

乳酸菌对肠出血性大肠杆菌 O157:H7 抑制作用的研究

李志刚 杨宝兰 徐 进

(中国疾控中心营养与食品安全所,北京 100021)

摘 要:为探讨乳酸菌对肠出血性大肠杆菌 O157:H7 ATCC43895 (*E. Coli* O157:H7) 的抑制作用,在培养基上进行了研究。将 *E. Coli* O157:H7 与干酪乳杆菌干酪亚种、植物乳杆菌、发酵乳杆菌、乳酸乳球菌和瑞士乳杆菌同时接种在培养基中,*E. Coli* O157:H7 的活性不受影响;将 *E. Coli* O157:H7 接种到培养了 24 h 的乳酸菌培养液中,*E. Coli* O157:H7 活性显著下降。以乳酸调整的低 pH 值对 *E. Coli* O157:H7 有一定的杀灭作用。本研究表明:乳酸菌的代谢产物乳酸对 *E. Coli* O157:H7 有杀灭作用。

关键词:肠出血性大肠杆菌 O157:H7;乳酸菌;抑制

Inhibition of the growth of *Escherichia coli* O157:H7 by Lactic acid bacteria

Li Zhigang, et al.

(National Institute for Nutrition and Food Safety, ChinaCDC, Beijing 100021)

Abstract: An experiment was performed to study the inhibition effect of Lactic acid bacteria on the growth of *Escherichia coli* O157:H7. When *L. casei subsp. casei*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *Lactococcus lactis* and *L. helveticus* were respectively mixed with *E. Coli* O157:H7 ATCC43895 and cultured, each of the 5 strains of Lactic acid bacteria had no inhibitive effect on the survival of *E. Coli* O157:H7 ATCC43895. When *E. Coli* O157:H7 ATCC43895 was inoculated into the 24 h-old Lactic acid bacteria MRS culture, the *E. Coli* O157:H7 ATCC43895 lost all its activity. The low pH (pH = 4) adjusted by lactic acid had substantial inactivating effect on *Escherichia coli* O157:H7. The study showed that the acidic metabolites of Lactic acid bacteria inhibited the activity of *Escherichia coli* O157:H7.

Key Words: *Escherichia coli* O157:H7; Lactic acid bacteria; inhibition

肠出血性大肠杆菌 (Enterohemorrhagic *E. coli*; EHEC) 主要引起出血性肠炎。EHEC 的毒力因子为志贺样毒素 (Shiga-like toxin, SLT)。EHEC 的主要血清型为 O157:H7, 即 *E. coli* O157:H7。

自 1982 年首次报道 *E. coli* O157:H7 是一种新出现的食源性致病菌以来,该菌引起的食物中毒已成为全球性的公共卫生问题。^[1] 目前报告发生 *E. coli* O157:H7 食源性疾病的有美国、英国、意大利、日本、爱尔兰、比利时、德国、澳大利亚、阿根廷、南非、以色列等国家。发病较多的国家为美国、加拿大和日本。我国 1998 年以前,从腹泻病人粪便标本中分离到 *E. coli* O157:H7,但未见该菌引起暴发流行和散发的报道。1999 年后发生过暴发流行。我国已经在 14 个省市分离到该病原菌,8 个省市发现了病人。^[2]

E. coli O157:H7 生长的 pH 为 4.5 ~ 9.0,最适生长 pH 为 7.0,它可在低温和低 pH 值条件下长时间存活。牛、猪等动物是 *E. coli* O157:H7 的主要传染源,畜、禽夏季携带 *E. coli* O157:H7 的比例较高。^[2] 我国江苏牛的 *E. coli* O157:H7 感染率夏季为 19.05 %。^[3] 因此,动物性食物如牛肉、鸡肉、牛奶和奶制品等是 *E. coli* O157:H7 传播的主要途径。在国外,检出 *E. coli* O157:H7 的食品包括汉堡包、烤牛肉、生奶、鲜榨苹果汁、酸奶酪、干酪、发酵香肠等。^[24] 我国王茂起等报道,北京、重庆、吉林、河南、陕西、浙江、福建、广东、湖北、山东 10 省市食品污染物监测结果表明,生肉、熟肉和生奶的 *E. coli* O157:H7 检出率分别为 0.64 %、0.79 %、0.22 %。^[4]

