

文章编号: 1004 - 7271(2008)03 - 0344 - 06

鱼源乳酸菌的抑菌特性研究

杨红玲¹, 孙云章^{1,2}, 叶继丹^{1,2}, 常建波^{1,2}, 陈政强¹

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

摘要:采用体外试验研究了3株从斜带石斑鱼仔鱼体内分离的乳酸菌其产酸能力及抑菌特性。结果表明:菌株EA-1和Y1B-3产乳酸的速度和pH值下降速度较快,培养后期乳酸含量显著高于Y4-2($P < 0.05$)。3株乳酸菌对致病性哈维氏弧菌和溶藻弧菌均有不同程度的抑制作用,但乳酸对三株乳酸菌的抑菌活性没有影响,提示3株乳酸菌均能产生乳酸以外的抑菌物质。三株乳酸菌的抑菌物质具有一定的热稳定性,经60℃和80℃热处理后保留70%以上的抑菌活性,但经100℃高温处理失去抑菌活性。3株乳酸菌产生的抑菌物质对胰蛋白酶敏感,在偏中性条件下抑菌活性较高。

关键词:乳酸菌; 抑菌特性; 乳酸; 胰蛋白酶

中图分类号: S 917.1 文献标识码: A

The antagonistic property of lactic acid bacteria derived from Orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) larvae

YANG Hong-ling¹, SUN Yun-zhang^{1,2}, YE Ji-dan^{1,2}, CHANG Jian-bo^{1,2}, CHEN Zheng-qiang¹

(1. The Key Laboratory of Science and Technology for Aquaculture and Food Safety,
Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Xiamen Key Laboratory of Feed Detection and Safety Evaluation, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: Three strains of lactic acid bacteria, Y4-2, EA-1 and Y1B-3, were isolated from orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) larvae. Lactic acid production and antagonistic property of three strains were studied *in vitro*. Results showed that EA-1 and Y1B-3 exhibited more rapid production of lactic acid and the amount of lactic acid were higher significantly than that of Y4-2 in the late fermentation period ($P < 0.05$). Consequently, pH in the culture of EA-1 and Y1B-3 decreased faster than that of Y4-2. Culture supernatants of the three strains showed different degrees of antagonistic activity on the pathogenic *Vibrio harveyi* and *Vibrio alginolyticus*. However, lactic acid had no effect on the inhibition action of the three strains, suggesting that the bacteria produced other inhibitory substances apart from lactic acid. The inhibition effects of cultures supernatant were above 70% after 15 min of heat treatment at 60℃ or 80℃, but lost their inhibition effects after 100℃ treatment. The inhibition substances of three strains were susceptible to trypsin and showed higher antagonistic activity at near neutral condition.

Key words: lactic acid bacteria; antagonistic property; lactic acid; trypsin

收稿日期: 2007-09-03

基金项目: 国家自然科学基金(30600461); 集美大学科研基金(C60616)

作者简介: 杨红玲(1976-), 女, 湖北石首人, 硕士, 助教, 主要从事水产微生物方面的研究。E-mail: honglingyang@sina.com

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

石斑鱼是近年人工育苗成功的一类名贵优良的海水养殖品种,在我国东南沿海已有较大规模的养殖。人工养殖过程中,引起石斑鱼高死亡率的各种细菌性疾病,尤其是弧菌病是影响生产的棘手问题^[1-2]。目前生产中多使用各种抗菌药物来预防和治疗鱼类的细菌性疾病,而抗菌药物的大量使用带来的药物残留和耐药菌株等负面效应引起了学术界和消费者的高度关注,为此,国内外科学家都致力于各种抗菌药物替代品的研究。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。但是,鱼用益生菌的作用效果并不稳定,其中一个很重要的原因可能是益生菌的选择不当,许多益生菌并非分离自鱼类消化道,而是来自于环境或恒温动物。这些益生菌往往因为不能在鱼类消化道定植或定植的时间太短,难以发挥其益生作用^[3-4]。因此,许多学者认为理想的益生菌菌株最好来自动物自身胃肠道^[3,5]。本文所用3株乳酸菌均分离自斜带石斑鱼仔鱼体内,通过研究这3株乳酸菌的抑菌能力及其所分泌的抑菌物质特性,为这些乳酸菌菌株作为益生菌在石斑鱼养殖中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌种

