

乳酸菌对金黄色葡萄球菌 生物拮抗作用的初步研究

(华中农业大学食品科技学院, 武汉 430070) 王小红 谢笔钧 史贤明 余佳

摘要:利用试管混合培养特性实验发现,保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌和金黄色葡萄球菌共同生长时,保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌二者对金黄色葡萄球菌的生长具有明显的抑制作用,在混合培养的前12h,实验组金黄色葡萄球菌的活菌数比对照组下降2~3个对数级,到培养后期则没有活的金黄色葡萄球菌检出。为了进一步探讨乳酸菌对金黄色葡萄球菌抑制作用的机理,采用牛津杯法观察了保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌发酵液对金黄色葡萄球菌的抑制作用,发现其抑制作用主要是由于有机酸和抗菌类物质共同作用的结果。

关键词:乳酸菌,金黄色葡萄球菌,拮抗作用,混合培养,抑菌圈

Abstract:The inhibition of *Staphylococcus aureus* by *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* was studied by tube mixed culture. The growth of *Staphylococcus aureus* was obviously checked, the colony-forming unit of *Staphylococcus aureus* in the test was decreased by 2~3 logarithm grades than the control. The inhibition of *Staphylococcus aureus* by *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* was owing to the production of organic acid and antimicrobial substances.

Key words:lactic acid bacteria; *staphylococcus aureus*; biologic inhibition; commix culture; antimicrobial zone

中图分类号: TS201.3 文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2005)01-0068-04

本实验以酸奶发酵剂菌种(保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌)和金黄色葡萄球菌为对象,探讨它们之间可能的相互作用机制,了解乳酸菌对金黄色葡萄球菌的生物拮抗作用,从而为利用乳酸菌控制金黄色葡萄球菌的潜在危害提供理论依据。

1 材料与方

1.1 菌种

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*,简称S.a)、保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus bulgaricus*,简称L.B)、嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*,简称S.T)均为华中农业大学食品安全与微生物系保存;其它药品与试剂均为生化试剂或化学纯试剂。

称L.B)、嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*,简称S.T)均为华中农业大学食品安全与微生物系保存;其它药品与试剂均为生化试剂或化学纯试剂。

1.2 培养基

MRS固体和液体培养基、LB固体和液体培养基、巴尔德-帕克(Baird-parker)培养基、脱脂乳培养基按参考文献[1~3]配制。

1.3 菌种活化

1.3.1 保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌的活化^[1]将置于冰箱中保存的保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌用铂耳环取少许,转移至灭菌的脱脂乳培养基中,42℃培养4~5h至凝固,反复活化2~3代。将活化的保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌分别转种至MRS液体培养基中,37℃恒温培养16~18h。

1.3.2 金黄色葡萄球菌的活化用铂耳环挑取冷藏保存的金黄色葡萄球菌菌种一环,在LB固体斜面培养基上划线,37℃恒温培养24h,反复活化2~3代,使菌种活力恢复,置于4~8℃冰箱保存备用。活化的金黄色葡萄球菌菌种挑取一环于装有LB液体培养基的试管中,37℃恒温培养16~18h。

1.4 金黄色葡萄球菌的Baird-Parker平板计数法^[2]

将待检样品进行10倍次递比稀释,取适宜的稀释度(一般取 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 这三个稀释度)1mL,每个稀释度做三个平行,然后在无菌操作的条件下把其加入到无菌的培养皿中,将95mL Baird-Parker培养基融化后加入5mL卵黄溶液,并混匀,待温度降为45~50℃时,可倒入培养皿中,37℃,48h后取菌数在30~300间的计数。

1.5 乳酸菌和金黄色葡萄球菌混合培养特性研究

在MRS液体培养基中按1%接种量分别接种保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌与金黄色葡萄球菌,混匀后置于37℃培养,间隔一定时间取样(0、4、8、12、24、48、72h),采用Baird-Parker平板计数法(37℃培养48h)对金黄色葡萄球菌进行活菌计数,检查金黄色

