

# 乳酸链球菌 L318 的培养及其对海洋弧菌的抑制作用 \*

姜英辉<sup>1</sup> 李光友<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 青岛海洋大学生命学院 266003)

(<sup>2</sup> 国家海洋局海洋生物活性物质重点实验室 青岛 266061)

**摘要** 以海洋弧菌作为检测菌,采用平板抑菌圈检测法,对发酵上清液的抑菌性质和在不同培养条件下,包括碳源、氮源、初始培养基 pH 值、温度、接种量和装液量等,乳酸链球菌 L318 的生长和对海洋弧菌的抑制作用进行研究。结果表明,含有乳链菌肽的发酵上清液经稀释 2~5 倍后,具有较强的抑菌活性;乳链菌肽在酸性条件下比在碱性条件下稳定。采用蔗糖或葡萄糖为碳源,酵母膏、蛋白胨和牛肉膏为复合氮源,能够获得菌体的最佳生长和最佳的抑菌活性,最适的对海洋弧菌的抑制条件为温度 30 ℃,接种量 2%~4%,装液量 100 ml,初始 pH 值对海洋弧菌的抑制作用不明显。

**关键词** 乳酸链球菌,乳链菌肽,培养条件

乳链菌肽是由某些乳酸链球菌所产生的一种多肽类抗菌物质,对许多革兰氏阳性菌,如李斯特氏菌、芽孢菌、梭菌等以及某些革兰氏阴性菌如大肠杆菌等有强烈的抑制作用<sup>[1]</sup>。1990 年 Broughton 综述了乳链菌肽作为一种安全、高效的食品防腐剂,在乳制品、肉

\* 国家海洋局海洋生物活性物质重点实验室基金资助项目 98-03 号。

第一作者:姜英辉,出生于 1972 年,博士,工程师。邮编:266500,黄岛出入境检验检疫局,E mail: yinghui@yeah.net

收稿日期:2000-08-18;修回日期:2001-12-20

制品、饮料等食品方面的应用。

近年来,海产品养殖业,包括对虾、扇贝、鱼类和鲍鱼等的养殖快速发展,具有可观的经济效益。但随着放养密度的加大,养殖环境及水质恶化等原因,导致的严重病害使养殖业蒙受巨大的损失。有报道表明,含有乳链菌肽的益生菌制剂作为对虾饵料添加剂应用于对虾养殖中,可以提高对虾的免疫力,抵御病原菌的侵袭,并可以避免使用抗生素带来的药物残留和细菌抗药性的问题<sup>[1]</sup>。但对引起鱼虾病害的病原菌之一的海洋弧菌,乳链菌肽对其的抑制作用的研究未见报道。本文报道乳酸链球菌 L318 在不同的培养条件下对乳链菌肽产生的影响和对海洋弧菌的抑制作用,以期海水养殖业绿色生物农药的开发提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

乳酸链球菌 (*Streptococcus lactis* L318) L318 系乳链菌肽产生菌,由山东大学微生物技术国家重点实验室提供。海洋弧菌 (*Vibrio* sp.),由国家海洋局第一海洋研究所王文兴提供。

### 1.2 培养基

#### 1.2.1 乳酸链球菌菌种保藏培养基

新鲜牛奶,经脱脂处理后,于 115 °C 15 min 灭菌。

#### 1.2.2 发酵培养基

蛋白胨, 10 g; 酵母膏, 5 g; 牛肉膏, 10 g; 葡萄糖, 20 g; 无水乙酸钠, 3 g; 柠檬酸三铵, 2 g;  $K_2HPO_4$ , 2 g;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.2 g;  $MnSO_4 \cdot H_2O$ , 0.05 g; 水, 1 000 ml; pH = 6.8。

#### 1.2.3 海洋弧菌培养基

采用 2216E 培养基。

#### 1.2.4 抑菌实验培养基

采用 2216 E 培养基,其中添加 0.5% 的 Tween 80,琼脂浓度为 1.25%。

### 1.3 测定方法及培养条件

#### 1.3.1 乳链菌肽的抑菌活性的测定

将发酵液离心除菌后,参照 Trauer 等的方法,并加以改动,测定抑菌活性。以海洋弧菌为指示菌,以牛津杯代替打孔。在 2216 E 平板上加入 0.1 ml 的海洋弧菌悬液涂布,制成待测平板,再将无菌牛津杯置于平板上,取 0.1 ml 的发酵液注入牛津杯内,于 25 °C 培养 24 h,检测抑菌圈的直径大小。抑菌圈的直径大小反映了乳链菌肽抑菌活性的高低。

