

植物乳杆菌 ATCC 8014 对寄生曲霉 NRRL 2999 孢子形态影响的研究

杨宝兰 李志刚 李玉伟 姚景会 徐进

(中国疾控中心营养与食品安全所,北京 100021)

摘要:为探讨植物乳杆菌 ATCC 8014 和植物乳杆菌 CGMCC 1.103 对包括寄生曲霉 NRRL 2999 在内的 5 株曲霉孢子活性的影响,将曲霉孢子接种到植物乳杆菌 24 h MRS 培养液中,28 ℃ 培养 24 h 后检测孢子的活性。结果显示:植物乳杆菌 ATCC 8014 和植物乳杆菌 CGMCC 1.103 对 5 株曲霉孢子均有灭活作用。镜下观察植物乳杆菌 ATCC 8014 将寄生曲霉 NRRL 2999 的孢子灭活,使其不能发育成菌丝,故也不能生长。

关键词:乳杆菌科;抑制;曲霉,黄;孢子

Study on the germination of spores of *Aspergillus flavus parasiticus* NRRL 2999 in the presence of *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014

Yang Baolan Li Zhigang Li Yuwei Yao Jinghui Xu Jin

(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100021)

Abstract: The effect of *L. plantarum* ATCC 8014 and CGMCC 1.103 on the germination of spores of 5 strains of *A. flavus* including *Aspergillus flavus parasiticus* NRRL 2999 was determined. A spore suspension of *Aspergillus flavus* was inoculated into MRS medium containing *L. plantarum* ATCC 8014 or CGMCC 1.103 and incubated at 28 ℃ for 24 h. It was observed that the growth of *A. flavus* was inhibited. The inhibition was probably due to the inactivation of the viability of the spores. The spores of *A. flavus* subsp. *parasiticus* NRRL 2999 became swollen with the presence of *L. plantarum* ATCC 8014 in the culture medium.

Key Words: Lactobacillaceae; Inhibition; *Aspergillus flavus*; Spores

真菌种类繁多,分布广泛,某些真菌被用于食品的加工生产,但有些真菌在特定条件下可导致粮油食品的腐败变质。某些真菌不仅本身作为病原体引发人类和动物疾病,其次级代谢产物真菌毒素对人和动物也具有毒性。在防控真菌对食物的污染研究中,乳酸菌对真菌生长与产毒的抑制作用吸引了研究人员的注意。^[1,2]

国外对乳酸菌抑制黄曲霉生长与产毒的研究始于 1980 年。^[3]人们通过调查认识到真菌可污染许多发酵乳制品后,开始探讨乳酸菌与真菌间的相互关系,继而开展对真菌生长有抑制作用的乳酸菌菌种的筛选。我们在前期的研究中,^[4]从 12 株乳酸菌中筛选出对寄生曲霉 NRRL 2999 孢子有灭活作用的植物乳杆菌 ATCC 8014 与植物乳杆菌 CGMCC 1.103。为进一步研究该两株乳酸菌对其他黄曲霉孢子的灭活作用,以及在灭活过程中对孢子萌发形态的影响,设计了本实验。

作者简介:杨宝兰 女 副主任技师

1 材料与方 法

1.1 材料 马铃薯葡萄糖琼脂(PDA, Oxoid)、deMan Rogosa Sharpe(MRS, pH 值为 6.8)(Oxoid)、精密 pH 值试纸(北京化工厂)、倒置显微镜(OL YMPUS B202)所使用的菌种见表 1。

表 1 本实验所使用的菌种

拉丁文	中文
<i>L. plantarum</i> ATCC 8014	植物乳杆菌 ATCC 8014
<i>L. plantarum</i> CGMCC 1.103	植物乳杆菌 CGMCC 1.103
<i>A. flavus</i> subsp. <i>parasiticus</i> NRRL 2999	寄生曲霉 NRRL 2999
<i>A. flavus</i> ATCC 28539	黄曲霉 ATCC 28539
<i>A. flavus</i> CGMCC 3.4409	黄曲霉 CGMCC 3.4409
<i>A. flavus</i> CGMCC 3.4408	黄曲霉 CGMCC 3.4408
<i>A. flavus</i> CGMCC 3.2898	黄曲霉 CGMCC 3.2898

寄生曲霉 NRRL 2999 由美国农业部惠赠。该菌株产黄曲霉毒素量稳定,为国际公认研究黄曲霉生长与产毒的模式菌种。黄曲霉 ATCC 28539、CGMCC 3.4409、CGMCC 3.4408 和 CGMCC 3.2898 均产黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂,购自中科院菌种保藏中心。

