

## pH 和 $\text{Ca}^{2+}$ 对四株条件致病菌的影响<sup>①</sup>

姬雪莉<sup>lab②</sup>, 刘军<sup>2</sup>, 陈颖<sup>lab③</sup>

(1. 桂林医学院 a. 广西高校生物化学与分子生物学重点实验室; b. 智能医学与生物技术学院, 广西桂林 541199; 2. 桂林优利特医疗电子有限公司, 广西桂林 541004)

**摘要** 目的: 探讨 pH 和钙离子 ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 对分别来自窄食单胞菌、气单胞菌、肠杆菌和马氏杆菌四个属的四株微生物的影响。方法: 分别在不同 pH 和不同  $\text{Ca}^{2+}$  浓度条件下培养微生物, 比较不同培养条件下微生物培养物的比浊度 ( $\text{OD}_{600}$ )。结果: 除窄食单胞菌外, 其余三个菌株都偏爱碱性的培养条件; 150 mg/L 浓度的  $\text{Ca}^{2+}$  对窄食单胞菌和气单胞菌具有显著的抑制效果, 对肠杆菌和马氏杆菌属的菌株无显著影响。结论: pH 和  $\text{Ca}^{2+}$  对潜在病原微生物的直接影响依菌种不同而呈现差异。

**关键词:** 钙离子; 窄食单胞菌; 气单胞菌; 肠杆菌; 马氏杆菌

中图分类号: Q935

文献标志码: A

文章编号: 1008-2409(2022)06-0006-06

### Effects of pH and $\text{Ca}^{2+}$ on four conditional pathogenic bacterial strains<sup>①</sup>

Ji Xueli<sup>lab②</sup>, Liu Jun<sup>2</sup>, Chen Ying<sup>lab③</sup>. (1. a. Key Laboratory of Biochemistry & Molecular Biology of Guangxi Institutions of Higher Learning; b. School of Intelligent Medicine and Biotechnology; Guilin Medical University, Guilin 541199; 2. Guilin URIT Medical Electronic Co., Ltd., Guilin 541004, China)

**Abstract** Objective: To investigate the effects of pH and calcium ions ( $\text{Ca}^{2+}$ ) on four strains of microorganisms from four genera of *Stenotrophomonas*, *Aeromonas*, *Enterobacter* and *Macellibacteroides*, respectively. Methods: The microorganisms were cultured at different pH and  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations, and the specific turbidity ( $\text{OD}_{600}$ ) of the microbial cultures were compared under different culture conditions. Results: All the three strains, except *Stenotrophomonas*, preferred alkaline culture conditions;  $\text{Ca}^{2+}$  at 150 mg/L concentration had significant inhibitory effects on *Stenotrophomonas* and *Aeromonas*, but had no significant effects on the strains of the *Enterobacter* and *Macellibacteroides* genus. Conclusion: The direct effects of pH and  $\text{Ca}^{2+}$  on potential pathogenic microorganisms showed differences depending on the strains.

**Keywords:** calcium ions; *Stenotrophomonas*; *Aeromonas*; *Enterobacter*; *Macellibacteroides*

条件致病菌是在宿主免疫能力低下等条件下感 受到这类微生物的感染。根据世界卫生组织统计, 染宿主的一类微生物, 在医院接受治疗的患者容易 15% 在医院接受治疗的患者会受到条件致病菌的感

① 基金项目: 国家自然科学基金项目(41662019)。

② 作者简介: 姬雪莉(1991—), 女, 湖北十堰人, 2022年桂林医学院生物医学工程专业毕业, 理学硕士。研究方向: 微生物资源开发利用。

③ 通信作者: 陈颖, E-mail: yingchen@glmc.edu.com。

染<sup>[1]</sup>。

pH和钙离子(Ca<sup>2+</sup>)是影响微生物的两个重要因素,Ca<sup>2+</sup>和pH的改变都可以调节肠道微生物群落的结构和功能<sup>[2-4]</sup>,进而影响人体健康。近年来,研究证实Ca<sup>2+</sup>具有益生元作用<sup>[3,5]</sup>,能够提升肠道有益菌的相对含量。目前关于Ca<sup>2+</sup>和pH对微生物影响的研究主要是以微生物群体为研究对象,对单个菌株的影响鲜有报道。以微生物纯培养物为材料,研究pH和Ca<sup>2+</sup>对条件致病菌的影响将有助于人们认识这类微生物的生理特征,为防治条件致病菌感染提供理论指导和技术支持。