目前我国乳酸菌发酵乳制品工业发展迅速,由于乳制品是污染 *E. coli* O157:H7 的高危食品,探讨乳制品中污染的 *E. coli* O157:H7 在乳酸菌发酵过程中对其存活的影响具有很强的实际意义。

作者简介:李志刚 男 主管技师

1 材料与方法

1.1 材料 培养基 LB 肉汤、MRS 肉汤、脑心浸液肉汤(Oxoid)。

菌种 所使用菌种见表 1。

表 1 本实验所使用的菌种

拉丁文名称	中文名称
<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC43895	大肠杆菌 O157:H7 ATCC43895
<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> CGMCC 1.574	干酪乳杆菌干酪亚种 CGMCC ⁽¹⁾ 1.574
<i>L. plantarum</i> ATCC8014	植物乳杆菌 ATCC ⁽²⁾ 8014
<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> CGMCC 1.539	干酪乳杆菌干酪亚种 CGMCC 1.539
<i>L. fermentium</i> ATCC14931	发酵乳杆菌 ATCC14931
<i>Lactococcus lactis</i> CGMCC 1.2030	乳酸乳球菌 CGMCC 1.2030
<i>L. plantarum</i> CGMCC 1.103	植物乳杆菌 CGMCC 1.103
<i>L. helveticus</i> CGMCC 1.1877	瑞士乳杆菌 CGMCC 1.1877

注:(1)CGMCC: China General Microbiological Culture Collection Center;
(2)ATCC: America Type Culture Collection, United States of America.

E. coli O157:H7 ATCC43895 由 University of Southern Alabama College of Medicine 惠赠,该菌株分离自美国引起食物中毒的牛肉末,为国际上耐酸研究的标准菌株,该菌株产 SLT1 和 SLT2 两类毒素。

1.2 方法 *E. coli* 菌悬液的制备 将 *E. coli* O157:H7接种到 LB 肉汤中,37 以 240 r/min 振荡过夜培养,将该培养液在 4 ,以 5 000 r/min 离心 20 min,弃去上清液,在离心沉淀的 *E. coli* O157:H7 细胞中加入无菌生理盐水,轻轻吹打,使 *E. coli* O157:H7细胞悬起,将活菌量调整为 1.0×10^7 CFU/mL。

乳酸菌 MRS 培养液的制备 将 7 种乳酸菌接种到 MRS 肉汤中,37 厌氧培养,24 h 后活菌计数,将细胞浓度调整为 1×10^9 CFU/mL,此时培养液 pH 值为 4.5 ± 0.5 。

乳酸菌对 *E. coli* O157:H7 ATCC43895 细胞活性的影响

试验组 1 分别将 1 mL 干酪乳杆菌干酪亚种 CGMCC1.574、植物乳杆菌 ATCC 8014、干酪乳杆菌干酪亚种 CGMCC 1.539、发酵乳杆菌 ATCC14931、乳酸乳球菌 CGMCC 1.2030、植物乳杆菌 CGMCC 1.103 和瑞士乳杆菌 CGMCC 1.1877 细胞悬浮液(1.0×10^9 CFU/mL)与 1 mL *E. coli* O157:H7 ATCC43895(1.0×10^7 CFU/mL)细胞悬液同时接种到 10 mL MRS 肉汤中,37 培养。

试验组 2 先分别将 1 mL 干酪乳杆菌干酪亚种 CGMCC1.574、植物乳杆菌 ATCC 8014、干酪乳杆菌干酪亚种 CGMCC 1.539、发酵乳杆菌 ATCC14931、乳酸乳球菌 CGMCC 1.2030、植物乳杆菌 CGMCC 1.103 和瑞士乳杆菌 CGMCC 1.1877 细胞悬液(1.0×10^9 CFU/mL)接种到 10 mL MRS 肉汤中,37 厌氧培养 24 h,再接种 1 mL *E. coli* O157:H7 ATCC43895(1.0×10^7 CFU/mL)细胞悬液,继续在 37 培养。

分别在上述两试验组培养的第十二小时和第二十四小时取 0.1 mL 样本涂布在脑心浸液琼脂上,37 培养 24 h 后计数 *E. coli* O157:H7 ATCC43895 的活菌数。

