

蛋氨酸羟基类似物和有机酸化剂对主要肠道病原菌体外抑菌效果的比较

马鑫 马秋刚* 计成 李桂明 赵丽红

(中国农业大学国家动物营养重点实验室,北京 100094)

摘要: 本文旨在采用平板法和试管法测定蛋氨酸羟基类似物(HMTBA)体外抑菌效果,并与常见有机酸,如乳酸(LA)、甲酸(FA)以及二甲酸钾(KDF)进行比较。试验结果表明,HMTBA对鼠伤寒沙门氏菌、肠炎沙门氏菌、产气荚膜梭菌和空肠弯曲菌的抑菌效果与等摩尔甲酸、二甲酸钾相当,优于等摩尔乳酸。

关键词: 蛋氨酸羟基类似物;有机酸;体外抑菌;牛津杯

鼠伤寒沙门氏菌、肠炎沙门氏菌、产气荚膜梭菌和空肠弯曲菌分别是禽细菌性腹泻、肠炎性腹泻、坏死性肠炎和空肠弯曲菌病等肠源性疾病的主要病原菌。传统畜禽养殖实践一般采用抗生素预防和治疗细菌性传染病,虽然取得了一定的效果,但是不可避免的产生了诸如耐药性、药物残留等问题。鉴于抗生素使用上的种种弊端,寻找合适的抗生素替代品已经成为世界性研究热点。

在饲料中添加各种有机酸是最常用的抗生素替代品之一^[1]。蛋氨酸羟基类似物化学名为2-羟基-4-甲硫基丁酸,pKa值为3.60左右,略低于乳酸和甲酸;88%水溶液pH略小于1,是一种比较强的有机酸。因此蛋氨酸羟基类似物除了作为DL-蛋氨酸替代物外,可能还具有类似于有机酸制剂的抑菌促生长作用。

目前国内外关于蛋氨酸羟基类似物的抑菌活性研究很少,尤其缺乏其对主要肠道病原菌的系统研究报道。本试验采用平板法测定蛋氨酸羟基类似物对4种主要肠道病原菌体外抑菌效果,通过与乳酸、甲酸和二甲酸钾等有机酸化剂进行系统比较,初步评价其作为抑菌促生长饲料添加剂的可能性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂

蛋氨酸羟基类似物(HMTBA,商品名AT-88,

纯度88%),安迪苏公司生产;二甲酸钾(potassium diformate, KDF, 纯度98%),巴斯夫公司生产;乳酸(lactic acid, LA, 纯度88%)、甲酸(formic acid, FA, 纯度88%),国药集团化学试剂有限公司生产。

1.1.2 供试菌种

鼠伤寒沙门氏菌标准株CVCC541和产气荚膜梭菌标准株CVCC65,购自中国兽医药品监察所(中监所);肠炎沙门氏菌标准株CMCC47736,购自中国科学院微生物研究所;空肠弯曲菌Penner 2型标准株,购自北京医科大学第一医院。

1.1.3 培养基

液体培养基:普通肉汤培养基,购自北京奥博星生物技术有限责任公司;厌氧菌液体培养基,购自中监所北京海淀中海动物保健科技公司;厌氧肉肝汤,中监所厌氧菌实验室惠赠。

固体培养基:营养琼脂培养基和SS琼脂培养基,购自奥博星生物技术有限责任公司;厌氧菌琼脂培养基,购自中监所中海动物保健科技公司。

1.1.4 菌悬液配制

在超净工作台开启供试菌株安瓿管,用无菌注射器吸取少量液体培养基溶解菌株。菌株一部分在固体培养基上划线(其中沙门氏菌采用SS琼脂培养基,产气荚膜梭菌采用厌氧菌固体培养基),一部分保存备用。菌株在固体培养基上传代2次,复壮后开始正式试验。挑取中等大小菌落,沙门氏菌属菌株接种到营养肉汤,恒温振荡器37 150 r/min振

收稿日期:2007-09-20

基金项目:本研究由法国安迪苏公司提供资助,并列入国家科技支撑计划"安全高效预混合饲料技术集成与产业化示范(2006BAD12B06)"

