

斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)肠道乳酸菌 MM1 和 MM4 抑菌特性研究*

杨红玲¹ 孙云章^{1,2} 马如龙¹ 宋凯^{1,2} 王琨¹ 林文燕^{1,2}

(1. 集美大学福建省高校水产科学技术与食品安全重点实验室 厦门 361021;

2. 集美大学厦门市饲料检测与安全评价重点实验室 厦门 361021)

提要 采用体外拮抗试验方法,研究了 2 株分离自斜带石斑鱼幼鱼肠道的乳酸菌(MM1 和 MM4)的产酸能力及抑菌特性。结果表明,MM1 产乳酸速度较快,且整个培养期间乳酸产量均显著高于 MM4($P < 0.05$)。MM1 和 MM4 对革兰氏阴性细菌梅氏弧菌、哈维氏弧菌和革兰氏阳性细菌金黄色葡萄球菌均有强烈的抑制作用,但乳酸对 2 株乳酸菌的抑菌活性没有影响。过氧化氢酶显著降低了 2 株乳酸菌对梅氏弧菌和哈维氏弧菌的抑菌活性($P < 0.05$),但对金黄色葡萄球菌的抑菌活性影响较小,提示 2 株乳酸菌除能产生过氧化氢外,还能产生其它抑菌物质。2 株乳酸菌产生的抑菌物质具有一定的热稳定性,对蛋白酶部分敏感,经 3 种蛋白酶(胃蛋白酶、胰蛋白酶和蛋白酶 K)处理后,均保留 70.0% 以上的抑菌活性。因此,2 株乳酸菌产生的抑菌物质具有热稳定性和蛋白酶部分敏感特性,且对革兰氏阴性菌和阳性菌均具有抑制效果,可推测为类细菌素物质。

关键词 斜带石斑鱼, 乳酸菌, 抑菌特性, 过氧化氢, 类细菌素

中图分类号 S917.1

石斑鱼是一类名贵优良的海水养殖品种,其生长快,适应能力强,加之肉质鲜美、营养丰富,市场价值高,在我国东南沿海及一些东南亚国家已有较大规模的养殖(王新安等, 2008)。然而人工养殖过程中,引起石斑鱼高死亡率的各种细菌性疾病是影响其生产的棘手问题(黄志坚等, 2002)。目前,生产中防治细菌性疾病最常用的方法是化学药物,而化学药物的大量使用带来的药物残留和耐药菌株等负面效应日益引起人们的关注,这使得开展化学药物有效替代品的研究显得十分必要和紧迫。其中,绿色环保的鱼用益生菌的开发正成为国际上的研究热点(Cai *et al.*, 1998; 刘文斌等, 2007)。乳酸菌是一类可以发酵糖类产生大量乳酸的细菌总称,是人和动物消化道的有益微生物之一。研究表明,乳酸菌能够通过产生有机酸、过氧化氢或细菌素等抑制病原菌的生长,维

持肠道菌群平衡,促进动物生长和健康(Panigrahi *et al.*, 2005)。因此,乳酸菌被广泛用于益生菌开发和应用,其抑菌特性的研究则是益生菌体外筛选的重要环节。本实验室在研究斜带石斑鱼肠道微生物区系与功能时发现,2 株乳酸菌对水产养殖中常见病原菌具有强烈的抑制作用。本文对 2 株乳酸菌的抑菌特性进行了研究,旨在为这 2 株乳酸菌作为益生菌在海水鱼养殖中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株

乳酸菌 MM1 和 MM4 由本实验室分离自斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)幼鱼肠道。利用生化鉴定结合 16S rRNA 基因测序分析,MM1 鉴定为乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*),MM4 鉴定为屎肠球菌

* 国家自然科学基金资助项目,30600461 号;福建省高校水产科学技术与食品安全重点实验室基金资助,2009J102 号;集美大学科研基金资助,ZQ2006012 号。杨红玲,硕士,讲师,E-mail: honglingyang@sina.com

