

研究报告

乳杆菌代谢产物对化脓性链球菌的抑制作用

苏本宪 艾静 朱德全 孟祥晨*

(东北农业大学 乳品科学教育部重点实验室 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:【目的】分析乳杆菌代谢产物对化脓性链球菌的抑制作用。【方法】基于双层平板打孔法,通过测量抑菌圈大小来检测乳杆菌代谢产物对化脓性链球菌的抑菌作用;然后分别采用高效液相色谱法和 4-氨酰安替比林法检测乳杆菌代谢产物中的有机酸和 H_2O_2 含量;最后,检测乳酸、乙酸和 H_2O_2 对化脓性链球菌的最小抑菌浓度(MIC)、最小杀菌浓度(MBC)。【结果】对化脓性链球菌的抑菌效果以植物乳杆菌 KLDS1.0667 最好,副干酪乳杆菌 KLDS1.0342-1 次之,瑞士乳杆菌 KLDS1.0203 抑菌效果最差;乳酸和乙酸产量 $KLDS1.0667 > KLDS1.0342-1 > KLDS1.0203$; H_2O_2 产量 $KLDS1.0203 > KLDS1.0667 > KLDS1.0342-1$ 。在抑菌试验中,乳杆菌的发酵上清液经去除 H_2O_2 处理后抑菌圈直径都减小;将发酵上清液的 pH 调至 7.0 后均检测不到抑菌圈。结果表明,乳杆菌代谢产物中对化脓性链球菌起抑制作用的主要物质为有机酸和 H_2O_2 ,其中乳酸是产生抑菌作用的最主要物质。乳酸、乙酸和 H_2O_2 对化脓性链球菌的最小抑菌浓度(MIC)分别为 1.28、0.64 和 0.008 g/L,对化脓性链球菌的最小杀菌浓度(MBC)分别为 5.12、2.56 和 0.032 g/L。【结论】乳杆菌可利用其代谢产物对化脓性链球菌产生抑制作用,主要抑菌物质为有机酸和 H_2O_2 。

关键词: 乳杆菌, 化脓性链球菌, 抑菌, 有机酸, H_2O_2

Inhibition of *Streptococcus pyogenes* by lactobacilli metabolites

SU Ben-Xian AI Jing ZHU De-Quan MENG Xiang-Chen*

(Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, Northeast Agricultural University,
Harbin, Heilongjiang 150030, China)

Abstract: [Objective] Inhibition of lactobacilli metabolites on *Streptococcus pyogenes* was analyzed. [Methods] Three lactobacilli strains was grown in MRS broth overnight, then the culture supernatants were collected and evaluated for inhibitory activity. Inhibition was determined by measuring inhibition zone diameters with double plate punching method. Then HPLC and 4-Aminoantipyrine were used to determine the concentration of organic acids and H_2O_2 respectively in lactobacilli metabolites. Finally, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of lactic acid, acetic acid and H_2O_2 on *S. pyogenes* were determined. [Results] *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0667 had the strongest inhibitory effect among the three strains, followed by *L. paracasei* KLDS1.0342-1 and *L. helveticus* KLDS1.0203. *L. plantarum* KLDS1.0667 had the highest production of lactic acid and acetic acid, followed by

*通讯作者: Tel: 86-451-55191813; ✉: xchmeng@163.com

收稿日期: 2013-12-17; 接受日期: 2014-02-12; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-02-18

KLDS1.0342-1 and KLDS1.0203. However, *L. helveticus* KLDS1.0203 had the highest production of H_2O_2 , followed by KLDS1.0667 and KLDS1.0342-1. The diameters of inhibition zone all decreased after elimination of H_2O_2 in lactobacilli supernatants, and no obvious inhibition zones were detected when the pH of lactobacilli supernatants was adjusted to 7.0. The results indicated that organic acids and H_2O_2 were the main inhibiting substances in lactobacilli metabolites, further lactic acid was the most important inhibiting substance. MIC of lactic acid, acetic acid and H_2O_2 on *Streptococcus pyogenes* were 1.28, 0.64 and 0.008 g/L, respectively. MBC of lactic acid, acetic acid and H_2O_2 on *Streptococcus pyogenes* were 5.12, 2.56 and 0.032 g/L, respectively. **[Conclusion]** The metabolites of lactobacilli could inhibit the growth of *Streptococcus pyogenes*, and the organic acids and H_2O_2 were the main inhibiting substances.