乳酸菌 EA-1、Y1B-3 和 Y4-2 均由本实验室分离自斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 仔鱼体内。指示菌为致病性哈维氏弧菌和溶藻弧菌,由本校水产学院水产动物病害实验室鄢庆枇副教授惠赠。乳酸菌培养用 MRS 培养基,指示菌培养和双碟制备用 2216E 培养基。

1.2 产乳酸分析试验

3 株乳酸菌经 MRS 液体培养基中培养 48 h 活化后接种到新鲜的 MRS 液体培养基,每个菌株设 3 个重复,28 ℃ 静置培养。培养一定时间后,测定培养基的 pH 值和乳酸含量。乳酸含量的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:新鲜乳酸菌培养液用无菌注射器接种于 MRS 液体培养基中,28 ℃ 静置培养 72 h,离心(4 000 r/min, 30 min)后取上清液,并测定其 pH 值。上清液通过管碟法进行抑菌试验,测定抑菌圈直径^[6]。

排除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 3 菌株培养上清液分别相同的 pH 值,作为对照,分别测定乳酸菌 72 h 培养上清液和对照液的抑菌圈直径。

1.4 抑菌物质的热稳定性试验

同上获得的 3 株乳酸菌上清液分别于 60 ℃、80 ℃、100 ℃ 加热处理 15 min,然后测定其抑菌圈大小,以未经加热处理的乳酸菌上清液为对照。

1.5 蛋白酶对抑菌活性的影响

3 株乳酸菌上清液中分别加入胃蛋白酶或胰蛋白酶(1 mg·mL⁻¹),于 28 ℃ 水浴中温育 2 h 后取出,测定其抑菌圈大小。对照为未经蛋白酶处理的乳酸菌上清液。

1.6 酸对抑菌活性的影响

用 1 mol·L⁻¹ 的 NaOH 和 HCl 溶液将 3 株乳酸菌上清液 pH 值调为 3.0、4.0、5.0、6.0 和 7.0,然后用于抑菌试验,测定乳酸菌上清液在不同 pH 值条件下的抑菌圈大小。

1.7 数据处理

实验数据均为 3 个重复的平均值,数据经 Microsoft Excel 初步整理后,利用 SPSS 11.5 单因子方差分析中 Duncan 法进行统计分析。

2 结果

2.1 pH 值和乳酸的测定

3 株乳酸菌培养液的 pH 值随时间变化见图 1(a), pH 值随培养时间延长呈下降趋势, Y1B-3 和 EA-1 菌株培养液的 pH 值下降速度较快, 终末 pH 值较低; Y4-2 菌株培养液的 pH 值下降速度较慢, 终末 pH 值较高。由图 1(b) 可知, 3 菌株培养液的乳酸产量随培养时间延长呈上升趋势, Y1B-3 和 EA-1 菌株培养液的乳酸产量在 96 h 达到最高, 此后随培养时间延长而增长缓慢甚至下降。可能是由于培养过程中乳酸菌的衰老, 生长能力下降, 继而出现所产生的乳酸为乳酸菌本身代谢所利用, 乳酸含量下降。培养后期(96 h 和 120 h) Y1B-3 和 EA-1 产生的乳酸显著高于 Y4-2 ($P < 0.05$)。