通讯作者: 孙云章,博士,副教授,E-mail: sunyunzhang@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-01-23, 收修改稿日期: 2009-03-18

(*Enterococcus faecium*)。预试验结果表明, MM1 和 MM4 对多株常见致病菌表现出不同程度的抑制作用, 其中 MM1 和 MM4 均对梅氏弧菌(*Vibrio metschnikovi*)、哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)表现出强烈的抑制效果, 因此后续抑菌特性研究均以此 3 株菌作为指示菌。乳酸菌培养用 MRS 培养基, 指示菌培养和双碟制备用营养肉汤培养基。

1.2 产乳酸试验

乳酸菌 MM1 和 MM4 经 MRS 液体培养基中培养 24h 活化后按 5% (V/V) 接种到新鲜的 MRS 液体培养基(Panigrahi *et al.*, 2005), 每个菌株设 3 个重复, 28 摇床培养(140r/min)。每 24h 测定培养基的 pH 值和乳酸含量。乳酸测定按照南京建成生物工程研究所乳酸测定试剂盒说明书进行。

1.3 抑菌试验

乳酸菌上清液抑菌: 经活化的乳酸菌培养液按 5%(V/V)接种于新鲜 MRS 液体培养基中, 28 摇床培养(140r/min)。培养液经离心(4000r/min, 30min)后取上清液。上清液通过管碟法进行抑菌试验, 测定抑菌圈直径(钱存柔等, 1999)。预试验中, 2 菌株培养 24h、48h、72h、96h 和 120h 的上清液分别进行了抑菌试验, 结果表明 48h 培养上清液的抑菌活性最好, 因此被用于后续抑菌试验。

乳酸对乳酸菌抑菌活性的影响: 用乳酸溶液调 MRS 液体培养基至与 MM1 和 MM4 培养上清液分别相同的 pH 值(pH 5.2 和 5.1)作为对照, 分别测定乳酸菌 48h 培养上清液和对照液的抑菌圈直径。

过氧化氢对乳酸菌抑菌活性的影响: MM1 和 MM4 培养上清液中分别加入终浓度为 0.5mg/ml 的过氧化氢酶, 于 28 水浴中温育 2h 后取出, 测定其抑菌圈大小。

1.4 抑菌物质的热稳定性试验

同上获得的 MM1 和 MM4 培养上清液分别于 60、80、100 加热处理 15min, 然后测定其抑菌圈大小, 以未经加热处理的培养上清液为对照。

1.5 蛋白酶对抑菌活性的影响

MM1 和 MM4 上清液中分别加入终浓度为 1mg/ml 的胃蛋白酶、胰蛋白酶或蛋白酶 K, 于 28 水浴中温育 2h 后取出, 测定其抑菌圈大小。对照为未经蛋白酶处理的培养上清液。

1.6 数据处理

实验数据经 Microsoft Excel 初步整理后, 利用 SPSS11.5 软件进行单因子方差分析, Duncan 法进行多重比较。试验结果用平均值 \pm 标准差表示。

2 结果

2.1 pH 值和乳酸的测定

由图 1a 可知, 乳酸菌 MM1 和 MM4 培养液的 pH 值变化基本一致, 在培养的前 24h 迅速下降, 48h 后趋于稳定, 2 菌株培养液 pH 值在整个培养期间差异不显著。由图 1b 可知, 乳酸含量在培养的前 48h 呈迅速上升趋势, 此后趋于稳定。2 株乳酸菌培养液的乳酸产量均在 48h 达到最高, 此后随培养时间的延长乳酸产量趋于稳定。原因可能是培养过程中, 由于乳酸菌的衰老, 乳酸产生能力下降, 继而出现所产生的乳酸为乳酸菌本身代谢所利用, 乳酸含量将保持不变。整个培养期间, MM1 培养液的乳酸含量显著高于 MM4 ($P < 0.05$), 提示 MM1 菌株产乳酸能力较强。