Keywords: Lactobacilli, *Streptococcus pyogenes*, Inhibition, Organic acid, H_2O_2

乳酸菌(Lactic acid bacteria, LAB)是指发酵糖类,主要产物为乳酸的一类无芽孢、革兰氏阳性细菌的总称。凡是能从葡萄糖或乳糖的发酵过程中产生乳酸的细菌统称为乳酸菌^[1-2]。它们广泛存在于人和禽畜的肠道、食品及少数临床样品中。乳杆菌属(*Lactobacillus*)是乳酸菌中最大的一个属,也是在食品工业中应用最广泛的一个属。作为益生菌,乳杆菌也以其优良的益生作用受到广泛的关注^[3-4]。许多乳杆菌代谢可以产生一些天然抑菌物质^[5-7],如有机酸、细菌素、过氧化氢、双乙酰等。乳杆菌的代谢产物对革兰氏阳性菌(枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌)、革兰氏阴性菌(大肠杆菌和沙门氏菌)均有较强的抑制作用^[5-6]。目前,已有部分研究报道了乳杆菌产生的乳酸对化脓性链球菌的抑制作用^[8]。

化脓性链球菌 *Streptococcus pyogenes* (Group A streptococcus, GAS)是一种重要的革兰氏阳性致病菌^[8-9],一般出现在人体的皮肤和喉咙部位,是人类细菌感染中最重要的病原菌之一。可引起急性咽喉炎、急性扁桃体炎,也可导致肺部感染、猩红热、皮肤软组织感染,并可导致全身性感染。该菌也是变态反应性疾病——风湿热和急性肾小球肾炎的间接致病菌。化脓性链球菌引起的感染占链球菌类感染的90%,王传清等对2000–2006年复旦大学附属儿科医院呼吸道感染患儿进行研究,发现化脓性链球菌为主要致病菌,且对抗生素类药物的耐受性较高^[10]。

由于目前治疗化脓性链球菌感染的药物多为

抗生素类药物,如青霉素、红霉素等,很容易使致病菌产生耐药性而对人体健康产生更大的危害。应用乳杆菌及其代谢产物治疗化脓性链球菌的药品还很少见,因此本研究的主要目的是分析乳杆菌及其代谢产物对化脓性链球菌的抑制作用,为采用乳杆菌活菌制剂及其代谢产物治疗细菌感染类疾病提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料和设备

1.1.1 材料: 植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) KLDS1.0667、副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*) KLDS1.0342-1、瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*) KLDS1.0203,由东北农业大学菌种库提供;化脓性链球菌 *Streptococcus pyogenes* (Group A streptococcus, GAS) ATCC19615,购于上海复祥生物科技有限公司。

1.1.2 试剂和仪器: 各种乳酸标准品、乙酸标准品, Sigma公司;30% H_2O_2 溶液,哈尔滨赛莱博科技有限公司;水饱和酚,北京索莱宝生物有限公司;辣根过氧化物酶、4-氨酰安替比林,上海源叶生物科技有限公司;MRS (De man, rogosa and sharpe medium)培养基、BHI (Brian heart infusion)培养基、BHIA (Brian heart infusion agar)培养基,青岛海博生物技术有限公司。各种规格 Eppendorf 移液器,德国艾本德股份有限公司;岛津 UV-2401PC 紫外分光光度计,日本岛津有限公司;WATERS2695 高效液相色谱仪,美国安捷伦公司;GL-21M 高速冷冻离

心机, 上海市离心机械研究所有限公司; Aminex HPX-87H 糖分析 HPLC 色谱柱, 美国伯乐公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株活化与培养: 乳杆菌的活化与培养: 从菌种库中取出冻存管, 取 0.2 mL 菌液加入到 10 mL MRS 液体培养基中^[2], 37 °C 培养 24 h。连续传代 2–3 次后, 4 °C 保存备用。

化脓性链球菌的活化与培养: 按照 ATCC 菌株活化方法, 将原始菌液划线接种于 BHIA 固体培养基上 37 °C 培养 48 h 挑取单菌落接种于 10 mL BHI 液体培养基中, 37 °C 培养 24 h。连续传代 2–3 次后, 4 °C 保存备用。

1.2.2 乳杆菌代谢产物对化脓性链球菌的抑制作用: (1) 乳杆菌发酵上清液的制备及其 pH 测定。活化后的乳杆菌按 1% 的接种量分别接种于 150 mL 的液体 MRS 培养基中, 37 °C 静置培养 24 h, 12 000×g、4 °C 离心 15 min, 收集上清液^[3,6]。取 20 mL 上清液进行 pH 的测定, 剩余上清液用于抑菌实验。