本文从受人类活动影响的岩溶环境中分离出四株条件致病菌:窄食单胞菌(*Stenotrophomonas*)、气单胞菌(*Aeromonas*)、肠杆菌(*Enterobacter*)和马氏杆菌(*Macellibacteroides*),分别研究了三种pH(5.0、7.0和9.0)和三种Ca<sup>2+</sup>浓度(0、50和100 mg/L)对这四株细菌生长的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 培养基的配制

用于微生物分离纯化的基础培养基每1 L包含:K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.53 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.41 g, CaCl<sub>2</sub> 0.05 g, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.21 g, NaCl 0.3 g, NaHCO<sub>3</sub> 4.0 g, NH<sub>4</sub>Cl 0.6 g, 维生素溶液1 ml, 微量元素溶液1 ml, 刃天青1 mg, Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O 0.96 g, L-半胱氨酸0.63 g, 调节至pH至7.0~8.0(用HCl调节), 最后用超纯水定容至1 L, 固体培养基除上述成分还包含1.5%琼脂。

维生素溶液:生物素8 mg, 叶酸8 mg, 盐酸硫胺20 mg, 核黄素20 mg, 烟酸20 mg, D-泛酸钙20 mg, 对氨基苯甲酸20 mg, 硫辛酸20 mg, 盐酸吡哆醇40 mg, 维生素B<sub>12</sub> 0.4 mg, 超纯水定容至1 L。

微量元素溶液:FeSO<sub>4</sub> 0.13 mg, CuSO<sub>4</sub> 0.05 mg, AlK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 0.04 mg, MnCl<sub>2</sub> 2.98 mg, CoCl<sub>2</sub> 0.44 mg, ZnCl<sub>2</sub> 0.38 mg, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.08 mg, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 0.07 mg, 超纯水定容至1 L。

本研究共使用了四种分离培养基(Mn-H2、NY-CH4、LN-H2和LNYA-H2), 培养基成分由上述基础培养基衍生而来,Mn-H2中添加了终浓度为20 mmol/L的甲醇,NY-CH4中添加了终浓度为2 mmol/L的硝

酸钠以及0.1 g/L的酵母提取物, LN-H2中添加了终浓度为20 mmol/L的乳酸钠以及终浓度为2 mmol/L的硝酸钠, LNYA-H2中添加了终浓度为20 mmol/L的乳酸钠, 终浓度为2 mmol/L的硝酸钠、终浓度为0.1 g/L的酵母提取物以及终浓度均为50 μg/L的万古霉素和氨苄青霉素。

用于研究Ca<sup>2+</sup>和pH对菌株影响的培养基由基础培养基改良而来, 每1 L培养基包含K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.53 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.41 g, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.1 g, NaCl 0.3 g, NaHCO<sub>3</sub> 4.0 g, 葡萄糖3.6 g, 维生素溶液1 ml, 微量元素溶液1 ml, Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O 0.96 g, L-半胱氨酸0.63 g, 根据实验目的调节pH至5.0、7.0和9.0, 调节Ca<sup>2+</sup>浓度至0 mg/L、50 mg/L和150 mg/L, 最后用超纯水定容至1 L。固体培养基除上述成分还包含1.5%琼脂。

厌氧培养基的制备过程:首先按照前文所述配置培养基, 将约20 ml培养基加入总容量为120 ml的血清瓶, 用丁基胶塞密封并用铝盖加固, 然后通过厌氧抽换气系统用氮气置换培养基中的空气, 共进行6次抽换气。121 °C高压灭菌20 min, 将培养基置于50 °C左右的恒温水浴中降温。

厌氧斜面培养基制备操作:斜面培养基中含有1.5%的琼脂, 制备时需在培养基凝固前倾斜放置, 待血清瓶内培养基凝固成斜面后, 使用上述厌氧抽换气系统和过滤除菌的无氧气体进行抽换气, 置换血清瓶内湿润的气体, 倒置于室温环境3 d, 用无菌注射器抽出瓶口的凝结水, 至无凝结水形成于瓶口后备用。