作者简介:马鑫(1981-),男,山东沂水人,在读硕士,E-mail:max0410@163.com

*通讯作者:马秋刚,讲师,E-mail:maqiugang@cau.edu.cn

荡培养 8 h,菌液浓度达到 2×10^{11} cfu/mL,稀释菌液至 2×10^8 cfu/mL,4 冰箱保存备用;产气荚膜梭菌接种到厌氧肉肝汤试管中,上面覆盖 2~3 mm 厚的灭菌液体石蜡以隔绝空气,放于生化培养箱中 37 培养 18 h,菌液浓度达到 2×10^9 cfu/mL,稀释菌液至 2×10^8 cfu/mL,4 冰箱保存备用。

1.1.5 抑菌剂配制

用无菌生理盐水将抑菌剂稀释成相应浓度备用。其中酸化剂稀释至 100 mmol/L,4 冰箱保存备用。

1.2 方法

取直径 85.00 mm 左右平板,每板倒入 15 mL 营养琼脂备用。取 100 μ L 已稀释至 2×10^8 cfu/mL 的检定菌液加入无菌生长并自然干燥 1 周的培养皿中,用无菌曲玻棒使之均匀铺于琼脂表面,然后将灭菌牛津杯(内径 6.00 mm,外径 7.80 mm,高 10.00 mm)置于平板内,每板 6 只。用灭菌加样器分别将 HMTBA、LA、FA、KDF 和无菌生理盐水(负对照)注入牛津杯内,每杯 100 μ L,将平碟盖好,置于 37 恒温箱培养 24 h 后用游标卡尺(精度为 0.02 mm)量取抑菌圈大小,观察抑菌效果,方法按照张治锁^[2]管碟法操作。判定标准参照邓来送^[3],抑菌圈直径 8.00 mm 视为不敏感,8.02~13.00 mm 为

低度敏感,13.02~19.00 mm 为中度敏感,19.02 mm 为高度敏感。

2 结果与分析

2.1 HMTBA 和其他抑菌剂对鼠伤寒沙门氏菌 CVCC541 的抑制作用

试验过程中生理盐水对所有被测肠道病原菌的抑菌圈直径均为 0,说明无菌生理盐水没有受到污染。

由表 1 可见,50.00 mmol/L 浓度条件下 HMTBA 抑菌效果接近中度敏感,并显著高于乳酸($P < 0.05$),但显著低于二甲酸钾和甲酸($P < 0.05$);25.00 mmol/L 浓度条件下 HMTBA 抑菌效果显著高于乳酸($P < 0.05$),但显著低于二甲酸钾和甲酸($P < 0.05$);12.50 mmol/L 浓度条件下 HMTBA 抑菌效果显著高于乳酸($P < 0.05$)。

2.2 HMTBA 和其他抑菌剂对肠炎沙门氏菌 CMCC47736 的抑制作用

由表 2 可见,50.00 mmol/L 浓度条件下 HMTBA 抑菌效果中度敏感。3 种浓度条件下 HMTBA 抑菌效果都显著高于乳酸($P < 0.05$),与甲酸和二甲酸钾相当。

表 1 不同浓度 HMTBA 和其他抑菌剂对鼠伤寒沙门氏菌 CVCC541 的抑制作用

Table 1 Inhibition efficacy of HMTBA and other substances against *S. Typhimurium* CVCC541 (mm)

抑菌剂 Bacteria inhibitive substances	浓度 Concentration (mmol/L)		
	50.00	25.00	12.50
蛋氨酸羟基类似物 HMTBA	12.96 \pm 0.13 ^b	10.39 \pm 0.10 ^b	8.16 \pm 0.01 ^b
乳酸 LA	11.33 \pm 0.11 ^a	9.04 \pm 0.13 ^a	8.01 \pm 0.00 ^a
二甲酸钾 KDF	14.86 \pm 0.13 ^c	11.20 \pm 0.19 ^c	8.26 \pm 0.01 ^c
甲酸 FA	14.76 \pm 0.14 ^c	11.43 \pm 0.12 ^c	8.30 \pm 0.01 ^d
P 值 P-value	< 0.001	< 0.001	< 0.001

同列肩标有不同字母者表示差异显著($P < 0.05$),下表同。

Means with different letter superscripts are significant difference ($P < 0.05$), the same as below.

