

抑制猪霍乱沙门氏菌的乳酸菌的分离、鉴定 及潜在抑菌物质分析

李宏伟, 肖 瑶, 张关令, 林连兵, 张麒麟*

(昆明理工大学 生命科学与技术学院, 云南 昆明 650500)

摘 要 猪霍乱沙门氏菌(*Salmonella choleraesuis*)是一种常见的食源性致病菌。为了预防和治疗该菌引起的疾病,饲养者在饲料中大量添加抗生素,致使猪肉存在严重的食品安全问题。从健康成年无量山乌骨鸡肠道内容物中筛选出具有抑菌作用的乳酸菌,测定其对猪霍乱沙门氏菌的抑菌效果,分析乳酸菌抑制猪霍乱沙门氏菌的有效成分,并对筛选的乳酸菌种进行了分子生物学鉴定。采用双层平板法对具有抑制猪霍乱沙门氏菌的乳酸菌进行筛选,采用牛津杯法对抑菌效果进行测定,并采用酶蛋白敏感性测定、热处理、有机酸处理等方法分析抑菌活性物质有效成分,采用16S rDNA分子标记对乳酸菌进行鉴定,并构建系统发育树。结果显示,从健康鸡肠道中筛选出18株乳酸菌,其中2株对猪霍乱沙门氏菌(*Salmonella choleraesuis*)、大肠埃希菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*)、肠炎沙门氏菌亚种(*Salmonella enteritidis* subspecies)、志贺氏菌(*Shigella*)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)具有良好的抑菌效果;不同蛋白酶、pH处理对乳酸菌无细胞培养液抑菌效果均有不同程度的影响,但是经80℃处理的乳酸菌无细胞培养液,其抑菌效果未明显改变。经鉴定,2株乳酸菌分别为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)和短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)。从健康成年无量山乌骨鸡肠道内容物中分离得到的植物乳杆菌菌株L2和短乳杆菌菌株L4对猪霍乱沙门氏菌等致病菌具有明显地抑制作用,推测其抑菌有效成分可能为小肽类及有机酸,这对减少抗生素使用,提高猪肉食品的品质与安全性具有一定价值。

关键词 乳酸菌;猪霍乱沙门氏菌;抑菌活性;抑菌物质

中图分类号 Q939.94

文献标识码 A

文章编号 1005-7021(2020)04-0052-08

doi:10.3969/j.issn.1005-7021.2020.04.008

Isolation and Identification of Lacto-Bacteria Inhibiting *Salmonella choleraesuis* and Analysis of Its Potential Bacteriostatic Substance

LI Hong-wei, XIAO Yao, ZHANG Guan-ling, LIN Lian-bing, ZHANG Qi-lin

(Faculty of Life Sci. & Technol., Kunming Uni. of Sci. & Technol., Kunming 650500)

Abstract *Salmonella choleraesuis* is a common food-borne pathogen. In order to prevent and treat the diseases caused by the bacterium, a large amount of antibiotics was added into the feed, causing serious food safety and quality problems. Lacto-bacteria with antibacterial activity were screened out from intestinal contents of adult healthy Wuliangshan black-bone chicken, their antibacterial effects on *S. choleraesuis* were determined and analyzed for effective components of the lacto-bacteria against *S. choleraesuis*, and the lacto-bacteria strain obtained in this study were identified using molecular biology. The lacto-bacteria that can inhibit *S. choleraesuis* were screened by the double-layer plate method. The antibacterial effect was determined by the Oxford Cup method. The effective components of antibacterial active substances were analyzed by the enzyme protein sensitivity experiments, heat and organic acid treatments. The

基金项目:国家自然科学基金项目(31760042,31960286)

作者简介:李宏伟 男,硕士研究生。主要研究肠道微生物及其高密度发酵。E-mail: lihongwei667@163.com

* 通讯作者。男,副教授,硕士生导师。研究方向为生态基因组学。E-mail: zhangql@kust.edu.cn

收稿日期:2019-11-15

lacto-bacteria were determined using 16S rDNA molecular marker, and a phylogenetic tree was reconstructed. The results showed that 18 strains of lacto-bacteria screened out in this study, two of them presented significant antibacterial effects on *S. choleraesuis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella enteritidis* subpeies, *Shigella* and *Streptococcus agatactiae*; different proteases and pH treatment showed different degrees of effects on antibacterial effects of the fermented broth of lacto-bacteria, but antibacterial effects of the lacto-bacteria fermented broth has no significant changes after treated at 80 °C. The two strains of lacto-bacteria were identified as *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* using 16S rDNA. *L. plantarum* strain L2 and *L. brevis* strain L4 isolated from the intestinal contents of adult healthy Wuliangshan black-bone chicken have significant inhibitory effects on pathogen, *S. choleraesuis* etc, and it is speculated that small peptides and organic acids may be potential antibacterial components of these two *Lactobacillus* strains, having a certain value for reducing the use of antibiotics to improve of the quality and security of pork-derived food.

