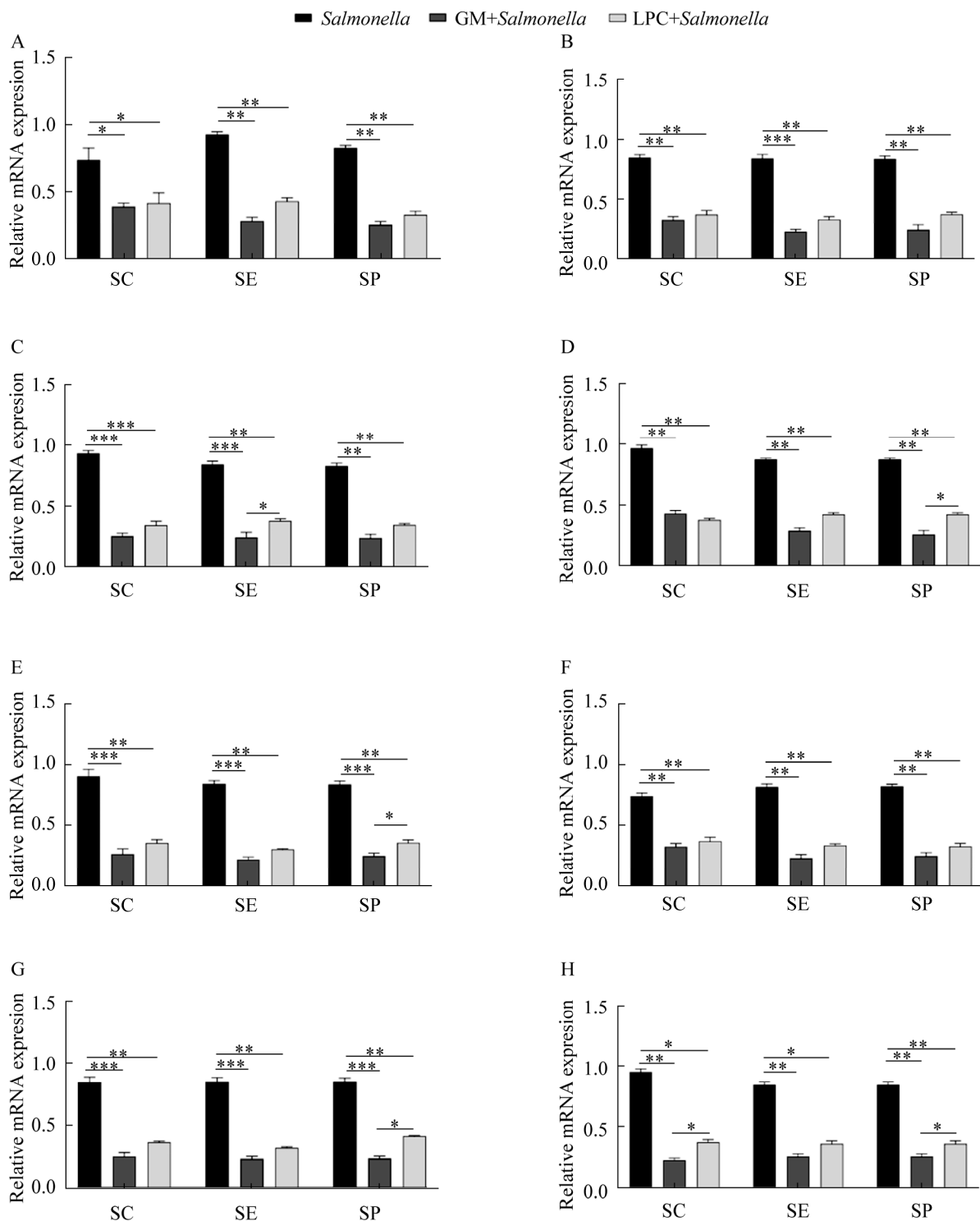


图3 2% LPC对三种血清型沙门氏菌毒力因子基因表达的影响

Figure 3 Effects of 2% LPC on the gene expression of virulence factors of three *Salmonella* serotypes. A: *SopE*. B: *SipB*. C: *InvA*. D: *SopB*. E: *InvF*. F: *HilA*. G: *SipA*. H: *SopD2*. *: $0.01 < P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