表 2 不同浓度 HMTBA 和其他抑菌剂对肠炎沙门氏菌 CMCC47736 的抑制作用

Table 2 Inhibition efficacy of HMTBA and other substances against *S. Enteritidis* CMCC47736 (mm)

抑菌剂 Bacteria inhibitive substances	浓度 Concentration (mmol/L)		
	50.00	25.00	12.50
蛋氨酸羟基类似物 HMTBA	14.70 \pm 0.05 ^b	10.22 \pm 0.05 ^b	8.11 \pm 0.01 ^b
乳酸 LA	13.25 \pm 0.03 ^a	9.93 \pm 0.04 ^a	8.02 \pm 0.01 ^a
二甲酸钾 KDF	14.80 \pm 0.10 ^b	10.14 \pm 0.04 ^b	8.08 \pm 0.01 ^b
甲酸 FA	14.75 \pm 0.04 ^b	10.23 \pm 0.10 ^b	8.07 \pm 0.01 ^c
P 值 P-value	< 0.001	0.005	< 0.001

2.3 HMTBA 和其他抑菌剂对产气荚膜梭菌 CVCC65 的抑制作用

由表 3 可见, 50.00 mmol/L 浓度条件下 HMTBA 抑菌效果接近中度敏感, 并显著高于乳酸 ($P < 0.05$), 与二甲酸钾、甲酸相当 ($P < 0.05$); 25.00 mmol/L 浓度条件下 HMTBA 抑菌效果略高于乳酸和二甲酸钾 ($P < 0.05$), 与甲酸相当; 12.50 mmol/L 浓度条件下 HMTBA 抑菌效果略高于乳酸 ($P < 0.05$), 低于甲酸和二甲酸钾 ($P <$

0.05)。

2.4 HMTBA 和其他抑菌剂对空肠弯曲菌 Penner2 的抑制作用

由表 4 可见, 50.00 mmol/L 浓度条件下 HMTBA 抑菌效果低度敏感。在 50.00 mmol/L 和 25.00 mmol/L 浓度条件下 HMTBA 抑菌效果与甲酸、二甲酸钾和乳酸相当 ($P < 0.05$); 12.50 mmol/L 浓度条件下 HMTBA 和其他抑菌剂对空肠弯曲菌无抑菌作用。

表 3 不同浓度 HMTBA 和其他抑菌剂对产气荚膜梭菌 CVCC65 的抑制作用

Table 3 Inhibition efficacy of HMTBA and other substances against *Clostridium Perfringens* CVCC65 (mm)

抑菌剂 Bacteria inhibitive substances	浓度 Concentration (mmol/L)		
	50.00	25.00	12.50
蛋氨酸羟基类似物 HMTBA	12.78 ±0.10 ^b	9.92 ±0.00	8.03 ±0.00 ^b
乳酸 LA	11.26 ±0.13 ^a	9.80 ±0.00	8.02 ±0.00 ^a
二甲酸钾 KDF	12.79 ±0.13 ^b	9.89 ±0.00	8.08 ±0.00 ^d
甲酸 FA	12.50 ±0.14 ^b	10.04 ±0.00	8.06 ±0.00 ^c
P 值 P-value	<0.001	0.081	<0.001

表 4 不同浓度 HMTBA 和其他抑菌剂对空肠弯曲菌 Penner2 的抑制作用

Table 4 Inhibition efficacy of HMTBA and other substances against *Campylobacter jejuni* Penner2 (mm)

抑菌剂 bacteria inhibitive substances	浓度 Concentration (mmol/L)		
	50.00	25.00	12.50
蛋氨酸羟基类似物 HMTBA	11.21 ±0.09	8.34 ±0.20	-
乳酸 LA	11.15 ±0.07	8.32 ±0.09	-
二甲酸钾 KDF	11.19 ±0.19	8.35 ±0.06	-
甲酸 FA	11.19 ±0.08	8.29 ±0.07	-
P 值 P-value	0.967	0.957	-

