

乳酸菌胞外产物对副溶血弧菌抑制作用的研究

窦晓明¹, 孙高英², 单 虎¹

(1. 莱阳农学院 动物科技学院, 山东 青岛 266109; 2. 莱阳农学院 乳品实验室, 山东 青岛 266109)

摘要:对副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)有抑制作用的3株乳酸菌,分别命名为A-1, A-2, A-3,并对其胞外产物的抑制作用进行了研究。结果表明,3株乳酸菌胞外产物对副溶血弧菌有较强抑制作用,抑菌圈直径分别可达18.6, 20.3, 19.5 mm;抑菌物质对热处理不敏感:在60, 80 ℃ 抑菌活性基本不变,在121 ℃ 处理20 min条件下抑菌效果分别是原液的67%, 83%, 74%,蛋白酶K处理对其活性有较大影响,抑菌成分可能是细菌素。进一步研究了细菌素抑菌活性与乳酸菌培养时间的关系。根据形态特征和常规生理生化反应进行鉴定,A-1, A-2 鉴定为嗜热链球菌,A-3 鉴定为嗜酸乳杆菌。

关键词:副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*); 乳酸菌; 细菌素

中图分类号:Q93 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-3096(2007)08-0011-04

弧菌病是世界各地海水养殖鱼、虾、贝类等动物中普遍流行、危害最大的细菌性疾病之一^[1]。副溶血弧菌是存在于近岸海洋环境中的嗜盐细菌,也是水产动物细菌性疾病的重要致病因素之一^[2-6]。目前防治副溶血弧菌主要使用抗生素,抗生素的使用在防治副溶血弧菌病方面发挥了重要作用,但是由于细菌耐药性及抗生素残留等问题,抗生素的使用受到限制。生物防治由于其特殊的优点正成为水产动物疾病防治的重要措施。乳酸菌(Lactic acid bacteria, LAB)是可发酵碳水化合物(主要为葡萄糖)产生大量乳酸的细菌的通称。乳酸菌可以产生有机酸、细菌素、过氧化氢等多种天然物质,这些物质除具有杀菌抑菌作用外,还可维持肠道内菌群平衡。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 菌种

从市售酸奶中用改进MRS半选择性培养基分离得到85株菌。

1.1.2 试验菌株

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*),由莱阳农学院乳品实验室惠赠。

1.1.3 培养基

2216E海水培养基:蛋白胨5 g,酵母粉1 g,磷酸铁0.1 g,琼脂粉20 g,陈海水1 000 mL,

加热溶解,调节pH至7.6,121 ℃ 灭菌20 min,

冷却至45 ℃ 左右倒平板。

改进MRS为半选择性培养基:蛋白胨10 g,牛肉膏10 g,酵母提取物5 g,葡萄糖20 g, K₂HPO₄2 g,柠檬酸二铵2 g,乙酸钠5 g,吐温801 mL, MnSO₄·4H₂O 0.25 g, MgSO₄·7H₂O 0.58 g,蒸馏水1 000 mL, TTC 0.05 g,分别用蒸馏水溶解,最后定容到1 000 mL,然后用1 mol/L的氢氧化钠调pH值为6.2~6.4,121 ℃ 高压灭菌30 min。

1.2 方 法

1.2.1 抑菌乳酸菌的筛选

1.2.1.1 乳酸菌胞外产物的制备

按照Bergey^[7]介绍的方法,将活化的乳酸菌悬液在无菌条件下按体积比1%接种到MRS液体培养基中,37 ℃ 培养48 h,6 000 r/min,4 min离心15 min,收集上清液,用0.22 μm过滤器过滤除菌,滤液即为乳酸菌的胞外产物。菌株胞外产物对指示菌的抑制作用,可能受酸性产物及过氧化氢作用的影响。为了排除酸性产物的干扰,将胞外产物pH调至7.6。加入过氧化氢酶除去过氧化氢。

收稿日期:2007-03-20;修回日期:2007-05-14

作者简介:窦晓明(1982-),男,山东济南人,硕士研究生,从事动物传染病研究,电话:13589379452, E-mail: xiekuangfei@sohu.com;单虎,通讯作者,博士生导师,教授,电话:0532-88030452; E-mail: hush@yac.edu.cn

1.2.1.2 抑菌活性的测定

采用牛津杯法。将副溶血弧菌接种于 2216E 液体培养基,25 °C 培养 24 h,菌液浓度达 10^8 cfu/mL,取培养物 0.1 mL 均匀涂在 2216E 固体平板上,自然干燥 30 min,然后在无菌条件下将牛津杯(内径为 6 mm)均匀放置在平板上,使其与平板培养基接触面无空隙。然后吸取 0.1 mL 经过相应处理的胞外产物于杯中,28 °C 培养 48 h,测量抑菌圈直径。每个样品做 3 个重复,结果取平均值。设定相应对照,培养条件相同。

