

A Study on Bacteriostatic Activity of Bacteriocins Produced by Probiotic Bacteria

Lan Wang¹, Yan Zhou², Biting Wu¹, Haiyan Li¹, Jimei Du^{1*}

¹School of Laboratory Medicine, Wenzhou Medical University, Wenzhou Zhejiang

²Demonstration Center of Biological Experimental Teaching, Wenzhou Medical University, Wenzhou Zhejiang

Email: hanazhou@126.com, djm@wmu.edu.cn

Received: Mar. 17th, 2015; accepted: Mar. 20th, 2015; published: Mar. 26th, 2015

Copyright © 2015 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Object: To reveal the bacteriostatic activity of bacteriocins produced by human intestinal probiotics. **Methods:** Intestinal probiotics were separated from excrement of healthy people and identified by routine method and PCR. Bacteriocins were refined as Yang's way and strains that could produce broad-spectrum efficient bacteriocins were selected by using 96-well plate method. Bacteriostatic activity of every selected bacteriocin was detected on *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*, *S. typhi*, *S. flexneri*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* and *C. albicans* by 96-well plate method respectively. **Results:** 32 strains of intestinal probiotics were separated, including 4 bifidobacteria (B), 6 lactobacillus (L), and 22 enterococcus (E). B3, B4, L5, E12, E15, E18 were broad-spectrum efficient bacteriocin producing strains. Bacteriocin of B3, L5, E15 has bacteriostatic action on gram positive and negative bacteria. Both B3 and L5 bacteriocin has strong inhibitory action on *S. typhi* and *S. pneumoniae*, while E15' shows higher inhibitory effects on *C. albicans* and *S. pneumoniae* than other bacteria used in this study. **Conclusion:** Bacteriocins produced by intestinal probiotic bacteria have broad bacteriostatic activity, and some of them are high efficient.

Keywords

Probiotics, Bacteriocins, Bacteriostatic Activity

益生菌细菌素的抑菌活性研究

王 澜¹, 周 燕², 吴碧婷¹, 李海燕¹, 杜季梅^{1*}

*通讯作者。

¹温州医科大学检验医学院, 浙江 温州

²温州医科大学生物学实验教学中心, 浙江 温州

Email: hanazhou@126.com, djm@wmu.edu.cn

收稿日期: 2015年3月17日; 录用日期: 2015年3月20日; 发布日期: 2015年3月26日

摘要

目的: 了解人体肠道益生菌细菌素的抑菌活性。方法: 从健康人粪便中分离肠道益生菌, 用传统方法和PCR法鉴定菌株; Yang法提取细菌素, 96微孔板法筛选产广谱、高效抑菌作用细菌素菌株; 96孔板显色法测定细菌素对金黄色葡萄球菌(*S. aureus*), 肺炎链球菌(*S. pneumoniae*), 大肠埃希菌(*E. coli*), 肺炎克雷伯菌(*K. pneumoniae*), 普通变形杆菌(*P. vulgaris*), 伤寒沙门菌(*S. typhi*), 福氏志贺菌(*S. flexneri*), 铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*), 鲍曼不动杆菌(*A. baumannii*), 白色念珠菌(*C. albicans*)抑菌效果。结果: 分离出32株肠道益生菌, 包括4株双歧杆菌(B)、6株乳杆菌(L)和22株肠球菌(E); B3、B4、L5、E12、E15、E18为产广谱高效细菌素菌株; B3、L5、E15菌株所产细菌素对革兰阳性菌和阴性菌均有抑制作用; 其中B3、L5细菌素对伤寒沙门菌和肺炎链球菌具有较强的抑制作用; E15细菌素对肺炎链球菌和白色念珠菌有较强的抑制作用。结论: 人体肠道益生菌产生的细菌素抑菌谱较广且活性较高, 具有一定的开发潜力。