1.2 方法

1.2.1 黄曲霉孢子悬液的制备 将黄曲霉接种在PDA琼脂斜面,28℃培养10 d后,加入一定量的无菌磷酸盐缓冲液(含0.05%的吐温-80体积分数),用接种针刮下斜面上的孢子,然后将含有霉菌孢子的悬液通过纱布过滤以除去菌丝残体。将孢子浓度调整为 1×10^7 CFU/mL,待用。

1.2.2 植物乳杆菌 ATCC 8014 与植物乳杆菌 CGMCC 1.103 MRS 培养液的制备 将植物乳杆菌 ATCC 8014 与 CGMCC 1.103 分别接种到 MRS 肉汤中,37℃厌氧培养,24 h 后活菌计数,将细胞浓度调整为 1×10^9 CFU/mL,培养液 pH 值为 4.5 ± 0.5 。

1.2.3 植物乳杆菌 ATCC 8014 和植物乳杆菌 CGMCC 1.103 对黄曲霉孢子活性的影响 将 1 mL 黄曲霉孢子悬液分别接种到 10 mL 植物乳杆菌 ATCC 8014 或 10 mL 植物乳杆菌 CGMCC 1.103 MRS 24 h 培养液中。以 pH 6.8 和用 85% 乳酸调整 pH 为 4.5 的 MRS 肉汤作为对照组,分别接种黄曲霉孢子悬液,试验组与对照组 28℃培养,第二十四小时取不同处理组中少量黄曲霉孢子悬液涂布在 PDA 平板上,以孢子不萌发判断为乳酸菌对其有灭活作用。

2 结果与讨论 结果见表 1 和图 1~图 10。

表 1 植物乳杆菌 ATCC 8014 与植物乳杆菌 CGMCC 1.103 对黄曲霉孢子活性的影响

Strains	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>	MRS	MRS
	ATCC 8014	CGMCC 1.103	pH6.8	pH4.5
<i>A. flavus</i> subsp. <i>parasiticus</i> NRRL 2999	+	+	-	-
<i>A. flavus</i> ATCC 28539	+	+	-	-
<i>A. flavus</i> CGMCC 3.4409	+	+	-	-
<i>A. flavus</i> CGMCC 3.4408	+	+	-	-
<i>A. flavus</i> CGMCC 3.2898	+	+	-	-

注:“+”植物乳杆菌 ATCC 8014 或植物乳杆菌 CGMCC 1.103 对孢子活性有灭活作用;“-”:植物乳杆菌 ATCC 8014 或植物乳杆菌 CGMCC 1.103 对孢子活性无作用。

表 1 显示,植物乳杆菌 ATCC 8014 和植物乳杆菌 CGMCC 1.103 对 5 种产毒曲霉的孢子有灭活作用,说明植物乳杆菌 ATCC 8014 和植物乳杆菌 CGMCC 1.103 有较广泛的抗真菌谱。在 pH 4.5 的条件下曲霉孢子的活性并不受影响。

图 1~图 5 显示,寄生曲霉 NRRL 2999 在 pH 6.8 的 MRS 肉汤中生长良好,28℃培养 12~48 h 后,孢子全部萌发且形成非常茂盛的菌丝体,7 d 后即形成完整的分生孢子,孢子脱落后即可再度萌发,重复上述生长过程。图 6~图 8 显示,寄生曲霉 NRRL 2999 孢子接种到植物乳杆菌 MRS 24 h 培养液中,28℃培养 12 h 后,仅少部分孢子萌发,且形成的菌丝体非

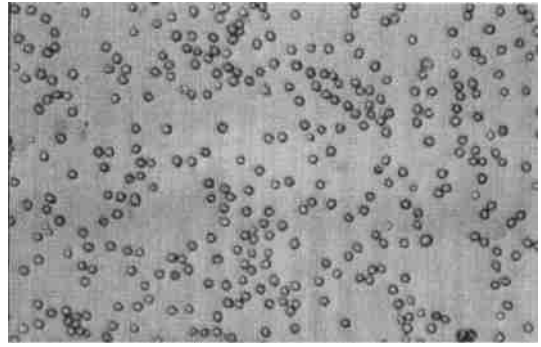


图 1 *A. flavus* subsp. *parasiticus* NRRL 2999 接种到 MRS 肉汤 (pH 6.8) 0 h 镜下形态, $\times 400$