1.2.1.3 乳酸菌胞外产物抑菌特性研究

1.2.1.3.1 热处理对乳酸菌代谢产物抑菌活性的影响

置胞外产物于 60,80,100,121 °C 处理 20 min,然后进行抑菌试验,同时设未经处理的代谢产物作对照。

1.2.1.3.2 蛋白酶 K 对乳酸菌代谢产物抑菌活性的影响

将蛋白酶 K 加入到乳酸菌的胞外产物中,使其终质量浓度为 2 g/L,37 °C 作用 1 h,不加蛋白酶 K (购自上海生物工程技术服务有限公司)的原液为对照,测定抑菌活性。

1.2.1.3.3 抑菌效果和生长曲线的关系

将各菌株已活化好的菌种以 1% 的接种量接种于装有 MRS 液体培养基的锥形瓶各 30 个,37 °C 培养,每隔 1 h 取出一个,在 600 nm 的波长处检测吸光值,以空白培养液为对照。并且测抑菌效果。

1.2.2 乳酸菌的鉴定

按照《伯杰氏细菌鉴定手册》第 9 版^[7]和《乳酸菌分类鉴定及实验方法》^[8]。先进行初步鉴定,再进行糖发酵试验鉴定到种。

2 结果

2.1 胞外产物的抑菌效果

85 株乳酸菌中有 3 株胞外产物对副溶血弧菌有抑制作用,3 株菌命名为 A-1,A-2,A-3,抑菌效果如表 1 所示。

表 1 3 株乳酸菌胞外产物对副溶血弧菌的抑菌作用

Tab.1 Inhibitory curve of extra cellular products of three strains on *Vibrio parahaemolyticus*

菌株	胞外产物	抑菌圈直径 (mm)					蛋白酶 K 处理的胞外产物
		热处理的胞外产物					
		60	80	100	121		
A-1	18.6	18.7	18.5	15.3	12.5	10.5	
A-2	20.3	20.2	20.0	18.2	16.8	9.4	
A-3	19.5	19.4	19.2	16.5	14.4	0	

由表 1 可以看出:3 株菌胞外产物对副溶血弧菌都具有较强抑制作用。胞外产物中抑菌物质在 60,

80 °C 抑菌活性基本不变,在 121 °C 处理 20 min 条件下抑菌效果分别是原液的 67%,83%,74%,说明胞外产物中抑菌物质具有较好的热稳定性。蛋白酶 K 处理组抑菌效果明显降低,推测抑菌物质可能是细菌素。

