

抑制副溶血性弧菌的乳酸菌筛选鉴定及其生物学特性研究

Screening, identification and biological characteristics of lactic acid bacteria inhibiting *Vibrio parahaemolyticus*

于晨 杨露 管峰 张捷 袁勇军

YU Chen YANG Lu GUAN Feng ZHANG Jie YUAN Yong-jun

(浙江万里学院生物与环境学院, 浙江 宁波 315100)

(College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo, Zhejiang 315100, China)

摘要:目的:丰富功能性乳酸菌资源库,寻找具有副溶血性弧菌拮抗能力的优良乳酸菌出发菌株。方法:采用牛津杯抑菌试验筛选具有广谱抑菌潜力的乳酸菌菌株,通过生长代谢性能、胃肠液耐受性能、耐盐性、抗生素敏感性、抑菌谱等指标探讨其生物学特性。结果:以副溶血性弧菌为指示菌,筛选得到 6 株乳酸菌,经形态学、生理生化、分子生物学鉴定,分别归类于类干酪乳酪杆菌、发酵黏液乳杆菌和植物乳杆菌。其中,类干酪乳酪杆菌 A1 抑菌活性最佳,24 h 内菌落总数超过 1×10^9 CFU/mL,发酵液 pH 值稳定在 4.1 左右,经人工模拟胃液处理 2 h 后,存活率为 54.61%,再经人工模拟肠液处理 8 h 后,存活率仍可达 45.46%,经 10% NaCl 胁迫处理 24 h 后,活菌总数 $> 1 \times 10^5$ CFU/mL。同时,类干酪乳酪杆菌 A1 细菌素粗提物对 13 种致病菌呈良好抑菌活性,具有广谱抑菌潜力,且对 8 种常见抗生素未见耐药性。结论:筛选得到了能够抑制副溶血性弧菌且生物学特性优良的类干酪乳酪杆菌 A1。

关键词:副溶血性弧菌;类干酪乳酪杆菌;筛选;鉴定;生物学特性

Abstract: Objective: This study aimed to enrich the functional lactic acid bacteria resource bank and to search for excellent starting strains of lactic acid bacteria with the antagonistic ability

of *Vibrio parahaemolyticus*. **Methods:** *Lactobacillus* strains with broad-spectrum bacteriostatic potential were screened by Oxford cup bacteriostatic test, and their biological characteristics were discussed by growth and metabolic performance, gastrointestinal fluid tolerance, salt tolerance, antibiotic sensitivity and bacteriostatic spectrum. **Results:** Six strains of lactic acid bacteria were screened by using *V. parahaemolyticus* as indicator bacteria. They were classified into *L. paracasei*, *L. fermentus* and *L. plantarum* by morphological, physiological and biochemical identification and molecular biological identification. Among them, the bacteriostatic activity of *L. paracasei* A1 was the best, the total number of colonies within 24 hours exceeded 1×10^9 CFU/mL, and the pH value of fermentation broth was stable at about 4.1. After artificial simulated gastric juice treatment for 2 h, the survival rate was 54.61%. After artificial simulated intestinal juice treatment for 8 h, the survival rate still reached 45.46%. After 10% NaCl stress treatment for 24 h, the total number of viable bacteria was $> 1 \times 10^5$ CFU/mL. Moreover, the crude bacteriocin extract of *L. paracasei* A1 showed good antibacterial activity against 13 pathogenic bacteria, had broad-spectrum antibacterial potential, and no resistance to 8 common antibiotics was found. **Conclusion:** *L. paracasei* A1, which can inhibit *V. parahaemolyticus* and has excellent biological characteristics, was obtained.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*; *Lactobacillus paracasei*; screening; identification; biological characteristics

基金项目:浙江省基础公益研究计划(编号:LGN22D060003);浙江省生物工程重中之重学科项目(编号:ZS2017005);浙江省“生物工程”一流学科(A类)学生创新计划项目(编号:SZ1000012005050)

作者简介:于晨,女,浙江万里学院在读硕士研究生。

通信作者:袁勇军(1976—),男,浙江万里学院教授,硕士生导师,博士。E-mail: yuan2007019@163.com

收稿日期:2022-09-13 **改回日期:**2023-01-07

副溶血性弧菌为常见水产源食品致病菌,26℃下可快速繁殖,引起食品污染^[1]。大量研究^[2-5]结果显示,国内外水产动物均存在副溶血性弧菌携带情况,携带率约为 30%~75%,夏季水温升高时,水体中固有的副溶血性弧菌大量繁殖,容易引起鱼虾蟹的爆发性死亡,造成重大

经济损失。与此同时,食用被副溶血性弧菌污染的食物,会引起腹痛、腹泻、发热、呕吐等多种肠胃炎症状,严重时甚至会引起休克、死亡^[6]。2017 年中国 348 起食物中毒事件中,由副溶血性弧菌引发 29 起,发病 1 094 例,占发病总人数的 14.81%^[7],副溶血性弧菌已成为食源性疾病头号致病菌^[8]。此外,副溶血性弧菌正逐步向北欧等国家扩展,且环境污染使其变异性和抗药性进一步加强^[9-10]。