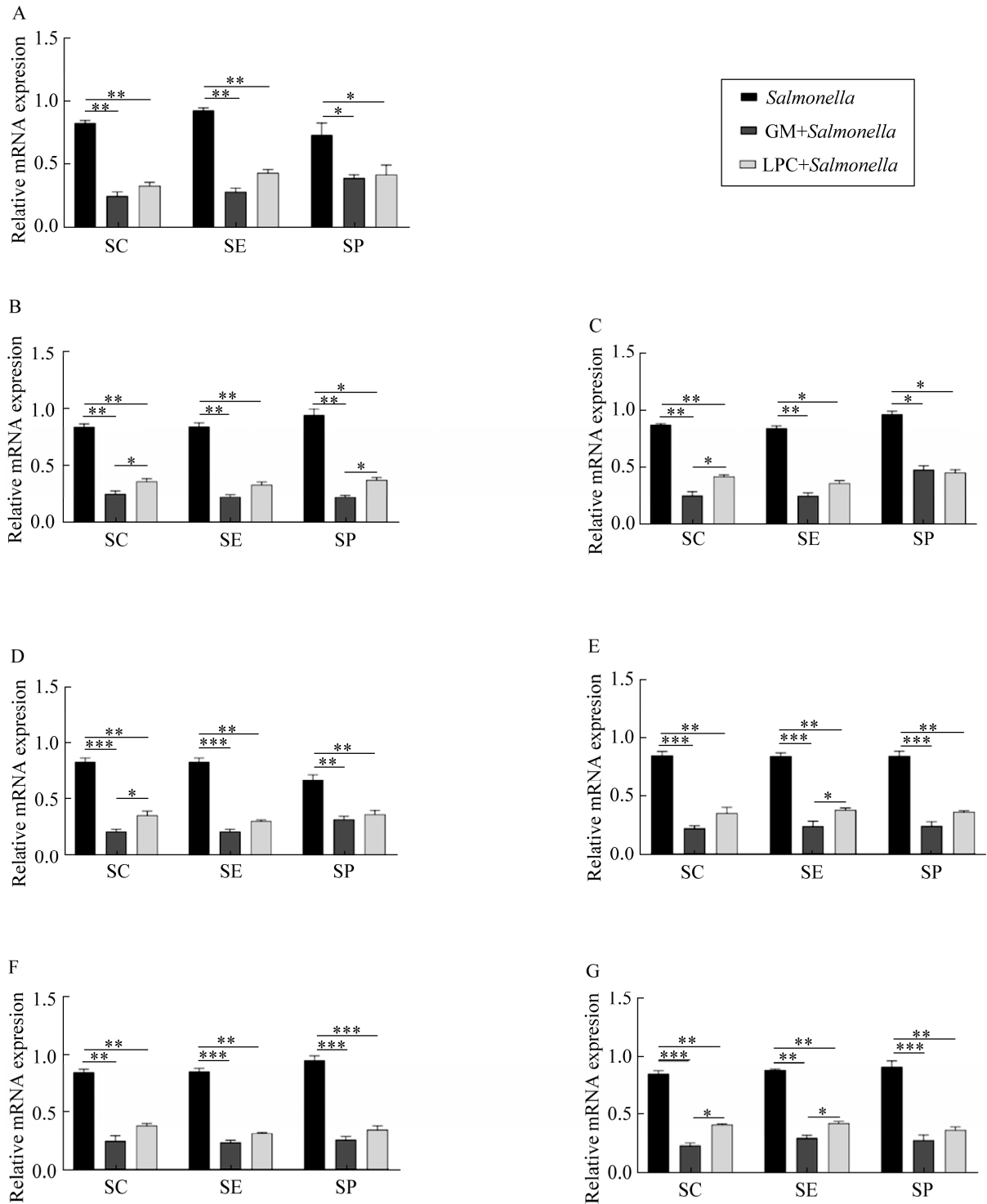


图 4 2% LPC 对 3 种血清型沙门氏菌菌毛、鞭毛相关基因表达的影响

Figure 4 Effects of 2% LPC on the expression of pili and flagella related genes of three serotypes *Salmonella*. A: *FliF*. B: *SefA*. C: *LpfA*. D: *FimF*. E: *FlhD*. F: *FliC*. G: *FliD*. *: $0.01 < P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