收稿日期: 2004-06-02

作者简介: 王小红(1970-),女,在职博士生,研究方向:食品安全与食品微生物。

葡萄球菌的存活情况,同时测定培养基 pH 的变化。以金黄色葡萄球菌在 MRS 液体培养基中的纯培养物做为对照,培养条件相同。

pH 的测定 奥立龙 pH 计。

对照组:金黄色葡萄球菌+MRS 液体培养基;实验组 1:金黄色葡萄球菌+保加利亚乳杆菌+MRS 液体培养基;实验组 2:金黄色葡萄球菌+嗜热链球菌+MRS 液体培养基;实验组 3:金黄色葡萄球菌+保加利亚乳杆菌+嗜热链球菌+MRS 液体培养基。

1.6 乳酸菌发酵液的制备

将保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌分别在无菌条件下按 1% 接种到 MRS 液体培养基中,37℃ 培养 48h,然后 4000r/min 离心,取发酵上清液,经细菌过滤器过滤(滤膜孔径为 45μm),收集滤液即为发酵原液,放冰箱备用。

1.7 乳酸菌发酵液抑菌效果观察^[5]

牛津杯法:将金黄色葡萄球菌培养物(菌数为 10^7 cfu/mL)0.1mL 均匀涂在 LB 固体平板上,自然干燥 30min,再在无菌条件下将牛津杯(内径为 6mm)均匀放置在平板上,稍微下压,使其与平板培养基接触面无空隙,然后吸取 0.1mL 发酵液于杯中,37℃ 培养 10~12h,测定抑菌圈直径。每个样品做 3 个重复,结果取平均值。对照组在牛津杯中添加 MRS 液体培养基 0.1mL,培养条件相同。

1.8 乳酸菌发酵液抑菌活性的热稳定性实验

将乳酸菌发酵液分别用 70℃、100℃ 和 121℃ 处理 30min 后,用牛津杯法测定其抑菌活性,方法同上。以未进行热处理的发酵上清液为对照,观察抑菌物质的热稳定性。

1.9 不同 pH 对乳酸菌发酵液抑菌效果的影响

用 1mol/L 的 HCl、NaOH 分别将发酵上清液 pH 调为 3.0、4.0、4.5、6.0、7.0,然后进行抑菌实验,以未调 pH 的发酵上清液为对照,观察 pH 对乳酸菌发酵液抑菌效果的影响。

2 结果与讨论

2.1 保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌和金黄色葡萄球菌混合培养特性研究

图 1~图 6 是金黄色葡萄球菌分别和保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌混合培养时,金黄色葡萄球菌活菌数和培养液 pH 变化情况。由图 1~图 6 可知,对照组金黄色葡萄球菌在 MRS 液体培养基中一直呈现良好生长趋势,其菌数在 12h 内稳定增加,至培养后期(24~72h)才稍有减少。实验组 1、2 和 3 中金黄色葡萄球菌在培养的前 12h 虽呈缓慢增加,但金黄色葡萄球菌的活菌数均比对照组下降 2~3 个对数级,至培养后期(24~72h),在实验组中检测不出金黄色葡萄球菌的存在了,而对照组中仍有 10^6 cfu/mL 左右的

金黄色葡萄球菌活菌数存在。

该实验结果表明,金黄色葡萄球菌和保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌混合培养时,其生长受到明显的抑制作用,这可能与它们之间的营养竞争或空间竞争有关,以及乳酸菌在生长过程中产生的低 pH 环境和其他代谢产物有关。

2.2 乳酸菌发酵液抑菌效果

2.2.1 乳酸菌发酵液原液抑菌结果 保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌发酵原液对金黄色葡萄球菌抑制作用结果见表 1。由表 1 可知,两种乳酸菌的发酵液均对金黄色葡萄球菌有一定的抑制作用。

2.2.2 乳酸菌发酵液抑菌活性的热稳定性实验 乳酸菌发酵液分别用 70℃、100℃ 和 121℃ 处理 30min 后对金黄色葡萄球菌的抑制作用结果见图 7。由图 7 可知,经过不同的温度处理后,保加利亚乳杆菌发酵液和嗜热链球菌发酵液仍对金黄色葡萄球菌具有抑