目前,副溶血性弧菌的防控方法主要有化学防控和生物防控,但化学药物引起的环境污染会使其变异性和抗药性进一步加强^[10],益生菌防控因具有环境友好、生物安全等优点逐渐兴起^[11]。乳酸菌及其相关制剂因具有维持肠道菌群平衡,增强机体免疫力和抑制病原菌侵害的功能,被广泛应用于食品工业中。目前,有关饲用乳酸菌添加剂类及乳品发酵类优良乳酸菌的筛选鉴定的报道较多^[12-16],但有关副溶血性弧菌等食品致病菌防控的乳酸菌的筛选报道较少。

研究将以副溶血性弧菌为指示菌,通过牛津杯抑菌法从大弹涂鱼肠道、发酵酸奶、健康母乳及婴幼儿粪便等环境中筛选乳酸菌菌株,对排除酸性产物影响后,代谢产物仍具有抑菌活性的乳酸菌分离株进行生理生化鉴定和 16S rDNA 测序,并选取抑菌活性最高的乳酸菌分离株进行相关生物学特性评价,确保菌株具有良好的安全性与应用潜力,为后续应用于食品致病菌防控的益生菌制剂制备提供优良出发菌株。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

样品分离自大弹涂鱼肠道、发酵酸奶、健康母乳及婴幼儿粪便。

1.1.2 指示菌株

白色念珠菌 ATCC10231、马红球菌 CICC22955、蜡芽孢杆菌(63509 上海疾控)、莱什曼氏乳杆菌 ATCC7830、单增李斯特氏菌 ATCC19115、金黄色葡萄球菌 ATCC25923、阪崎肠杆菌 CICC221543、大肠埃希氏菌 ATCC25922、鼠伤寒沙门氏菌 CICC22956、副溶血性弧菌 CICC21618、荧光假单胞菌 ATCC13525、哈维氏弧菌 Zj2008、溶藻弧菌、嗜水气假单胞菌;浙江万里学院微生物实验室保存。

1.1.3 主要试剂和仪器

MRS 肉汤、LB 营养肉汤、LB 固体培养基:青岛海博生物技术有限公司;

人工胃液(USP,无菌)、人工小肠液(USP,无菌):上海源叶生物科技有限公司;

2.5%戊二醛电镜固定液:泉州以达科技有限公司;

细菌基因组 DNA 提取试剂盒:美国 Omega Bio-Tek 公司;

大容量全温度恒温培养振荡器:ZHWY-2112B 型,金坛市盛蓝仪器制造有限公司;

台式冷冻离心机:Sorvall ST 16R 型,德国赛默飞世尔科技有限公司;

酶标仪:Multiskan FC 型,德国赛默飞世尔科技有限公司;

PCR 仪:AG22331 型,德国艾本德公司;

凝胶成像系统:天能 3500 型,上海天能科技有限公司;

冷冻浓缩仪器:FreeZone 型,美国 Labconco 公司;

生物扫描电镜:SU8100 型,日本 JEOL 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 抑制副溶血性弧菌乳酸菌菌株的筛选 取样品稀释,涂布于 MRS 平板,37 °C 培养 24 h,挑选具有溶钙圈的菌株,制备种子液,以体积分数 2%接种量接种于 MRS 液体培养基,37 °C 静置发酵 24 h,4 °C、8 000 r/min 离心 10 min,取上清液真空冷冻干燥,用 5 倍无菌水复溶,0.22 μm 滤膜过滤,4 °C 保存备用。取对数生长期的副溶血性弧菌,菌液浓度调至 1×10^7 CFU/mL,接种 LB 固体平板,放置牛津杯,分别加入 200 μL 浓缩发酵液和 pH 调为 6 的浓缩发酵液,测量其抑菌圈直径。

1.2.2 菌种鉴定

(1) 形态学鉴定:通过牛津杯试验挑选具有抑菌潜力的菌株,取单菌落革兰氏染色,在光学显微镜下观察菌体大小、形状、颜色及排列方式等。

(2) 生理生化鉴定:挑选革兰氏阳性菌,参照 GB 4789.35—2016 对菌株进行常规生理生化试验。

(3) 分子生物学鉴定:利用基因组 DNA 提取试剂盒的方法提取菌株总 DNA,参照章检明等^[17]的方法进行 16S rRNA 序列 PCR 扩增。其中,正向引物 27f: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-3',反向引物 1495r: 5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3'。PCR 反应条件:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 1 min,55 °C 复性 1 min,72 °C 延伸 90 s,30 次循环;72 °C 延伸 10 min。将 PCR 产物回收送至上海生物工程有限公司测序。

1.2.3 菌株电镜表征 取对数生长期的抑菌活性最高的乳酸菌分离菌株,用 0.2 mol/L 磷酸缓冲液漂洗两遍,再用新鲜的 2.5%戊二醛电镜固定液固定,送至南京宁标科技检测有限公司进行扫描电镜观察细菌表面特征。