Keywords lacto-bacteria; *Salmonella choleraesuis*; inhibitory activity; bacteriostatic component

猪霍乱沙门氏菌(*Salmonella choleraesuis*)为革兰阴性杆菌,是一种常见的食源性致病菌^[1]。人们在食用肉制品尤其卤制及腌制食品过程中,常被该菌感染引起全身不适及胃肠道反应等典型的食物中毒症状^[2]。在世界各国的细菌性食物中毒中,沙门氏菌引起的食物中毒占比最高^[3]。此外,为了预防和治疗猪霍乱沙门氏菌,饲养者在猪饲料中大量添加抗生素,使得猪肉制品和养殖排放物对人体健康和环境安全造成了巨大的潜在威胁。以往研究表明,添加抗生素饲喂的猪肉品质远不如采用益生菌无抗养殖的猪肉^[4-5],因此开发与利用控制猪霍乱沙门氏菌的益生菌是提高猪肉食品质量的重要手段。在生猪屠宰、猪肉食品加工与贮存中,猪霍乱沙门氏菌随着肠道内容物、体液及其他液体等交叉污染猪肉制品,导致后续的食品安全问题,如人接触后引起肠道沙门氏菌病^[6-7]。目前,生猪细菌性疾病的预防和治疗以抗生素作为主要手段。随着抗生素的大量使用,猪霍乱沙门氏菌对抗生素的耐药性逐渐凸显,致使猪肉中抗生素含量超标,严重影响猪肉食品的品质,如色泽、鲜味和口感等。因此,寻找抗生素替代品是猪肉食品上游生产亟需解决的问题^[8-10]。乳酸菌(*Lactobacillus*)在食品生产中具有安全、可靠等特点,并在动物肠道疾病防治等方面具有重要作用^[11-12]。近年来,乳酸菌对肉制品中致病菌的抑菌作用引起了科研人员的广泛关注,抑菌机制也得以被探索^[13-20]。然而,由于对有抑菌效果的乳酸菌资源开发较晚,缺乏足够重视,其种质资源仍极为匮乏,应用范围也较为有限。本研究拟从健康鸡肠道内筛选得到具有明显抑制猪霍乱沙

门氏菌作用的乳酸菌,对抑菌物质进行分析,并对其进行分子生物学鉴定。研究结果将为生猪养殖和猪肉食品生产中猪霍乱沙门氏菌的控制提供潜在的乳酸菌菌种资源,并对如何提高猪肉食品质量提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 乳酸菌(*Lactobacillus*)从云南特有品种无量山乌骨鸡(*Gallus gallus*)健康成年鸡肠道内分离获得。猪霍乱沙门氏菌(*S. choleraesuis*)、大肠埃希菌(*E. coli*)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、肠炎沙门氏菌(*S. enteritidis*)、肠炎沙门氏菌亚种(*S. enteritidis* subspecies)、志贺氏菌(*Shigella*)、无乳链球菌(*S. agatactiae*)为昆明理工大学生命科学与技术学院噬菌体与肠道微生物课题组实验室保存。供试鸡购自云南南涧无量山乌骨鸡养殖场。

1.1.2 培养基(g/L) ①MRS培养基:胰蛋白胨10,牛肉粉8,酵母粉4,葡萄糖20,硫酸锰0.04,磷酸氢二钾2,柠檬酸氢二铵2,乙酸钠5,硫酸镁0.2,吐温-80 1 mL,琼脂15,加水至1 L,用1 mol/L盐酸将培养基pH调至5.8,121 °C灭菌20 min;②LB培养基:胰蛋白胨10,酵母粉5,氯化钠10,琼脂15,加水至1 L,121 °C灭菌20 min。

1.1.3 试剂与仪器 结晶紫、碘液、乙醇、盐酸、胰蛋白酶、胃蛋白酶、卡那霉素粉末均购自上海源叶生物科技有限公司。落地式超净工作台(SW-CJ-2F,邦西仪器科技(上海)有限公司);酸碱度pH测定计(PHSJ-SF,上海佑科仪器仪表有限公