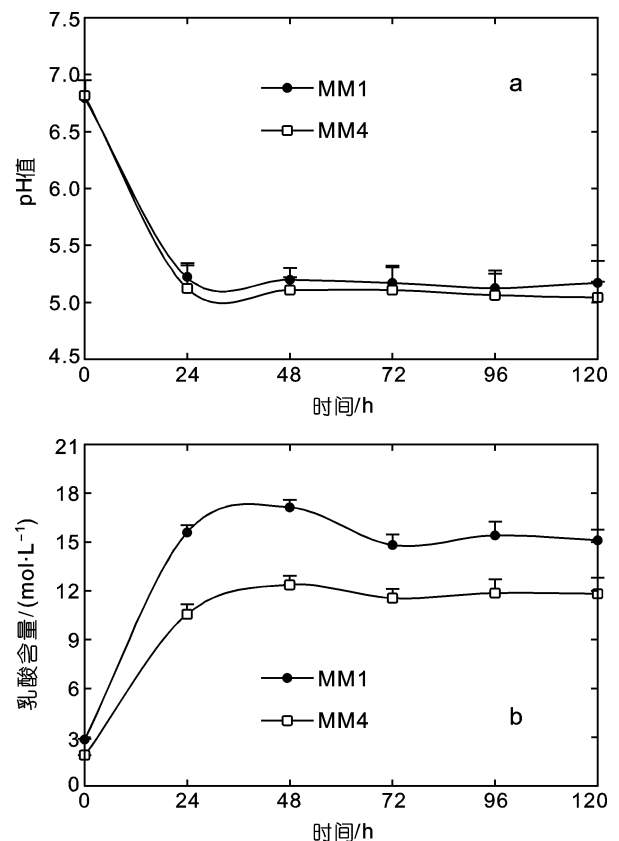


图 1 2 株乳酸菌不同培养时间 pH 值(a)和乳酸含量(b)的变化
Fig. 1 Variations of pH (a) and lactic acid concentrations (b) with incubation time

2.2 培养上清液抑菌效果比较

由表 1 可知, MM1 和 MM4 对革兰氏阴性细菌梅氏弧菌、哈维氏弧菌和革兰氏阳性细菌金黄色葡萄球菌都有强烈的抑制作用。其中, 2 株乳酸菌对哈维氏弧菌的抑制作用最强, 抑菌圈直径达 30mm 以上; 对金黄色葡萄球菌的抑制作用次之, 抑菌圈直径分别为 27.7mm 和 28.6mm; 对梅氏弧菌, 抑菌圈稍小, 但也分别有 18.8mm 和 21.6mm。

2.3 乳酸对乳酸菌抑菌效果的影响

由表 2 可知, 2 株乳酸菌对 3 株致病菌均具有很强抑制作用, 而各对照组(用乳酸调 MRS 液体培养基 pH 值与培养上清液相同)均没有对致病菌产生抑制作用。由此可知, 2 株乳酸菌产生的抑菌物质中, 乳酸不起作用, 起抑菌作用的是其它物质。

2.4 过氧化氢酶对乳酸菌抑菌效果的影响

由表 3 可见, 经过过氧化氢酶处理后, 2 株乳酸菌对病原菌的抑菌能力均有不同程度下降。对于革兰氏阴性细菌梅氏弧菌、哈维氏弧菌, MM1 的抑菌圈直径下降了 41.5% 和 48.9% ($P < 0.05$), MM4 的抑菌圈直径下

降了 25.4% 和 22.0% ($P < 0.05$); 对于革兰氏阳性金黄色葡萄球菌, MM1 的抑菌圈直径下降了 8.7% ($P < 0.05$), MM4 的抑菌圈直径仅下降了 2.1%。提示 2 株乳酸菌能产生过氧化氢, 还能产生其它的抑菌物质。