(2) 抑菌实验。首先, 对乳杆菌发酵上清液分别进行如下处理: 1) 取 20 mL 上清液用 0.22 μm 滤膜过滤, 除去菌体及其他杂质, 制得无细胞发酵上清液, 作为样品组 A。2) 取 20 mL 上清液, 用 3 mol/L 的 NaOH 溶液调节发酵上清液的 pH 至 7.0, 中和上清液中的有机酸。然后用 0.22 μm 滤膜过滤, 作为样品组 B。3) 取 20 mL 上清液, 80 °C 水浴 3 h 去除 H₂O₂^[4], 然后用 0.22 μm 滤膜过滤, 作为样品组 C。4) 取 20 mL 上清液, 80 °C 水浴 3 h 去除 H₂O₂ 后, 再用 3 mol/L 的 NaOH 溶液调节发酵上清液的 pH 至 7.0, 然后用 0.22 μm 滤膜过滤, 作为样品组 D。5) 取 20 mL 上清液, 80 °C 水浴 3 h 去除 H₂O₂ 后, 再用 3 mol/L 的 NaOH 溶液调节发酵上清液的 pH 至 7.0, 旋转蒸发至 2 mL, 溶解于 8 mL 的 4 °C 酒精中, 然后 12 000×g、4 °C 离心 15 min, 收集上清液, 再旋转蒸发至 2 mL^[11], 用 0.22 μm 滤膜过滤后, 作为样品组 E。

用上述 5 组样品分别进行抑菌实验, 实验时, 首先将已知菌液浓度的化脓性链球菌菌液稀释到

浓度为 10⁸ CFU/mL (Colony-forming units, CFU; CFU/mL 指每毫升样品中含有的细菌群落总数), 采用双层平板打孔法进行抑菌实验^[12-13]。指示菌的接种量为 1%, 上述 5 组经不同处理的上清液加入量均为 0.08 mL, 下层素琼脂和上层软琼脂的加入量均为 10 mL。

1.2.3 H⁺浓度对抑菌作用的影响: 用 1 mol/L 的 HCl 溶液调节无菌 MRS 液体培养基的 pH 分别为 3.5、4.0、4.5^[14-15], 以化脓性链球菌作为指示菌进行抑菌实验, 测量抑菌圈直径。

1.2.4 乳杆菌在培养过程中抑菌活性、主要有机酸及 H₂O₂ 含量的测定: 活化后的乳杆菌以 1% 接种量接种于 MRS 液体培养基中, 37 °C 静置培养 36 h, 其间每 4 h 取样一次(10 mL), 然后 12 000×g、4 °C 离心 15 min, 收集上清液, 经 0.22 μm 滤膜过滤, 除去菌体及其他杂质后-20 °C 保存备用。所得样品分别进行如下实验。

(1) 抑菌活性的测定。以化脓性链球菌作为指示菌, 采用双层平板打孔法进行抑菌实验, 测量抑菌圈直径。

(2) 主要有机酸含量的测定。用高效液相色谱法测定发酵上清液中主要有机酸含量^[16-17], 条件如下: 色谱柱: Aminex HPX-87H 糖分析 HPLC 色谱柱; 柱温: 65 °C; 流动相: 5 mmol/L 稀硫酸; 流速: 0.5 mL/min; 进样量: 10 μL; 检测器: 示差检测器。

(3) H₂O₂ 含量的测定。首先用高锰酸钾法标定 H₂O₂, 用 Marty-Teyssset 等^[18-19]描述的比色法测定发酵上清液中 H₂O₂ 含量。具体操作有如下改动: 样品用 MRS 培养基稀释 5 倍后再进行测定; 水浴时间为 15 min。实验中需要先测定标准曲线, 再根据标准曲线得乳杆菌发酵上清液中 H₂O₂ 含量。

1.2.5 乳酸、乙酸和 H₂O₂ 最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)的测定: (1) 最小抑菌浓度(MIC)的测定。用液体培养基连续稀释法测定乳酸、乙酸和 H₂O₂ 的最小抑菌浓度 (Minimum inhibition concentration, MIC)。以乳酸为例, 取无菌试管若干并编号, 向 1 号试管中加入 BHI 液体培养基 3.2 mL,

其他试管中加入 2 mL。向 1 号试管中加入 0.8 mL 浓度为 1.28 g/L 的乳酸溶液(无菌), 混匀后取 2 mL 加入 2 号管, 如此连续倍比稀释, 稀释至最后一管时, 混匀后取出 2 mL 弃去。取一无菌试管编号为 0, 加入 2 mL 无菌 BHI 液体培养基, 不加乳酸, 作为对照。然后向各管中加入 2 mL 菌液浓度为 10^6 CFU/mL 的化脓性链球菌菌液, 混匀后 37 °C 静置培养 11 h, 测 OD 值(波长 610 nm)。以乳酸浓度为横坐标, OD 值为纵坐标绘制折线图。折线图中 OD 值骤降的折点所对应的的乳酸浓度即为化脓性链球菌的最小抑菌浓度(MIC)^[20]。

(2) 最小杀菌浓度(MBC)的测定。以乳酸为例, 参照 MIC 的测定方法, 对乳酸进行连续稀释, 每个试管中含有 2 mL 固定乳酸浓度的 BHI 液体培养基, 并设置对照组, 然后向各管中加入 2 mL 活菌数为 10^6 CFU/mL 的化脓性链球菌菌液, 混匀后 37 °C 培养 11 h, 取菌液澄清的样品组稀释涂布, 测活菌数, 计算杀菌率。杀菌率计算公式如下:

杀菌率(%)=(a-b)/a×100

a: 原始菌液(对照组)浓度(5×10^5 CFU/mL);

b: 培养后的菌液(菌液澄清的样品组)浓度。

最小杀菌浓度(Minimal bactericidal concentration, MBC)的确定: 杀菌率大于 90%的最小乳酸浓度, 即为乳酸对化脓性链球菌的最小杀菌浓度 (MBC)^[20-21]。

1.2.6 数据处理与分析: 上述所有实验均重复 3 次,

采用 SPSS 20.0 软件对实验数据进行差异性分析。

2 结果与分析

2.1 乳杆菌代谢产物对化脓性链球菌的抑菌作用

2.1.1 乳杆菌代谢产物经不同处理后的抑菌作用: 乳杆菌 37 °C 静置培养 24 h 后制得的无细胞发酵上清液经不同处理后, 以化脓性链球菌为指示菌进行抑菌实验, 结果如表 1 所示。从表 1 中可以看出, 未经处理的乳杆菌发酵上清液产生的抑菌作用以 KLDS1.0342-1 最强, KLDS1.0667 次之, KLDS1.0203 最小。发酵上清液的 pH 从小到大依次为: KLDS1.0342-1 < KLDS1.0667 < KLDS1.0203, 可以看出, pH 低的发酵上清液抑菌效果强。所以需要进一步的实验来确定 H^+ 浓度是否为产生抑菌作用的主要因素。

发酵上清液经去除 H_2O_2 处理后, 抑菌圈直径都减小。且上清液中主要有机酸的沸点均高于 100 °C (乳酸为 122 °C, 乙酸为 118.3 °C), 溶于水中后在 80 °C 情况下不会挥发, 不会影响抑菌实验结果。说明 3 株乳杆菌的发酵上清液中都存在 H_2O_2 , 并且 H_2O_2 对化脓性链球菌有一定的抑制作用。将发酵上清液的 pH 调至 7.0 后均检测不到抑菌圈, 说明有机酸是产生抑菌作用的主要物质。发酵上清液经去除 H_2O_2 、调 pH 至 7.0 处理后再浓缩 10 倍, 可以检测到直径很小的明显抑菌圈, 说明上清液中除有机酸和 H_2O_2 以外还存在浓度很小的其他抑菌物质。

表 1 乳杆菌发酵上清液的 pH 测定及经不同处理后对化脓性链球菌的抑菌效果 Table 1 Determination of pH of lactobacilli supernatant and its inhibition effect on <i>Streptococcus pyogenes</i> after different treatment						
菌株 Strains	上清液 pH pH of lactobacilli supernatant	抑菌圈直径 Inhibition zone diameters (mm)				
		A	B	C	D	E
KLDS1.0667	3.77±0.01	13.24±0.26	13.18±0.45	—	—	9.13±0.39
KLDS1.0342-1	3.71±0.02	13.62±0.41	13.05±0.15	—	—	9.12±0.34
KLDS1.0203	4.36±0.04	9.64±0.14	9.02±0.22	—	—	7.98±0.16

注: 双层平板打孔的孔径为 7.0±0.2 mm。A: 不作任何处理的上清; B: 去除 H_2O_2 的上清; C: 调 pH 为 7.0 的上清; D: 除 H_2O_2 并调 pH 为 7.0 的上清; E: 除 H_2O_2 并调 pH 为 7.0 后, 浓缩 10 倍的上清。—: 未检测出抑菌圈。

Note: Diameter of double plate punching hole was 7.0±0.2 mm. A: Supernatant with no treatment; B: Supernatant with H_2O_2 elimination; C: Supernatant with pH adjusted; D: Supernatant with H_2O_2 elimination and pH adjustment; E: Supernatant of 10 fold concentration after H_2O_2 elimination and pH adjustment. —: Undetected inhibition zone.

根据实验结果初步推断, 乳杆菌发酵上清液中含有有机酸、 H_2O_2 和浓度很小的其他抑菌物质。其中, 有机酸为主要的抑菌物质, H_2O_2 也具有一定的抑菌作用。

2.1.2 上清液中 H^+ 浓度对抑菌作用的影响: 通过测定乳杆菌发酵上清液(培养 24 h)的 pH 发现, 3 株乳杆菌的 pH 在 3.5–4.5 之间, 所以调节 MRS 液体培养基的 pH 为 3.5、4.0、4.5, 进行抑菌实验, 来确定 H^+ 浓度是否是产生抑菌作用的主要因素。

pH 为 4.0、4.5 的 MRS 液体培养基没有检测到抑菌圈; 而 pH 为 3.5 的 MRS 液体培养基仅检测到了较小的抑菌圈(8.46 mm), 而 KLDS1.0342-1 上清液的 pH 为 3.71, 对指示菌的抑菌圈直径达到 13.62 mm。说明乳杆菌发酵上清液对指示菌的抑制作用并非是 H^+ 所致的低 pH 导致的, 从而排除了 H^+ 浓度的影响。