司);体式显微镜(GERMANY,上海佑科仪器仪表有限公司);紫外分光光度计(729,上海佑科仪器仪表有限公司);立式高压蒸汽灭菌锅(LD2F-75KB,上海申安医疗器械有限公司);台式高速离心机(TGL-23,四川蜀科仪器有限公司);恒温培养箱(DHP-9052B,上海一恒科学仪器有限公司);恒温摇床(TH2-100,上海一恒科学仪器有限公司);电热鼓风干燥箱(101-2AB,天津市泰斯特仪器有限公司);超低温冰箱(BC-203HCN,日本三洋电器股份有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 鸡肠道中乳酸菌的分离和纯化 取体型大小均一的云南黑鸡 10 只,解剖并取其肠道,用无菌生理盐水清洗鸡肠道并刮去肠道内容物,在肠黏膜表层不同位置刮取黏液,置于液体 MRS 培养基中,37 ℃ 培养 12 h^[21]。将菌液取 100 μL 涂布于 MRS 固体培养基平板上(含 5% CaCO₃),37 ℃ 培养 24 h^[22-23]。挑取生长最为旺盛且具有透明溶钙圈的单菌落继续在 MRS 固体培养基上进行分离纯化,将产生溶钙圈的菌落进行革兰染色实验,革兰染色阳性菌株初步定为乳酸菌,将上述菌株用含有 15% 甘油的 MRS 培养基保存于 -80 ℃^[14,24]。

1.2.2 乳酸菌无细胞培养液的制备 将乳酸菌以 1% 的接种量接种于装液量 200 mL 的锥形瓶中,37 ℃、150 r/min 培养 24 h,将发酵液在 4 ℃、8 000 r/min 冷冻离心 10 min,弃沉淀,取上清液,用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤去除菌体,得到乳酸菌无细胞培养液,置于 4 ℃ 冰箱中备用。

1.2.3 抑制猪霍乱沙门氏菌的乳酸菌筛选 使用牛津杯双层平板法(牛津杯直径 6 mm)筛选对猪霍乱沙门氏菌具有抑制作用的乳酸菌^[25-26]。首先将 LB 固体培养基倒入培养皿中作为下层培养基,待其凝固后将 100 μL 猪霍乱沙门氏菌与 4 mL 半固体 LB 培养基混合后倒入下层培养基上作为上层培养基。待凝固后,用镊子将无菌牛津杯置于无菌培养皿中,于牛津杯中加入乳酸菌无细胞培养液 200 μL。平行加入卡那霉素于另外的牛津杯作为阳性对照,加入 MRS 的牛津杯为阴性对照。后于 4 ℃ 下静置 4~5 h,待乳酸菌无细胞培养液完全扩散后,于 37 ℃ 培养 12 h。用游标卡尺

测量抑菌圈直径^[27]。

1.2.4 乳酸菌抑制猪霍乱沙门氏菌的有效成分分析 ①热处理乳酸菌无细胞培养液对抑制猪霍乱沙门氏菌的影响:将乳酸菌无细胞培养液于 80 ℃ 下处理 5 min,用牛津杯双层平板法检测乳酸菌无细胞培养液对猪霍乱沙门氏菌的抑菌作用,无处理的乳酸菌无细胞培养液作为对照^[28],实验独立重复 3 次。②乳酸菌无细胞培养液中有有机酸对猪霍乱沙门氏菌的影响:用无细胞培养液作为对照组,用乳酸调节 MRS 液体培养基至与无细胞培养液 pH 相同的液体作为实验组,用牛津杯双层平板法检测乳酸菌无细胞培养液对猪霍乱沙门氏菌抑制的影响,实验独立重复 3 次。③蛋白酶敏感性实验的测定:分别向乳酸菌无细胞培养液加入不同蛋白酶溶液(胃蛋白酶、胰蛋白酶),终浓度为 1 mg/mL,于 37 ℃ 水浴 2 h,然后 80 ℃ 水浴 2 min 使酶失活。用牛津杯双层平板法检测加有不同蛋白酶的乳酸菌无细胞培养液对猪霍乱沙门氏菌抑制能力的影响,无处理的乳酸菌无细胞培养液作为对照。实验独立重复 3 次。④乳酸菌对猪霍乱沙门氏菌的最小抑菌浓度的测定:用紫外分光光度计,于 600 nm 处测定猪霍乱沙门氏菌菌液的吸光光度值,并调整其 OD 值为 1,将筛选出抑菌效果强的乳酸菌的无细胞培养液上清液分别稀释 2、4、8 倍。用牛津杯双层平板法,采用上述稀释液分别进行对猪霍乱沙门氏菌的抑菌实验,以能产生抑菌圈的最低稀释浓度作为最小抑菌浓度^[29]。实验独立重复 3 次。