1.2.4 菌株生长产酸曲线 将乳酸菌分离株以体积分数 2%接种量分别接种于 MRS 液体培养基中,37 °C、100 r/min 震荡培养,每隔 2 h 测量 OD_{600 nm} 和 pH 值,共计 36 h。以培养时间为横坐标,以 OD_{600 nm} 和 pH 值为纵坐标绘制菌株生长产酸曲线。

1.2.5 菌株人工胃肠液耐受性 根据冯艳琴等^[18]的方法,按式(1)、式(2)分别计算人工胃液和人工小肠液中菌株存活率。

$$S_1 = A_1/A_0 \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

S_1 ——人工胃液中菌株存活率,%;

A_0 ——耐受人工胃液 0 h 的活菌数,CFU/mL;

A_1 ——耐受人工胃液 2 h 的活菌数,CFU/mL。

$$S_2 = B_n / B_0 \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

S_2 ——人工小肠液中菌株存活率,%;

B_0 ——耐受人工小肠液 0 h 的活菌数,CFU/mL;

B_n ——耐受人工小肠液 2, 4, 6, 8 h 的活菌数, CFU/mL。

1.2.6 菌株耐盐性 参照杨小慧^[19]的方法并修改。挑取乳酸菌分离株单菌落接种于 MRS 液体培养基中,37 ℃ 恒温静置培养至对数期,以体积分数 2% 接种量接种于 NaCl 质量浓度分别为 0%, 2%, 4%, 6%, 8%, 10% 的 MRS 液体培养基中,静置培养 24 h,梯度稀释涂布计数,每组 3 个平行,按式(3)计算耐盐率。

$$S_3 = C_n / C_0 \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

S_3 ——菌株耐盐率,%;

C_0 ——NaCl 含量为 0% 的 MRS 肉汤中的活菌数, CFU/mL;

C_n ——NaCl 含量为 2%, 4%, 6%, 8%, 10% 的 MRS 肉汤中的活菌数,CFU/mL。

1.2.7 菌株抗生素敏感性 以金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 为质控菌株,按体积分数 2% 接种量接种于 LB 肉汤,37 ℃、110 r/min 震荡培养 12 h;以乳酸菌分离株为试验菌株,按体积分数 2% 接种量接种于 MRS 肉汤,37 ℃ 静置培养 24 h。将质控菌株均匀涂布于 LB 固体平板,将试验菌株涂布于 MRS 固体平板。将不同种类的药敏片分别贴于两种平板表面,每个平板贴 3~4 张抗生素药敏片,每个平板各设 3 组平行,质控菌于 37 ℃ 培养 12 h,试验菌于 37 ℃ 培养 24 h,分别测量其抑菌圈直径,并按表 1 进行药敏性判定。

表 1 不同抗生素药敏性判定标准[†]

Table 1 Criteria for determining drug sensitivity of different antibiotics

抗菌药片	含药量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{片}^{-1}$)	药敏性判断标准/mm		
		R	I	S
阿莫西林	10	≤ 13	14~16	≥ 17
氯霉素	30	≤ 12	13~17	≥ 18
利福平	5	≤ 16	17~19	≥ 20
四环素	30	≤ 14	15~18	≥ 19
头孢噻吩	30	≤ 14	15~17	≥ 18
庆大霉素	10	≤ 12	13~14	≥ 15
青霉素	10	≤ 18	19~28	≥ 29
氟苯尼考	30	≤ 12	13~17	≥ 18

[†] S. 敏感;I. 中度敏感;R. 耐药。

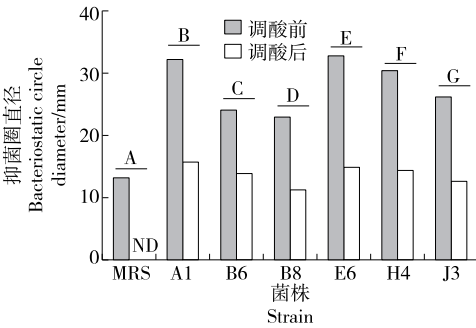
1.2.8 LP-A1 细菌素粗提物抑菌谱 参照吴惠贞^[20]的方法。

1.2.9 数据处理 利用 MEGA 6 构建系统发育树,SPSS 25 进行显著性分析,显著性水平设置为 $P < 0.05$,每组试验设 3 个平行,Graphpad Prism 6.07 作图。

2 结果与分析

2.1 抑制副溶血性弧菌乳酸菌的筛选

通过溶钙圈法筛选得到 100 株产酸菌株,再通过牛津杯抑菌试验,复筛出 6 株排除酸性产物干扰后仍对副溶血性弧菌有明显抑制作用的菌株(A1、B6、B8、E6、H4、J3)。由图 1 可知,调酸前,菌株对副溶血性弧菌的抑菌圈直径由大到小依次为 $E6 > A1 > H4 > J3 > B6 > B8$,抑菌圈直径均 > 20 mm,抑菌活性优良。调酸后,以相同 pH 值乳酸为对照,乳酸对副溶血性弧菌的生长未表现出抑制作用,6 株菌株抑菌圈直径由大到小依次为 $A1 > E6 > H4 > B6 > E6 > B8$,抑菌圈直径为 11~16 mm,抑菌效果较调酸前显著减小($P < 0.05$);以 MRS 培养基为对照,排除后,MRS 培养基不呈现抑菌活性。吕蕾等^[21-22]研究发现,当 pH 为 6 时,可排除酸性产物对抑菌活性的影响,6 株复筛菌的代谢产物排除酸性产物干扰后仍对副溶血性弧菌保留抑菌活性,推测可能含有乳酸菌细菌素类成分。