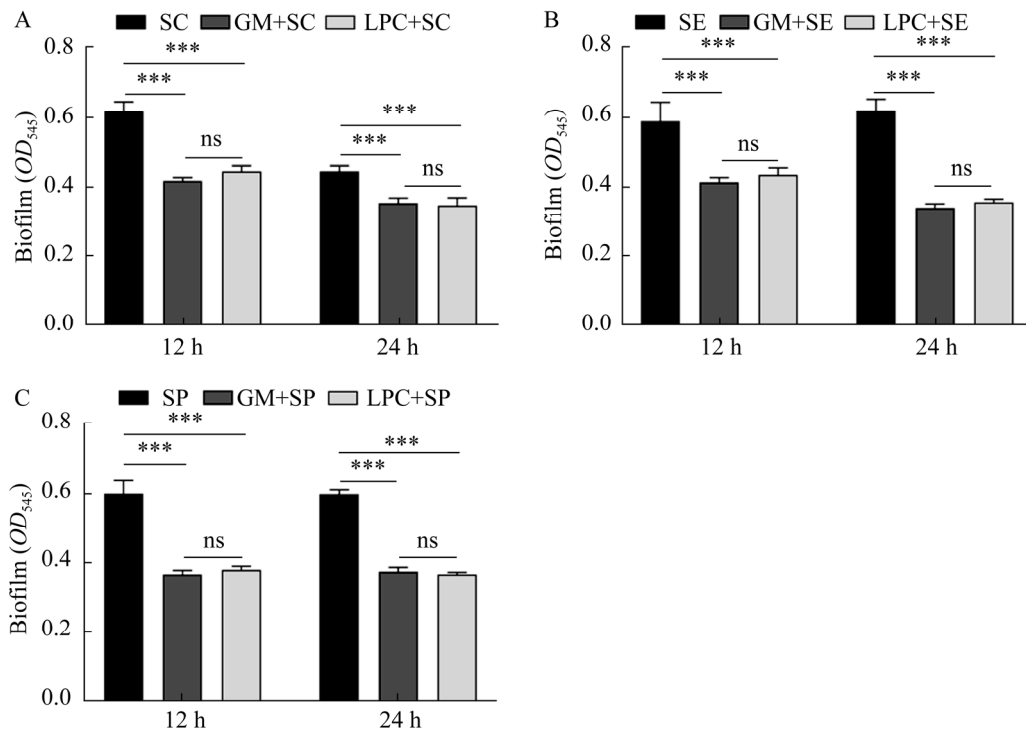


图 5 2% LPC 对 3 种血清型沙门氏菌生物被膜形成的影响

Figure 5 Effects of 2% LPC on the biofilm formation of three serotypes of *Salmonella*. A: SC. B: SE. C: SP. ***: $P < 0.001$.

表 2 2% LPC 对 3 种血清型沙门氏菌生物被膜的抑制率

Table 2 Inhibition rates of 2% LPC on the biofilms of *Salmonella* serotypes

Groups	GM+SC	LPC+SC	GM+SE	LPC+SE	GM+SP	LPC+SP
12 h inhibition rate (%)	55.68	48.38	46.00	40.35	63.31	59.23
24 h inhibition rate (%)	62.18	64.62	89.05	83.63	73.74	76.68

3 讨论

3.1 2% LPC 对 3 种血清型沙门氏菌生长具有抑制作用

已有研究表明植物乳杆菌培养上清 LPC 对沙门氏菌的生长有抑制效果, 张甜甜等^[20]的研究发现植物乳杆菌可对鸡白痢沙门氏菌产生抑菌效果, 刘俊生^[21]发现植物乳杆菌可以直接抑制鼠伤寒沙门氏菌的生长, 但目前鲜有植物乳杆菌对不同血清型沙门氏菌抑制作用的比较。我们前期进行了不同浓度 LPC 对沙门氏菌的生长抑制效果的研究, 发现当 LPC 浓度为 2% 时开始出现抑菌效果, 因此本研究比较了 2% LPC 与 GM 对不同血清型沙门氏菌(SC、SE 和 SP)生长的抑