关键词

益生菌, 细菌素, 抑菌活性

1. 引言

随着现代医学技术的发展, 抗生素品种和数量不断增加并为人类抵抗疾病做出卓越贡献的同时, 抗生素滥用使用也给人类健康造成了一系列严重后果: 如细菌耐药性增加、医药资源浪费、环境污染等等[1]。此外, 抗生素过量或不当使用还会引起人和动物的胃肠功能紊乱, 肠道菌群失调[2]。细菌素(Bacteriocin)是某些细菌在代谢过程中, 通过核糖体合成机制产生的一类具有抑菌活性的多肽或前体多肽, 抑菌范围不局限于同源的细菌, 产生菌对其细菌素有自身免疫性[3]。细菌素是微生物代谢产物, 可以被肠道的水解蛋白酶分解, 对肠道菌群没有不利影响, 且无毒副作用、无残留和抗药性, 同时对环境也不会产生污染[2]。本研究从人新鲜粪便标本中分离肠道益生菌, 筛选产广谱高效细菌素菌株, 通过Yang法粗提细菌素并测定不同细菌素的抑菌活性。结果报告如下:

2. 材料与方法

2.1. 材料

2.1.1. 粪便标本

采集两周内未服用任何抗菌药物健康个体的新鲜粪便 28 份分离培养肠道益生菌。

2.1.2. 试剂和仪器

TPY 培养基(青岛海博); 肠球菌琼脂(青岛海博); 改良番茄汁琼脂培养基(杭州天和); MRS 培养基(杭州天和); LB 肉汤(北京奥博星); 厌氧产气袋(日本三菱); 溶菌酶(大连宝生物); RNA 酶(大连宝生物); Nisin (Oxiod); 酶标仪(Thermo)。

2.1.3. 测试菌株

金黄色葡萄球菌(*S. aureus*) ATCC 25923、肺炎链球菌(*S. pneumoniae*) ATCC 49619、大肠埃希菌(*E. coli*) ATCC 25922、伤寒沙门菌(*S. typhi*) CMCC(B) 50071、福氏志贺菌(*S. flexneri*) CMCC 51572、肺炎克雷伯菌(*K. pneumoniae*) ATCC 4352、普通变形杆菌(*P. vulgaris*) CMCC(B) 49027、铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*) ATCC 27853、鲍曼不动杆菌(*A. baumannii*) ATCC 17978、白色念珠菌(*C. albicans*) ATCC 90028。

2.2. 方法

2.2.1. 益生菌分离

粪便标本用 PBS 均质化处理, 500 rpm 离心 5 min 后取上清, 10 倍倍比稀释。分别吸取 100 μL 的 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 的稀释液涂布改良番茄汁培养基分离乳杆菌, 涂布肠球菌培养基分离肠球菌, 烛缸培养 24 h。吸取 100 μL 的 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} 的稀释液涂布 TPY 培养基分离双歧杆菌, 厌氧培养 48 h。依据《临床微生物学和微生物检验》[4]、《厌氧菌和微需氧菌感染与实验诊断》[5]进行传统方法鉴定; 参照文献[6]扩增细菌 16S rRNA, PCR 产物送 SUNNY 公司测序鉴定。

2.2.2. 筛选菌株

按 Rajaram G 筛选菌株方法[7], 分别制备各分离菌发酵液; 以大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌为指示菌, 100 IU/mL Nisin 和 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 环丙沙星为阳性对照, 按公式: 抑菌率(%) = $100 \times (\text{生长对照 OD}_{590} \text{ 值} - \text{试验 OD}_{590} \text{ 值}) / \text{生长对照 OD}_{590} \text{ 值}$, 96 孔板法筛选产抑菌活性物质菌株。