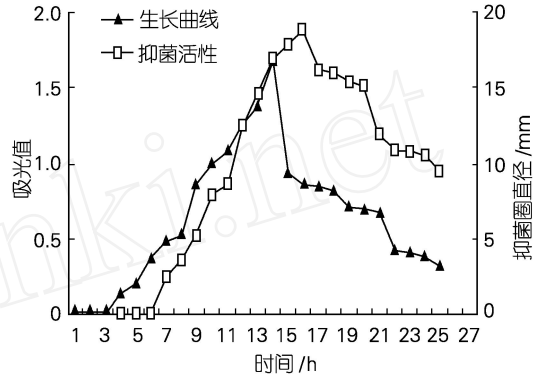


图 1 A-1 株生长时间与抑菌活性的关系

Fig.1 The relation between growth time of A-1 strain and its inhibitory effect

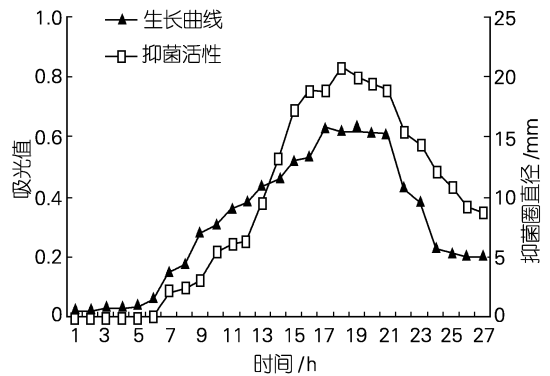


图 2 A-2 株生长时间与抑菌活性的关系

Fig.2 The relation between growth time of A-2 strain and its inhibitory effect

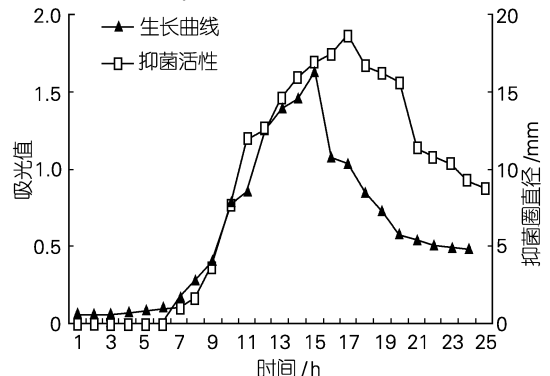


图 3 A-3 株生长时间与抑菌活性的关系

Fig.3 The relation between growth time of A-3 strain and its inhibitory effect

2.2 乳酸菌的生长时间与抑菌活性的关系

由图 1,2,3 可以看出:3 株乳酸菌的抑菌活性呈现一致的规律:由于数量较少,在延滞期乳酸菌抑菌活性基本为 0;当乳酸菌进入对数生长期时,随着乳酸菌数量的增长,胞外产物抑菌活性迅速增长,增长速度大于乳酸菌增长速度,这可能是乳酸菌在对数增长期分泌比较活跃,产生了更多的抑菌物质;抑菌活性在乳酸菌增长到最高峰后达到最高值,可能是抑菌物质积累所致;然后下降速度较快,可能是因为活性物质分解的缘故。

表 2 3 株乳酸菌的糖发酵结果

Tab.2 The sugar fermentation experiment of the three strains of *Lactobacillus*

分离菌株	标准菌株	七叶苷	麦芽糖	山梨醇	海藻糖	精氨酸	甘露醇	麦芽糖	纤维二糖	水杨苷	葡萄糖	乳糖	蔗糖	45 培养结果
A-1	嗜热链球菌	-	ND	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
A-2	嗜热链球菌	-	ND	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
A-3	嗜酸乳杆菌	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+

+ :阳性; - :阴性;ND:没有测定

3 讨论

与目前水产养殖业的发展规模相比,我国水产动物疾病防治研究严重滞后,仍处于化学疗法时代^[9]。频繁无节制地使用药物,导致耐药性菌株的产生并且造成环境的污染,因此,抗菌素的有效替代品的研究显得尤为迫切。近年来,一些乳酸菌开始应用于水产养殖业,实践证明应用乳酸菌来防治水生动物疾病是可行的。Gatesoupe^[10]研究发现,将乳酸菌应用于大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)幼苗培育中能增强幼苗对病原性弧菌的抵抗力。杨莺莺^[11]研究了乳酸杆菌 L1 对致病弧菌的抑制作用,证明乳酸杆菌及其代谢物质对鲈鱼弧菌和溶藻弧菌具有协同抑制作用。周海平等^[12]探讨了乳酸杆菌 LH 代谢产物对沙蚕弧菌(*Vibrio neresis*)、哈维氏弧菌(*V. harveyi*)、溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)、漂浮弧菌(*V. natriegen*)的抑制能力,并在模拟养殖水体实验中探讨了乳酸杆菌 LH 对哈维氏弧菌的抑制效果。杨勇等^[13]证明乳酸菌代谢产物对鳗弧菌的生长具有非常显著的抑制作用,该代谢产物对鳗弧菌的抑制效率在 90% 以上。姜英辉

2.3 乳酸菌的鉴定

2.3.1 乳酸菌的初步鉴定结果

球菌 A-1、A-2 显微镜观察为革兰氏阳性、无鞭毛、无芽孢、不运动、球状;杆菌 A-3 为革兰氏阳性、无鞭毛、无芽孢、不运动、杆状。3 种菌接触酶试验、明胶试验、靛基质试验、硫化氢实验均为阴性,pH4.5 下的正常生长,凝乳试验为阳性。初步鉴定为乳酸菌。