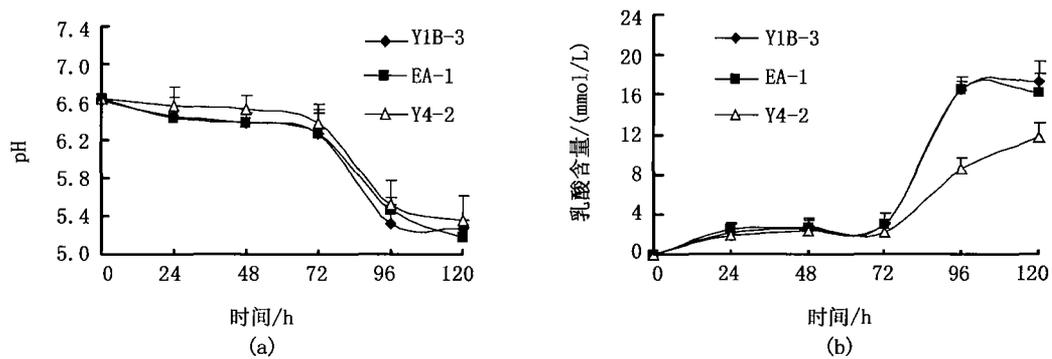


图 1 3 株乳酸菌不同培养时间 pH(a) 和乳酸含量(b) 的变化

Fig. 1 Variation of pH value(a) and lactic acid concentration(b) during different fermentation periods

2.2 乳酸菌培养上清液抑菌活性

由表 1 可知, 3 株乳酸菌对哈维氏弧菌和溶藻弧菌均能产生一定的抑制作用, 抑菌圈直径均在 10 mm 以上。Y1B-3 对哈维氏弧菌的抑菌圈直径显著高于 Y4-2 ($P < 0.05$), 提示 Y1B-3 对哈维氏弧菌的抑菌效果优于 Y4-2, 而 EA-1 和 Y4-2 对哈维氏弧菌的抑菌效果差异不显著。EA-1 和 Y4-2 对溶藻弧菌的抑菌圈直径显著高于 Y1B-3 ($P < 0.05$), 提示 EA-1 和 Y4-2 对溶藻弧菌的抑菌效果优于 Y1B-3。

表 1 乳酸菌上清液抑菌圈直径

Tab. 1 Inhibition zone of culture supernatant of lactic acid bacteria

乳酸菌菌株	Y1B-3	EA-1	Y4-2
哈维氏弧菌	16.0 ± 2.0 ^a	11.3 ± 3.5 ^{ab}	10.7 ± 1.1 ^b
溶藻弧菌	10.3 ± 0.6 ^b	13.3 ± 0.6 ^a	12.3 ± 0.5 ^a

注: 同行肩列字母不同者差异显著 ($P < 0.05$)

2.3 排除酸对乳酸菌抑菌效果的影响

由表 2 可见, 3 株乳酸菌对两株致病性弧菌均具有一定的抑制作用, 而各对照组(用乳酸调 MRS 液体培养基 pH 值至与培养上清液相同)均没有对哈维氏弧菌和溶藻弧菌产生抑制作用。由此可知, 3 株乳酸菌产生的抑菌物质中, 乳酸基本不起作用, 起抑菌作用的应该是其它物质, 下文对三株乳酸菌产生的抑菌物质性质进行了初步探讨。

表 2 排除酸对乳酸菌抑菌效果的影响

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

mm

乳酸菌菌株		Y1B-3	EA-1	Y4-2
哈维氏弧菌	原液	16.0 ± 2.0 ^a	11.3 ± 3.5 ^{ab}	10.7 ± 1.1 ^b
	对照	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
溶藻弧菌	原液	10.3 ± 0.6 ^b	13.3 ± 0.6 ^a	12.3 ± 0.5 ^a
	对照	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

注:同行肩列字母不同者差异显著($P < 0.05$)

2.4 抑菌物质的热稳定性

由表 3 可见,经 60 °C、80 °C、100 °C 加热处理 15 min 后,3 株乳酸菌的抑菌活性有不同程度的下降。经 60 °C、80 °C 处理后, Y1B-3 对哈维氏弧菌和溶藻弧菌的抑制活性显著下降($P < 0.05$),但仍保留有 70% 以上的抑菌活性;EA-1 和 Y4-2 对哈维氏弧菌的抑菌效果基本不变,对溶藻弧菌的抑菌效果显著下降($P < 0.05$),但仍保留有 70% 以上的抑菌活性。经 100 °C 处理后 3 株菌的抑菌效果完全丧失。提示 3 株菌产生的抑菌物质具有一定的热稳定性,60 °C 和 80 °C 处理 15 min 能保留大部分的抑菌活性,但均不能耐受 100 °C 以上的高温。