大写字母不同表示差异显著($P < 0.05$);ND 为未检出

图 1 调酸前后各菌株抑菌效果对比

Figure 1 Comparison of bacteriostatic effects of different strains before and after acid regulation

2.2 菌种鉴定

2.2.1 菌体形态和生理生化鉴定 6 株复筛菌株菌落均呈圆形,凸起,为白色或乳白色,边缘齐整,表面湿润光滑,直径约为 (2 ± 1) mm。由表 2 可知,革兰氏染色后光学显微镜下初步判断,均为革兰氏阳性菌,呈链状或单个排列,无芽孢。各菌株生理生化特征结果与 GB 4789.35—2016 中乳杆菌生化特征描述相符,初步确定复筛细菌均为乳杆菌。

2.2.2 分子生物学鉴定 由图 2 可知,以各乳杆菌分离株 DNA 为模板,经 16S rDNA PCR 扩增获得长度为 1 500 bp 的碱基序列。将测序结果进行同源比对后构建

表 2 复筛菌株生理生化特征[†]
Table 2 Physiological and biochemical characteristics
of rescreened strains

检测指标	A1	B6	B8	E6	H4	J3
七叶苷	+	+	+	+	+	+
纤维二糖	+	—	—	+	+	—
麦芽糖	+	+	+	+	+	+
甘露醇	+	—	—	+	+	—
水杨苷	+	—	—	+	+	—
山梨醇	+	—	—	+	+	—
蔗糖	+	+	+	+	+	+
棉子糖	—	+	+	+	—	+
菊糖	+	—	—	+	+	—
乳糖	—	+	+	+	+	+
1%马尿酸钠	—	—	—	+	+	—

[†] “+”表示阳性;“—”表示阴性。

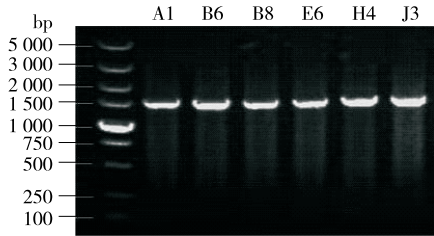


图 2 复筛菌株 PCR 电泳图

Figure 2 PCR electrophoresis of rescreened strains

系统发育树,如图 3 所示。菌株 A1 与类干酪乳酪杆菌 (*Lactobacillus paracasei*) 亲缘关系最近,菌株 B6、B8、J3 与发酵黏液乳杆菌 (*Limosilactobacillus fermentum*) 亲缘关系最近,菌株 E6、H4 与植物乳植物杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 亲缘关系最近。结合菌落形态鉴定、生理生化鉴定和分子生物学鉴定,确定菌株 A1 为类干酪乳酪杆菌,菌株 B6、B8、J3 为发酵黏液乳杆菌,菌株 E6、H4 为植物乳植物杆菌。类干酪乳酪杆菌因具有促进肠胃蠕动、增强机体免疫能力等功能^[23],且无毒副作用、易被人体降解^[24],逐渐成为颇具潜力的工业微生物,且部分类干酪乳酪杆菌能够抑制副溶血性弧菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌等食品致病菌的生长。因此,选取排除酸性产物干扰后抑菌活性最强的类干酪乳酪杆菌 A1 (*Lactobacillus paracasei* A1, LP-A1) 继续探索其生长产酸性能、人工胃肠液耐受性、耐盐性、抗生素敏感性等生物学特性。

2.3 LP-A1 形态特征

由图 4 可知,经 10.0 kV 加速电压进行场发射扫描电镜观察,LP-A1 菌体表面完好,无鞭毛和荚膜,以单个形式排列,无分支,分散效果良好,边界明亮清晰,呈短杆状,长宽比约为 1.5。