试验组 3 将试验 1 及试验 2 中对 *E. coli* O157:H7 ATCC43895 细胞有抑制作用的瑞士乳杆菌 CGMCC 1.1877 接种到 MRS 肉汤中,37 厌氧培养 24 h 后,培养液以 3 000 r/min 离心 15 min,取上清液,再使之通过 0.2 μ m 的微孔滤膜,该滤液作为乳杆菌培养液的上清液;在离心沉淀的乳杆菌细胞中加入生理盐水,轻轻吹打,使乳杆菌细胞悬起,即成为乳杆菌的细胞悬液,将含菌量调整为 1.0×10^9 CFU/mL。取该乳杆菌的上清液和细胞悬液(1.0×10^9 CFU/mL) 10 mL,分别接种 1 mL *E. coli* O157:H7 ATCC43895(1.0×10^7 CFU/mL)细胞悬液,在 37 培养的不同时间点取 0.1 mL 样本涂布在脑心浸液琼脂上,37 培养 24 h 后计 *E. coli* O157:H7 ATCC43895 的活菌数,以 pH6.8 和 85 %乳酸调整的 pH4.0 MRS 培养基作对照。

本试验重复 2 次,以 3 次试验结果的平均值作分析。

2 结果与讨论

乳酸菌与 *E. coli* O157:H7 的相互作用结果见表 2。当乳酸菌与 *E. coli* O157:H7 ATCC43895 同时接种到 MRS 培养基中时,在培养的第十二小时与第二十四小时 *E. coli* O157:H7 活菌计数与接种前差别无显著性,即乳酸菌对 *E. coli* O157:H7 无明显的灭活作用。当乳酸菌在 MRS 培养基中厌氧培养 24 h 后再接种 *E. coli* O157:H7 ATCC43895,混合培养后 12 h,在干酪乳杆菌干酪亚种 CGMCC 1.574、植物乳杆菌 ATCC8014 和 CGMCC 1.103、乳酸乳球菌 CGMCC 1.2030 和瑞士乳杆菌 CGMCC 1.1877 培养基中已检测不到 *E. coli* O157:H7 的活性;而在第十二小时发酵乳杆菌 ATCC14931 培养基和第十二小时与第二十四小时的干酪乳杆菌干酪亚种 CGMCC 1.539 的培养基中,还有存活的 *E. coli* O157:H7。

选取对 *E. coli* O157:H7 ATCC43895 有灭活作

用的瑞士乳杆菌,按试验 3 步骤进行操作。瑞士乳杆菌的细胞悬液及代谢产物对 *E. coli* O157:H7 ATCC43895 存活影响的结果见表 3。结果表明,瑞士乳杆菌的细胞悬液与 *E. coli* O157:H7 ATCC43895 在生理盐水中,37℃ 培养 7 d 后,瑞士乳杆菌对 *E. coli* O157:H7 的存活无明显影响,而瑞士乳杆菌的

代谢产物则可在 12 h 内全部杀死接种其中的 *E. coli* O157:H7。将 *E. coli* O157:H7 ATCC43895 接种于用乳酸调整 pH4.0 的 MRS 培养基中,第八小时即检测不到该致病菌。而在 pH6.8 的 MRS 培养基中该菌生长良好。

表 2 乳酸菌对 *E. coli* O157:H7 ATCC43895 存活的影响($\bar{x} \pm s$) lg CFU/mL

乳酸菌菌株	0 h	试验组 1		试验组 2	
		12 h	24 h	12 h	24 h
干酪乳杆菌干酪亚种 CGMCC1.574	6.0	6.07 $\pm$ 0.70	7.33 $\pm$ 0.86	0.00	0.00
植物乳杆菌 ATCC 8014	6.0	5.60 $\pm$ 0.46	7.10 $\pm$ 0.36	0.00	0.00
干酪乳杆菌干酪亚种 CGMCC 1.539	6.0	6.33 $\pm$ 0.35	6.86 $\pm$ 0.32	2.34 $\pm$ 0.47	1.56 $\pm$ 0.11
发酵乳杆菌 ATCC14931	6.0	6.27 $\pm$ 0.64	6.79 $\pm$ 0.25	1.70 $\pm$ 0.13	0.00
乳酸乳球菌 CGMCC 1.2030	6.0	6.37 $\pm$ 0.63	7.23 $\pm$ 0.25	0.00	0.00
植物乳杆菌 CGMCC 1.103	6.0	6.23 $\pm$ 0.25	6.70 $\pm$ 0.26	0.00	0.00
瑞士乳杆菌 CGMCC 1.1877	6.0	6.30 $\pm$ 0.35	6.63 $\pm$ 0.21	0.00	0.00