表 3 不同温度处理乳酸菌的抑菌圈直径

Tab. 3 Inhibition zone of lactic acid bacteria after different temperature treatment

mm

乳酸菌菌株		Y1B-3	EA-1	Y4-2
哈维氏弧菌	对照	12.3 ± 0.6 ^a	11.3 ± 1.5 ^a	10.3 ± 0.6 ^a
	60 °C	9.2 ± 0.8 ^b	11.7 ± 1.5 ^a	11.3 ± 1.5 ^a
	80 °C	9.7 ± 0.6 ^b	11.3 ± 1.2 ^a	10.7 ± 0.6 ^a
	100 °C	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.0 ^b
溶藻弧菌	对照	10.0 ± 0.5 ^a	11.8 ± 0.3 ^a	10.8 ± 0.8 ^a
	60 °C	8.8 ± 0.3 ^b	8.7 ± 0.6 ^b	8.3 ± 0.6 ^b
	80 °C	7.3 ± 0.6 ^c	7.7 ± 1.2 ^b	7.5 ± 0.5 ^b
	100 °C	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^c

注:同一乳酸菌株同一指示菌同列数据肩标字母不同者差异显著($P < 0.05$)

2.5 抑菌物质的蛋白酶敏感性

由表 4 可见,经胃蛋白酶处理后, Y1B-3 和 EA-1 抑菌活性没有明显下降,仅有 Y4-2 对溶藻弧菌的抑菌效果显著下降($P < 0.05$),且保留有 80% 以上的抑菌活性,说明这 3 株乳酸菌产生的抑菌物质对胃蛋白酶不敏感。经胰蛋白酶处理后, Y1B-3 和 EA-1 对哈维氏弧菌的抑制效果显著下降($P < 0.05$), Y4-2 的抑菌效果完全消失,说明 3 株乳酸菌产生的抑菌物质对胰蛋白酶敏感。

表 4 蛋白酶对乳酸菌抑菌圈直径的影响

Tab. 4 Effect of protease on inhibition zone of lactic acid bacteria

mm

乳酸菌菌株		Y1B-3	EA-1	Y4-2
哈维氏弧菌	对照	12.3 ± 0.6 ^a	11.3 ± 1.5 ^a	10.3 ± 0.6 ^a
	胃蛋白酶	11.3 ± 1.5 ^a	11.3 ± 0.6 ^a	11.0 ± 1.7 ^a
	胰蛋白酶	9.0 ± 1.0 ^b	9.3 ± 0.6 ^b	0.0 ± 0.0 ^b
溶藻弧菌	对照	10.0 ± 0.5	11.8 ± 0.3	10.8 ± 0.8 ^a
	胃蛋白酶	8.7 ± 0.6	11.7 ± 0.6	8.2 ± 0.3 ^b
	胰蛋白酶	9.3 ± 1.5	11.0 ± 1.0	0.0 ± 0.0 ^c

注:同一乳酸菌株同一指示菌同列数据肩标字母不同者差异显著($P < 0.05$)

2.6 酸对抑菌物质抑菌活性的影响

由表 5 可见,各乳酸菌株对哈维氏弧菌和溶藻弧菌的抑制活性随 pH 值的上升呈上升趋势。其中,

pH 值为 6 和 7 时 Y4-2 对溶藻弧菌的抑菌圈直径显著高于 pH 值为 3、4 和 5 的抑菌圈直径 ($P < 0.05$), pH 值为 6 时 Y4-2 对哈维氏弧菌的抑菌圈直径显著高于 pH 值为 3 的抑菌圈直径 ($P < 0.05$), pH 值为 7 时 EA-1 对溶藻弧菌的抑菌圈直径显著高于 pH 值为 3 和 4 的抑菌圈直径 ($P < 0.05$)。由此可见,偏中性 pH 值条件下乳酸菌培养上清液抑菌效果较好,提示 3 株乳酸菌产生的抑菌物质在偏中性环境下的抑菌活性较强。

