

# 大肠埃希氏菌在模拟胃肠道环境下耐受性的研究

马文思, 刘发山\*

(昆明市食品药品检验所 食品检验中心, 云南 昆明 650032)

**摘要:** 以大肠埃希氏菌为试验菌株, 采用活菌计数法, 分别探究大肠埃希氏菌在不同酸性、不同胆盐质量浓度环境下的存活情况, 并通过模拟胃酸、肠胆盐环境对大肠埃希氏菌的耐受性进行研究. 结果表明, 酸性、胆盐环境对大肠埃希氏菌的生长具有抑制作用, 但胆盐质量浓度的变化对大肠埃希氏菌生长的抑制效果无明显差异. 此外, 大肠埃希氏菌对模拟胃酸、肠胆盐环境具有良好的耐受性, 能在人工肠液以及 pH $\geq$ 4.5 的人工胃液中保持较高的存活率.

**关键词:** 大肠埃希氏菌; 胆盐; 人工胃液; 人工肠液; 耐受性

**中图分类号:** R378.21 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674 - 5639 (2019) 03 - 0113 - 04

**DOI:** 10.14091/j.cnki.kmxyxb.2019.03.024

## Study on the Tolerance of Escherichia Coli under Simulated Gastrointestinal Environment

MA Wensi, LIU Fashan\*

(Center for Food Inspection, Kunming Institute for Food and Drug Control, Kunming, Yunnan, China 650032)

**Abstract:** Taking escherichia coli as the test strain, its survival in acidic and different concentrations of bile salts was investigated by viable count method, and its tolerance was studied by simulated gastric acid and intestinal bile salt environment. The results showed that the growth of escherichia coli was inhibited by the acidic and bile salt environment, but the growth of escherichia coli was not significantly inhibited by the change of bile salt concentration. Besides, escherichia coli had good tolerance to simulated gastric acid and intestinal cholate environment, and maintains a high survival rate in artificial intestinal fluid and artificial gastric fluid with a pH value greater than or equal to 4.5.

**Key words:** Escherichia coli; Bile salts; artificial gastric juice; artificial intestinal juice; tolerance

近年来, 随着社会和工业化发展的影响, 食品安全事件的发生率在不断提高<sup>[1]</sup>, 国内外食源性致病事件层出不穷, 尤其是由食源性致病菌污染食物引发的中毒或死亡事件在全球频发, 并且呈逐年上升趋势, 食源性致病菌引起的疾病已成为当今危害人类健康的头号杀手. 常见的食源性致病菌包括大肠埃希氏菌、沙门氏菌、弯曲杆菌等<sup>[2]</sup>. 这些食源性致病菌引起的食品安全事件, 不仅严重损害消费者的健康, 而且给公众带来巨大心理恐惧, 严重影响了社会稳定.

食源性致病菌分布广泛, 种类繁多, 其中大肠埃希氏菌是目前存在较为广泛, 也是引发食品安全事件较多的食源性病原微生物, 其污染食物引发的

食品安全事件在全球屡屡发生. 因此, 大肠埃希氏菌引起的食源性致病越来越受到人们的关注, 其检验方法及感染途径已成为国内外众多学者研究的热点<sup>[3-4]</sup>, 但有关其在胃肠道环境耐受性的研究鲜有报道.

大肠埃希氏菌通常被称为大肠杆菌, 为革兰氏阴性短杆菌, 大小 0.5 ~ 1.5  $\mu\text{m}$ , 周生鞭毛, 能运动, 无芽孢<sup>[5]</sup>. 其在相当长的一段时间内, 一直被认为是非致病菌, 直到 20 世纪中叶, 才发现一些血清型的大肠杆菌对人和动物有病原性<sup>[6]</sup>, 经常会引起严重腹泻和败血症等, 因此将其归为食源性病原微生物. 大肠埃希氏菌作为食源性病原微生物之一, 其引发食物中毒的前提是能以活菌状态抵

收稿日期: 2019 - 05 - 17

作者简介: 马文思 (1995—), 男 (壮族), 云南文山山人, 主要从事食品检验研究.

\* 通讯作者: 刘发山 (1985—), 男, 云南楚雄人, 工程师, 主要从事食品检验研究, E-mail: 343967634@qq.com.