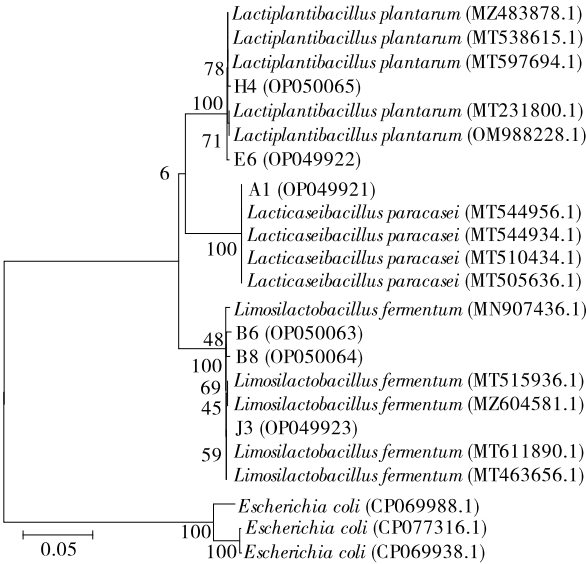


图 3 复筛菌株系统进化树

Figure 3 Phylogenetic tree of rescreened strains

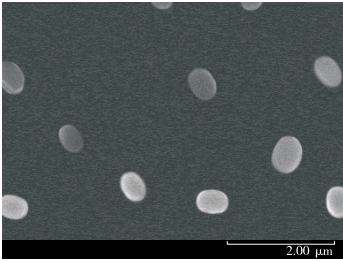


图 4 LP-A1 场发射扫描电镜图

Figure 4 Scanning electron microscope of LP-A1 field emission

2.4 LP-A1 生长产酸曲线

由图 5 可知,菌株在 4~12 h 呈指数增长,24 h 时 OD_{600 nm} 达到稳定状态,指数生长期菌落总数达 1 × 10⁹ CFU/mL 以上,菌株生长旺盛。由产酸曲线可知,LP-A1 发酵液原始 pH 值为 6.1,对数生长期,发酵液 pH 值迅速下降,24 h 后发酵液 pH 值稳定在 4.1 左右,菌株产酸旺盛,具有良好代谢能力。

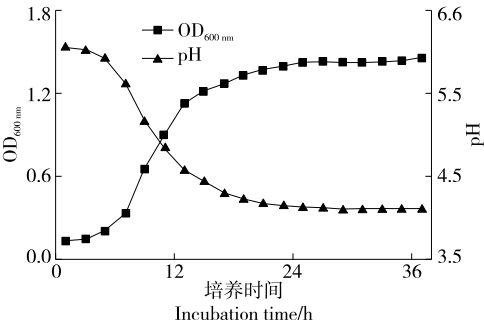
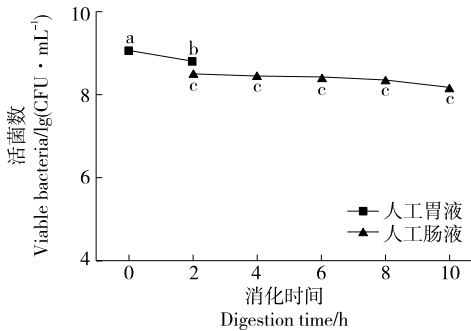


图 5 LP-A1 生长产酸情况

Figure 5 Growth and acid production of LP-A1

2.5 LP-A1 人工模拟胃液耐受性

由图 6 可知,经人工模拟胃液(pH 3)处理 2 h,LP-A1 存活率可达 54.61%,再经人工模拟肠液继续处理 2, 4, 6, 8 h,其存活率分别为人工模拟胃液处理后细菌总数的 91.35%,83.32%,72.05%,45.46%。人工模拟胃液(pH 3)处理 2 h,LP-A1 活菌数显著下降($P<0.05$);人工模拟肠液处理 0 h,LP-A1 活菌数亦显著降低($P<0.05$),经人工模拟肠液继续处理 8 h,LP-A1 活菌数无显著差异。人工模拟肠液消化 8 h 后,LP-A1 活菌数仍高于 10^8 CFU/mL,具有良好的胃液耐受能力。这与黄桂东等^[25]、余萍等^[26]的研究结果基本一致。



小写字母不同表示差异显著($P<0.05$)

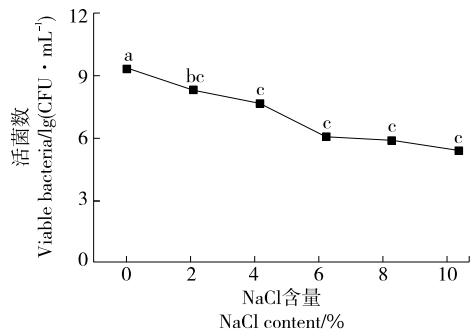
图 6 LP-A1 在人工模拟胃肠液中的生长情况

Figure 6 Growth of LP-A1 in artificial simulated gastrointestinal fluid

由图 7 可知,LP-A1 活菌数随盐浓度的上升而下降,当盐浓度为 2%~6%时,LP-A1 活菌数呈指数下降,其存活率分别为 87.20%,19.27%,0.51%,当盐浓度为 8%~10%时,LP-A1 活菌数下降减缓,其存活率分别为 0.33%,0.11%,以 10%盐浓度胁迫处理 24 h,LP-A1 活菌数仍在 10^5 CFU/mL 以上,呈现良好的盐应激适应能力,具有应用于高盐环境食品致病菌防控的优良潜力。

2.6 LP-A1 抗生素敏感性

由表 3 可知,LP-A1 对阿莫西林、氯霉素、利福平、四



小写字母不同表示差异显著($P<0.05$)

图 7 LP-A1 不同盐浓度耐受情况

Figure 7 Tolerance of LP-A1 to different salt concentrations

表 3 LP-A1 药敏试验结果[†]