#### 1.3.2 乳酸链球菌 L318 生长测定

用 721 型分光光度计在 600 nm 处测定稀释后菌悬液的吸光度,以同样稀释度的同样培养基作对照。

#### 1.3.3 不同稀释倍数发酵上清液的抑菌活性测定

发酵液离心过滤后,得到的无菌上清液按一定比例分别稀释 2.0, 5.0, 7.5, 10.0 倍后检测其抑菌活性。

#### 1.3.4 不同的培养条件

1.3.4.1 不同碳源、氮源对乳酸链球菌 L318 的生长和对海洋弧菌的抑制作用

(1) 不同碳源的影响 用不同的可溶性糖类代替发酵培养基中的葡萄糖,浓度为 20 g/L,培养 24 h 后测定乳酸链球菌 L318 的生长和抑菌活性,不加碳源的培养基为对照。

(2) 不同氮源的影响 以葡萄糖为碳源,选取不同的氮源测定氮源对乳酸链球菌 L318 的生长和抑菌活性,氮源浓度为 1%,培养 24 h,不加氮源的培养基为对照。

1.3.4.2 不同起始培养基 pH 对海洋弧菌的抑制作用

分别用 2 mol/L 的 HCl 和 NaOH 调节发酵培养基的 pH 为 5.0~8.0,于 37 °C 培养 24 h 后,测定抑菌活性和发酵后的培养基 pH 值。pH 值采用 pHS-3C 型精密 pH 计测定。

#### 1.3.4.3 不同培养温度对海洋弧菌的抑制作用

采用不同的培养温度(20, 25, 30, 37 和 40 °C),培养 24 h 后测定生长和抑菌活性,以及发酵后培养基的 pH 值。

#### 1.3.4.4 不同接种量对海洋弧菌的抑制作用

以 0.5%~6% 的接种量接入发酵培养基,37 °C 培养,分别于 20, 24 和 30 h 测定抑菌活性和发酵液的 pH 值。

#### 1.3.4.5 不同装液量对海洋弧菌的抑制作用

采用 300 ml 的三角瓶,分别装入 30, 50, 100, 150 和 200 ml 的培养液,37 °C 静止培养 24 h,测定抑菌活性的大小。

## 2 结果和讨论

### 2.1 不同稀释倍数的发酵上清液的抑菌活性

实验结果表明,发酵上清液对海洋弧菌有一定的抑制作用,稀释至 2~5 倍后,还保存较强的抑菌活性,抑菌活性可保留 80% 以上;发酵上清液稀释 10 倍后,检测不到对海洋弧菌的抑制作用。将上清液同原发酵液相比较,前者抑菌活性略微降低(为发酵液的

96%)。其原因在于原发酵液中含有的乳酸链球菌 L318, 在检测过程中, 继续产生乳链菌肽抗菌活性物质, 显示出比去菌上清液较强的抗菌活性。

## 2.2 不同碳源、氮源对乳酸链球菌 L318 的生长和对海洋弧菌的抑制作用

### 2.2.1 不同碳源的影响

不同碳源对乳酸链球菌 L318 的生长及其代谢产物乳链菌肽对海洋弧菌的抑制作用的结果见表 1。在表 1 所提供的碳源中, 以蔗糖为碳源, 可得到最大的抑菌圈直径和较高的菌体生长, 因此, 蔗糖是所测定

表 1 不同碳源对乳酸链球菌 L318 生长和对海洋弧菌的抑制作用

Tab.1 Effect of carbon sources on growth of *Streptococcus lactis* L318 and inhibition effects on marine *Vibrio* sp.

碳源	发酵后 pH 值	OD <sub>600</sub>	抑菌圈直径 (mm)
葡萄糖	3.83	5.07	13.6
乳糖	3.82	4.90	13.4
半乳糖	3.93	2.81	13.5
蔗糖	3.81	5.47	14.6
麦芽糖	3.81	7.07	10.9
果糖	3.87	3.21	12.4
甘露糖	3.80	4.04	11.3
纤维二糖	3.81	4.86	12.1
木糖	5.38	0.501	无
山梨糖	5.68	0.429	无
对照	6.15	0.496	无

的碳源中能够产生对海洋弧菌最大抑菌活性的碳源。同时, 乳酸链球菌 L318 也能利用葡萄糖、乳糖和半乳糖良好的生长和产生较高的抑菌活性。以麦芽糖为碳源, 可获得最高的生长量, 但抑菌活性较低。乳酸链球菌 L318 不利用木糖和山梨糖生长, 从而检测不到抑菌活性。