达胃肠道。基于此,拟通过模拟胃酸、肠胆盐环境对大肠埃希氏菌的耐受性进行研究,以期为进一步探讨大肠埃希氏菌的致病机理、疫苗开发以及对大肠埃希氏菌的控制和治疗提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种

大肠埃希氏菌 *E. coli* (ATCC25922) 购于美国典型菌种保藏中心,批号:20172023。

#### 1.1.2 培养基

脑心浸出液肉汤 BHI (批号:180205-4),结晶紫中性红胆盐琼脂 VRBA (批号:170730-82),均购于北京陆桥技术股份有限公司。

#### 1.1.3 试剂和仪器

牛胆盐 (批号:3207076,广东环凯微生物科技有限公司);胃蛋白酶 (酶活力 $\geq 1\ 200.0\ \text{U/g}$ ,批号:20160613,国药集团化学试剂有限公司);胰蛋白酶 (酶活力 1:250,批号:20170126,北京索莱宝科技有限公司);其余试剂均为国产分析纯。

高压蒸汽灭菌锅 (MLS-3782L-PC,日本松下集团);恒温恒湿培养箱 (HPP260,美墨尔特上海有限公司);台式电子天平 (JB5374-91,美国奥豪斯仪器(常州)有限公司);pH计 (S220K,梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 菌种活化

用一次性接种环挑取一环大肠埃希氏菌 (ATCC25922) 储备菌种接种于 BHI 液体培养基中,置于 36℃ 恒温恒湿培养箱中培养 24 h 增菌,制成工作菌液置于 4℃ 菌种冰箱备用。

#### 1.2.2 耐酸性试验

试验在生物安全柜内无菌操作。用 36.5% 的浓盐酸、1 mol/L 盐酸溶液及 0.1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 值,制成 6 份 pH 值分别为 1.5, 2.5, 3.5, 4.5, 5.5, 6.5 的 BHI 耐酸工作培养基。同时制作 1 份对照组,经测定对照组 BHI 液体培养基的 pH 值为 7.3。

将不同 pH 值的 BHI 液体培养基,各取 10 mL 装入 7 支已灭菌试管内,同时接种 0.1 mL 充分混匀的大肠埃希氏菌工作菌液,在 36℃ 恒温恒湿培

养箱中培养 24 h。后续试验按 GB 4789.2—2010<sup>[7]</sup> 操作并计数<sup>[7]</sup>。

#### 1.2.3 胆盐耐受性试验

分别称取 8 份牛胆盐 0.06, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 g 于锥形瓶中,121℃ 高压灭菌 15 min。

试验在生物安全柜内无菌操作。各加入 400 mL BHI 液体培养液,制成的胆盐质量浓度分别为 0.3, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 mg/mL 的胆盐工作培养液。

分别量取 10.00 mL 胆盐工作培养液于 8 支已灭菌试管中,同时接种 0.1 mL 充分混匀的大肠埃希氏菌工作菌液,然后在 36℃ 恒温恒湿培养箱中培养 24 h。后续试验按 GB 4789.2—2010<sup>[7]</sup> 操作并计数。

#### 1.2.4 人工胃液耐受性试验

分别量取 5 份 200 mL 已灭菌的纯化水,用 36.5% 的浓盐酸、1 mol/L 盐酸溶液及 0.1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 值分别为 1.5, 2.5, 3.5, 4.5, 5.5, 分别加入 2.0 g 胃蛋白酶<sup>[8]</sup>,摇匀,用微生物限度仪 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤除菌,制成不同 pH 值的人工胃液工作液。

试验在生物安全柜内无菌操作。将 5 个不同 pH 值的人工胃液工作液每个 4 支分别装入 20 支无菌试管,同时接种 0.1 mL 充分混匀的大肠埃希氏菌工作菌液,在 36℃ 恒温恒湿培养箱中培养 24 h。

后续试验按 GB 4789.2—2010<sup>[7]</sup> 操作并计数。以 0.1 mL 大肠埃希氏菌工作菌液的活菌含量作为 0 h 时的菌落计数。检测 0.1 mL 大肠埃希氏菌工作菌液在人工胃液工作液中培养 1, 2, 3, 4 h 后的活菌计数,统计试验结果,并计算大肠埃希氏菌的存活率,公式如下:

存活率 =  $\left[ \frac{\text{人工胃液处理 4 h 后的活菌数}}{\text{人工胃液处理 0 h 时的活菌数}} \right] \times 100\%$ 。

#### 1.2.5 人工肠液耐受性试验

称取 1.7 g 磷酸二氢钾固体加入 125 mL 灭菌纯化水,用 1 mol/L 盐酸溶液及 0.1 mol/L NaOH 溶液调节其 pH 值至 6.8 后定容到 250 mL,然后加入 2.5 g 胰蛋白酶<sup>[8]</sup>,摇匀,用微生物限度仪 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤除菌,制得人工肠液工作液。

在生物安全柜内,分别取 10.00 mL 人工肠液工作液于 5 支无菌试管,同时接种 0.1 mL 充分混

匀的大肠埃希氏菌工作菌液, 在 36℃ 恒温恒湿培养箱中培养.