2.3.2 糖发酵试验

对比《伯杰氏细菌鉴定手册》第 9 版和《乳酸菌分类鉴定及实验方法》,A-1、A-2 鉴定为嗜热链球菌,A-3 鉴定为嗜酸乳杆菌。结果如表 2 所示。

等^[14]研究了乳酸链球菌 L3-18 的培养及其对海洋弧菌的抑制作用。本实验中作者扩大了抑制弧菌活性物质的筛选范围,从市售酸奶中成功筛选出 3 株乳酸菌,其胞外产物对副溶血弧菌具有较好的抑制作用,并且进一步探讨了胞外产物的抑菌特性,该菌株的抑菌成分对热不敏感,蛋白酶 K 对其活性有较大影响,成分可能是细菌素。3 株乳酸菌胞外产物的热敏感性以及对蛋白酶 K 敏感性不尽相同,可能是抑菌物质不同表现出理化特性的差异。本实验还研究了乳酸菌培养时间与抑菌活性之间的规律,有助于下一步提取抑菌物质的最佳时间的确定。现在的乳酸菌抑制弧菌研究还局限于单个菌株的筛选,不但费时费力而且很难进行商品化生产,本试验从酸奶中分离筛选的 3 株乳酸菌,胞外产物都有很好的抑制副溶血弧菌效果,且理化性质比较稳定。如果解决其活性物质的提取的问题,可以进行活性物质的工业化生产,前景十分诱人。

参考文献:

- [1] 吴后波,潘金培. 弧菌属细菌及其所致海水养殖动物疾病[J]. 中国水产科学,2001,8(1): 89-93.
- [2] 许兵,纪伟尚,徐怀恕. 中国对虾病原菌及其致病机理

- 的研究[J]. 海洋学报, 1993, 15(1): 98-106.
- [3] Vanderzant C, Nickelson R, Parlier J C. Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* from Gulf coast shrimp[J]. *J Milk Food Technology*, 1970, 33(1): 161-162.
- [4] 李天道, 于佳, 俞开康. 四种弧菌对中国对虾的致病性研究[J]. 海洋湖沼通报, 1998, 1: 57-64.
- [5] 陶保华, 胡超群, 任春华. 副溶血弧菌对斑节对虾和日本对虾的致病力研究[J]. 中国水产科学, 2000, 7(3): 117-119.
- [6] 许斌福, 林能锋, 杨金先, 等. 大黄鱼副溶血弧菌的分离、鉴定及致病力分析[J]. 福建农业科学, 2002, 17(3): 174-177.
- [7] Bergey R, Darid H, John G. Bergeys' Manual of Determinative Bacteriology[M]. 9th. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.
- [8] 凌代文, 东秀珠. 乳酸菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
- [9] 许斌福, 林能锋, 杨金先, 等. 新世纪福建水产科技发展趋势[J]. 福建农业学报, 2000, 15(增刊): 252-255.
- [10] Gatesoupe F J. The use of probiotics in aquaculture[J]. *J Aquaculture*, 1999, 180(12): 147-165.
- [11] 杨莺莺, 李卓佳, 陈永青, 等. 乳酸杆菌 L1 对致病弧菌的抑制作用[J]. 南方水产, 2005, 1(1): 62-65.
- [12] 周海平, 李卓佳, 杨莺莺, 等. 乳酸杆菌 LH 对几种水产养殖病原弧菌的抑制作用[J]. 台湾海峡, 2006, 25(3): 387-394.
- [13] 杨勇. 乳酸菌及其代谢产物对鳃弧菌的影响[J]. 中国水产, 2006, 10: 73-75.
- [14] 姜英辉, 李光友. 乳酸链球菌 L318 的培养及其对海洋弧菌的抑制作用[J]. 海洋科学, 2002, 26(2): 54-57.

Inhibitory activity of *Lactobacillus*'s metabolic product to *Vibrio parahaemolyticus*

DOU Xiao-ming¹, SUN Gao-ying², SHAN Hu¹

(1. College of Animal Science and Technology of Lai Yang Agricultural College, Qingdao 266109, China; 2. Dairy Laboratory of Lai Yang Agricultural College, Qingdao 266109, China)

Received: Mar. , 20, 2007

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; *Lactobacillus*; bacteriocin

Abstract : Three strains of *Lactobacillus* isolated from yoghurt were named A-1, A-2 and A-3 and their metabolic products can inhibit *Vibrio parahaemolyticus*. The inhibitory effect of the metabolic product was studied in this paper. The results showed that the metabolic product could inhibit the growth of *V. parahaemolyticus*; the max bacteriostatic circle diameters of three strains of lactobacilli were 18.6 mm, 20.3 mm, 19.5 mm respectively; the inhibitory activity was heat-stable under 60 and 80 ; the effect can keep 67%, 83% and 74% of the origin liquid even if temperature reaches 100 for 20min and damage some activity after treating with protease K; the antibacterial component was bacteriocin possibly. The paper also studied the relation between the cultural time of *Lactobacillus* and antibacterial activity. The strains A-1 and A-2 were identified as *Streptococcus thermophilus* by morphological character, traditional physiological and biochemical method, and A-3 was identified as *Lactobacillus*.

(本文编辑:张培新)