### 1.2 菌株的分离纯化

“Hungate滚管纯化法+划线纯化法”的操作流程:用无菌注射器吸取1 ml基础培养基稀释的沉积物样品, 转接至未凝固的培养基中并混合均匀, 在室温下置于水中匀速滚动血清瓶, 直至带菌的培养基在血清瓶内壁凝固成一薄层, 最后充入氮气或者其他特种气体。将接种后的培养基置于30 °C培养箱静置培养并观察, 1次/d, 待滚管中长出可见的菌落后, 在厌氧操作箱中挑取菌落至厌氧斜面培养基, 进行三区划线纯化, 待单菌落长出后重复划线纯化至少3次。

### 1.3 基于16S rRNA基因的菌种鉴定

挑取纯化后的单菌落到无菌水中,99℃裂解10 min,以此裂解液为模板,每个菌株使用1 μl,3 μl和5 μl三种体积的模板分别配置PCR反应体系。(50 μl):10×Ex Taq Buffer(Mg<sup>2+</sup>)5 μl,dNTP 4 μl,细菌通用引物27F(AGAGTTTGARCMGTGGCTCAG)和1492R(GGTTACCTTGTTACGACTT)<sup>[6]</sup>各1 μl,模板1~5 μl,Ex Taq酶0.25 μl,补加无菌水至50 μl。

PCR产物测序:选取电泳结果呈现为单一条带的PCR产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行Sanger测序。

PCR产物序列比对:测序结果用Geneious 9.0.2软件(<https://www.geneious.com>)处理,依据测序质量剪除每基数有1%以上出现错误的区域,大于1 kb的测序样品需拼接正反向测序结果,序列拼接后,将拼接结果与NCBI的16S rRNA基因数据库进行BLAST序列分析(<https://www.blast.ncbi.net/>)。

### 1.4 菌株的染色和显微镜观察

革兰染色步骤为:在玻片上滴加1滴生理盐水,用接种环挑取单菌落到生理盐水中,用酒精灯外焰固定后,首先用结晶紫液染1 min,水洗后用碘液染1 min,滴加脱色酒精30 s后用超纯水冲洗,直至玻片上没有紫色染液,最后滴加沙黄复染液,复染1 min,水洗,干燥后进行显微镜观察。

### 1.5 不同pH和Ca<sup>2+</sup>浓度下微生物生长曲线的测定

从纯化菌株的单菌落上挑取菌体接种到添加有葡萄糖的培养基中,置于30℃,200 r/min的空气浴恒温摇床中培养24 h后取菌液,分别接种到pH分别为5.0、7.0和9.0以及Ca<sup>2+</sup>浓度分别为0 mg/L、50 mg/L和150 mg/L的培养基中培养,温度设定为30℃,摇床速度设为200 r/min。在不同时间段测定培养液的OD<sub>600</sub>,绘制OD<sub>600</sub>随时间变化的生长曲线。

## 2 结果

### 2.1 菌株的分离和鉴定

经过三轮厌氧条件的划线纯化,最终从NY-CH<sub>4</sub>、LN-H<sub>2</sub>、LNYA-H<sub>2</sub>和Mn-H<sub>2</sub>四类分离培养基中获得了四个微生物菌株,分别命名为Aa1、K、N1和J1,菌株N1分离自添加有万古霉素和氨苄青霉素的培

养基中,因此具有耐受这两种抗生素的特性。对上述四个菌株进行菌落PCR和Sanger测序,测序结果都已经上传至GenBank,Aa1、K、N1和J1四个菌株的16S rRNA基因序列准入号分别为ON726259、ON726249、ON726241和ON726251,对这些序列进行BLAST分析,见表1。结果显示,四个菌株分布在两门四属四种中,包含变形菌门中的*Stenotrophomonas maltophilia*、*Aeromonas veronii*、*Enterobacter hormaechei*,和拟杆菌门中的*Macellibacteroides fermentans*。这四个菌株都曾在人类肠道中发现,可能会经饮水和食物进入人体影响人体健康<sup>[7]</sup>。