表 3 瑞士乳杆菌的细胞悬液及代谢产物对 *E. coli* O157:H7 ATCC43895 细胞活性的影响($\bar{x} \pm s$) lg CFU/mL

试验组	0 h	4 h	8 h	12 h	24 h	24 h $\times$ 7
瑞士乳杆菌细胞悬液	6.0	-	5.83 $\pm$ 0.15	-	5.77 $\pm$ 0.25	5.80 $\pm$ 0.21
瑞士乳杆菌代谢产物	6.0	5.76 $\pm$ 0.32	4.88 $\pm$ 0.87	0.00	-	-
MRS pH4.0	6.0	4.43 $\pm$ 0.60	0.00	-	-	-
MRS pH6.8	6.0	-	-	7.07 $\pm$ 0.25	7.50 $\pm$ 0.46	-

注:“-”表示未作分析。

作为污染食品的致病菌,*E. coli* O157:H7 对低酸的耐受性是其对人类产生致病性的关键,它可在低温和低 pH 值条件下长时间生存。当人食用了被污染的食品后,*E. coli* O157:H7 要经历一系列的低酸环境,首先胃液中的 pH 值极低(pH 值为 2~3),且胃液成分为盐酸,其次当其进入小肠后,小肠液中的 pH 值为 4~6 的弱酸环境,但 *E. coli* O157:H7 可引起人类出血性肠炎与溶血性尿毒综合征,说明 *E. coli* O157:H7 对酸有极强的耐受性。Zhao^[5]报道,*E. coli* O157:H7 在未经巴氏消毒的苹果汁中存活时间可长达 31 d。不同的肠道致病菌对人的感染剂量是与其耐酸性强弱成反比的,如霍乱弧菌、伤寒沙门氏菌和福氏志贺氏菌对人的口服感染剂量分别为 1×10^9 、 1×10^5 和 1×10^2 ,因此霍乱弧菌对酸的耐受性最弱,而福氏志贺氏菌对酸的耐受性最强。*E. coli* O157:H7 对人的感染剂量与福氏志贺氏菌相似,约为 10~100 个。^[6,7]

本研究的结果说明,当乳酸菌与 *E. coli* O157:H7 同时接种在有利于乳酸菌生长的环境时,在发酵过程中并不影响 *E. coli* O157:H7 存活。说明如果乳品在发酵初期受到 *E. coli* O157:H7 污染,则对 *E. coli* O157:H7 无明显的杀灭作用。这就为乳品在发酵之前的消毒灭菌提出了较高的要求。我国关于发酵乳制品中污染的 *E. coli* O157:H7 存活

情况的报道很少,丁洁等报道,^[8]将保加利亚乳杆菌和乳链球菌与 *E. coli* O157:H7 同时接种到经高温灭菌的牛奶中,44℃ 培养 3 h,牛奶凝固成酸奶,尽管 pH 值降到 4.0~4.5,但 *E. coli* O157:H7 仍能繁殖,在 4℃ 储存 7 d 后菌量虽有下降,但仍能检出活菌。作者提示,若牛奶灭菌效果差,或灭菌后被 *E. coli* O157:H7 二次污染,则酸奶在生产与储存过程中检出 *E. coli* O157:H7 的机率增加。

综上所述,夏季 *E. coli* O157:H7 在牛体内的高携带率,*E. coli* O157:H7 本身具有的耐酸性和对人体的低感染剂量提示,加强乳制品中 *E. coli* O157:H7 污染的监测,对保证乳制品的安全性,防止对消费者造成潜在的危害,具有重要的实际意义。

参考文献:

[1] Giffin P M, Tauxe R B. The epidemiology of infectious caused by *Escherichia Coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome [J]. Epidemiol Rev, 1991, 13:60—98.

[2] Chapman P A, Siddons C A, Gerdan Malo A T, et al. A 1-year study of *Escherichiacoli* O157 in cattle, sheep, pigs and poultry [J]. Epidemiol Infect, 1997, 119 (2):245—250.