2.5 抑菌物质的热稳定性

由表 4 可见, 经 60、80、100 加热处理 15min 后, 2 株乳酸菌的抑菌活性有不同程度的下降。经 60 热处理 15min 后, MM1 对 3 株病原菌的残留抑菌活性(热处理后菌液的抑菌圈直径除以对照抑菌圈直径)基本不变, MM4 对 3 株病原菌的抑制活性显著下降($P < 0.05$), 但残留抑菌活性均在 86.0% 以上; 经 80 热处理 15min 后, 2 株菌的抑菌活性均显著下降($P < 0.05$), MM1 对 3 株病原菌的残留抑菌活性分别是 84.0%、60.2% 和 90.2%, MM4 的残留抑菌效果分别是 79.2%、82.8% 和 72.7%; 经 100 热处理 15min 后, 2 株菌的抑菌活性均显著下降($P < 0.05$), MM1 的残留抑菌效果分别为 74.5%、43.3% 和 56.3%, MM4 的残留抑菌效果分别为 68.1%、53.8% 和 57.3%。提示 2 株菌产生的抑菌物质具有较好的热稳定性。

表 1 乳酸菌上清液抑菌圈直径(mm)

Tab.1 Diameters of the inhibition zones of culture supernatant of lactic acid bacteria (mm)

菌株	梅氏弧菌	哈维氏弧菌	金黄色葡萄球菌
MM1	18.8±0.7 ^c	30.7±1.6 ^a	27.7±0.3 ^b
MM4	21.6±0.3 ^c	30.3±1.2 ^a	28.6±0.7 ^b

注: 同行肩标字母不同者表示差异显著($P < 0.05$)

表 2 排除乳酸对乳酸菌抑菌效果的影响(mm)

Tab.2 Inhibition activity of lactic acid bacteria after eliminating the effect of lactic acid (mm)

菌株	梅氏弧菌	哈维氏弧菌	金黄色葡萄球菌	
MM1	上清液	18.8±0.7 ^a	30.7±1.6 ^a	27.7±0.3 ^a
	对照	0.0±0.0 ^b	0.0±0.0 ^b	0.0±0.0 ^b
MM4	上清液	21.6±0.3 ^a	30.3±1.2 ^a	28.6±0.7 ^a
	对照	0.0±0.0 ^b	0.0±0.0 ^b	0.0±0.0 ^b

注: 同一乳酸菌株同一指示菌同列肩标字母不同者表示差异显著($P < 0.05$)。下同

表 3 过氧化氢酶对乳酸菌抑菌圈直径的影响(mm)

Tab.3 Effect of catalase on the diameters of the inhibition zones of lactic acid bacteria (mm)

菌株	梅氏弧菌	哈维氏弧菌	金黄色葡萄球菌	
MM1	对照	18.8±0.7 ^a	30.7±1.6 ^a	27.7±0.3 ^a
	过氧化氢酶	11.0±0.1 ^b	15.6±1.5 ^b	25.3±0.7 ^b
MM4	对照	21.6±0.3 ^a	30.3±1.2 ^a	28.6±0.7
	过氧化氢酶	16.1±1.1 ^b	23.7±2.0 ^b	28.0±1.1

表 4 不同温度处理后乳酸菌的抑菌圈直径(mm)

Tab.4 Diameters of the inhibition zones of lactic acid bacteria after different temperature treatment (mm)

菌株	梅氏弧菌	哈维氏弧菌	金黄色葡萄球菌	
MM1	对照	18.8±0.7 ^a	30.7±1.6 ^a	27.7±0.3 ^a
	60	16.5±2.0 ^{ab}	30.5±2.0 ^a	27.8±0.4 ^a
	80	15.8±0.5 ^{bc}	18.3±0.6 ^b	25.1±0.4 ^b
	100	14.0±0.6 ^c	13.3±1.2 ^c	15.6±1.6 ^c
MM4	对照	21.6±0.3 ^a	30.3±1.2 ^a	28.6±0.7 ^a
	60	19.7±1.3 ^b	28.8±0.5 ^b	24.6±0.6 ^b
	80	17.1±0.5 ^c	25.1±0.4 ^c	20.8±0.5 ^c
	100	14.7±0.7 ^d	16.3±0.8 ^d	16.4±0.7 ^d