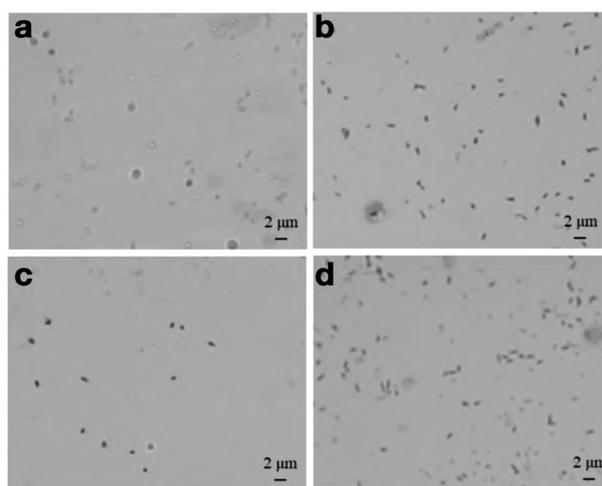
表1 四个菌株的名称及其近源物种

菌株名称	近源序列	序列相似度	e-Value*
Aa1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99.64%	0
K	<i>Aeromonas veronii</i>	99.93%	0
N1	<i>Enterobacter hormaechei</i>	99.86%	0
J1	<i>Macellibacteroides fermentans</i>	99.13%	0

\*e-Value:表明在随机的情况下,其他序列与目标序列相似度要大于表中近源序列的可能性

### 2.2 菌株的形态

四个菌株经革兰氏染色后都为革兰氏阴性,细胞都呈短杆状,长度约为0.8 μm,见图1。



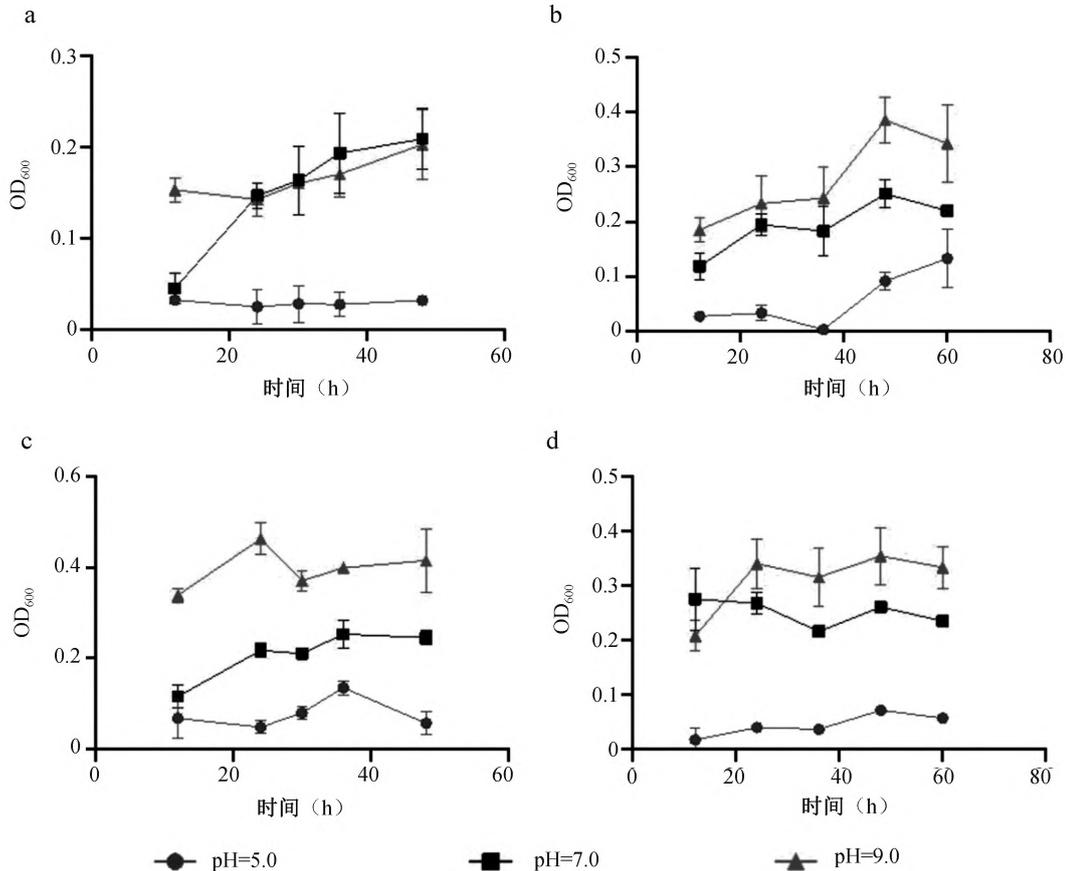
a:菌株Aa1;b:菌株K;c:菌株N1;d:菌株J1

图1 鉴定菌株的革兰氏染色图

### 2.3 pH对菌株生长的影响

菌株 *Stenotrophomonas* sp. Aa1、*Aeromonas* sp. K、*Enterobacter* sp. N1 和 *Macellibacteroides* sp. J1 在不同 pH 培养条件下的生长情况如图 2 所示。结果表明,所有菌株在 pH 7.0 和 9.0 时培养液的比浊度都高于 pH 5.0 时培养液的比浊度,差异在误差范围外。这