2.2.3. Yang 法粗提细菌素

参考文献[8] [9]粗提细菌素。发酵液调 pH 至 6.0, 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 2 h, 细菌素吸附于菌体; 4 $^{\circ}\text{C}$, 8000 rpm/min 离心 15 min, 去上清, 磷酸缓冲液(pH = 6.0)洗涤; 离心, 4 $^{\circ}\text{C}$, 8000 rpm/min 离心 15 min; 将沉淀悬浮在 pH 为 2.0 的 100 mmol/L NaCl 溶液中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 振荡 5 h, 细菌素从菌体解离; 4 $^{\circ}\text{C}$, 8000 rpm/min 离心 15 min, 上清液为细菌素粗提液。

2.2.4. 细菌素抑菌活性测定

以金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、白色念珠菌、铜绿假单胞菌、福氏志贺菌、伤寒沙门菌、肺炎链球菌、鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯菌、普通变形杆菌为指示菌, 取 96 微孔板分别加入 50 μL 的细菌素粗提液、50 μL 的 10^5 cfu/mL 指示菌液和 100 μL 5% 溴甲酚紫 LB 液体培养基, 以 50 μL 生理盐水、50 μL 指示菌液和 100 μL 显色液体培养基为空白和生长对照, 同时以 100 IU/mL Nisin 和 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 环丙沙星为阳性对照, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h, 酶标仪测定 426 nm OD 值。重复三次。按以下公式计算抑菌率。

$$\text{抑菌率}(\%) = 100 \times (\text{生长对照 OD}_{426} - \text{试验 OD}_{426}) / \text{生长对照 OD}_{426}.$$

3. 结果与分析

3.1. 肠道益生菌分离筛选结果

共培养出双歧杆菌属 4 株, 乳杆菌属 6 株, 肠球菌属 22 株。具体见表 1。

3.2. 益生菌细菌素的抑菌活性

32 株细菌分别发酵, 将发酵液调节 pH 及过氧化氢酶处理后测定抑菌活性, 结果其中 11 株菌的发酵液具有抑菌活性。11 株菌的发酵液经胃蛋白酶、胰蛋白酶和蛋白酶 K 处理后测定抑菌活性, 发现抑菌活性均完全消失。

Table 1. The result of the separation of intestinal probiotics
表 1. 肠道分离菌筛选结果

属名	种名	数量(株)
双歧杆菌属	短双歧杆菌	1
	假小链双歧杆菌	2
	青春双歧杆菌	1
乳杆菌属	鼠李糖乳杆菌	2
	植物乳杆菌	2
	嗜酸乳杆菌	1
	卷曲乳杆菌	1
肠球菌属	屎肠球菌	13
	粪肠球菌	6
	鸟肠球菌	2
	铅黄肠球菌	1
合计		32

提取 11 株菌的细菌素并分别测定抑菌活性，结果见表 2。所有菌株产生的细菌素对金黄色葡萄球菌均有抑制作用，其中 B3 为高效菌株；除 L1 株外，其余菌株产生的细菌素对大肠埃希菌均有抑制作用，其中 B3、B4、L5 为高效菌株；B3、B4、L5、E12、E15、E18、E19 共 7 株菌产生的细菌素对白色念珠菌有抑制作用，但无高效菌株。

3.3. 高效菌株细菌素对致病菌的抑制作用

高效菌株 B3、L5、E15 的细菌素对金黄色葡萄球菌，肺炎链球菌，大肠埃希菌，肺炎克雷伯菌，普通变形杆菌，伤寒沙门菌，福氏志贺菌，铜绿假单胞菌，鲍曼不动杆菌，白色念珠菌均有抑制作用；其中 B3、L5 对伤寒沙门菌和肺炎链球菌具有较强的抑菌作用，优于 100 IU/mL Nisin 所产生的抑菌效果($P < 0.05$)；E15 细菌素对肺炎链球菌和白色念珠菌有较强的抑制作用，对肺炎链球菌的抑菌效果高达 94.46% 并优于 100 IU/mL Nisin ($P < 0.05$) (见表 3)。