2.2 乳杆菌在培养过程中发酵上清液的抑菌活性

乳杆菌经 36 h 的培养, 检测发酵上清液的抑菌活性, 结果如图 1 所示。培养 4 h 时, 未检测到抑菌圈。培养 8 h 时, KLDS1.0667、KLDS1.0342-1 能够检测到明显的抑菌圈, 而 KLDS1.0203 仍未检测到抑菌圈, 该菌培养到 16 h 时才检测到明显的抑菌圈。KLDS1.0667 和 KLDS1.0342-1 的抑菌圈在培养 8–20 h 期间不断增大, 20 h 后趋于稳定。

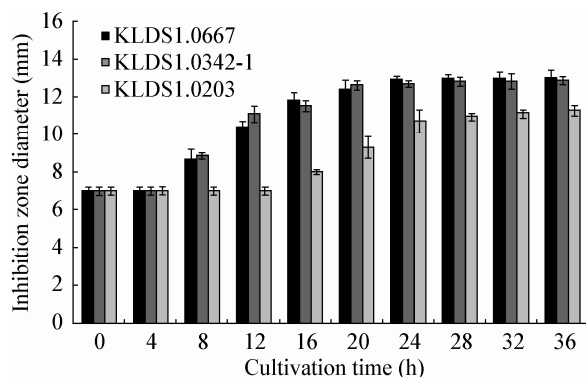


图 1 乳杆菌培养过程中发酵上清液的抑菌活性

Figure 1 Inhibition activity of supernatant in lactobacilli cultivation

注: 双层平板打孔的孔径为 7.0 ± 0.2 mm.

Note: Diameter of double plate punching hole was 7.0 ± 0.2 mm.

KLDS1.0203 的抑菌圈在培养 16–24 h 期间持续增大, 24 h 后趋于稳定。

对 24、28、32、36 h 的抑菌实验数据的差异性分析显示, KLDS1.0667、KLDS1.0342-1 抑菌作用较强, 且差异不显著($P > 0.05$), 其中 KLDS1.0667 抑菌作用最强。KLDS1.0203 的抑菌作用较弱, 与 KLDS1.0667、KLDS1.0342-1 之间的差异显著($P < 0.05$)。

2.3 乳杆菌代谢产物中主要抑菌物质的分析

2.3.1 乳杆菌在培养过程中发酵上清液中有有机酸含量分析: 高效液相色谱(HPLC)法乳酸测定标准曲线为 $y = 71\,707x - 8\,290.4$, $R^2 = 0.997\,9$, 乳酸保留时间为 14.58 min。乳杆菌经 36 h 的培养, 检测发酵上清液中乳酸含量, 结果如图 2A 所示。3 株乳杆菌在培养 0–16 h 期间代谢产生的乳酸增加较快。KLDS1.0667 和 KLDS1.0342-1 在培养 16–24 h 期间的乳酸产量持续增加, 24 h 后趋于稳定。KLDS1.0203 在培养 16–20 h 期间的乳酸产量缓慢增加, 20 h 后趋于稳定。

高效液相色谱(HPLC)法乙酸测定标准曲线为 $y = 71\,906x - 7\,013.4$, $R^2 = 0.999\,9$, 乙酸保留时间为 16.99 min。乳杆菌经 36 h 的培养, 检测发酵上清液中乙酸含量, 结果如图 2B 所示。3 株乳杆菌在培养 0–32 h 期间代谢产生的乙酸有不同程度的增加, 32 h 后趋于稳定。MRS 培养基中有乙酸根的存在, 乳杆菌在培养过程中既会消耗乙酸根, 也会产生乙酸。所以, MRS 培养基中的乙酸根会对乳杆菌的乙酸产量检测结果产生影响, 但总体上能检测出不同乳杆菌乙酸产量的变化趋势

对 24、28、32、36 h 的乳酸、乙酸含量检测实验数据的差异性分析显示, KLDS1.0667 的乳酸产量最大, KLDS1.0667、KLDS1.0342-1 的乳酸产量差异不显著($P > 0.05$)。KLDS1.0203 的乳酸产量最小, 与 KLDS1.0667、KLDS1.0342-1 之间差异显著($P < 0.05$); KLDS1.0667 的乙酸产量最大, KLDS1.0203 的乙酸产量最小, KLDS1.0667 的乙酸产量与 KLDS1.0342-1、KLDS1.0203 之间差异显著($P < 0.05$)。