一结果表明 pH 7.0 和 9.0 培养条件下菌株的生长情况优于 pH 5.0 培养条件下菌株的生长情况。除 *S.* sp. Aa1 外,见图 2a,其余三个菌株都偏爱偏碱性的培养条件,见图 2b-d,特别是菌株 *E.* sp. N1 在 pH 为 9.0 培养条件下的生长情况显著优于 pH 7.0 和 5.0 培养条件下的生长情况,见图 2c。



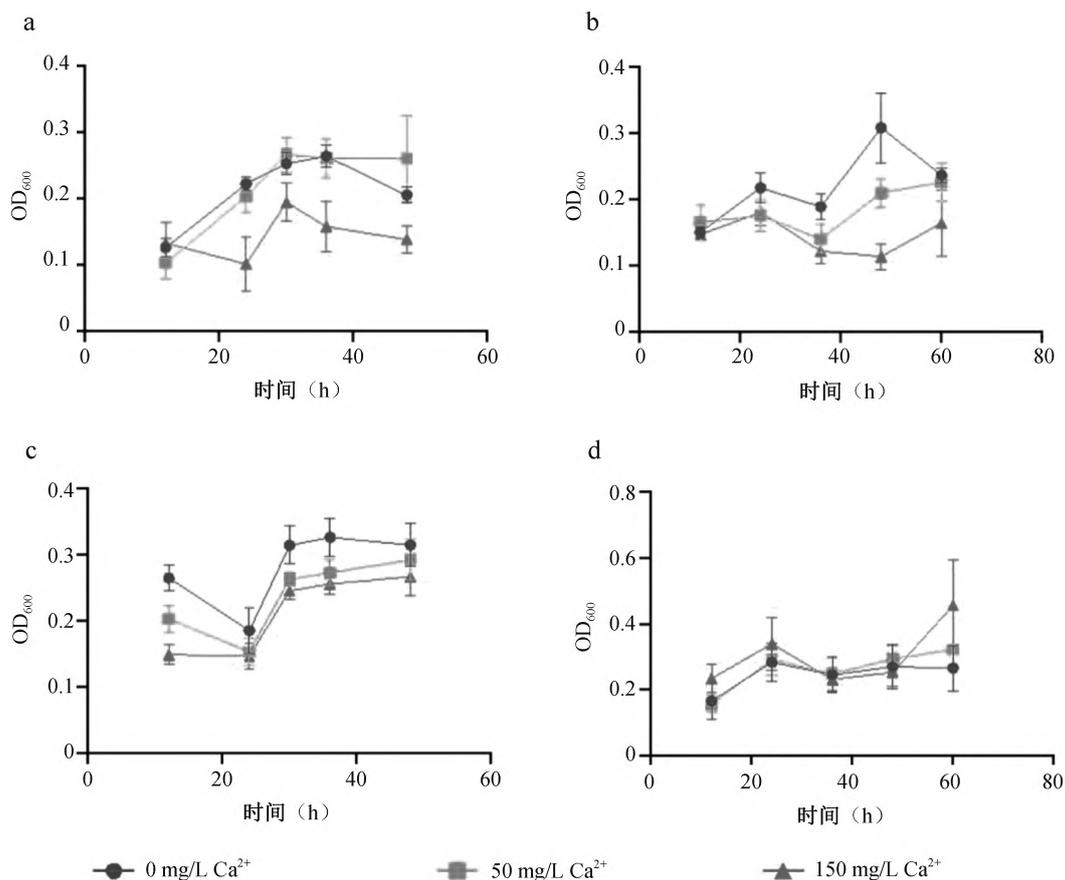
a: 菌株 Aa1; b: 菌株 K; c: 菌株 N1; d: 菌株 J1

图 2 不同 pH 条件下鉴定菌株的生长曲线

### 2.4 Ca<sup>2+</sup>对细菌生长的影响

菌株 *Stenotrophomonas* sp. Aa1、*Aeromonas* sp. K、*Enterobacter* sp. N1 和 *Macellibacteroides* sp. J1 在不同 Ca<sup>2+</sup>浓度下的生长曲线,见图 3。Ca<sup>2+</sup>浓度为 150 mg/L 时微生物培养液的比浊度要显著低于 Ca<sup>2+</sup>浓度为 0 mg/L 和 50 mg/L 时培养液的比浊度,差异超出了