3 讨论

无论是肠道微生物发酵产生的有机酸, 还是外源性添加的有机酸化剂, 都具有一定的抗菌效果^[4-5]。有机酸抑菌作用模式主要有两种: 有机酸在水溶液中通过解离作用释放出 H^+ , 破坏适宜有害微生物生存的酸碱环境, 抑制其生长繁殖; 小分子有机酸可以透过细胞壁进入病原菌细胞内, 降低胞内 pH, 抑制 DNA 和 RNA 的合成, 破坏病原菌细胞膜的完整性, 达到抑菌和杀菌作用^[5-6]。HMTBA 88% 水溶液 pH 略小于 1, 可能具有与甲酸、乳酸、柠檬酸等有机酸相似的抑菌作用机制。

体外抑菌试验结果可以说明病原菌对抑菌剂敏感性的高低, 为动物试验中抑菌剂种类和剂量的筛

选提供参考数据。HMTBA 在 12.50 mmol/L (相当于质量分数 0.21%) 时可以抑制鸡白痢沙门氏菌、肠炎沙门氏菌等病原菌的生长繁殖; HMTBA 在 25.00 mmol/L (相当于质量分数 0.42%) 时可以抑制产气荚膜梭菌和空肠弯曲菌的生长繁殖。肉鸡生产中蛋氨酸羟基类似物用量一般在 0.20% ~ 0.30% 左右。据此推测, 除了补充蛋氨酸外, 蛋氨酸羟基类似物在饲料贮存过程中或畜禽胃肠道内具有一定的抑菌作用, 具体作用效果如何有待动物试验进一步验证。

4 结论

HMTBA 对 4 株供试菌的体外抑菌效果与等摩尔甲酸和二甲酸钾相当, 高于等摩尔乳酸。

体外 12.50 ~ 25.00 mmol/L HMTBA 可以抑制病原菌的生长繁殖。

参考文献:

- [1] Partanen K. Organic acids: The efficiency and modes of action in pigs. Nottingham: Nottingham University Press, 2001. 201-230.
- [2] 张治锁. 抗生素药品检验. 北京:人民卫生出版社, 1987.
- [3] 邓来送. 中药制用经验录. 北京:中国中医药出版社, 1992.
- [4] Blank R, Sauer W C, Mosenthin R, Zentek J, Huang S, Roth S. Effect of fumaric acid supplementation and dietary buffering capacity on the concentration of microbial metabolites in ileal digesta of young pigs. Canadian Journal of Animal Science, 2001, 81: 345-353.
- [5] Russell J B. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: Anion accumulation versus uncoupling. Journal of Applied Bacteriology, 1998, 73: 363-370.
- [6] Christian L Ükst. Effects of organic acids in animal nutrition: alternatives for feed safety and animal health. Kraftfutter Feed Magazine, 2003, 86 (11/12): 370-372.

Inhibition Efficacy of HMTBA Against Major Enteric Pathogens Compared with Other Organic Acids in vitro

MA Xin MA Qiu-gang* JI Cheng LI Gui-ming ZHAO Li-hong

(National Key Laboratory of Animal Nutrition, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: Inhibition efficacy of HMTBA against major enteric pathogens was compared with other antibacterial substances, such as lactic acid (LA), formic acid (FA), and potassium diformate (KDF) in vitro according to Oxford cup method and test tube method. The result showed that the antibacterial activity in vitro of HMTBA was almost the same as formic acid, potassium diformate (KDF), but better than lactic acid at same molecular concentration, against *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *Clostridium Perfringens* and *Campylobacter Jejuni*. [Chinese Journal of Animal Nutrition, 2008, 20(2): 238-241]

Key words: HMTBA; Organic acid; Bacteria inhibition in vitro; Oxford cup

*Corresponding author, lecture, E-mail: maqiugang@cau.edu.cn

(编辑 胡晓蕾)