制效果。结果表明, LPC 能够直接抑制 3 株沙门氏菌的生长, 其中 LPC 对 SE 的抑菌效果甚至大于 GM 的抑菌效果, LPC 对 SC 和 SE 生长的抑制效果要优于 SP。综上所述, 益生菌对同一病原菌的不同血清型的生长抑制效果具有特异性。

3.2 2% LPC 中的有机酸是其主要抑菌物质

研究表明, 益生菌培养上清发挥抗菌作用的物质主要为有机酸、细菌素、过氧化氢等^[22]。有机酸主要通过制造低 pH 环境来抑制病原菌的生长; 细菌素可通过破坏细胞膜完整性、破坏 DNA 结构及抑制细胞壁合成来抑制病原菌^[23]。本研究表明 LPC 所产抑菌物质为有机酸, 这与王志新等^[24]、Russo 等^[25]的研究结果一致。王志

新等^[24]报道了植物乳杆菌中含有的有机酸对常见的食源性致病菌和腐败菌具有较好的抑制作用,且其主要物质为醋酸、乳酸及苯乳酸。本研究中 LPC 的抑菌物质对酶抑制剂(胰蛋白酶、蛋白酶 K、过氧化氢酶)不敏感,因此 LPC 中的主要抑菌物质非细菌素类物质及过氧化氢。此外,我们还探究了 LPC 是否会高温失活,研究表明热处理组与未处理组抑菌圈大小无显著差异,由此可知 LPC 的抑菌物质具有很强的热稳定性,这与李宏伟等^[22]的研究结果相似。综上所述,LPC 中的抑菌物质为有机酸,但其具体起抑菌作用的成分还需进一步探究。

3.3 2% LPC 对沙门氏菌毒力因子基因表达具有抑制作用

沙门氏菌能够通过黏附、侵染肠道上皮细胞并在细胞内复制造成肠道感染。研究表明,沙门氏菌的致病性是由大量的毒力因子相互作用所致^[23]。SPI-1 编码的主要毒力基因为 *InvA*、*InvF*、*SopE*、*SopB*、*SipB*、*HilA* 和 *SipA*, SPI-2 编码的主要毒力基因为 *SopD2*,其中 *SopB*、*SopE*、*HilA*^[26]等在沙门氏菌入侵细胞膜时发挥关键作用,*SipA* 及 *SopB* 对于生成 SCV 膜及细胞内定位非常重要,此外 *SopD2* 有助于其逃避溶酶体降解^[27],*InvA*、*InvF* 分别参与细菌侵入宿主并启动感染及参与效应蛋白的表达,*SipB* 可引起细胞炎症^[26]。这些毒力基因在沙门氏菌入侵宿主细胞及发挥致病性起到重要作用。Zhang 等^[28]的研究表明,乳球菌能够抑制沙门氏菌毒力基因的表达,这与本研究结果一致。我们的研究表明,LPC 能够通过抑制 3 种血清型沙门氏菌毒力因子的基因表达显著降低其致病力,且抑制效果接近 GM。其中 LPC 对 3 种血清型沙门氏菌的 *HilA*、*SipB*、*SopE* 基因的表达抑制效果相似;对 SC 和 SE 的 *InvF*、*SipA*、*SopB* 基因表达的抑制效果要优于 SP;对 SC 和 SP 的 *InvA* 基因抑制效果要优于

SE;对 SE 基因表达的抑制效果要优于 SC 和 SP。

3.4 2% LPC 对沙门氏菌菌毛、鞭毛相关基因表达具有抑制作用

菌毛(又称纤毛)是细菌表面的丝状蛋白附属物^[29],鞭毛是细菌表面长丝状的运动器官^[30],对于沙门氏菌启动、发挥致病作用及躲避宿主免疫系统攻击均发挥重要作用。结果表明,LPC 能够通过降低 3 种血清型沙门氏菌菌毛、鞭毛的基因表达来抑制沙门氏菌的致病性,且抑制效果与 GM 相似。其中,LPC 对 3 种血清型沙门氏菌菌毛的 *FliF*、*FilC* 基因表达的抑制效果相近;对 SE 和 SP 菌毛的 *LpfA*、*FimF* 基因表达的抑制效果要优于 SC;对 SE 菌毛的 *SefA* 基因表达的抑制效果要优于 SC 和 SP;对 SC 和 SP 鞭毛的 *FliH* 基因表达的抑制效果要优于 SE;对 SP 鞭毛的 *FilD* 基因表达的抑制效果要优于 SC 和 SE。综上所述,LPC 对同一病原菌的不同血清型菌毛及鞭毛基因表达的抑制作用具有特异性。