Table 3 Results of LP-A1 drug sensitivity test

抗生素 种类	<i>Staphylococcus aureus</i>		LP-A1	
	抑菌圈直径/mm	判定标准	抑菌圈直径/mm	判定标准
阿莫西林	20.22±0.28	S	19.85±0.58	S
氯霉素	20.43±0.24	S	27.73±0.31	S
利福平	24.55±0.42	S	23.25±0.79	S
四环素	24.39±0.31	S	25.85±0.75	S
头孢噻吩	30.99±0.51	S	19.20±0.64	S
庆大霉素	20.59±0.43	S	16.15±0.45	S
青霉素	28.05±0.15	I	22.84±0.66	I
氟苯尼考	22.30±0.21	S	26.21±0.56	S

[†] S. 敏感;I. 中度敏感;R. 耐药。

环素、头孢噻吩、庆大霉素、青霉素、氟苯尼考 8 种抗生素均表现中高度敏感,未见耐药性,与刘禹辰等^[27]、Cai 等^[28]认为乳酸菌及其制剂有望作为抗生素的潜在候选替代物的观点一致。

2.7 LP-A1 发酵液抑菌谱

由表 4 可知,LP-A1 细菌素粗提物对真菌、革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌均有抑菌活性。对溶藻弧菌、哈维氏弧菌、嗜水气假单胞菌、副溶血性弧菌、荧光假单胞菌、白色念珠菌、马红球菌、蜡样芽孢杆菌、大肠埃希氏菌 9 种

表 4 LP-A1 细菌素粗提物抑菌谱[†]

Table 4 Antibacterial spectrum of LP-A1 bacteriocin crude extract

指示菌株	LP-A1 细菌素粗提物		MRS 培养基沉淀复溶物	
	抑菌圈直径/mm	效果	抑菌圈直径/mm	效果
白色念珠菌	16.75±0.13	+++	—	—
马红球菌	15.97±0.29	+++	—	—
单增李斯特氏菌	14.81±0.06	++	—	—
蜡样芽孢杆菌	17.27±0.12	+++	—	—
金黄色葡萄球菌	14.28±0.03	++	—	—
阪崎肠杆菌	11.58±0.10	+	—	—
大肠埃希氏菌	16.46±0.03	+++	—	—
鼠伤寒沙门氏菌	13.27±0.02	++	—	—
溶藻弧菌	15.53±0.10	+++	—	—
哈维氏弧菌	18.27±0.04	+++	—	—
嗜水气假单胞菌	16.78±0.02	+++	—	—
副溶血性弧菌	17.72±0.03	+++	—	—
荧光假单胞菌	17.15±0.05	+++	—	—

[†] “+++”表示抑菌圈直径为 15~20 mm;“++”表示抑菌圈直径为 12~15 mm;“+”表示抑菌圈直径为 7.8~12 mm;“—”表示未检出抑菌圈。

致病菌抑菌圈直径均达 15 mm 以上,呈现尤其良好的抑菌活性,对鼠伤寒沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、单增李斯特氏菌、大肠埃希氏菌 4 种食品致病菌亦呈现良好抑菌活性,具有广谱抑菌潜力。

3 结论

以副溶血性弧菌为指示菌,从环境中筛选出了 6 株排除酸性产物干扰后仍具抑菌活性的乳酸菌菌株,对 LP-A1 生物学特性进行深入研究,发现其生长活力高,产酸旺盛,对人工模拟胃肠液及高盐的苛刻环境具有良好耐受能力,对常见的 8 种抗生素均无耐药性,其细菌素粗提物具有广谱抑菌潜力,对 13 种食品致病菌均呈现良好抑菌活性,有成为食品致病菌防控领域绿色、安全出发菌株的优良潜力,应用前景广阔。此外,可通过 LC-MS/MS 蛋白鉴定进一步挖掘 LP-A1 细菌素粗提物的有效抑菌成分,可结合免疫组学和蛋白组学进一步阐明其抑菌机制。