表 5 不同 pH 值条件下乳酸菌的抑菌圈直径
Tab. 5 Inhibition zone of lactic acid bacteria at different pH values

乳酸菌菌株		Y1B-3	EA-1	Y4-2	
哈维氏弧菌	pH 3	9.7 ± 2.1	11.0 ± 1.0	8.2 ± 0.3 ^b	
	pH 4	9.0 ± 1.0	11.3 ± 0.6	8.3 ± 0.6 ^{ab}	
	pH 5	10.3 ± 0.6	13.3 ± 1.5	11.0 ± 2.0 ^{ab}	
	pH 6	13.0 ± 4.0	12.7 ± 0.6	11.3 ± 2.5 ^a	
	pH 7	13.0 ± 4.5	13.3 ± 1.5	11.0 ± 1.0 ^{ab}	
	溶藻弧菌	pH 3	8.2 ± 0.3	8.3 ± 0.6 ^b	8.2 ± 0.3 ^b
		pH 4	8.7 ± 0.6	8.2 ± 0.3 ^b	8.3 ± 0.6 ^b
pH 5		12.3 ± 2.5	11.7 ± 0.6 ^{ab}	8.0 ± 0.0 ^b	
pH 6		10.7 ± 1.5	12.0 ± 4.0 ^{ab}	12.0 ± 3.0 ^a	
pH 7		10.4 ± 2.6	14.3 ± 4.9 ^a	13.7 ± 2.1 ^a	

注:同一乳酸菌株同一指示菌同列数据肩标字母不同者差异显著 ($P < 0.05$)

3 讨论

饵料或水体中的乳酸菌进入鱼消化道后定植于肠道并大量繁殖,与消化道其它有益菌形成优势菌群,抑制致病菌的增殖^[5]。但是,不同乳酸菌菌株产生的抑菌物质有很大差异。Vazquez 等研究了 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和乙酸等有机酸抑制病原菌^[7]。Campos 等报道,多株分离自大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 的乳酸菌均通过产生细菌素抑制病原菌的生长,而非通过乳酸或乙酸等有机酸^[8]。但是,最近的研究表明,一株从日本鲶肠道内分离的乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*) 产生的抑菌物质主要为过氧化氢^[9]。本试验所用 3 株乳酸菌均分离自斜带石斑鱼仔鱼体内,对致病性哈维氏弧菌和溶藻弧菌均有不同程度的抑制作用,且能产生一定量的乳酸。但体外抑菌试验表明,乳酸对哈维氏弧菌和溶藻弧菌没有表现出抑制作用。因此,3 株乳酸菌均能产生非乳酸的抑菌物质,本研究对 3 株乳酸菌产生的抑菌物质特性进行了初步研究。

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^[10-11]。张辉华等报道,6 株鸡源乳酸菌经 100 °C 处理 15 min 后对鸡大肠杆菌、鸡白痢沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的抑菌效果不变^[10]。吴惠芬等报道,5 株猪源乳酸菌培养上清液经 70 °C/30 min、100 °C/30 min 和 120 °C/15 min 加热处理后,其抑菌效果均为处理前的 92% 以上^[11]。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。本研究表明,3 株分离自石斑鱼仔鱼体内的乳酸菌培养上清液经 60 °C 和 80 °C 分别加热处理 15 min 后,仍保留有 70% 以上的抑菌活性,但 100 °C 处理 15 min 后抑菌活性基本丧失,这说明乳酸菌产生的抑菌活性物质具有一定的热稳定性,但不能耐受 100 °C 的高温。