3.5 2% LPC 对 3 种血清型沙门氏菌生物被膜形成具有抑制作用

生物被膜是一种附着在接触表面上的致密网络结构,其主要是由细菌和细菌分泌的细胞外聚合物共同形成,可发挥沙门氏菌致病性^[11]。本研究表明 LPC 对 SC、SE 和 SP 生物被膜形成具有显著的抑制效果,且抑制效果与 GM 接近。其中,LPC 对 SC 的生物被膜的 24 h 抑制效果比 12 h 低,推测其原因是相比于 SE 及 SP,SC 的生长速度更快,因此 24 h 时 SC 可能已进入衰退期,活菌数量下降,因此 24 h 时生物被膜形成量较 12 h 低。本研究结果发现 LPC 对 SE 和 SP 的生物被膜抑制效果要优于 SC。与本研究结果一致的是,Tazehabadi 等^[31]的研究表明,枯草芽孢杆菌 KATMIRA1933 的培养上清抑制了肠炎沙门氏菌的生物膜形成;此外,Divyashree 等^[32]的研究表明植物乳杆菌的培养上清能够抑制鼠

伤寒沙门氏菌生物被膜的形成及生长。

4 结论

植物乳杆菌培养上清对 3 种主要血清型沙门氏菌(猪霍乱沙门氏菌、肠炎沙门氏菌及鸡白痢沙门氏菌)的生长及致病性均具有较好的抑制作用, 其中对 SE 抑制效果最佳。植物乳杆菌培养上清发挥抑菌效果的物质主要为有机酸, 此外其还通过抑制沙门氏菌毒力基因、菌毛和鞭毛基因的表达及沙门氏菌生物被膜的形成降低沙门氏菌的致病力。本研究结果深化了益生菌在防治沙门氏菌方面的研究, 为使用益生菌代谢产物防治沙门氏菌提供科学依据。