误差范围,见图 3a 和 3b。这一结果表明, Ca<sup>2+</sup>浓度的升高对 *Stenotrophomonas* sp. Aa1 和 *A.* sp. K 有抑制效果。同理可知 Ca<sup>2+</sup>浓度对菌株 *Enterobacter* sp. N1 和 *Macellibacteroides* sp. J1 的影响不明显,见图 3c 和 3d。



a:菌株 Aa1;b:菌株 K;c:菌株 N1;d:菌株 J1

图3 不同  $\text{Ca}^{2+}$  浓度下鉴定菌株的生长曲线

### 3 讨论

本研究分离纯化的四个菌株 *Stenotrophomonas* sp. Aa1、*Aeromonas* sp. K、*Enterobacter* sp. N1 和 *Macellibacteroides* sp. J1 的 16S rRNA 基因序列分别与 *Stenotrophomonas maltophilia*、*Aeromonas veronii*、*Enterobacter hormaecheis* 和 *Macellibacteroides fermentans* 四个菌种的 16S rRNA 基因序列相似度都超过 99%，这些菌株的细胞形态均为短杆状，且革兰氏染色都呈阴性，因此初步鉴定为 *Stenotrophomonas maltophilia*、*Aeromonas veronii*、*Enterobacter hormaecheis* 和 *Macellibacteroides fermentans* 四个菌种的亚型，它们可能也具备相似的生理特征。

菌株 Aa1、K 和 N1 都分离自添加了硝酸钠的培养基中，与相关研究报告中 *Stenotrophomonas maltophilia*<sup>[8]</sup>、*Aeromonas veronii*<sup>[9]</sup> 和 *Enterobacter hormaecheis*<sup>[10]</sup> 都具有反硝化能力的描述相一致。菌株 J1 的分离培养基中未添加电子受体硝酸盐，推测可能是通过发酵甲醇的代谢方式在培养基中生存，因为

其近源物种 *Macellibacteroides fermentans* 可在厌氧条件下通过发酵多种有机物获得生长所需的能量和营养<sup>[11]</sup>。

菌株 Aa1、K 和 N1 的近源物种 *Stenotrophomonas maltophilia*<sup>[12]</sup>、*Aeromonas veronii*<sup>[13]</sup> 和 *Enterobacter hormaecheis*<sup>[14]</sup> 都属于条件致病菌，会引起免疫力低下患者的各种疾病，包括伤口感染和腹泻等。菌株 J1 的近源物种 *Macellibacteroides fermentans* 被发现于人类的口腔和肠道中。近年来，有研究<sup>[15]</sup> 发现在 HPV 携带者口腔中，*M. fermentans* 的丰度要显著高于正常个体口腔中同种微生物的丰度，并且这种丰度的提升与患者牙龈组织中核苷酸剪切修复相关基因的下调呈显著相关，有可能导致口腔癌。

pH 是一个影响微生物生理功能的重要特征参数。此前的研究<sup>[4]</sup> 表明，肠道 pH 的降低会同时改变肠道微生物群体的均匀度、丰富度，以及微生物产生短链脂肪酸的能力，进而可能影响人体健康。本研究以 *Stenotrophomonas* sp. Aa1、*Aeromonas* sp. K、

*Enterobacter* sp. N1 和 *Macellibacteroides* sp. J1 四个菌株为研究对象,发现它们在中性和碱性环境下的生长情况都优于 pH 5.0 条件下的生长情况。这一结果与之前关于 pH 对微生物群落的影响结果基本一致,即大部分人体相关的微生物都偏好中性和偏碱性环境。

Ca<sup>2+</sup>被认为是一种有助肠道益生菌生长的益生元,通过我们的实验研究发现, Ca<sup>2+</sup> 浓度的升高确实可以抑制 *Stenotrophomonas maltophilia* 和 *Aeromonas veronii* 这两类条件致病菌。此前曾有文献报道 Ca<sup>2+</sup> 能够影响 *S. maltophilia* 的蛋白酶活性和毒力<sup>[16-17]</sup>。本研究的实验结果进一步验证了这一论述。而关于 Ca<sup>2+</sup> 对 *A. veronii* 的影响,目前尚无相关文献报道。因此,本研究首次报道了 150 mg/L 浓度的 Ca<sup>2+</sup> 对菌株 *Aeromonas. veronii* 的抑制作用。