参考文献

- [1] 焦辛妮, 韦贤瑞, 陈坚磊, 等. 一起副溶血性弧菌引起的食源性疾病暴发调查[J]. 实用预防医学, 2020, 27(6): 724-726.
- [2] JIAO X N, WEI X R, CHEN J L, et al. Investigation on an outbreak of foodborne disease caused by *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Practical Preventive Medicine, 2020, 27(6): 724-726.
- [3] YU Q, NIU M, YU M, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from retail shellfish in Shanghai[J]. Food Control, 2016, 60: 263-268.
- [4] CHEN J, ZHANG R, QI X, et al. Epidemiology of foodborne disease outbreaks caused by *Vibrio parahaemolyticus* during 2010—2014 in Zhejiang Province, China[J]. Food Control, 2017, 77: 110-115.
- [5] KUNBAWUI P, SOO M J, RA R A, et al. Occurrence and virulence of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seawater and bivalve shellfish of the Gyeongnam coast, Korea, in 2004—2016[J]. Marine Pollution Bulletin, 2018, 137: 382-387.
- [6] SILVA I P, CARNEIRO C D S, SARAIVA M A F, et al. Antimicrobial resistance and potential virulence of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from water and bivalve mollusks from Bahia, Brazil[J]. Marine Pollution Bulletin, 2018, 131: 757-762.
- [7] LI L, MENG H, GU D, et al. Molecular mechanisms of *Vibrio parahaemolyticus* pathogenesis[J]. Microbiol Res, 2019, 222: 43-51.
- [8] 王霄晔, 任婧寰, 王哲, 等. 2017 年全国食物中毒事件流行特征分析[J]. 疾病监测, 2018, 33(5): 359-364.
- [9] WANG X Y, REN J H, WANG Z, et al. Epidemiological characteristics of food poisoning events in China, 2017[J]. Disease Surveillance, 2018, 33(5): 359-364.
- [10] 李红秋, 郭云昌, 宋壮志, 等. 2019 年中国大陆食源性疾病暴发监测资料分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2021, 33(6): 650-656.
- [11] LI H Q, GUO Y C, SONG Z Z, et al. Analysis of foodborne disease outbreaks in China in 2019[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2021, 33(6): 650-656.
- [12] BAKER-AUSTIN C, OLIVER J D, ALAM M, et al. *Vibrio* spp. infections[J]. Nat Rev Dis Primers, 2018, 4(1): 8.
- [13] ZHAO S, WEI W, FU G, et al. Application of biofertilizers increases fluoroquinolone resistance in *Vibrio parahaemolyticus* isolated from aquaculture environments [J]. Marine Pollution Bulletin, 2020, 150: 110592.
- [14] KUMAR B K, DEEKSHIT V K, RAJ J R M, et al. Diversity of *Vibrio parahaemolyticus* associated with disease outbreak among cultured *Litopenaeus vannamei* (Pacific white shrimp) in India[J]. Aquaculture, 2014, 433: 247-251.
- [15] MENG F, ZHANG F, CHEN Q, et al. Virtual screening and in vitro experimental verification of LuxS inhibitors from natural products for *Lactobacillus reuteri* [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 147: 112521.
- [16] YU X, ZHANG Y, XU F, et al. Screening of immune-enhancing *Lactobacillus* in mice by using a cell-line[J]. J Microbiol Methods, 2022, 192: 106380.
- [17] HAI D, LU Z, HUANG X, et al. In vitro screening of chicken-derived lactobacillus strains that effectively inhibit salmonella colonization and adhesion[J]. Foods, 2021, 10(3): 569.
- [18] OZKAN E R, DEMIRCI T, OZTURK H I, et al. Screening *Lactobacillus* strains from artisanal Turkish goatskin casing Tulum cheeses produced by nomads via molecular and in vitro probiotic characteristics[J]. J Sci Food Agric, 2021, 101(7): 2 799-2 808.
- [19] 李理, 余腾斐, 周晴晴, 等. 零乳糖乳酸菌发酵菌种的筛选及应用研究[J]. 中国乳品工业, 2022, 50(2): 16-20, 30.
- [20] LI L, YU T F, ZHOU Q Q, et al. Screening and application research of low lactose fermentation lactic acid bacteria strains[J]. China Dairy Industry, 2022, 50(2): 16-20, 30.
- [21] 章检明, 步雨珊, 杨慧, 等. 产抗菌肽乳酸菌筛选及抗菌肽的分离纯化与特性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(4): 781-787.
- [22] ZHANG J M, BU Y S, YANG H, et al. Screening of lactic acid bacteria producing antimicrobial peptides and separation, purification and characterization of antimicrobial peptides [J]. Journal of Food Safety and Quality Inspection, 2018, 9(4): 781-787.
- [23] 冯艳琴, 万夕和, 沈辉, 等. 水产动物副溶血性弧菌的拮抗菌研究进展[J]. 微生物学杂志, 2021, 41(1): 99-106.
- [24] FENG Y Q, WAN X H, SHEN H, et al. Advances in antagonistic research of *Vibrio parahaemolyticus* in aquatic animals[J]. Journal of Microbiology, 2021, 41(1): 99-106.
- [25] 杨小慧. 白酒窖池中益生性乳酸菌的分离筛选及其胞外多糖生物活性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2018: 13-14.
- [26] YANG X H. Isolation and screening of probiotic lactic acid