2.6 蛋白酶对乳酸菌抑菌效果的影响

由表 5 可见, 经 3 种蛋白酶处理后, 2 株乳酸菌的抑菌效果均有不同程度的降低。经 3 种蛋白酶处理 2h 后, MM1 培养上清液对 3 种指示菌的抑菌活性均显著下降($P < 0.05$), 但残留抑菌活性(蛋白酶处理后菌液抑菌圈直径除以对照抑菌圈直径)均在 71.3% 以上。经胃蛋白酶和胰蛋白酶处理 2h 后, MM4 培养上清液对 3 种指示菌的抑菌活性均显著下降 ($P < 0.05$), 但残留抑菌活性均在 63.4% 以上。经蛋白酶 K 处理后, MM4 培养上清液对哈维氏弧菌的抑制活性显著下降($P < 0.05$), 但对梅氏弧菌和金黄色葡萄球菌的抑制活性没有明显影响。因此, 2 株乳酸菌对 3 种蛋白酶部分敏感。

表 5 蛋白酶对乳酸菌抑菌圈直径的影响(mm)
Tab.5 Effect of proteases on the diameters of the inhibition zones of lactic acid bacteria (mm)

菌株	梅氏弧菌	哈维氏弧菌	金黄色葡萄球菌
MM1	对照	18.8±0.7 ^a	27.7±0.3 ^a
	胃蛋白酶(Pepsin)	13.7±1.2 ^c	23.3±0.6 ^c
	胰蛋白酶(Tripsin)	15.6±0.4 ^b	23.7±0.4 ^c
	蛋白酶 K(Protease K)	15.4±0.5 ^b	25.9±1.6 ^b
MM4	对照	21.6±0.3 ^a	28.6±0.7 ^{ab}
	胃蛋白酶(Pepsin)	13.7±0.6 ^c	26.4±1.4 ^b
	胰蛋白酶(Tripsin)	18.3±0.6 ^b	23.1±1.6 ^c
	蛋白酶 K(Protease K)	22.4±1.5 ^a	29.0±1.2 ^a

3 讨论

乳酸菌是一类人和动物消化道的有益微生物,能产生多种抑菌活性物质,如乳酸、过氧化氢和细菌素等,但不同的鱼源乳酸菌菌株产生的抑菌物质有很大差异。Vazquez 等(2005)研究了 9 株不同来源乳酸菌对鱼源致病菌的抑制作用,结果表明,乳酸菌主要通过分泌乳酸等有机酸抑制病原菌。Sugita 等(2007)从日本鲶(*Silurus asotus* Linnaeus)肠道内分离到 2 株乳酸乳球菌,其产生的抑菌物质主要为过氧化氢。Campos 等(2006)报道,多株分离自大菱鲂(*Psetta maxima*)的乳酸菌均通过产生细菌素抑制病原菌的生长。本试验的 2 株乳酸菌均分离自斜带石斑鱼幼鱼肠道,对革兰氏阴性病原菌梅氏弧菌、哈维氏弧菌和革兰氏阳性病原菌金黄色葡萄球菌均有很强的抑制作用,且能产生一定量的乳酸。但本研究体外抑菌试验表明,乳酸对 3 株病原菌没有表现出抑菌效果,说明 2 株乳酸菌均能产生非乳酸的抑菌物质。