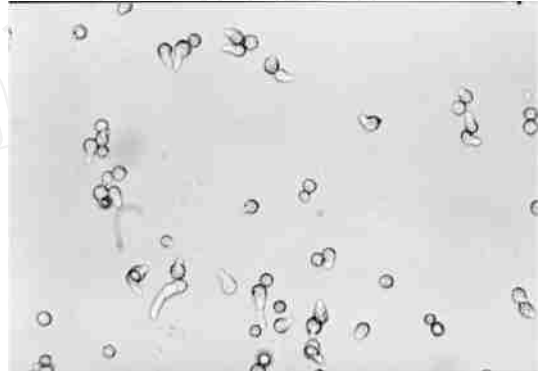


图 2 *A. flavus* subsp. *parasiticus* NRRL 2999 接种到 MRS 肉汤 (pH 6.8) 8 h 镜下形态, $\times 400$

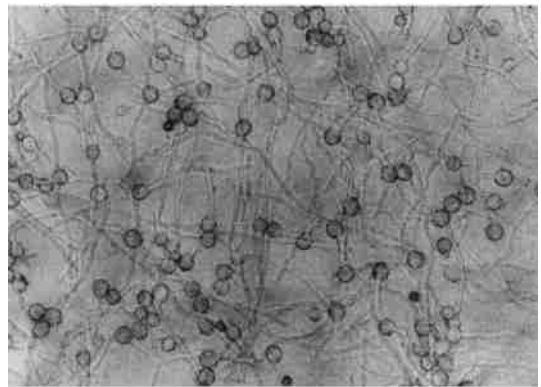


图 3 *A. flavus* subsp. *parasiticus* NRRL 2999 接种到 MRS 肉汤 (pH 6.8) 12 h 镜下形态, $\times 400$

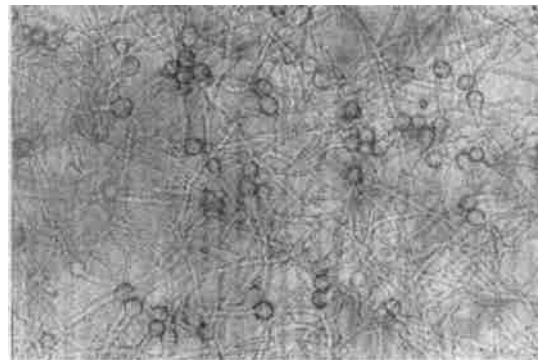


图 4 *A. flavus* subsp. *parasiticus* NRRL 2999 接种到 MRS 肉汤 (pH 6.8) 24 h 镜下形态, $\times 400$

常;24 h 后仅见未萌发的孢子,如将该孢子接种到

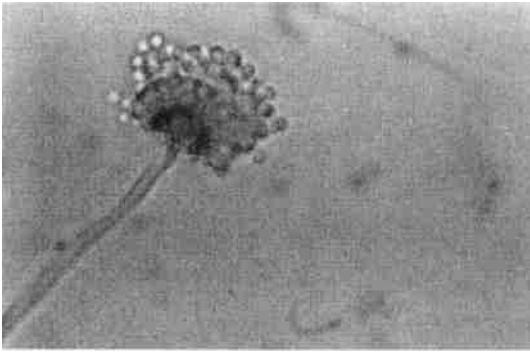


图5 *A. flavus* subsp. *parasiticus* NRRL 2999
接种到 MRS 肉汤 (pH 6.8) 7 d 镜下形态, $\times 400$

PDA 平板上, 28 $^{\circ}$ C 培养 48 h, 孢子未见萌发, 证明孢子已死亡。图 9 和图 10 所示, 寄生曲霉 NRRL 2999 孢子接种到 pH 4.5 的 MRS 培养基, 28 $^{\circ}$ C 培养第二十四小时, 可见孢子萌发后形成的菌丝体及未萌发的孢子, 培养 48 h 后可见孢子全部萌发, 但菌丝体的生长比接种到 pH 6.8 MRS 培养基中生长的菌丝体小, 说明乳酸可轻度抑制菌丝体的生长。