#### 参考文献:

- [1] KHAN H A, BAIG F K, MEHBOOB R. Nosocomial infections; epidemiology, prevention, control and surveillance[J]. Asian Pac J Trop Biomed, 2017, 7(5): 478-482.
- [2] HE W, XIE Z, THOGERSEN R, et al. Effects of calcium source, inulin, and lactose on gut-bone associations in an ovariectomized rat model[J]. Mol Nutr Food Res, 2022, 66(8): e2100883.
- [3] CHAPLIN A, PARRA P, LARAICHI S, et al. Calcium supplementation modulates gut microbiota in a prebiotic manner in dietary obese mice[J]. Mol Nutr Food Res, 2016, 60(2): 468-480.
- [4] FIRMAN J, LIU L, MAHALAK K, et al. The impact of environmental pH on the gut microbiota community structure and short chain fatty acid production[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2022, 98(5): fiac038.
- [5] FUHREN J, SCHWALBE M, BOEKHORST J, et al. Dietary calcium phosphate strongly impacts gut microbiome changes elicited by inulin and galacto-oligosaccharides consumption[J]. Microbiome, 2021, 9(1): 218.
- [6] GALKIEWICZ J P, KELLOGG C A. Cross-kingdom amplification using bacteria-specific primers: complications for studies of coral microbial ecology[J]. Appl Environ Microbiol, 2008, 74(24): 7828-7831.
- [7] PANDEY P K, KASS P H, SOUPIR M L, et al. Contamination of water resources by pathogenic bacteria[J]. AMB Express, 2014, 4(1): 51.
- [8] AN Q, DENG S, ZHAO B, et al. Simultaneous denitrification and hexavalent chromium removal by a newly isolated *Stenotrophomonas maltophilia* strain W26 under aerobic conditions[J]. Environ Chem, 2021, 18(1): 20-30.
- [9] LV X, SHAO M, LI C, et al. Operation performance and microbial community dynamics of phosphorus removal sludge with different electron acceptors[J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2014, 41(7): 1099-1108.
- [10] O'HARA C M, STEIGERWALT A G, HILL B C, et al. *Enterobacter hormaechei*, a new species of the family Enterobacteriaceae formerly known as enteric group 75[J]. J Clin Microbiol, 1989, 27(9): 2046-2049.
- [11] JABARI L, GANNOUN H, CAYOL J L, et al. *Macellibacteroides fermentans* gen. nov., sp. nov., a member of the family Porphyromonadaceae isolated from an upflow anaerobic filter treating abattoir wastewaters[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2012, 62(Pt 10): 2522-2527.
- [12] ADEGOKE A A, STENSTRÖM T A, OKOH A I. *Stenotrophomonas maltophilia* as an emerging ubiquitous pathogen: looking beyond contemporary antibiotic therapy[J]. Front Microbiol, 2017, 8: 2276.
- [13] SMYRLI M, TRIGA A, DOURALA N, et al. Comparative study on a novel pathogen of European seabass. diversity of *aeromonas veronii* in the aegean sea[J]. Microorganisms, 2019, 7(11): 504.
- [14] MONOWAR T, RAHMAN MD S, BHOORE S J, et al. Endophytic bacteria *enterobacter hormaechei* fabricated silver nanoparticles and their antimicrobial activity[J]. Pharmaceutics, 2021, 13(4): 511.
- [15] CHOWDHRY R, SINGH N, SAHU D K, et al. Dysbiosis and variation in predicted functions of the granulation tissue microbiome in hpv positive and negative severe chronic periodontitis[J]. Biomed Res Int, 2019, 2019: 8163591.
- [16] FIGUEIRÊDO P M S, FURUMURA M T, SANTOS A M, et al. Cytotoxic activity of clinical *stenotrophomonas maltophilia*[J]. Lett Appl Microbiol, 2006, 43(4): 443-449.
- [17] VAZQUEZ S C, MAC CORMACK W P, RIOS MERINO L N, et al. Factors influencing protease production by two antarctic strains of *stenotrophomonas maltophilia*[J]. Rev Argent Microbiol, 2000, 32(2): 53-62.

[收稿日期:2022-07-12]

[责任编辑:杨建香 英文编辑:阳雨君]