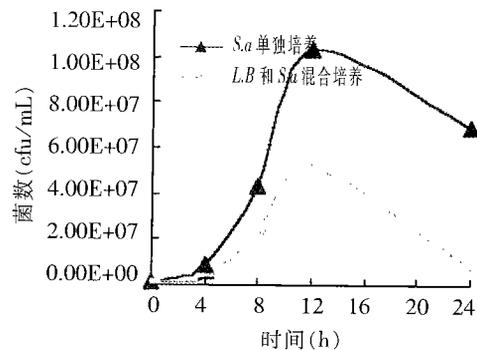


图 1 S.a. 和 L.B. 混合培养特性

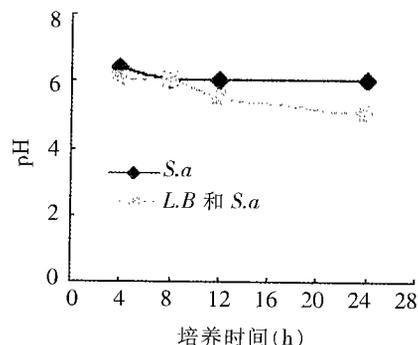


图 2 S.a. 和 L.B. 混合培养时 pH 的变化

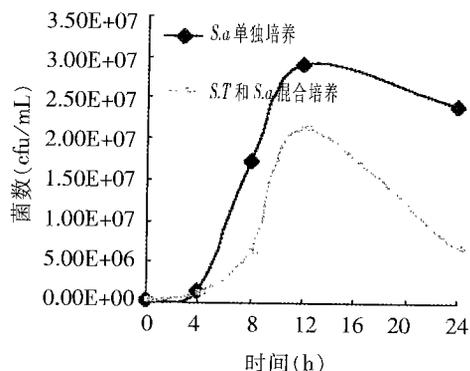


图 3 S.a. 和 S.T. 混合培养特性

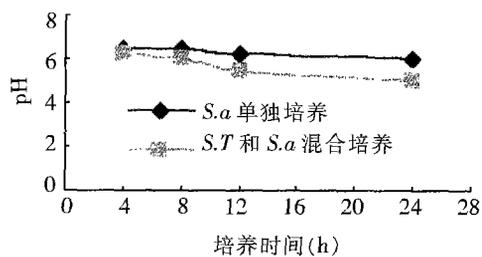


图4 S.a 和 S.T 混合培养时 pH 的变化

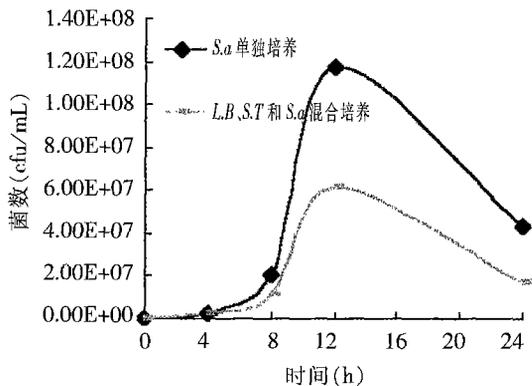


图5 S.a 和 LB, S.T 混合培养特性

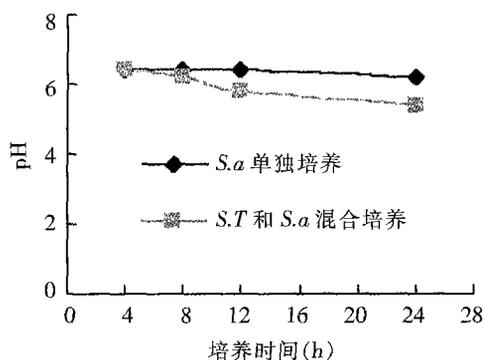


图6 S.a 和 LB, S.T 混合培养时 pH 的变化

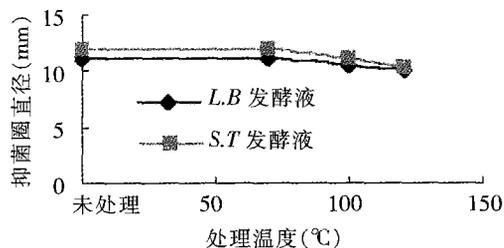


图7 LB 和 S.T 的发酵液经不同温度处理后对 S.a 的抑制作用

制作用, 这说明乳酸菌发酵液中的抑菌物质具有一定的热稳定性。

2.2.3 不同 pH 对乳酸菌发酵液抑菌效果的影响

8 为不同 pH 处理后, 乳酸菌发酵液对金黄色葡萄球菌的抑制作用效果。由图 8 可知, 较强的酸性环境可增强乳酸菌发酵液对金黄色葡萄球菌的抑制作用, 而弱酸性环境对其抑制作用影响不大。