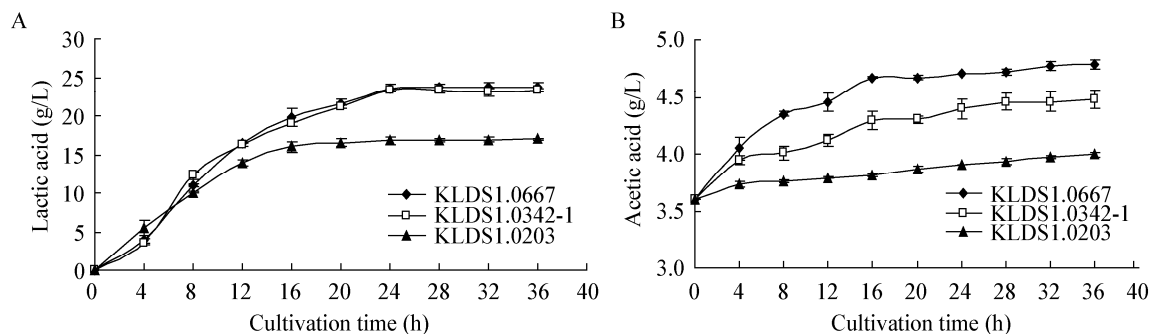


图2 乳杆菌发酵上清液中乳酸(A)和乙酸(B)含量随培养时间的变化趋势图

Figure 2 Change of lactic acid (A) and acetic acid (B) concentration in lactobacilli supernatant

注: 图2B中MRS中乙酸根含量为3.6 g/L.

Note: Acetate concentration in MRS was 3.6 g/L in Figure 2B.

2.3.2 乳杆菌在培养过程中发酵上清液中 H_2O_2 含量的测定: 先用高锰酸钾法标定 H_2O_2 标准溶液的密度为 1.10 g/mL, 然后用比色法测得 H_2O_2 的标准曲线为 $y=1.2434x+0.0051$, $R^2=0.9996$ 。乳杆菌经 36 h 的培养, 检测发酵上清液中 H_2O_2 含量, 结果如图 3 所示。3 株乳杆菌在培养 0–8 h 期间代谢产生的 H_2O_2 有不同程度的增加, 在培养 8–32 h 期间逐渐减少, 32 h 后趋于稳定。这种现象的产生主要有两方面的原因: 一是培养 8 h 后乳杆菌代谢产生的 H_2O_2 量减少; 二是发酵上清液中的 H_2O_2 不断挥发降解, 最终导致乳杆菌在培养 8–32 h 期间的 H_2O_2 含量检测结果不断减小。

对 8、28、32、36 h 的 H_2O_2 含量检测实验数据的差异性分析显示, KLDS1.0203 的 H_2O_2 产量最大, KLDS1.0342-1 的 H_2O_2 产量最小, KLDS1.0667 的 H_2O_2 产量与 KLDS1.0342-1、KLDS1.0203 之间差异显著 ($P<0.05$)。

通过分析 2.2 中的实验数据发现, 乳杆菌发酵上清液中主要的抑菌物质有乳酸、乙酸和 H_2O_2 , 乳酸是决定乳杆菌对化脓性链球菌抑菌作用大小的主要物质。

2.4 乳酸、乙酸和 H_2O_2 最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)的测定

2.4.1 MIC 的测定: 以乳酸、乙酸和 H_2O_2 的浓度

为横坐标, 对应菌液的 OD 值为纵坐标绘制折线图, 结果如图 4 所示。乳酸、乙酸和 H_2O_2 对化脓性链球菌的 MIC 分别为 1.280、0.640 和 0.008 g/L, 对化脓性链球菌的 MIC $H_2O_2<$ 乙酸<乳酸。因此, 在相同浓度的情况下, 对化脓性链球菌的抑菌作用 $H_2O_2>$ 乙酸>乳酸。

2.4.2 MBC 的测定: 对 MBC 的测定结果如表 2 所示, 乳酸、乙酸和 H_2O_2 对化脓性链球菌的 MBC 分别为 5.120、2.560 和 0.032 g/L, 对化脓性链球菌的 MBC $H_2O_2<$ 乙酸<乳酸。因此, 在相同浓度的情况下, 对化脓性链球菌的杀菌作用 $H_2O_2>$ 乙酸>乳酸。