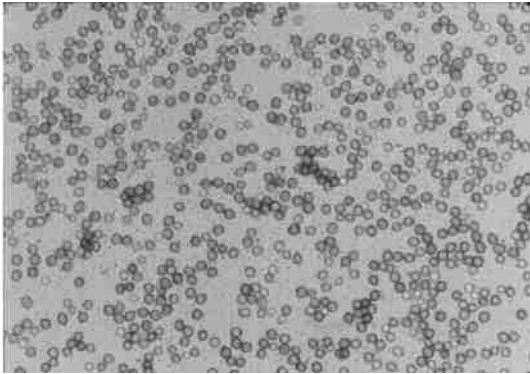


图6 *A. flavus* subsp. *parasiticus* NRRL 2999
接种到 *L. plantarum* ATCC 8014 24 h
MRS 培养液 0 h 镜下形态, $\times 400$

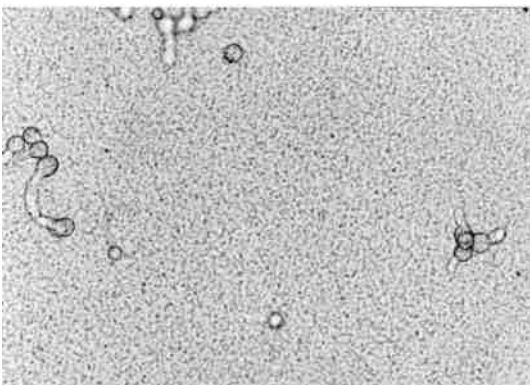


图7 *A. flavus* subsp. *parasiticus* NRRL 2999
接种到 *L. plantarum* ATCC8014
MRS 培养液 12 h 镜下形态, $\times 400$

乳酸菌对真菌孢子的灭活有种类的特异性, 有这种特性的乳酸菌只占种类众多乳酸菌中很少的一部分, 且必须有活菌存在的条件下才体现出对孢子的

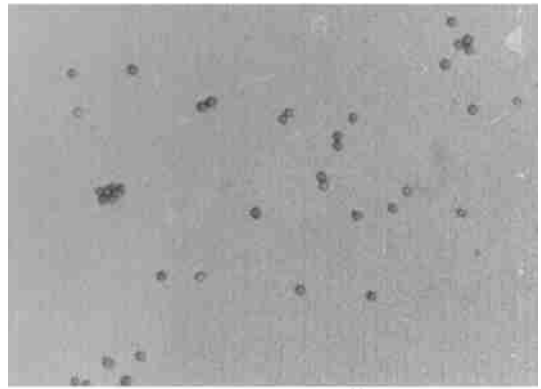


图8 *A. flavus* subsp. *parasiticus* NRRL 2999
接种到 *L. plantarum* ATCC 8014
MRS 培养液 24 h 镜下形态, $\times 400$

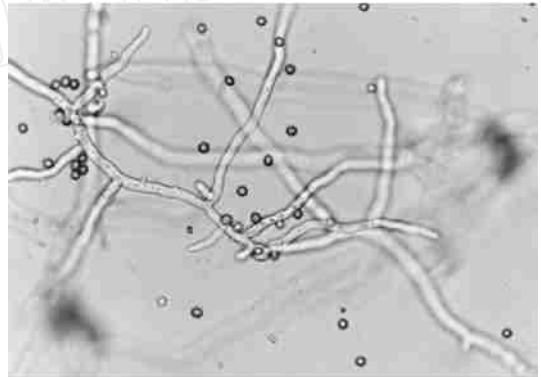


图9 *A. flavus* subsp. *parasiticus* NRRL 2999
接种到 MRS 肉汤 (pH 4.5), 28 $^{\circ}$ C 培养
24 h 后镜下形态, $\times 400$

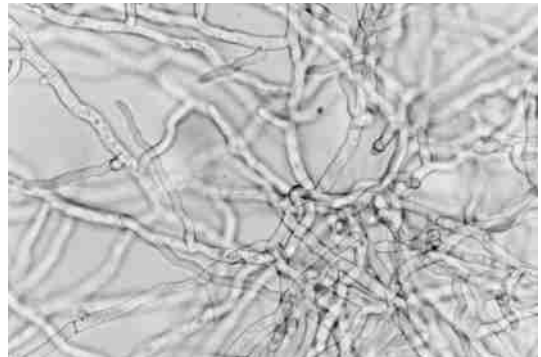


图10 *A. flavus* subsp. *parasiticus* NRRL 2999
接种到 MRS 肉汤 (pH 4.5), 28 $^{\circ}$ C 培养
48 h 后镜下形态, $\times 400$