本研究表明,经胰蛋白酶处理后,3 株乳酸菌培养液的抑菌活性明显下降,其中, Y4-2 的抑菌活性完全消失, Y1B-3 和 EA-1 对哈维氏弧菌的抑制效果显著下降 ($P < 0.05$)。提示 3 株乳酸菌产生的抑菌物质对胰蛋白酶敏感。已有文献报道一些乳酸菌分泌的多肽类细菌素具有热稳定性和蛋白酶敏感性^[12-13]。但是,本文的这 3 株乳酸菌产生的抑菌物质是否为多肽类细菌素还有待进一步研究。据报道,多数乳酸菌分泌的细菌素的抑菌活性随 pH 值的升高呈下降趋势,但由 71 个氨基酸残基组成的多肽类细菌素 Piscicolin 61 的抑菌活性随 pH 值的升高呈上升趋势^[14-15]。本试验中各乳酸菌抑菌物质对致病菌的抑制活性随 pH 值的升高呈上升趋势,在偏中性环境下的抑菌活性较高。因此,本研究中 3 株

乳酸菌产生的抑菌物质是否为细菌素 Piscicolin 61 类似的物质,还有待今后进一步进行抑菌物质的分离、鉴定和理化性质研究。

综上所述,3 株鱼源乳酸菌对致病性弧菌均具有一定的抑菌效果,但乳酸不是主要的抑菌物质。3 株乳酸菌产生的抑菌物质具有一定的热稳定性、对胰蛋白酶敏感、在偏中性环境抑菌活性较强的特性,可能为细菌素类物质。

参考文献:

- [1] 黄志坚,何建国. 鲑点石斑鱼细菌病原的分离鉴定和致病性[J]. 中山大学学报,2002,41(5):64-67.
- [2] 黄瑞芬. 斜带石斑鱼溶藻弧菌病的研究[J]. 水产科学,2005,24(6):1-3.
- [3] Verschuere L, Rombout G, Sorgeloos P, et al. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2000,64(4):655-671.
- [4] Gatesoupe F J. The use of probiotics in aquaculture[J]. Aquaculture,1999,180:147-165.
- [5] Ringo E, Olsen R E, Mayhew T. Electron microscopy of the intestinal microflora of fish[J]. Aquaculture,2003,227:395-415.
- [6] 钱存柔,黄仪秀. 微生物学实验教程[M]. 北京:北京大学出版社,1999,176-182.
- [7] Vazquez J A, Gonzalez M P, Murado M A. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish[J]. Aquaculture, 2005,245:149-161.
- [8] Campos C A, Rodriguez O, Calo-Mata P, et al. Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*) [J]. Food Res Int,2006,39:356-364.
- [9] Suigita H, Ohta K, Kuruma A, et al. An antibacterial affect of *Lactococcus lactis* isolated from the intestinal tract of the Amur catfish, *Silurus asotus* Linnaeus[J]. Aquaculture Res,2007,38:1002-1004.
- [10] 张辉华,曹永长,毕英佐,等. 6 株乳酸菌体外抑菌实验[J]. 中国兽医杂志,2001,37(7):8-10.
- [11] 吴惠芬,毛胜勇,姚文,等. 猪源乳酸菌产酸及其抑菌特性研究[J]. 微生物学通报,2005,32(1):81-86.
- [12] 陈世琼,李平兰,张麓. 猪源产细菌素乳酸菌的抑菌产物特性研究[J]. 中国微生态杂志,2001,13(4):213-215.
- [13] 田召芳,常维山,唐珂心. 产细菌素乳酸菌的筛选及体外抑菌试验[J]. 中国微生态杂志,2003,15(3):87-88.
- [14] Holck A L, Axelsson L, Schillinger U. Purification and cloning of piscicolin 61, a bacteriocin from *Carnobacterium piscicola* LV61[J]. Curr Microbiol,1994,29(2):63-68.
- [15] Blom H, Katla T, Hagen B F, et al. A model assay to demonstrate how intrinsic factors affect diffusion of bacteriocins[J]. Int J Food Microbiol,1997,38:103-109.