后续试验按 GB 4789.2—2010<sup>[7]</sup> 操作并计数. 以 0.1 mL 大肠埃希氏菌工作菌液的活菌含量作为 0 h 时的菌落计数. 检测 0.1 mL 大肠埃希氏菌工作菌液在人工肠液工作液中培养 1, 2, 3, 4 h 后的活菌计数, 统计试验结果, 并计算大肠埃希氏菌的存活率 (计算公式同上).

2 结果与分析

2.1 耐酸性试验分析

大肠埃希氏菌在 BHI 耐酸性工作液培养 1 d 后, pH 值为 1.5 和 2.5 时均无菌落生长. 当 pH 值为 3.5 时有菌落生长, 但仅为 6 CFU/mL. 当 pH 值从 3.5 到 7.3 时, 菌落总数随 pH 值的升高逐渐增多, 且呈正相关关系, 见表 1. 说明大肠埃希氏菌可耐受一定酸性环境, 但过酸性环境对其生长和存活具有显著抑制作用.

表 1 E. coli 在不同 pH 培养液中培养 1 d 后的生长情况

pH 值	菌落总数/ (CFU · mL <sup>-1</sup> )	菌落总数 对数值
1.5	0	—
2.5	0	—
3.5	6	0.78
4.5	3.6 × 10 <sup>6</sup>	6.56
5.5	6.8 × 10 <sup>7</sup>	7.83
6.5	7.1 × 10 <sup>8</sup>	8.85
7.3 (自然 pH 值)	1.1 × 10 <sup>9</sup>	9.04

2.2 胆盐耐受性试验分析

大肠埃希氏菌在不同质量浓度胆盐工作液中培养 1 d 后. 未添加胆盐的对照组中检出菌落总数对数值为 9.04, 而在质量分数为 0.03% ~ 0.7% 的胆盐工作液中检出菌落总数对数值在 8.1 左右, 见图 1. 说明大肠埃希氏菌对胆盐具有一定的敏感性, 但在 0.03% ~ 0.7% 胆盐质量分数范围内, 质量分数变化对其无明显的抑制作用, 表明大肠埃希氏菌在这一范围对胆盐环境具有很好的耐受能力.

2.3 人工胃液耐受性试验分析

随胃液处理时间的增长, 大肠埃希氏菌在不同 pH < 4.5 的人工胃液作用后检出菌落数均有所降低, 且 pH 值越低, 其变化越明显. 但当 pH ≥ 4.5 时, 胃液对其无明显抑制作用, 见图 2. 说明酸度

的人工胃液可以抑制或杀死大肠埃希氏菌, 而 pH ≥ 4.5 后, 大肠埃希氏菌对人工胃液的耐受能力则趋于稳定.

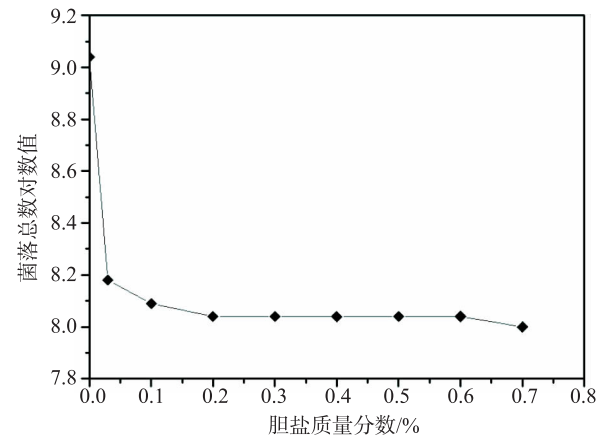


图1 E.coli在不同胆盐工作液中培养1 d后的活菌含量

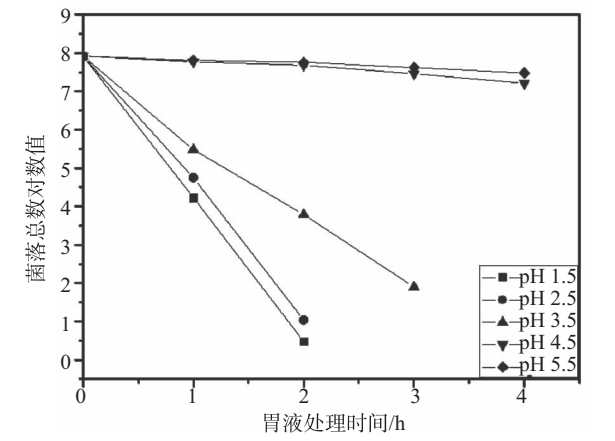


图2 E.coli在各pH值人工胃液中不同时间的活菌含量

在 pH ≤ 3.5 时, 大肠埃希氏菌在人工胃液中作用 4 h 后已无菌落检出, 但 pH 值为 4.5 时, 人工胃液作用 4 h 后其存活率却达到 19.50%, 见下表 2. 说明该菌株在一定酸度的人工胃液中能够保持较好的存活率, 其对人工胃液具有一定的耐受能力.