### 2.2.2 不同氮源的影响

不同氮源对乳酸链球菌 L318 的生长及其代谢产物乳链菌肽对海洋弧菌的抑制作用的结果见表 2。表明, 有机氮源, 例如酵母膏、蛋白胨和胰蛋白胨等可促进菌体生长, 并产生有抑菌活性的乳链菌肽。无机氮源不支持菌体生长, 检测不到抑菌活性。因此乳酸链球菌 L318 的生长需要有丰富的有机氮源。这是由于对乳链菌肽产生菌而言,

多数需要外源特定的生长因子, 提供生长所需。采用复合有机氮源可获得菌体的最佳生长和产生最佳的抑菌活性。

## 2.3 不同起始培养基 pH 值对海洋弧菌的抑制作用的影响

不同起始培养基 pH 值对海洋弧菌抑制作用的结果如图 1。可以看出, 在 pH=7.0 时有最大的抑菌

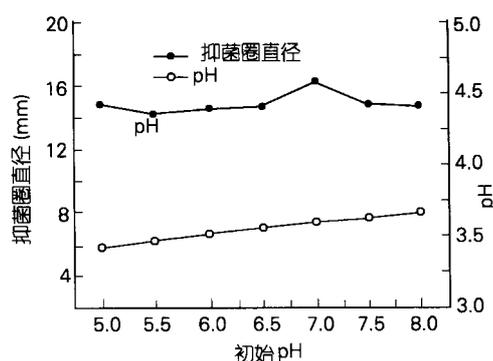


图 1 不同起始 pH 对海洋弧菌的抑制作用

Fig.1 Inhibition effect of different initial pH on *Vibrio* sp.

活性, 随着 pH 值的增加和降低, 抑菌活性略有下降, 但对抑菌活性的产生的影响不是很明显。同时, 随着 pH 值由 5.0 增加至 8.0 时, 发酵后 pH 值呈略微增加的趋势。

## 2.4 不同培养温度对海洋弧菌的抑制作用的影响

表 2 不同氮源对乳酸链球菌 L318 生长和对海洋弧菌的抑制作用

Tab.2 Effect of nitrogen sources on growth of *Streptococcus lactis* L318 and inhibition effect on *Vibrio* sp.

氮源	发酵后 pH 值	OD <sub>600</sub>	抑菌圈直径 (mm)	
有机	酵母膏	4.22	10.3	
	蛋白胨	5.03	7.2	
	牛肉膏	5.56	无	
	胰蛋白胨	4.80	7.1	
无机	NH <sub>4</sub> Cl	5.51	无	
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5.48	无	
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	6.97	无	
复合有机	酵母膏 + 蛋白胨 + 牛肉膏	4.12	11.5	
对照		6.04	0.429	无

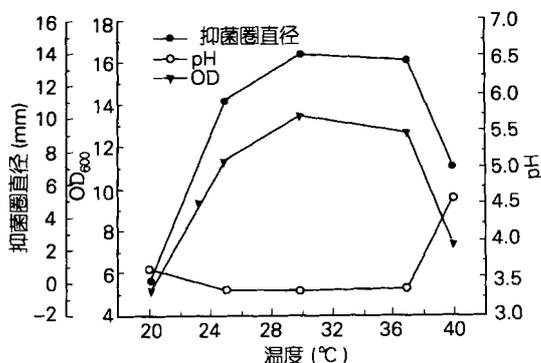


图 2 不同温度对海洋弧菌的抑制作用  
Fig.2 Inhibition effect of different temperatures on *Vbno* sp.

培养温度对海洋弧菌的抑制作用的影响, 结果如图 2 所示。在所测定的温度范围内, 30~37 °C 时, 乳酸链球菌 L318 生长良好, 抑菌活性较高, 其中以 30 °C 为最佳值。当温度高于 37 °C 至 40 °C 时, 抑菌活性明显下降。当温度低于 30 °C 时, 乳酸链球菌 L318 生长缓慢, 在 20 °C 培养至 40 h, 可检测到抑菌活性。

### 2.5 不同接种量对海洋弧菌的抑制作用的影响

不同接种量对海洋弧菌的抑制作用的影响, 结果见图 3。表明, 以 2%~4% 的接种量为最佳, 发酵 24 h 可获得最大的抑菌活性。发酵时间延长至 30 h, 抑

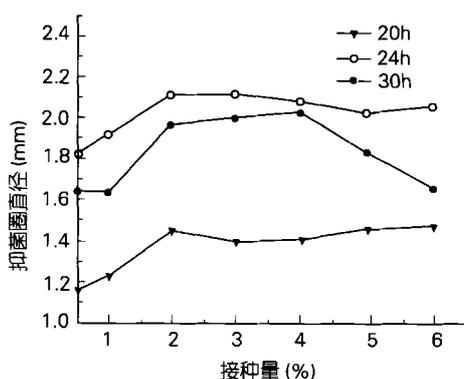


图 3 不同接种量对海洋弧菌的抑制作用  
Fig.3 Inhibition effect of different inoculate volume on *Vbno* sp.