1.2.5 乳酸菌菌株的鉴定 ①乳酸菌基因组总 DNA 提取:采用十六烷基三甲基溴化铵(cetyl trimethyl ammonium bromide, CTAB)法提取乳酸菌的基因组总 DNA。②乳酸菌 16S rDNA 的聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增与测序:以乳酸菌基因组 DNA 为模板,利用通用引物对细菌 16S rDNA 基因全长序列进行 PCR 扩增:27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R(5'-TACGGATACCTTGTACGACTT-3')。扩增程序:94 ℃ 预变性 5 min;然后 94 ℃ 变性 30 s、52 ℃ 退火 30 s、72 ℃ 延伸 50 s,35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物大小经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后,将目标条带切胶纯化,然后送至生工生物工

程(上海)股份有限公司进行双向 Sanger 测序,直至测通。③乳酸菌 16S 序列的同源性分析与系统发育树构建:将测序获得的乳酸菌 16S rDNA 序列提交至美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Informmion, NCBI)网站的 GenBank 数据库。采用 BLAST 在线服务器(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)将其与细菌数据库进行比对,比对得分最高的已知乳酸菌种类确定为目标物种。此外,下载物种分类地位明确的乳酸菌属其他种类的 16S rDNA 序列。利用 MEGA 6^[30] 分子进化分析软件包中的 Clustal W 子程序,联合所测菌株 16S rDNA 序列进行多重序列比对;采用 Gblocks 在线服务器(http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks_server.html)鉴定序列间适宜用于系统发育分析的保守区域;将序列比对结果导入 MEGA 中,评估最佳碱基替换模型,并利用最大似然法(100 次取样)构建系统发育树,确定目标菌株分类地位。

1.2.6 数据处理与分析 每个实验重复 3 次,取其平均值并计算标准差。采用 Microsoft Excel 2007 及 IBM SPSS 22.0 软件对数据进行分析。数据对间显著性检验采用 Student's t test 进行。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌的分离和纯化

通过含有碳酸钙的 MRS 培养基对鸡肠道中的乳酸菌进行筛选,经 37 ℃ 恒温培养箱培养 24 h,挑选生长旺盛、溶钙圈明显的菌落,继续在 MRS 固体培养基平板上进行平板划线分离,得到纯化后具有溶钙圈的革兰阳性菌疑似乳酸菌 18 株,编号为 L1 ~ L18。

2.2 筛选具有对猪霍乱沙门氏菌抑菌作用的乳酸菌

通过牛津杯法对分离自无量山乌骨鸡肠道内容的 18 株备选乳酸菌进行抑菌能力检测,筛选得到对猪霍乱沙门氏菌具有抑菌作用的 4 株乳酸菌(L2、L4、L12、L14)。4 株乳酸菌无细胞提取物对猪霍乱沙门氏菌的抑菌效果见表 1。

2.3 不同处理方式对乳酸菌抑菌效果的影响

选择对猪霍乱沙门氏菌抑菌效果最强的两株菌 L2 和 L4,通过对其无细胞培养液采用热处理法、乳酸处理法、蛋白酶处理法、稀释处理法对乳

酸菌抑制猪霍乱沙门氏菌的可能有效成分进行了分析。表 2 为不同处理方式对猪霍乱沙门氏菌的抑菌效果影响,图 1 为 2 株乳酸菌不同处理方式对猪霍乱沙门氏菌及对不同菌株的抑菌效果。

表 1 4 株乳酸菌的无细胞培养液对猪霍乱沙门氏菌的抑菌效果

Table 1 Antibacterial effect of four cell-free culture solutions of lactic acid bacteria on *S. choleraesuis* in pig cholera

菌株	抑菌圈大小(独立重复 3 次)
L2	+++
L4	+++
L12	++
L14	++

注:“+++”抑菌效果良好,抑菌圈直径 12~18 mm;
“+++”抑菌效果强,抑菌圈直径 >18 mm

表 2 经过不同方式处理后的乳酸菌无细胞培养液对猪霍乱沙门氏菌的抑菌效果影响

Table 2 Effect of cell-free culture medium of lactic acid bacteria treated by different methods on the antibacterial effect of *S. choleraesuis*

样品	抑菌圈直径/mm	
	L2	L4
无细胞培养液	25 ± 0.20 ^a	29 ± 0.70 ^a
80 ℃ 热处理	26 ± 0.15 ^a	27 ± 0.23 ^a
胰蛋白酶	22 ± 0.61 ^a	18 ± 0.52 ^b
胃蛋白酶	21 ± 0.24 ^a	22 ± 0.27 ^a
稀释 2 倍无细胞培养液	19 ± 0.15 ^a	14 ± 0.13 ^b
稀释 4 倍无细胞培养液	13 ± 0.50 ^a	0 ^b
稀释 8 倍无细胞培养液	0 ^a	0 ^a
加乳酸调 pH = 4.56 的 MRS 培养液	16 ± 0.30 ^a	15 ± 0.20 ^a
MRS 液体培养基	0 ^a	0 ^a