表 2 E. coli 在各 pH 值人工胃液中不同时间的生长情况

pH 值	人工胃液作用不同时间后 菌落总数对数值					4 h 后的 存活率/%
	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h	
1.5	7.92	4.23	0.48	—	—	0.00
2.5	7.92	4.75	1.04	—	—	0.00
3.5	7.92	5.48	3.79	1.90	—	0.00
4.5	7.92	7.77	7.68	7.46	7.21	19.50
5.5	7.92	7.81	7.76	7.62	7.48	36.31

## 2.4 人工肠液耐受性试验分析

随着人工肠液处理时间的增长,大肠埃希氏菌的菌落总数检出有所减少.但在人工肠液工作液作用 4 h 后,大肠埃希氏菌依然保持较高的活菌含量,见图 3.说明大肠埃希氏菌能在人工肠液中较好的存活,对人工肠液具有较好的耐受能力.

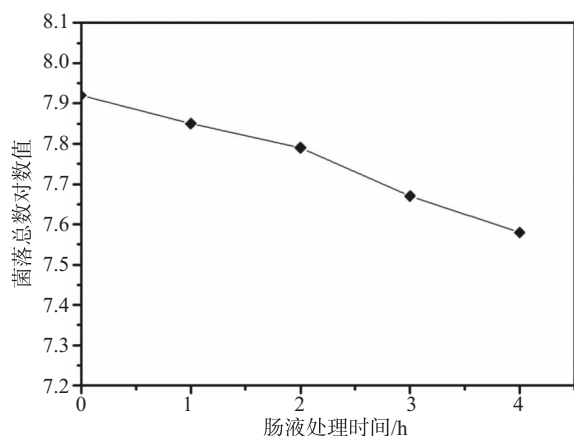


图3 E.coli在人工肠液中不同时间的活菌含量

## 3 讨论与结论

食源性致病菌在胃肠道引发致病性,必须要具备一定的耐酸和耐胃蛋白酶的能力.在人体中,食物在胃中的停留时间一般为 1~2 h,胃液的 pH 值会因饮食结构的不同而具有一定的波动,通常 pH 值为 3.0 左右,空腹或食用酸性食品 pH 值为 1.5,食用碱性食物时 pH 值可达 4~5<sup>[9]</sup>.此外,食源性致病菌要在肠道内生存,还必须具备一定的对胆盐质量浓度的耐受能力.在人体中,食物在小肠中停留时间一般为 1~4 h,肠道内的胆盐质量浓度在 0.3~3.0 mg/mL<sup>[9]</sup>.

本试验结果表明,大肠埃希氏菌对胆盐具有一

定的敏感性,但在 0.03%~0.7% 胆盐质量分数范围内具有很好的耐受能力.此外,当  $\text{pH} \geq 4.5$  时对人工胃液具有稳定的耐受能力,而人工肠液对大肠埃希氏菌则无明显抑制作用.

因此,大肠埃希氏菌会通过胃酸环境在肠道内生存,从而发挥致病作用.另外,为了进一步探索大肠埃希氏菌的致病性,今后还将考虑对大肠埃希氏菌的毒力因子及其病发特征等进行研究,以全面评估大肠埃希氏菌的致病特性.

### 〔参考文献〕

- [1] 兰岚. 食品安全风险分析及其在食品质量管理中的应用 [J]. 食品安全导刊, 2019 (3): 17.
- [2] 王思琦, 张昭寰, 穆丽丽, 等. 人工模拟胃肠道模型在食源性致病菌耐受及致病机理中的应用 [J]. 生物工程学报, 2018, 34 (6): 839-851.
- [3] 刘骆强, 姚艳玲, 管佳丽, 等. 5 种食源性致病菌 PCR 检测方法的建立 [J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10 (5): 1330-1335.
- [4] 黄文进, 尹小燕, 莫宗平. 产 ESBLs 大肠埃希菌血流感染的危险因素分析 [J]. 检验医学与临床, 2019 (9): 1297-1298, 1312.
- [5] 房海. 大肠埃希氏菌 [M]. 石家庄: 河北科学技术出版社, 1997.
- [6] 李海华, 郭蔚冰, 杨海明, 等. 内蒙古中东部地区不同来源大肠杆菌耐药性调查 [J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44 (4): 1182-1188.
- [7] 中华人民共和国卫生部. 食品安全国家标准: 食品微生物学检验 菌落总数测定: GB 4789. 2—2010 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [9] 熊涛, 宋苏华, 黄锦卿, 等. 植物乳杆菌 NCU116 在模拟人体消化环境中的耐受力 [J]. 食品科学, 2011, 32 (11): 114-117.