4. 讨论

随着现代医学的发展，制药工业在迅速有效地开发出新型有效抗生素上已受到了制约，长期滥用抗生素会危害人类健康，并导致耐药性病原菌的产生，限制抗生素的使用或者选择其他可以克服这个难题的替代方式是目前研究的重点[3]。细菌素是一类蛋白类物质，可以被蛋白酶所降解，因此具有较高的安全性，且病原菌对细菌素不产生耐药性。益生菌细菌素，尤其是一些对食品中致病菌有抑制作用的细菌素，如 Nisin。新的研究证实，Nisin 作用的靶位点与万古霉素相同，而且以 Nisin 为主要形式的羊毛硫细菌素可治疗老鼠葡萄球菌引起的传染性疾病和人类的粉刺、痤疮，有效地抑制引起口腔疾病的乳酸菌，可用来治疗病原菌为幽门螺杆菌的胃溃疡[10]。但目前为止一直没有进一步应用于临床的研究报道。

本研究共分离培养出 32 株肠道益生菌，包括双歧杆菌属 4 株，乳杆菌属 6 株，肠球菌属 22 株；其中青春双歧杆菌 B3、假小链双歧杆菌 B4、植物乳杆菌 L5、粪肠球菌 E12、屎肠球菌 E15、屎肠球菌 E18 所产细菌素对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌和白色念珠菌均有较强的抑制作用。抑菌试验是结果表明 B3、L5、E15 所产细菌素不仅对革兰阳性菌如金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌等有抑菌作用，而且对革兰阴性菌如大肠埃希菌、伤寒沙门菌、铜绿假单胞菌等也有较强的抑菌作用，与 Carraturo A.等[11]进行体外试

Table 2. Bacteriostasis rate of the 11 probiotics
表 2. 11 株益生菌细菌素的抑菌率

肠道益生菌 Intestinal probiotics	抑菌率 Bacteriostatic rate (%)		
	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	大肠埃希菌 <i>E. coli</i>	白色念珠菌 <i>C. albicans</i>
B3 (青春双歧杆菌)	49.23	77.82	15.97
B4 (假小链双歧杆菌)	30.88	68.75	30.45
L1 (鼠李糖乳杆菌)	30.21	—	—
L5 (植物乳杆菌)	36.96	68.24	30.36
E1 (屎肠球菌)	45.88	42.69	—
E10 (屎肠球菌)	7.85	46.22	—
E12 (粪肠球菌)	16.57	59.39	10.19
E13 (屎肠球菌)	10.68	47.87	—
E15 (屎肠球菌)	31.23	57.90	5.17
E16 (粪肠球菌)	25.56	42.12	—
E18 (屎肠球菌)	23.89	57.75	20.23

注：“—”表示抑菌率 < 0.1%；N = 5。

Table 3. Bacteriostasis rate of B3, L5 and E15 Bacteriocin on pathogenic bacteria
表 3. B3、L5、E15 细菌素对致病菌的抑菌率

指示菌 Indicator	抑菌率 Bacteriostatic rate (%)			
	100 IU/mL Nisin	B3 细菌素 B3 Bacteriocin	L5 细菌素 L5 Bacteriocin	E15 细菌素 E15 Bacteriocin
金黄色葡萄球菌	94.16%	12.43%	24.74%	5.39%
肺炎链球菌	17.24%	92.13%	95.66%	94.46%
大肠埃希菌	50.25%	41.50%	35.12%	1.42%
伤寒沙门菌	32.68%	74.37%	70.14%	2.94%
福氏志贺菌	44.64%	44.09%	14.00%	47.93%
肺炎克雷伯菌	9.97%	34.34%	24.50%	1.65%
普通变形杆菌	20.50%	45.55%	45.49%	11.95%
铜绿假单胞菌	16.31%	13.78%	26.53%	13.62%
鲍曼不动杆菌	27.27%	16.81%	31.91%	48.65%
白色念珠菌	32.16%	31.25%	35.38%	89.21%