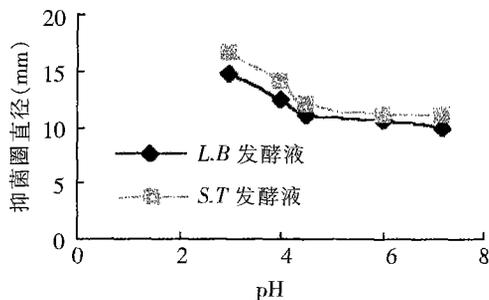


图8 LB 和 S.T 的发酵液经不同 pH 处理后对 S.a 的抑制作用

3 结论

3.1 由保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌和金黄色葡萄球菌混合培养特性研究可知, 保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌均对金黄色葡萄球菌具有一定的抑制作用, 这种抑制作用在混合培养的初期表现不是很明显, 因为在培养的 0~12h 内, 保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌对金黄色葡萄球菌生长的影响不大, 对照组金黄色葡萄球菌菌数分别为实验组金黄色葡萄球菌菌数的 10 倍、1~5 倍和 1~3 倍。但随着培养时间的延长, 保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌对金黄色葡萄球菌的生长表现出明显的抑制作用, 在 MRS 液体培养基中检测不出活的金黄色葡萄球菌, 这主要是由于保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌在发酵过程中可产生大量乳酸, 导致环境 pH 显著降低, 同时可能还产生一些抑制微生物存活物质(细菌素), 从而抑制了金黄色葡萄球菌的生长。

3.2 乳酸菌发酵液抑菌效果以及不同温度和 pH 处理的发酵液抑菌实验结果进一步表明, 保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌和金黄色葡萄球菌共同培养时, 乳酸菌对金黄色葡萄球菌的抑制作用不仅仅是由于发酵过程中产生大量乳酸导致 pH 降低, 而且乳酸菌在生长代谢过程中还可能产生抗微生物存活物质, 即细菌素等^[6], 并且该类物质具有较好的热稳定性, 是一种热稳定性物质。

3.3 利用有益微生物制约有害微生物是开发、利用微生物资源的重要研究领域之一^[7], 乳酸菌的抑菌活性是多方面的, 其代谢产物酸、过氧化氢及细菌素或抗生素类物质都具有抑菌活性。据文献报道^[8], 嗜热链球菌代谢产生的物质具有抗烟曲霉、寄生曲霉和根霉等真核生物的能力。从整个实验的结果来看, 保

表1 保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌发酵液对金黄色葡萄球菌的抑制作用

	保加利亚乳杆菌发酵液	嗜热链球菌发酵液	MRS 液体培养基
抑菌圈直径(mm)	10.0	11.0	0

(下转第 73 页)