研究表明,一些乳酸菌能产生过氧化氢抑制细菌的生长,尤其是对革兰氏阴性菌的抑制效果较好(Sugita *et al*, 2007; Juven *et al*, 1988)。例如,2 株鱼源乳酸乳球菌(C74 和 C80)能够产生过氧化氢,强烈的抑制多株革兰氏阴性细菌气单胞菌的生长(Sugita *et al*, 2007)。本研究表明,MM1 和 MM4 培养上清液经过过氧化氢酶处理后,其抑菌效果出现了不同程度的下降,对于革兰氏阴性细菌梅氏弧菌和哈维氏弧菌,MM1 的抑菌活性分别下降了 41.5%和 48.9%,MM4 抑菌活性分别下降了 25.4%和 22.0%,但对于革兰氏阳性细菌金黄色葡萄球菌,MM1 和 MM4 的抑制活性仅分别下降了 8.7%和 2.1%。因此,分离自斜带石斑鱼肠道的乳酸乳球菌(MM1)和尿肠球菌(MM4)能产生过氧化氢,抑制致病菌的生长。然而,对革兰氏阴

性细菌梅氏弧菌和哈维氏弧菌的抑制效果近一半来自过氧化氢,对革兰氏阳性细菌金黄色葡萄球菌的抑制效果却绝大部分来自除过氧化氢以外的其它抑菌物质,下文对该抑菌物质的特性进行了探讨。

研究表明,陆生动物来源的乳酸菌产生的抑菌物质具有一定的热稳定性。Bromberg 等(2005)研究发现,一株鸡源乳球菌产生的抑菌物质在 121 加热 10min 后,抑菌活性不变。吴惠芬等(2005)报道,5 株猪源乳酸菌培养上清液经 70 /30min、100 /30min 和 120 /15min 加热处理后,其抑菌效果均保持在处理前的 92%以上。但是,目前有关鱼源乳酸菌产生的抑菌物质的热稳定性的研究很少。本研究中,2 株乳酸菌培养上清液经 80 加热处理 15min 后,均保留有 60.2%以上的抑菌活性,100 处理 15min 后,2 株乳酸菌仍保留有 43.3%以上的抑菌活性。鉴于过氧化氢对热不稳定,80 水浴 10min 即可排除过氧化氢的作用(张艾青等, 2007),这进一步说明了 2 株乳酸菌能产生除过氧化氢以外的抑菌物质,且这种抑菌物质对热较稳定。

本研究表明,2 株乳酸菌的培养上清液经 3 种蛋白酶(胃蛋白酶、胰蛋白酶和蛋白酶 K)处理后,抑菌活性均有不同程度的下降,但 MM1 和 MM4 培养上清液残留抑菌活性分别在 71.3%和 63.4%以上,提示 2 株乳酸菌产生的抑菌物质对蛋白酶部分敏感。已有研究表明,乳酸菌能分泌具有热稳定性和蛋白酶敏感特性的细菌素或类细菌素物质(Tagg *et al*, 1976; Arekova *et al*, 2007; Chen *et al*, 2006; Bogovic-Matijasic *et al*, 1998)。乳酸菌产生的细菌素通常只能抑制亲缘关系相近的乳酸菌或非乳酸菌的革兰氏阳性细菌,对革兰氏阴性细菌则鲜有抑制效果(Tagg *et al*, 1976; Bogovic-Matijasic *et al*, 1998)。但是乳酸菌产生的类细菌素的抑菌谱较广,对革兰氏阳性和阴性菌均有

抑制效果(Ocana *et al*, 1999; 侯运华等, 2002; Dimov, 2007)。Ocana 等(1999)从健康妇女阴道内分离获得一株产类细菌素的唾液乳杆菌(*Lactobacillus salivarius*), 能够杀死革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌, 该菌株对热稳定, 对胰蛋白酶和蛋白酶 K 敏感; 侯运华等(2002)从鸡肠道分离获得一株产类细菌素的乳酸菌, 能够抑制革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的生长, 该菌株具有热稳定性, 对胰蛋白酶敏感。本文中的 2 株乳酸菌产生的抑菌物质对革兰氏阴性菌和阳性菌均表现出强烈的抑制作用, 且具有热稳定性和蛋白酶部分敏感特性, 可推测为类细菌素物质。据笔者所知, 这是首次从海水鱼肠道中分离到产类细菌素的乳酸菌, 同株乳酸菌既产过氧化氢又产类细菌素的研究更是鲜有报道。