参考文献

- [1] YANG FJ, HOU CL, ZENG XF, QIAO SY. The use of lactic Acid bacteria as a probiotic in Swine diets[J]. Pathogens: Basel, Switzerland, 2015, 4(1): 34-45.
- [2] 田志梅, 崔艺燕, 杜宗亮, 马现永. 抗生素替代物在畜禽养殖中的研究及应用进展[J]. 动物营养学报, 2020, 32(4): 1516-1525.
TIAN ZM, CUI YY, DU ZL, MA XY. Advances in researches and applications of antibiotic alternatives in livestock breeding[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2020, 32(4): 1516-1525 (in Chinese).
- [3] PENG MF, TABASHUM Z, PATEL P, BERNHARDT C, BISWAS C, MENG JH, BISWAS D. Prevention of enteric bacterial infections and modulation of gut microbiota with conjugated linoleic acids producing *Lactobacillus* in mice[J]. Gut Microbes, 2020, 11(3): 433-452.
- [4] 阚刘刚, 赵丽杰, 李秀业, 曾丹, 王忠. 鸡沙门氏菌病的生物预防和控制研究进展[J]. 动物营养学报, 2018, 30(9): 3432-3443.
KAN LG, ZHAO LJ, LI XY, ZENG D, WANG Z. Progress on biological prevention and control strategies in avian salmonellosis[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2018, 30(9): 3432-3443 (in Chinese).
- [5] 张建平. 猪沙门氏菌病的分析诊断及管控方案[J]. 饲料博览, 2018(8): 66.
ZHANG JP. Analysis, diagnosis and control scheme of swine salmonellosis[J]. Feed Review, 2018(8): 66 (in Chinese).
- [6] ENG SK, PUSPARAJAH P, AB MUTALIB NS, SER HL, CHAN KG, LEE LH. *Salmonella*: a review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance[J]. Frontiers in Life Science, 2015, 8(3): 284-293.
- [7] EVIVIE SE, ABDELAZEZ A, LI BL, BIAN X, LI W, DU JC, HUO GC, LIU F. *In vitro* organic acid production and *in vivo* food pathogen suppression by probiotic *S. thermophilus* and *L. bulgaricus*[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 782.
- [8] ÖZOGUL F, HAMED I. The importance of lactic acid bacteria for the prevention of bacterial growth and their biogenic amines formation: a review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2018, 58(10): 1660-1670.
- [9] DERIU E, LIU JZ, PEZESHKI M, EDWARDS RA, OCHOA RJ, CONTRERAS H, LIBBY SJ, FANG FC, RAFFATELLU M. Probiotic bacteria reduce *Salmonella* typhimurium intestinal colonization by competing for iron[J]. Cell Host & Microbe, 2013, 14(1): 26-37.
- [10] GOMAA A, VERGHESE M, HERRING J. Modulation of anti-microbial resistant *Salmonella heidelberg* using synbiotics (probiotics and prebiotics) in two *in-vitro* assays (cross-streaking and agar wells diffusion)[J]. Open Journal of Applied Sciences, 2020, 10(9): 561-575.
- [11] HORVÁTH P, KATO T, MIYATA T, NAMBA K. Structure of *Salmonella* flagellar hook reveals intermolecular domain interactions for the universal joint function[J]. Biomolecules, 2019, 9(9): 462.
- [12] REHMAN T, YIN LZ, LATIF MB, CHEN JH, WANG KY, GENG Y, HUANG XL, ABAIDULLAH M, GUO HR, OUYANG P. Adhesive mechanism of different *Salmonella* fimbrial adhesins[J]. Microbial Pathogenesis, 2019, 137: 103748.
- [13] 闫玉卿, 张一敏, 董鹏程, 毛衍伟, 梁荣蓉, 朱立贤, 罗欣. 次氯酸钠对德尔卑沙门氏菌生物被膜的抑制作用及机制[J]. 食品科学, 2021, 42(13): 1-9.
YAN YQ, ZHANG YM, DONG PC, MAO YW, LIANG RR, ZHU LX, LUO X. Biofilm inhibition activity and mechanism of action of sodium hypochlorite against *Salmonella* derby[J]. Food Science, 2021, 42(13): 1-9 (in Chinese).
- [14] KIM NN, KIM WJ, KANG SS. Anti-biofilm effect of crude bacteriocin derived from *Lactobacillus brevis* DF01 on *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium[J]. Food Control, 2019, 98: 274-280.
- [15] 胡爱心, 刘金松, 许英蕾, 吴艳萍. 乳酸菌抑菌作用机制的研究进展[J]. 动物营养学报, 2021, 33(12): 6690-6698.
HU AX, LIU JS, XU YL, WU YP. Research progress in antibacterial mechanism of lactic acid bacteria[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2021, 33(12): 6690-6698 (in Chinese).