表2 江米甜酒香气成分分析结果

序号	化合物名称	保留时间(min)	相对含量(%)	相似度(%)
1	甲酸乙烯酯 Formic acid, ethenyl ester	4.32	1.250	65.45
2	2-甲基丙氨酸 2-methyl alanine	5.10	0.643	63.32
3	乙酸酐 Acetic anhydride	5.55	0.025	44.69
4	乙醇 Ethanol	5.86	8.164	94.56
5	丙醇 Propanol	6.49	1.506	95.81
6	2,3-丁二酮 2,3-Butenedione	6.65	0.150	85.59
7	2-丁酮 2-Butanone	6.89	0.010	79.05
8	乙酸乙酯 Ethyl acetate	7.27	0.785	96.57
9	3-甲基-2-戊酮 3-Methyl-2-pentanone	7.60	0.032	64.64
10	四氢呋喃 Tetrahydro furan	7.69	1.350	83.00
11	异丁醇 2-Methyl propanol	7.97	29.90	64.65
12	醋酸 Acetic acid	8.29	0.203	57.31
13	3-甲基-1-丁醇 3-Methyl-1-butanol	10.93	0.903	68.46
14	正戊醇 1-Pentanol	11.01	20.50	72.56
15	2-甲基-1-丁醇 2-Methyl-1-butanol	11.08	2.600	65.43
16	3-甲基丁醛 3-Methyl butanal	11.66	0.019	49.59
17	正己醛 Caproaldehyde	12.92	0.066	66.89
18	醋酸异丁酯 Acetic acid, isobutyl ester	13.47	2.385	84.00
19	安息香醛 Benzaldehyde	18.65	0.029	50.67
20	壬醛 Nonanal	22.80	0.020	62.58
21	安息香酸乙酯 Benzoic acid, ethyl ester	24.91	0.007	52.68
22	癸醛 Decanal	25.60	0.018	60.91
23	甲氧基香茅醛 Methoxy citronellal	29.85	0.012	58.89
24	反式-香叶烯丙酮 Trans-geranyl acetone	31.85	0.026	59.72
25	琥珀酸二异丁酯 Succinic acid, diisobutyl ester	32.23	0.022	59.51
26	油酸-2-苯基-1,3-二氧桥甲酯 Oleic acid, 2-phenyl-1,3-dioxolan-4-yl-methyl ester	33.10	0.004	47.43
27	异酞酸二甲酯 Isophthalic acid, dimethyl ester	33.28	0.004	48.48
28	月桂酸 Lauric acid	34.14	0.003	63.93
29	甲基丁二酮酸-二异丁酯 Methyl butanedioic acid, bis (1-methylpropyl) ester	34.48	0.004	54.56
30	肉豆蔻酸 Myristic acid	38.26	0.152	76.46
31	12-甲基-2,13-十八二烯-1-醇 12-Methyl-E,E-2,13-octadecadien-1-ol	39.18	0.025	45.04
32	十五酸 Pentadecanoic acid	40.20	0.125	61.72
33	11-十六烯酸 Z-11-hexadecenoic acid	41.82	0.059	75.56
34	棕榈酸 Hexadecanoic acid	42.09	0.225	73.96

参考文献:

- [1] 刘忠义. 发酵糯米饮料的加工技术[J]. 软饮料工业, 1995(1): 13~14.
- [2] 傅金泉. 传统的发酵食品-甜酒酿造[J]. 酿酒, 1987(5): 9~11.
- [3] 刘振民. 江米酒生物化学变化研究[J]. 食品研究与开发, 2000(3): 15~16.
- [4] Lambrechts M G, Pretorius I S. Yeast and its

(上接第70页) 加利亚乳杆菌和嗜热链球菌对金黄色葡萄球菌的抑制作用是不同的, 在用其作为发酵菌种时是否产细菌素及产量有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 凌代文, 东秀珠. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999, 3.
- [2] 孟昭赫. 食品卫生检验方法注解微生物学部分(第一版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1990.
- [3] 喻子牛, 何绍江. 农业微生物学实验技术[M]. 北京: 中国

importance to wine aroma—a review[J]. S Afr J Enol Vitic, 2000, 21: 9713~14129.

- [5] 藤卷正生, 服部达彦, 林和夫, 荒井综一编, 夏云译. 香料科学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1988, 214~246.
- [6] 施钧慧, 汪聪慧. 香料质谱图集[M]. 北京: 中国质谱学会, 1992, 112~145.
- [7] Boido E, Lloret A, Medina K, Dellacassa E. Aroma composition of Vitis vinifera tannat: the typical red wine from Uruguay[J]. J Agri Food Chem, 2003, 51: 5408~5413. 农业出版社, 1996.
- [4] 刘慧, 冯一兵. 酸奶生产的菌种保藏, 活化及其扩培技术[J]. 食品工业, 1996(1): 21~22.
- [5] 何波. 苦瓜抗菌作用的研究[J]. 食品科学, 1998, 19(3): 34~36.
- [6] 李平兰. 江汉湖. 乳酸菌细菌素研究进展[J]. 微生物学通报, 1998, 25(5): 295~298.
- [7] 余建新, 韩春茂. 益生菌的作用机制及临床应用前景[J]. 中国微生物学杂志, 2002, 14(6): 371~372.
- [8] Jack RW, TAGG JR, RAY B. Bacteriocins of Gram-positive bacteria[J]. Microbiol Rev, 1995, 59: 171.