注:组间不同的小写字母表示其具有统计学差异($P < 0.05$),表 3 同

由表 2 可知,对无细胞培养液经不同方法处理后,乳酸菌抑菌效果有不同程度的变化。经 80 ℃ 热处理 5 min 后,乳酸菌抑菌能力几乎没有受到高温影响,说明 2 株乳酸菌无细胞培养液中抑菌物质具有较高的热稳定性。经胃蛋白酶和胰蛋白酶处理后,2 株乳酸菌抑菌能力都有不同程度的下降,说明 2 株乳酸菌无细胞培养液中抑菌物质有蛋白质或肽类物质存在。以与无细胞培养液 pH 相同的 MRS 培养基作为阴性对照,MRS 液体培养基作为阳性对照相比,乳酸菌无细胞培养液

经稀释后,其抑菌能力大幅下降,说明有机酸可能是 2 株乳酸菌无细胞培养液中潜在的抑菌物质。

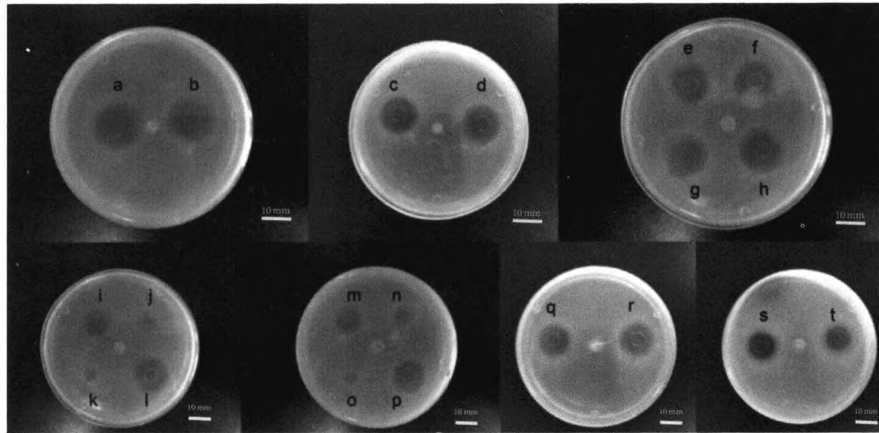


图 1 两株乳酸菌经过不同方式处理后的无细胞培养液对猪霍乱沙门氏菌的抑菌效果

Fig. 1 Antibacterial effect of cell-free culture solution of two strains of lactic acid bacteria treated with different methods on *S. choleraesuis*

a~b: 分别为 L2 和 L4 对猪霍乱沙门氏菌的抑制效果; c~d: 分别为 L2 和 L4 热处理后对猪霍乱沙门氏菌的抑制效果; e~h: 分别为胃蛋白酶、胰蛋白酶处理后的 2 株乳酸菌对霍乱沙门氏菌抑制效果; i~l: 分别为 L2 稀释 2、4、8 倍原液对霍乱沙门氏菌的抑制效果; m~p: 分别为 L4 稀释 2、4、8 倍原液对霍乱沙门氏菌抑制效果; q~r: 分别为 L2、L4 对大肠埃希菌的抑菌效果; s~t: 分别为 L2、L4 对金黄色葡萄球菌的抑菌效果

a-b: The inhibitory effect of L2 and L4 on *S. choleraesuis*; c-d: The inhibitory effect of L2 and L4 on *S. choleraesuis* after heat treatment; e-h: Inhibition of *S. choleraesuis* by two strains of lactic acid bacteria after pepsin and trypsin treatment; i-l: L2 dilution 2, 4, 8, respectively, the inhibitory effect of the original solution on *S. choleraesuis*; m-p: L4 dilution 2, 4, 8, respectively, the original solution against inhibition effect *S. choleraesuis*; q-r: Bacteriostasis effect of L2 and L4 on *E. coli*; s-t: Bacteriostasis effect of L2 and L4 on *S. aureus*

2.4 乳酸菌抑菌广谱性分析

本研究进一步验证了 2 株乳酸菌对实验室保存的致病菌的抑菌效果(见表 3)。

表 3 乳酸菌无细胞培养液对其他致病菌的抑菌谱

Table 3 Bacteriostasis spectrum of cell-free culture medium of lactic acid bacteria against other pathogenic bacteria

菌株	L2	L4
大肠埃希菌	22 ± 0.25 ^a	19 ± 0.30 ^a
金黄色葡萄球菌	28 ± 0.31 ^a	29 ± 0.42 ^a
肠炎沙门氏菌	22 ± 0.26 ^a	21 ± 0.37 ^a
肠炎沙门氏菌亚种	20 ± 0.22 ^a	21 ± 0.36 ^a
志贺氏菌	26 ± 0.32 ^a	25 ± 0.29 ^a
无乳链球菌	23 ± 0.23 ^a	25 ± 0.36 ^a