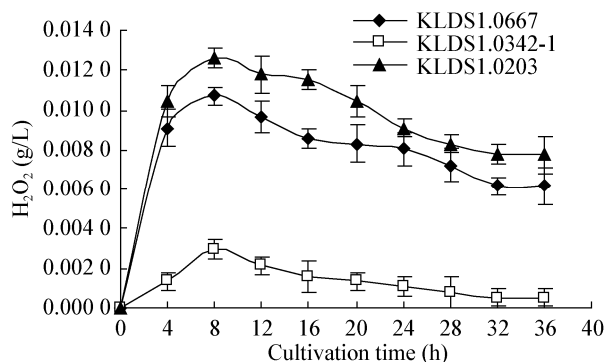


图3 乳杆菌发酵上清液中 H_2O_2 含量的变化趋势图

Figure 3 Change of H_2O_2 concentration in lactobacilli supernatant

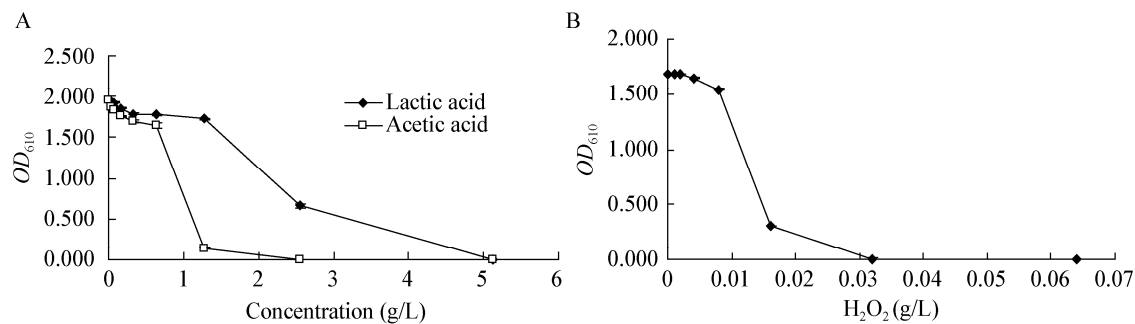


图 4 乳酸、乙酸(A)和 H₂O₂ (B)对化脓性链球菌的 MIC

Figure 4 MIC of lactic acid, acetic acid (A) and H₂O₂ (B) on *Streptococcus pyogenes*

注：图中 OD 值骤降的折点所对应的有机酸和 H₂O₂ 的浓度即为其对指示菌的 MIC。

Note: The inflexion point of the curve obtained by plotting organic acid and H₂O₂ concentration vs optical density was MIC of them to index strain.

表 2 乳酸、乙酸和 H ₂ O ₂ 对化脓性链球菌的 MBC 测定结果		
Table 2 MBC of lactic acid, acetic acid and H ₂ O ₂ on <i>Streptococcus pyogenes</i>		
抑菌物质 Inhibiting substances	MBC (g/L)	杀菌率 Sterilizing rate (%)
Lactic acid	5.120	91.20
Acetic acid	2.560	98.80
H ₂ O ₂	0.032	98.20

3 结论

通过上述实验发现，3 株乳杆菌对化脓性链球菌的抑菌作用大小为：KLDS1.0667>KLDS1.0342-1>KLDS1.0203，乳酸和乙酸的产量依次为：KLDS1.0667>KLDS1.0342-1>KLDS1.0203，H₂O₂ 的产量依次为：KLDS1.0203>KLDS1.0667>KLDS1.0342-1。乳杆菌代谢产物中对化脓性链球菌有抑制作用的主要物质为有机酸和 H₂O₂，其中乳酸是产生抑菌作用最主要的物质，乙酸和 H₂O₂ 也起一定的作用。对化脓性链球菌的抑菌和杀菌能力为：H₂O₂>乙酸>乳酸，乙酸和 H₂O₂ 产量高的乳杆菌对化脓性链球菌的抑菌作用强。通过本实验可以得出结论：乳杆菌可利用其代谢产物对化脓性链球菌产生抑制作用，主要抑菌物质为有机酸和 H₂O₂。

参 考 文 献

[1] Zhang Y. The isolation, identification and genetic diversity

analysis of lactobacilli of two sources[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2008: 1-59 (in Chinese)

张杨. 两种来源乳杆菌的分离鉴定及遗传多态性研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2008: 1-59

[2] Song TS, Kim YG, Kim KH, et al. *In vitro* evaluation of probiotic lactic acid bacteria isolated from dairy and non-dairy environments[J]. Food Science and Biotechnology, 2010, 19(1): 19-25

[3] Cui YW, Meng XC. Isolation and identification of several Lactobacilli[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2008, 39(6): 115-119 (in Chinese)

崔艳伟, 孟祥晨. 乳杆菌的分离及鉴定[J]. 东北农业大学学报, 2008, 39(6): 115-119

[4] Wu J, Mang L, Wang YL, et al. Screening and identification of lactobacillus producing antimicrobial substance from Koumiss[J]. Journal of Inner Mongolia Agricultural University, 2011, 32(1): 17-22 (in Chinese)

吴敬, 芒来, 王英丽, 等. 马奶酒中产抑菌物质乳杆菌的筛选及鉴定[J]. 内蒙古农业大学学报, 2011, 32(1): 17-22

[5] Xiong J, Han RN, Zhang ZH, et al. Screening of lactic acid bacteria strains with high antibacterial activity from Douchi and it's research of bacteriostatic[J]. Chinese Journal of Microecology, 2011, 23(6): 485-489 (in Chinese)