- bacteria in liquor pits and study on the exopolysaccharides biological activity[D]. Hohhot: Inner Mongolia University, 2018: 13-14.
- [20] 吴惠贞. 罗伊氏乳杆菌发酵制备抑菌物质及其特性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2020: 16-17.
- WU H Z. Study on fermentation preparation of antimicrobial substance by *Lactobacillus Reuteri* and its characteristics [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2020: 16-17.
- [21] 吕蕾, 杨晓萍, 王阿利, 等. 酱油渣中具有抑菌活性的乳酸菌的筛选及其抑菌特性[J]. 食品工业科技, 2022, 43(18): 137-144.
- LU L, YANG X P, WANG A L, et al. Screening of lactic acid bacteria with antibacterial activity in soy sauce residue and its antibacterial properties [J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(18): 137-144.
- [22] 佳木泰, 林晓龙, 吴敬, 等. 副干酪乳酸杆菌所产抑菌物质的特性研究[J]. 中国乳品工业, 2018, 46(2): 9-15.
- JIA M T, LIN X L, WU J, et al. Characteristics of antimicrobial substance produced by *Lactobacillus paracasei* [J]. China Dairy Industry, 2018, 46(2): 9-15.
- [23] 杨慧, 郭慧, 郝红伟, 等. 副干酪乳杆菌 N1115 发酵乳对 II 型糖尿病患者血糖的影响[J]. 食品科技, 2018, 43(3): 14-19.
- YANG H, GUO H, HAO H W, et al. Effect of *Lactobacillus paracasei* N1115 fermented milk on blood glucose in people with type II diabetes [J]. Food Science and Technology, 2018, 43(3): 14-19.
- [24] YANG S C, LIN C H, SUNG C T, et al. Antibacterial activities of bacteriocins: Application in foods and pharmaceuticals [J]. Front Microbiol, 2014, 5: 683.
- [25] 黄桂东, 唐素婷, 程云辉, 等. 酱油渣中乳酸乳球菌分离鉴定及对模拟胃肠环境的耐受性[J]. 食品与机械, 2019, 35(8): 15-19, 26.
- HUANG G D, TANG S T, CHENG Y H, et al. Isolation, identification and tolerance to simulated gastrointestinal environment of *Lactococcus lactis* from soy sauce residue [J]. Food & Machinery, 2019, 35(8): 15-19, 26.
- [26] 余萍, 曹蓝, 矫艳平, 等. 副干酪乳杆菌 HCS17-040 的筛选鉴定及其益生特性[J]. 食品与机械, 2021, 37(11): 28-33, 129.
- YU P, CAO L, JIAO Y P, et al. Screening of *Lactobacillus paracasei* HCS17-040 with triglyceride function and study on its probiotic characteristics [J]. Food & Machinery, 2021, 37(11): 28-33, 129.
- [27] 刘禹辰, 程雪, 邓见文, 等. 益生菌在家禽生产中的应用及影响因素研究进展[J]. 中国家禽, 2020, 42(4): 86-92.
- LIU Y C, CHENG X, DENG J W, et al. Research progress on the application and influencing factors of probiotics in poultry production [J]. China Poultry, 2020, 42(4): 86-92.
- [28] CAI T, GALLELLI L, CIONE E, et al. The use of *Lactobacillus casei* DG(R) prevents symptomatic episodes and reduces the antibiotic use in patients affected by chronic bacterial prostatitis: results from a phase IV study [J]. World J Urol, 2021, 39(9): 3 433-3 440.
- (上接第 11 页)
- [22] 洗学权, 黎演明, 杨辉, 等. 凝沉型及交联型淀粉微球的水包水乳液法制备及理化特性比较研究[J]. 河南工业大学学报, 2017, 38(3): 25-30, 37.
- XI X Q, LI Y M, YANG H, et al. Comparative study on preparation and properties of recrystallized and crosslinked starch microspheres by water-in-water emulsion method [J]. Journal of Henan University of Technology, 2017, 38(3): 25-30, 37.
- [23] 张昆明, 陆小菊, 黄永春, 等. 文丘里管空化强化壳聚糖抗菌纳米微球的制备研究[J]. 保鲜与加工, 2018, 18(3): 60-66.
- ZHANG K M, LU X J, HUANG Y C, et al. Preparation of chitosan antimicrobial nanosphere intensified by using venturi tube-based hydrodynamic cavitation [J]. Storage and Process, 2018, 18(3): 60-66.
- [24] 李海, 张文康, 冉力通, 等. 木薯淀粉微球的制备工艺研究[J]. 广西科技大学学报, 2021, 32(3): 108-112.
- LI H, ZHANG W K, RAN L T, et al. Study on the preparation technology of cassava starch microspheres [J]. Journal of Guangxi University of Science and Technology, 2021, 32(3): 108-112.
- [25] 丁涌波. RS3 和 RS4 基纳米抗性淀粉的制备技术及其结构和功能性质研究[D]. 重庆: 西南大学, 2018: 252.
- DING Y B. Preparation and characterization of retrograded starch nanoparticles and chemically modified starch nanoparticles [D]. Chongqing: Southwest University, 2018: 252.
- [26] PUNCHA-ARNON S, JIRANUNTAKUL W, UTTAPAP D. Effects of crosslinking temperature and time on microstructure and stability of cassava starch microspheres [J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 134: 344-352.
- [27] 朱旻鹏, 李新华, 张博, 等. 交联淀粉微球的合成与表征[J]. 农业机械, 2011(2): 111-115.
- ZHU M P, LI X H, ZHANG B, et al. Synthesis and characterization of crosslinked starch microspheres [J]. Farm Machinery, 2011(2): 111-115.
- [28] EJSMTONT A, STASILOWICZ-KRZEMIEN A, LUDOWICZ D, et al. Synthesis and characterization of nanoporous carbon carriers for losartan potassium delivery [J]. Materials, 2021, 14(23): 7 345.
- [29] SONDARI D, RESTU W K, SEPTEVANI A A, et al. Effect of catalyst and cross-linker concentrations on the functional and chemical properties of sago starch [J]. Starch-Starke, 2022, 74(5/6): 2000266.
- [30] PRITAM P, GOKUL K, JITENDRA N. Preparation and statistical optimization of losartan potassium loaded nanoparticles using Box Behnken factorial design: Microreactor precipitation [J]. Chemical Engineering Research & Design, 2015, 104: 98-119.