由表 3 可知, 2 株乳酸菌无细胞培养液不但

对猪霍乱沙门氏菌具有非常明显的抑菌效果, 还对大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌等 6 种重要食源性病原菌具有较为明显的抑菌效果, 其中对金黄色葡萄球菌的抑菌效果最佳, 抑菌圈直径达到 25 mm 以上。

2.5 菌种鉴定

菌株 L2 的 16S rDNA 序列与植物乳杆菌(*L. plantarum*) 的 16S rDNA 序列有超过 99% 的相似性。菌株 L4 的 16S rDNA 序列与短乳杆菌(*L. brevis*) 的 16S rDNA 序列有超过 99% 的相似性。据此, 菌株 L2 和 L4 分别被确定为植物乳杆菌和短乳杆菌。基于两株乳酸菌及其余部分乳酸菌 16S rDNA 序列构建的系统发育树见图 2。可见, 菌株 L2 和 L4 分别与植物乳杆菌种和短乳杆菌聚为两个枝, 并与同属其余乳酸菌种类明显分开, 进一步明确了菌株 L2 和 L4 的分类地位。

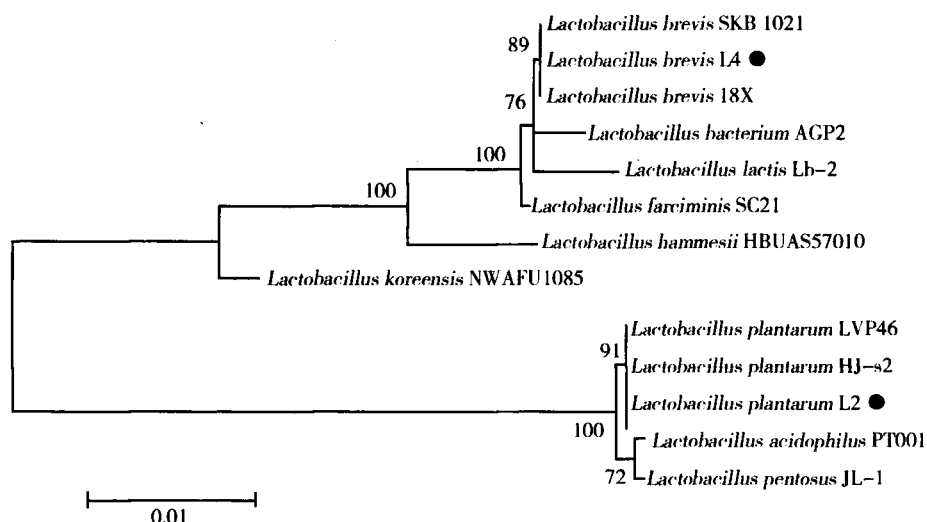


图2 基于16S rDNA序列构建的乳酸菌L2和L4的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of lactic acid bacteria L2 and L4 constructed based on 16S rDNA sequence

3 讨论

近年来,有关益生菌对人体健康、动物疾病防治、食品防腐等方面的研究越来越多^[31-33]。研究发现,乳杆菌可以抑制沙门氏菌等致病菌的生长,可以有效防治动物细菌性疾病的发生^[34]。本研究从健康成年无量山乌骨鸡肠道内分离获得了2株对猪霍乱沙门氏菌具有良好抑菌效果的乳酸菌。经16S rDNA序列分析,2株具有抑菌效果的乳酸菌分别鉴定为植物乳杆菌和短乳杆菌,表明鸡肠道内存在可培养及利用的,用于防治食品中有害致病菌的乳酸菌类益生菌。

乳酸菌会产生细菌素、有机酸等抑菌类物质^[35]。本研究筛选到的2株乳酸菌无细胞培养液对猪霍乱沙门氏菌有非常明显的抑制作用。此外,2株菌的无细胞培养液热稳定性较强,对蛋白酶处理表现出了一定的敏感性;使用乳酸处理的MRS液体培养基表现出了一定的抑菌作用,据此推测乳酸菌抑菌作用的有效成分可能为小肽类或有机酸亦或其共同作用,这与李院等^[36]、da Silva Sabo等^[37]的研究结果一致。当然,此推测后续需要进一步的研究证实。