注：N = 5。

验结果：某些细菌素能够对具有多重抗性的金黄色葡萄球菌、肠道杆菌以及链状球菌具有较好的杀死作用相一致。并且 B3、L5 对伤寒沙门菌和肺炎链球菌的抑菌作用，优于 100 IU/mL Nisin 所产生的抑菌效果(P < 0.05)；E15 细菌素对肺炎链球菌的抑菌效果高达 94.46%且优于 100 IU/mL Nisin，有望应用于临床。张红星等[12]对植物乳杆菌 LH-09 细菌素抑菌谱相关性研究中，也有类似的结果，此外 Martinez 等[13]人对双歧杆菌细菌素相关研究也表明细菌素对革兰阴性菌如大肠埃希菌等均有一定的抑制作用，提示 B3、L5、E15 细菌素应用于医疗等领域有着广泛的开发潜力。

本研究提纯的细菌素对细菌抑制作用研究较多但并未对病毒的抑制作用有所探究，考虑到肠道病毒

的多样性、传播的广泛性及在肠道的静默复制[14]，较难在短时间内探究出细菌素对病毒的抑制作用，将在后续试验进一步研究。

基金项目

2012 年浙江省教育厅项目(Y201223986)；温州医科大学本专科学科科研项目(wyx201401031)。

参考文献 (References)

- [1] 樊亭亭 (2012) 我国抗生素滥用规制研究. 硕士学位论文, 南京中医药大学, 南京.
- [2] 丁成为 (2007) 乳酸片球菌素抑菌谱及应用性研究. 硕士学位论文, 天津大学, 天津.
- [3] Nettles, C.G. and Susan, F. (1993) Biochemical and genetic characteristics of bacteriocin of food-associated lactic acid bacteria. *Food Protection*, **50**, 338-356.
- [4] 张卓然 (2004) 临床微生物学和微生物测试 (第三版). 人民卫生出版社, 北京.
- [5] 赵虎 (2005) 厌氧菌和微需氧菌感染与实验诊断. 上海科学技术出版社, 上海.
- [6] Ausubel, F.M., Kingston, R.E. and Seidman, J.G. (2005) Short protocols in molecular biology. 4th edition, Science Press, Beijing.
- [7] Rajaram, G., Manivasagan, P. and Thilagavathi, B. (2010) Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus lactis* isolated from marine environment. *Advance Journal of Food Science and Technology*, **2**, 138-144.
- [8] Li, Y.L., Zhou, Z.J., Han, Y., Wang, P., Ding, C.W. and Bai, H. (2008) Isolation and purification of the antibacterial material produced by *Pediococcus acidilactici*. *Food Science*, **29**, 271-274.
- [9] Yang, R., Johnson, M.C. and Ray, B. (1992) Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**, 3355-3359.
- [10] Hancock, R.E. and Chapple, D.S. (1999) Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*, **43**, 1317-1323.
- [11] Carraturo, A., Raieta, K., Ottaviani, D. and Russo, G.L. (2006) Inhibition of *Vibrio parahaemolyticus* by a bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) produced by *Vibrio mediterranei* 1. *Journal of Applied Microbiology*, **101**, 234-241.
- [12] 张红星, 刘丽, 谢远红, 熊丽霞, 刘慧 (2010) 植物乳杆菌 LH-09 产细菌素的抑菌特性研究. 第一次细胞分子生物学生物物理学和生物工程国际会议论文集, 齐齐哈尔, 2010.12.25, 234-235.
- [13] Martinez, F.A., Balciunas, E.M., Converti, A., Cotter, P.D. and de Souza Oliveira, R.P. (2013) Bacteriocin production by *Bifidobacterium* spp. A review. *Biotechnology Advances*, **31**, 482-488.
- [14] 王占锋, 张萍, 魏萍 (2010) 肠道益生菌抗病毒作用及其机制研究进展. *中国微生态学杂志*, **22**, 184-185.