灭活作用。^[4]因此, 发酵乳制品中维持一定的活菌量尤为重要。在美国, 生产商建议在货架期末酸奶中乳酸菌的含量应为 2×10^6 CFU/mL, 但由于酸奶产品中乳酸菌对酸或氧敏感, 存活数目易下降, 这些因素可能使产品中乳酸菌含量低于上述建议的水平,^[5]造成污染发酵乳制品中的黄曲霉生长与产毒。由于黄曲霉毒素对发酵乳制品的污染在短期内不易为人们所重视, 但其危害是长期的, 故在食品工业发酵过

[下转第 328 页]

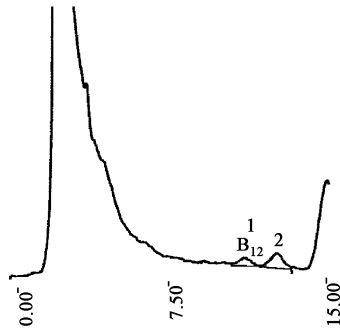


图 8 样品 5 色谱分离图

参考文献:

[1] Morelli B. Determination of a quaternary mixture of vitamins B₆, B₁, and B₁₂ and Uridine 5'-triphosphate, by derivative spectrophotometry[J]. J pharm Sci, 1995, 81(1): 34—37.

[2] Morelli B. Determination synthetic mixtures and commercial injections for drugs[J]. Fresenius 'F Anal chem, 1996, 354(1), :97—102.

[3] Herbeth V, Drivas G, Foscaldi R. Forms of vitamin B₁₂ compounds in fertilized and unfertilized eggs[J]. N Engl J Med, 1982(307): 255.

[4] Kondo H, Binter M J. The assay of cyanocobalamin in pharmaceutical preparations by spectrophotometry[J]. J Acclin Invest, 1982, (70): 889.

[5] Watanabe F, Takenaka S, Abe K, et al. Comparison of a

microbiological assay and a fully automated chemiluminescent system for the determination of vitamin B₁₂ in food[J]. J Agric Food chem, 1998, 46: 1433—1436.

[6] Qiu Ecao, Yunkun Zhao, Shu Qing Wu, et al. Study on the mechanism and applications of the fluorescence reactions among cobalt (), H₂O₂ and two new derivatives of 8-sulfonamidoquinoline[J]. Talanta, 2000(51): 615—623.

[7] L Ballesteros. Analytical use of the kinetics of complex formation: Simultaneous determination of iron and cobalt by differential kinetic methods[J], Analyst, 2001, 108(1285): 443.

[8] Surapote wongyain. Determination of vitamin B₁₂ in multivitamin tablets by multimode high-performance liquid chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2000, (870): 217—220.

[9] Hua-Bin Li, Feng Chen, Yue Jiang. Determination of vitamin B₁₂ in multivitamin tablets and fermentation medium by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection[J]. Journal of Chromatography A, 2000, (891): 243—247.

[10] 中国药典(二部) [M]. 北京: 化学工业出版社. 2000, 760.

[11] Hiroshi Iwase. Ultramicrodetermination of cyanocobalamin in elemental diet by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with visible detection [J]. Journal of Chromatography, 1992, (590): 359—363.

[收稿日期: 2004 - 01 - 22]

中图分类号: R15; O657.72 文献标识码: A 文章编号: 1004 - 8456(2004)04 - 0324 - 05

[上接第 323 页]

程中应该有目的地选择对霉菌孢子活性有灭活作用的乳酸菌, 减少发酵食品对消费者的潜在危害。

参考文献:

[1] Hassan G, Bulleman L B. Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus* spp [J]. J Food Prot, 1995, 57: 1249—1256.

[2] Cotty P J, Bhatnagar D. Variability among toxigenic *Aspergillus flavus* strains in ability to prevent aflatoxin contamination and production of aflatoxin biosynthetic pathway enz-

ymes[J]. Appl Environ Microbiol, 1994, 60: 2248—2251.

[3] Woloshuk C P, Foutz K R, Brewer J F, et al. Molecular characterization of *afIR*, regulatory locus, for aflatoxin biosynthesis[J]. Appl Environ Microbiol, 1994, 60: 2408—2414.

[4] 徐进, 冉陆, 杨宝兰, 等. 乳杆菌抑制黄曲霉孢子萌发的研究[J]. 卫生研究, 2002, 31(1): 47—48.

[5] Dave R I, Shah N P. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures[J]. International dairy Journal, 1997a, 7: 31—41.

[收稿日期: 2004 - 03 - 08]

中图分类号: R15; TS201.3 文献标识码: A 文章编号: 1004 - 8456(2004)04 - 0321 - 04