[3] 倪大新,汪华,顾玲,等. 江苏省 1999 年大肠杆菌 O157:H7 宿主动物带菌情况调查 [J]. 中华流行病学



杂志, 2002, 23(2):102—104.

- [4] 王茂起,王竹天,包大跃,等. 中国 2000 年食品污染状况监测分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2002, 14(2): 3—8.
- [5] Zhao T, Doyle M P, Besser R E. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia Coli* O157:H7 in apple cider with and without perservative[J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59: 2526—2530.

- [6] Blaser M J, Newman L S. A review of human salmonellosis, Infective dose[J]. Rev Infect Dis, 1982, 4: 1096—1106.
- [7] Boyd R F. Basic medical microbiology[M]. Little Brown and Co, Bdston, 1995.
- [8] 丁洁,陈晓蔚. 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 在酸乳制备和 4 储存时的存活状况[J]. 卫生研究. 2002, 31(1): 57—58.

[收稿日期:2003-05-06]

中图分类号:R15;R378.21 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2003)04-0298-04

卫生部办公厅关于加强食物中毒 预防与控制工作的紧急通知

卫发电[2003]36号

各省、自治区、直辖市卫生厅局,新疆生产建设兵团卫生局,卫生部卫生监督中心,中国疾病预防控制中心:

自2月份以来,重大食物中毒的发生起数、中毒人数及死亡人数逐月增多。各级卫生行政部门在预防和控制传染性非典型肺炎的同时,要充分认识到预防和控制食物中毒对保障人民群众身体健康、维护社会稳定的重要作用,认真抓好各项食物中毒预防与控制工作。

一、各级卫生行政部门在接到食物中毒报告(包括疑似及各种原因不明的食物中毒)后,应及时组织调查,全力做好处理工作,上级卫生行政部门应加强督查,避免事态扩大。

二、各级卫生监督部门在深入贯彻《卫生部办公厅关于做好公共场所和食品生产经营单位预防和控制非典型肺炎工作的紧急通知》的同时,要加强卫生许可证发放的监督管理,严把卫生准入关,对不符合有关规定的企业一律不得发放卫生许可证,已发放卫生许可证的要予以撤销。要结合日常卫生监督工作,加强对一些重点食品生产经营单位如学校、企事业单位集体食堂、学校周边餐馆、集体供餐单位,特别是学生餐及学生奶、学生豆奶供应单位等的卫生监督和指导,落实各项责任制度;督促和提倡行业自律,提高食品卫生管理水准和消费者的食品安全意识,预防与控制食物中毒发生。

三、严格执行食物中毒报告制度。重大食物中毒要按照《食物中毒事故处理办法》的规定,发生地县级以上人民政府卫生行政部门要在6小时内上报卫生部,并同时向当地政府报告。

四、规范食物中毒报告内容。要按照《国家救灾防病与突发公共卫生事件信息报告管理规范》(2003版)规定,初次报告应有必须报告的信息和尽可能报告的信息,对疑似或初次报告时原因不明的食物中毒,在调查处理过程中或调查处理结束后要有阶段报告、总结报告。

五、加大食物中毒预防控制宣传教育工作的力度。卫生行政部门要利用各种宣传媒体,通过各种形式广泛开展食品卫生知识宣传教育工作,特别是要使群众了解科学灭鼠知识和剧毒农药的危害性,在可能发生河豚鱼和毒蕈中毒的地区,卫生部门要开展针对性宣传和教育,提高消费者的自我保护能力。

六、加强救治培训工作。各级卫生行政部门要加强对有关医疗机构食物中毒诊断、应急处理和治疗的培训工作,使基层医务人员掌握农药中毒的救治措施,降低食物中毒病死率。同时,医疗机构要准备充足的常用解毒药品和必备的抢救设备,药品要定期检查、更换,设备要保证处于完好状态。

七、进一步提高有关食物中毒处理工作的透明度,及时向社会和新闻媒体公开相关信息,赢得处理食物中毒事件的主动权。

各级卫生行政部门要本着对人民健康高度负责的精神,认真做好食物中毒预防控制的组织准备工作,对重大食物中毒要反应迅速,措施得力。对由于重大食物中毒瞒报、迟报和调查处理不及时以及督查不力等引起恶劣社会影响的,我部将予以通报;情节严重的,责令追究相关单位和直接责任人的责任。

卫生部办公厅
二〇〇三年四月三十日