菌活性下降, 这可能是由于蛋白酶类对乳链菌肽的降解, 从而引起抑菌活性的降低。接种量对发酵后的 pH 无明显影响。

### 2.6 不同装液量对海洋弧菌的抑制作用的影响

装液量对海洋弧菌的抑制作用的影响, 结果表明, 每 300 ml 的三角瓶的装液量为 100 ml, 培养 24 h 后, 其抑菌圈直径可达 15.2 mm, 抑菌活性最强。比其他装液量的抑菌活性提高 8.6%~22.6%。这是因为, 乳酸链球菌 L318 属兼型厌氧菌, 液体培养呈颗粒沉淀生长, 不形成菌膜。因此, 对氧的要求不严格, 但仍需一定的溶氧量。

## 3 结语

综上所述, 本文探讨了乳酸链球菌 L318 在碳源和氮源、初始 pH、培养温度、接种量和装液量等培养条件下产生的代谢产物乳链菌肽对海洋弧菌的抑制作用。以蔗糖或葡萄糖为碳源, 酵母膏、蛋白胨和牛肉膏为复合氮源作为发酵培养基, 采用可获得良好的菌体生长和较高的抑菌活性。培养基起始 pH 对乳链菌肽产生的影响不明显, 30 °C 的培养温度为最佳的培养温度, 以 2%~4% 的接种量, 培养 24 h 可获得最大的抑菌活性, 采用 100 ml 的装液量可比其他装液量提高抑菌活性提高 8.6%~22.6%。

本文的研究结果表明, 乳链菌肽作为一种天然的无毒性的抗菌多肽, 对海洋弧菌有较强的抑制作用。因此, 乳链菌肽为由海洋弧菌引起的鱼虾等海水养殖经济动物传染病的控制, 提供了可能性。但乳链菌肽是否对鱼虾类等海洋养殖生物其他的病原菌有较强的抑制作用, 还需做进一步的研究。

### 参考文献

- 孟凡伦, 马桂荣, 孔 健. 益生菌制剂在中国对虾养殖中的研究, 山东大学学报, 1998, 33:101~104
- Carneiro de Melo, Cassar C. A., Mies R. J. et al. . Trisodium phosphate increases sensitivity of gram negative bacteria to lysozyme and nisin, *J. Food Prot.*, 1998, 61: 839~843

### 辅助参考文献

- Cai Y., Ng L. K., Farber J. M., Isolation and characterization of nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from bearsprouts, *J. Appl. Microbiol.*, 1997, 83:499~507

研究报告 *REPORTS*

# THE CULTURE OF *Streptococcus lactis* L318 AND ITS INHIBITION EFFECTS ON MARINE *Vibro* sp.

JIANG Yinghui<sup>1</sup> LI Guangyou<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> College of Marine Life Science, Ocean University of Qingdao, 266003)

(<sup>2</sup> Key Lab. of Marine Biological Active Substance, SOA, Qingdao, 266001)

Received: Aug., 18, 2000

Key Words: *Streptococcus lactis* L318, Nisin, Culture conditions

## Abstract

The effects of different culture conditions on nisin producing of *Streptococcus lactis* L318 were investigated in 1998-1999. The estimation of nisin is a zone plate inhibition method using the test organism marine *Vibro* sp. These culture conditions include different carbon sources (glucose, lactose, galactose, sucrose, maltose, fructose, mannose, cellobiose, xylose, sorbose), nitrogen sources (yeast extract, peptone, beef extract, tryptone, NH<sub>4</sub>Cl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> and combined nitrogen sources), temperature (20, 25, 30, 37 and 40 °C), pH (5.0-8.0), inoculate volume (0.5%-6%) and broth volume (30, 50, 100, 150 and 200 ml). The results were as follow. The fermentation broth free of *Streptococcus lactis* L318 keeps antibacterial activity after 2-5 times dilution. The best growth of strain and the high antibacterial activity can be obtained when sucrose or glucose is used as carbon source and yeast powder, peptone and beef extract are used as combined nitrogen source. The optimum temperature, inoculation proportion and volume were 30 °C, 2% and 100 ml, respectively. In addition, the initial pH had no significant effect on nisin producing. (本文编辑:刘珊珊)