综上所述, 2 株鱼源乳酸菌 MM1 和 MM4 对革兰氏阴性细菌和革兰氏阳性细菌均具有很强的抑制作用, 抑菌物质具有较好的热稳定性, 对蛋白酶部分敏感, 抑菌物质除过氧化氢外, 还可能有类细菌素。2 株乳酸菌的这些特性提示其具有作为益生菌进一步开发的潜力。目前笔者实验室正开展这两株乳酸菌作为益生菌应用于斜带石斑鱼的试验, 相关结果将另外报道。

参 考 文 献

- 王新安, 马爱军, 陈超等, 2008. 七带石斑鱼(*Epinephelus septemfasciatus*)两个野生群体形态差异分析. 海洋与湖沼, 39(6): 655—660
- 刘文斌, 尹君, 方星星等, 2007. 3 种益生菌配伍对异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)生长、消化及肠道菌群组成的影响. 海洋与湖沼, 38(1): 29—35
- 吴惠芬, 毛胜勇, 姚文等, 2005. 猪源乳酸菌产酸及其抑菌特性研究. 微生物学通报, 32(1): 81—86
- 张艾青, 刘书亮, 詹莉等, 2007. 产广谱细菌素乳酸菌的筛选. 中国酿造, 167: 45—48
- 侯运华, 孔健, 郝运伟等, 2002. 一株乳酸菌产类细菌素 Enteriocin LK-S1 的初步研究. 山东大学学报(理学版), 37(5): 463—470
- 钱存柔, 黄仪秀主编, 1999. 微生物学实验教程. 北京: 北京大学出版社, 176—182
- 黄志坚, 何建国, 2002. 鲑点石斑鱼细菌病原的分离鉴定和致病性. 中山大学学报, 41(5): 64—67
- Arekova M, Laukova A, Skaugen M *et al*, 2007. Isolation and characterization of a new bacteriocin, termed enterocin M, produced by environmental isolate *Enterococcus faecium* AL41. J Ind Microbiol Biotechnol, 34: 533—537
- Bogovic-Matijasic B, Rogelj I, Nes I F *et al*, 1998. Isolation and characterization of two bacteriocins of *Lactobacillus acidophilus* LF221. Appl Microbiol Biotechnol, 49: 606—612
- Bromberg R, Moreno I, Delboni R R *et al*, 2005. Characteristics of the bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. cremoris CTC 204 and the effect of this compound on the mesophilic bacteria associated with raw beef. World J Microbiol Biotech, 21: 351—358
- Cai Y, Benno Y, Nakase T *et al*, 1998. Specific probiotic characterization of *Weissella hellenica* DS-12 isolated from flounder intestine. J Gen Appl Microbiol, 44(5): 311—316
- Campos C A, Rodriguez O, Calo-Mata P *et al*, 2006. Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). Food Res Int, 39: 356—364
- Chen Y S, Yanagida F, 2006. Characteristics and effects of temperature and surfactants on bacteriocin-like inhibitory substance production of soil-isolated *Lactobacillus animalis* C060203. Curr Microbiol, 53: 384—387
- Dimov S G, 2007. A novel bacteriocin-like substance produced by *Enterococcus faecium* 3587. Curr Microbiol, 55: 323—327
- Juven B J, Weisslowicz H, Harel S, 1988. Detection of hydrogen peroxide produced by meat lactic starter cultures. J Appl Bacteriol, 65: 357—360
- Ocana V S, Pesce de Ruiz Holgado A A, Nader-Macias M E, 1999. Characterization of a bacteriocin-like substance produced by a Vaginal *Lactobacillus salivarius* Strain. Appl Environ Microbiol, 65(12): 5631—5635
- Panigrahi A, Kiron V, Puangkaew J *et al*, 2005. The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture, 243: 241—254
- Sugita H, Ohta K, Kuruma A *et al*, 2007. An antibacterial effect of *Lactococcus lactis* isolated from the intestinal tract of the Amur catfish, *Silurus asotus* Linnaeus. Aquacult Res, 38: 1002—1004
- Tagg J R, Dajani A S, Wannamaker L W, 1976. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. Bacteriol Rev, 40: 722—756
- Vazquez J A, Gonzalez M P, Murado M A, 2005. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. Aquaculture, 245: 149—161