熊骏, 韩瑞娜, 张忠华, 等. 豆豉中高效抑菌活性乳酸菌的筛选及其抑菌研究[J]. 中国微生态学, 2011, 23(6): 485-489

[6] Mezaini A, Chihib NE, Bouras AD, et al. Antibacterial activity of some lactic acid bacteria isolated from an Algerian dairy product[J]. Journal of Environmental and Public Health, 2007: 1-6

[7] González L, Sandoval H, Sacristán N, et al. Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity[J]. Food Control, 2007, 18: 716-722

[8] Maudsdotter L, Jonsson H, Roos S, et al. Lactobacilli reduce cell cytotoxicity caused by *Streptococcus pyogenes* by producing lactic acid that degrades the toxic component lipoteichoic acid[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2011, 55(4): 1622-1628

[9] Cunningham MW. Pathogenesis of group A streptococcal infections[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2000, 13(3):

- 470-511
- [10] Wang CQ, Wang Y, Wang XH, et al. Recovery rates and antimicrobial susceptibility of *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* and *Moraxella catarrhalis* collected from children with respiratory tract infection in Children's Hospital of Fudan University from 2000 to 2006[J]. Chinese Journal of Evidence Based Pediatrics, 2007, 2(3): 197-208 (in Chinese)
王传清, 王艺, 王晓红, 等. 2000至2006年复旦大学附属儿科医院呼吸道感染患儿4种常见细菌分离率及耐药趋势[J]. 中国循证儿科杂志, 2007, 2(3): 197-208
- [11] Gao YR, Jia SR, Gao Q, et al. A novel bacteriocin with a broad inhibitory spectrum produced by *Lactobacillus sake* C2, isolated from traditional Chinese fermented cabbage[J]. Food Control, 2010, 21: 76-81
- [12] Wang H, Gong HS, Meng XC. Partial characteristics of the bacteriocin produced by *Lactobacillus brevis*[J]. Microbiology China, 2011, 38(7): 1036-1042 (in Chinese)
王辉, 贡汉生, 孟祥晨. 一株短乳杆菌所产细菌素的部分特性[J]. 微生物学通报, 2011, 38(7): 1036-1042
- [13] Oh SJ, Kim SH, Ko Y, et al. Effect of bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. HY 449 on skin-inflammatory bacteria[J]. Food and Chemical Toxicology, 2006, 44: 1184-1190
- [14] Ito A, Sato Y, Kudo S, et al. The screening of hydrogen peroxide-producing lactic acid bacteria and their application to inactivating psychrotrophic food-borne pathogens[J]. Current Microbiology, 2003, 47: 231-236
- [15] Li PL, Zhang C, Jiang HH. Analysis of characteristics of the bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum*[J]. China Brewing, 1999(5): 18-19 (in Chinese)
李平兰, 张箴, 江汉湖. 一种植物乳杆菌细菌素的特性研究[J]. 中国酿造, 1999(5): 18-19
- [16] Lü ZL, Lin X, Deng WH, et al. Content determination of malic acid and lactic acid in cider by HPLC[J]. Fine and Specialty Chemicals, 2012, 20(1): 9-13 (in Chinese)
吕兆林, 林西, 邓文红, 等. HPLC 法测定苹果酒中苹果酸及乳酸含量[J]. 精细与专用化学品, 2012, 20(1): 9-13
- [17] Bianchini A. Factors affecting production and stability of antifungal compounds of *Lactobacillus plantarum*, and effects of the antifungal compounds on growth and aflatoxin production by *Aspergillus* spp.[D]. Nebraska: Faculty of the Graduate College at the University of Nebraska, 2010: 1-238
- [18] Batdorj B, Trinetta V, Dalgarrondo M, et al. Isolation, taxonomic identification and hydrogen peroxide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* T31, isolated from Mongolian yoghurt: inhibitory activity on food-borne pathogens[J]. Journal of Applied Microbiology, 2006, 103: 584-593
- [19] Marty-Teyssset C, De La Torre F, Garel JR. Increased production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* upon aeration: involvement of an NADH oxidase in oxidative stress[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(1): 262-267
- [20] Qiao ZH, Cheng YQ, Lu ZH, et al. Antibacterial and bactericide activity of lactic acid against three strains of food-borne pathogenic bacteria[J]. Food Science and Technology, 2008, 10: 187-191 (in Chinese)
乔支红, 程永强, 鲁战会, 等. 乳酸对三种食源性致病菌的抑菌及杀菌作用[J]. 食品科技, 2008, 10: 187-191
- [21] Otero MC, Nader-Macias ME. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂-producing *Lactobacillus gasseri* isolated from the vaginal tract of cattle[J]. Animal Reproduction Science, 2006, 96: 35-46