由于乳酸菌生物学特性的不同,分泌的抑菌物质也有所不同,使乳酸菌有不同的抑菌谱^[8]。研究结果显示,2株乳酸菌对动物肠道及食品中

的有害细菌具有抑菌作用,表明这两株乳酸菌对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、无乳链球菌、猪霍乱沙门氏菌、沙门氏菌、志贺氏菌、肠炎沙门氏菌及其亚种等均具有良好的抑菌效果。该结果相较于李清等^[38]对一株广谱抑菌活性乳酸菌的研究,抗菌谱更加广泛,表明2株乳酸菌也具有广谱抑菌活性。值得注意的是,本研究及大量相关研究^[38-39]的乳酸菌抗菌谱中均包含金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、沙门氏菌、志贺氏菌等,说明不同乳酸菌种类对这些致病菌的抑制广泛存在。但是,也存在特异性,如本研究中乳酸菌抑制猪霍乱沙门氏菌和无乳链球菌,其他研究未见报道;李清等^[38]发现乳酸菌对铜绿假单胞菌有抑菌作用,这可能和供试抑菌谱中的病原菌种数有关。因此,筛选乳酸菌抑菌谱应尽可能多的纳入备选致病菌,以充分揭示乳酸菌普遍及特异的抑菌种类。此外,2株乳酸菌对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径达到了28 mm以上,而其他研究报道中其抑菌圈仅有13~18 mm^[39],表明本研究中筛选到的2株乳酸菌具有较好的抑菌性能,值得后续进一步深入开发和利用。通过乳酸菌对猪霍乱沙门氏菌的最小抑菌浓度实验,测定了2株乳酸菌对猪霍乱沙门氏菌有效抑制的最大稀释倍数(最小抑菌浓度)。

当前,食品生产和加工正向着无抗生素、零细菌性食品安全问题的方向发展。乳酸菌不仅可以抑菌,而且可以提高食品风味且维持肠道微生态平衡。本研究筛选的抑制猪霍乱沙门氏菌的乳酸菌既在猪肉无抗生产方面具有潜在利用价值,同时可降低食源性致病菌引起的食物中毒风险,为进一步研究开发抗生素替代产品及无毒副作用食品提供了有价值的菌种资源。本研究获得的乳酸菌资源将进一步在动物的实际养殖和生产中开展实验,以期达到实际的应用效果。此外,2株乳酸菌的动物体内抗菌实验和抗菌有效成分的化学分离也将在未来的研究中开展,以进一步明确其抑制肠道病原菌生长的效果和机制。

参考文献:

- [1] 牛瑞江. 沙门氏菌富集及 ELISA 检测方法的研究[D]. 南昌:南昌大学, 2012.
- [2] 郁川. 猪霍乱沙门氏菌 C78-1 株 *crp* 缺失株的构建及其生物学特性初步研究[D]. 洛阳:河南科技大学, 2010.
- [3] 朱奇, 陆斌兴, 覃有泉, 等. 沙门氏菌生物学研究进展[J]. 疾病监测与控制, 2015, 9(7): 474-478.
- [4] 刘金阳. 饲料中添加益生菌对苏淮猪生长性能、胃肠道 pH 和肉品质的影响[D]. 合肥:安徽农业大学, 2014.
- [5] 呼红梅, 林松, 武英, 等. 饲料添加益生菌对猪生长性能和肉品质的影响[J]. 养猪, 2017, 2(2): 50-53.
- [6] 李怀玉. 一起猪霍乱沙门氏菌引起食物中毒的调查报告[J]. 中国医药指南, 2008, 6(10): 86-87.
- [7] 邱燕, 温贵兰, 张升波. 定点屠宰场(点)猪肉中三种主要食源性致病菌污染情况调查[J]. 中国动物检疫, 2018, 35(8): 29-34.
- [8] 董岩. 肠道细菌 O 多糖结合疫苗生物合成研究[D]. 北京:中国食品药品检定研究院, 2015.
- [9] 刘畅, 樊明文. 针对细菌感染的治疗性疫苗研究进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2008, 21(5): 445-448.
- [10] Cabello FC. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment[J]. Environ Microbiol, 2010, 8(7): 1137-1144.
- [11] 高璐, 于锋, 王坚. 生菌制剂在慢性肝脏疾病中的应用进展[J]. 中国药房, 2016, 27(3): 426-429.
- [12] 刘文华, 任慧英, 邹玲, 等. 一株优良乳酸菌的分离鉴定与特性研究[J]. 中国畜牧兽医, 2008, 35(2): 152-155.
- [13] 李利, 孔丽, 张宁, 等. 耐酸耐胆盐乳酸菌的鉴定及筛选[J]. 食品科学, 2015, 36(21): 123-128.
- [14] 郭夏蕾, 张健, 杨贞耐. 抑制口腔变异链球菌的乳酸菌筛选及其抑菌机理[J]. 食品科学, 2016, 37(19): 117-122.
- [15] 李院, 魏新元, 王静, 等. 抑制青霉菌乳酸菌的分离、鉴定及抑菌物质分析[J]. 食品科学, 2015, 36(21): 150-155.
- [16] Crowley S, Mahony J, Sinderen DV. Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives[J]. Trends Food Sci Tech, 2013, 33(2): 93-109.
- [17] Cizeikiene D, Juodeikiene G, Paskevicius A, et al. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread[J]. Food Control, 2013, 31(2): 539-545.
- [18] Ahn H, Kim J, Kim WJ. Isolation and characterization of bacteriocin-producing *Pediococcus acidilactici* HW01 from malt and its potential to control beer spoilage lactic acid bacteria[J]. Food Control, 2017, 80: 59-66.
- [19] Messaoudi S, Manai M, Kergourlay G, et al. *Lactobacillus salivarius*: Bacteriocin and probiotic activity[J]. Food Microbiol, 2013, 36(2): 296-304.
- [20] Jacouton E, Chain F, Sokol H, et al. Probiotic strain *Lactobacillus casei* BL23 prevents colitis-associated colorectal cancer[J]. Front Immunol, 2017, 8: 1553.
- [21] 李龙, 刘锁珠, 王宏辉. 藏鸡源乳酸菌菌株的分离、鉴定与筛选[J]. 饲料研究, 2013, (8): 13-15, 64.
- [22] 刘国荣, 周康, 李平兰, 等. 传统干酪中一株产 II a 类细菌素乳酸菌的分离与鉴定[J]. 食品科学, 2007, 28(5): 185-189.
- [23] 黄奕雯, 刘悦欣, 陶政, 等. 鸡源乳酸菌细菌素的分离筛选及鉴定[J]. 中国兽医杂志, 2017, 53(9): 23-27.
- [24] 苟兴华, 王艳文, 李翔, 等. 耐酸乳酸菌的筛选及初步鉴定[J]. 成都大学学报(自然科学版), 2010, 29(2): 95-97.
- [25] 张旭, 赵斌, 张香. 细菌素乳酸菌的筛选及细菌素相关基因的分析[J]. 中国农业大学学报, 2013, 18(4): 168-177.
- [26] 吕好新, 王巍东, 谈重芳, 等. 产广谱细菌素乳酸菌 CW3 的筛选和初步鉴定[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(12): 5504, 5565.
- [27] 谭才邓, 朱美娟, 杜淑霞, 等. 抑菌试验中抑菌圈法的比较研究[J]. 食品工业, 2016, 37(11): 122-125.
- [28] Rushdy AA, Gomaa EZ. Antimicrobial compounds produced by probiotic *Lactobacillus brevis* isolated from dairy products[J]. Ann Microbiol, 2013, 63(1): 81-90.
- [29] 黄宝莹, 余之蕴, 苏妙仪, 等. 食品添加剂对两种乳酸菌的抑菌作用[J]. 中国乳品工业, 2015, 43(8): 16-18.
- [30] Tamura K, Stecher G, Peterson D. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [31] Kaya HI, Simsek O. Characterization of pathogen-specific bac-

- teriocins from lactic acid bacteria and their application within cocktail against pathogens in milk[J]. LWT-Food Sci Technol, 2019, 115: 108464.
- [32] 林勇, 赵伟, 吴云良, 等. 益生菌防治畜禽肠道感染的作用机制研究进展[J]. 江苏农业科学, 2010, (5): 327-329.
- [33] 郑少君, 王志仁, 王永前, 等. 益生菌防治抑郁症的研究进展[J]. 国际精神病学杂志, 2019, (1): 24-26.
- [34] 张卉, 钱国强, 李宾. 具有优良拮抗沙门氏菌能力的乳酸杆菌的研究[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(16): 171-174.
- [35] Kim N, Kim WJ, Kang S. Anti-biofilm effect of crude bacteriocin derived from *Lactobacillus brevis* DF01 on *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* [J]. Food Control, 2019, 98: 274-280.
- [36] 李院, 魏新元, 王静, 等. 抑制青霉菌乳酸菌的分离、鉴定及抑菌物质分析[J]. 食品科学, 2015, 36(21): 150-155.
- [37] da Silva Sabo S, Perez-Rodriguez N, Dominguez JM, et al. Inhibitory substances production by *Lactobacillus plantarum* ST16Pa cultured in hydrolyzed cheese whey supplemented with soybean flour and their antimicrobial efficiency as biopreservatives on fresh chicken meat [J]. Food Res Int, 2017, 99 (Part1): 762-769.
- [38] 李清, 王英, 刘小莉, 等. 一株广谱抑菌活性乳酸菌的筛选及特性研究[J]. 微生物学通报, 2015, 42(2): 332-339.
- [39] 路则宝, 王靓贤, 姬志林, 等. 具抑菌活性乳酸菌筛选及抑菌活性物质分析[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(6): 170-173.

欢迎投稿

欢迎订阅