ANTAGONISTIC PROPERTY OF LACTIC ACID BACTERIA MM1 AND MM4 ISOLATED FROM THE INTESTINE OF GROUPER *EPINEPHELUS COIOIDES*

YANG Hong-Ling¹, SUN Yun-Zhang^{1,2}, MA Ru-Long¹, SONG Kai^{1,2}, WANG Kun¹, LIN Wen-Yan^{1,2}

(1. The Key Laboratory of Science and Technology for Aquaculture and Food Safety, Fisheries College, Jimei University, Xiamen, 361021; 2. Xiamen Key Laboratory of Feed Detection and Safety Evaluation, Fisheries College, Jimei University, Xiamen, 361021)

Abstract Lactic acid bacteria can produce inhibitory substances, such as lactic acid, hydrogen peroxide, bacteriocin and bacteriocin-like substance, and therefore can be used as probiotics to modulate the composition of gut microbiota and maintain the health of the host. The most rapid and experimentally simplest means for evaluating potential probiotic effects was to determine the inhibitory activity of the cell-free culture of lactic acid bacteria on pathogenic bacteria. In this study, two strains of lactic acid bacteria, MM1 and MM4, were isolated from the intestine of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). Lactic acid production and antibacterial activity of two strains were studied *in vitro*. The results showed that MM1 exhibited more rapid production of lactic acid than MM4; and the amount of lactic acid produced by MM1 was significantly larger than that by MM4 in the whole incubation period ($P < 0.05$), but the pH values in the cultures of two strains were similar. MM1 and MM4 exhibited strong inhibitory activity against the pathogenic gram-negative *Vibrio metschnikovi* and *V. harveyi*, and gram-positive *Staphylococcus aureus*. However, lactic acid did not contribute to the inhibitory activity of the two strains. After 2 h of treatment with catalase, the inhibitory activity of MM1 and MM4 against *V. metschnikovi* and *V. harveyi* decreased significantly ($P < 0.05$), while the inhibitory activity against *S. aureus* was only affected slightly, suggesting, in addition to hydrogen peroxide, other inhibitory substances might be produced by the two strains. After 15min of heat treatments at 60 °C, 80 °C and 100 °C, the residual inhibitory activity of MM1 and MM4 were above 86.0%, 60.2% and 42.9%, respectively, indicating the inhibitory substances secreted by the two strains were heat stable. The residual inhibition activity of MM1 and MM4 were more than 70.0% after being treated with pepsin, trypsin and protease K, revealing that the inhibitory substances secreted by the two strains were partially sensitive to protease. Therefore, the inhibitory substances might be bacteriocin-like as they were heat stable and partially sensitive to protease, and could strongly inhibit both gram-negative and gram-positive pathogens. In summary, MM1 and MM4 can produce hydrogen peroxide and bacteriocin-like substances, and have showed strong inhibitory activity against gram-negative and gram-positive pathogens, suggesting that the two stains might have the potential to function as probiotics in aquaculture.

Key words *Epinephelus coioides*, Lactic acid bacteria, Antagonistic property, Hydrogen peroxide, Bacteriocin-like substance