- [16] BENBARA T, LALOUCHE S, DRIDER D, BENDALI F. *Lactobacillus plantarum* S27 from chicken faeces as a potential probiotic to replace antibiotics: *in vivo* evidence[J]. *Beneficial Microbes*, 2020, 11(2): 163-173.
- [17] DANILOVA TA, ADZHIEVA AA, DANILINA GA, POLYAKOV NB, SOLOVIEV AI, ZHUKHOVITSKY VG. Antimicrobial activity of supernatant of *Lactobacillus plantarum* against pathogenic microorganisms[J]. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2019, 167(6): 751-754.
- [18] LIU JS, HU DG, CHEN YQ, HUANG HX, ZHANG H, ZHAO JX, GU ZN, CHEN W. Strain-specific properties of *Lactobacillus plantarum* for prevention of *Salmonella* infection[J]. *Food & Function*, 2018, 9(7): 3673-3682.
- [19] LIU LY, YE CX, SOTEYOME T, ZHAO XH, XIA J, XU WY, MAO YZ, PENG RX, CHEN JX, XU ZB, SHIRTLIFF ME, HARRO JM. Inhibitory effects of two types of food additives on biofilm formation by foodborne pathogens[J]. *MicrobiologyOpen*, 2019, 8(9): e00853.
- [20] 张甜甜, 鹿瑶, 吕文亮, 林显华, 徐海燕, 谷巍. 具有沙门氏菌拮抗能力的植物乳杆菌益生特性评价[J]. *河南农业科学*, 2021, 50(2): 130-137.
- ZHANG TT, LU Y, LÜ WL, LIN XH, XU HY, GU W. Probiotic properties assessment of *Lactobacillus plantarum* with *Salmonella* antagonistic ability[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2021, 50(2): 130-137 (in Chinese).
- [21] 刘俊生. 植物乳杆菌对沙门氏菌感染预防作用的研究[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2019.
- LIU JS. Study on the preventive effects of *Lactobacillus plantarum* against *Salmonella* infection[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2019 (in Chinese)
- [22] 李宏伟, 肖瑶, 张关令, 林连兵, 张棋麟. 抑制猪霍乱沙门氏菌的乳酸菌的分离、鉴定及潜在抑菌物质分析[J]. *微生物学杂志*, 2020, 40(4): 52-59.
- LI HW, XIAO Y, ZHANG GL, LIN LB, ZHANG QL. Isolation and identification of lacto-bacteria inhibiting *Salmonella cholerae* and analysis of its potential bacteriostatic substance[J]. *Journal of Microbiology*, 2020, 40(4): 52-59 (in Chinese).
- [23] 曹恬雪, 蒋文灿, 何文成, 纪凤仙, 魏志刚. 沙门氏菌毒力因子的研究进展[J]. *中国预防兽医学报*, 2014, 36(4): 331-334.
- CAO TX, JIANG WC, HE WC, JI FX, WEI ZG. Research progress of virulence factors of *Salmonella*[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2014, 36(4): 331-334 (in Chinese).
- [24] 王志新, 韩烁培, 王雨, 何建卓, 宁亚维, 贾英民. 植物乳杆菌的筛选、鉴定及其抑菌物质研究[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(9): 133-139, 146.
- WANG ZX, HAN SP, WANG Y, HE JZ, NING YW, JIA YM. Screening and identification of *Lactobacillus plantarum* and studies on its antibacterial substances[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(9): 133-139, 146 (in Chinese).
- [25] RUSSO P, ARENA MP, FIOCCO D, CAPOZZI V, DRIDER D, SPANO G. *Lactobacillus plantarum* with broad antifungal activity: a promising approach to increase safety and shelf-life of cereal-based products[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2017, 247: 48-54.
- [26] 侯悦, 刘洁. 肠炎沙门氏菌中侵袭相关毒力基因研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(10): 3867-3873.
- HOU Y, LIU J. Research progress of invasion-related virulence genes in *Salmonella enteritidis*[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2021, 12(10): 3867-3873 (in Chinese).
- [27] WANG MY, QAZI IH, WANG LL, ZHOU GB, HAN HB. *Salmonella* virulence and immune escape[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(3): 407.
- [28] ZHANG JS, CORREDIG M, MORALES-RAYAS R, HASSAN A, GRIFFITHS MW, LAPOINTE G. Downregulation of *Salmonella* virulence gene expression during invasion of epithelial cells treated with *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* JFR1 requires OppA[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2020, 12(2): 577-588.
- [29] 王思权, 丁雪燕, 朱国强. 沙门氏菌 I 型菌毛研究进展[J]. *生命科学*, 2021, 33(2): 231-237.
- WANG SQ, DING XY, ZHU GQ. The research progress of *Salmonella* type I fimbriae[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2021, 33(2): 231-237 (in Chinese).
- [30] 杨溢. 特定沙门氏菌鞭毛相关假基因的探索研究[D]. 扬州: 扬州大学博士学位论文, 2020.
- YANG Y. Exploratory study on specific flagella-associated *Pseudogenes* of *Salmonella*[D]. Yangzhou: Doctoral Dissertation of Yangzhou University, 2020 (in Chinese)
- [31] TAZEHBADI MH, ALGBURI A, POPOV IV, ERMAKOV AM, CHISTYAKOV VA, PRAZDNOVA EV, WEEKS R, CHIKINDAS ML. Probiotic bacilli inhibit *Salmonella* biofilm formation without killing planktonic cells[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 615328.
- [32] DIVYASHREE S, ANJALI PG, SOMASHEKARAI AH R, SREENIVASA MY. Probiotic properties of *Lactobacillus casei* - MYSRD 108 and *Lactobacillus plantarum*-MYSRD 71 with potential antimicrobial activity against *Salmonella paratyphi*[J]. *Biotechnology Reports*, 2021, 32: e00672.