

# 基于发光细菌法的农产品中主要重金属的联合毒性评价

## Assessment on joint toxicity of heavy metals in agricultural products based on luminescent bacteria method

刘霞<sup>1,2</sup> 何早<sup>1,2</sup> 胡雨欣<sup>1,2</sup> 郑舒<sup>1,2</sup> 罗芳<sup>1,2</sup>

LIU Xia<sup>1,2</sup> HE Zao<sup>1,2</sup> HU Yu-xin<sup>1,2</sup> ZHENG Shu<sup>1,2</sup> LUO Fang<sup>1,2</sup>

(1. 湖南农业大学食品科技学院, 湖南长沙 410128; 2. 食品科学与生物技术湖南省重点实验室, 湖南长沙 410128)

(1. College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China;

2. Hunan Province Key Laboratory of Food Science and Biotechnology, Changsha, Hunan 410128, China)

**摘要:**通过细菌发光抑制试验,研究  $Pb^{2+}$ 、 $Cd^{2+}$  和  $Hg^{2+}$  的单一毒性,以及  $Pb^{2+} + Cd^{2+}$ 、 $Cd^{2+} + Hg^{2+}$ 、 $Pb^{2+} + Hg^{2+}$ 、 $Pb^{2+} + Cd^{2+} + Hg^{2+}$  的混合毒性,分别采用等毒性单位法与加和指数法,对其混合物的联合毒性进行评价。结果表明,3 种重金属的毒性大小为  $Hg^{2+} > Pb^{2+} > Cd^{2+}$ 。对于混合体系,两种评价方法结果一致,即  $Pb^{2+} + Cd^{2+}$  为协同作用; $Cd^{2+} + Hg^{2+}$ 、 $Pb^{2+} + Hg^{2+}$  和  $Pb^{2+} + Cd^{2+} + Hg^{2+}$  均为拮抗作用。

**关键词:**发光细菌法;明亮发光杆菌;联合毒性;重金属;等毒性单位法;加和指数法

**Abstract:** Toxic of  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Pb^{2+} + Cd^{2+}$ ,  $Cd^{2+} + Hg^{2+}$ ,  $Pb^{2+} + Hg^{2+}$  and  $Pb^{2+} + Cd^{2+} + Hg^{2+}$  were investigated using luminescent bacteria test. The joint toxicities of heavy metals mixtures were assessed by toxic unit method and additive index method. Results showed that the joint toxicity of  $Pb^{2+}$  with  $Cd^{2+}$  was synergistic in action while the joint toxicities of  $Cd^{2+}$  with  $Hg^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  with  $Hg^{2+}$ , and  $Pb^{2+}$  with  $Cd^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  were antagonistic.

**Keywords:** luminescent bacteria method; *P. phosphoreum*; joint toxicity; heavy metals; toxic unit method; additive index method

中国是世界主要农产品生产与消费大国之一。农产品的安全关系到广大人民群众的身心健康<sup>[1]</sup>。农用灌溉所用的江、河、湖泊水,若受到了重金属的污染,极易造成蔬菜、大米等农产品中重金属的含量超标,其中以  $Pb$ 、 $Cd$ 、 $Hg$ 、 $Cu$  最为突出<sup>[2]</sup>。重金属极易在人体内积累,在机体内多种重金属

可呈现十分复杂的相互作用,最终对机体引起综合毒性,因此单一重金属毒性并不能真实地反映受污染的农产品对人类和其他生物的危害,必须选择合适的方法对重金属的综合毒性进行评价<sup>[3]</sup>,这对于农产品的食用安全性具有重要的实用价值。

传统的生物毒性评价主要以哺乳类、鱼类<sup>[4-7]</sup>等为受试对象,试验操作复杂,周期长,不能满足快速检测需要。发光细菌不仅具有独特的生理特性,其发光强度可用现代光电手段进行检测。近年来,由此发展的发光细菌法备受关注<sup>[8]</sup>。发光细菌法即发光细菌与外来受试物接触后,若外来受试物具有毒性,则可抑制发光细菌的发光强度。在一定范围内,发光细菌发光强度的变化程度与受试物的浓度呈正相关关系,同时可判断出该物质的毒性大小。李真等<sup>[9]</sup>利用发光杆菌对  $Cu^{2+}$ 、 $Cd^{2+}$ 、 $Pb^{2+}$ 、 $Hg^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Cr^{6+}$  6 种重金属的单一毒性进行了检测;卢俊荣等<sup>[10]</sup>应用发光细菌法,对农产品中的重金属镉和赭曲霉毒素分别进行了单一毒性的检测。该法简单快速,灵敏,不需昂贵的仪器设备,最重要的是可以对受试物的综合毒性进行评价;吴淑杭等<sup>[11]</sup>利用明亮发光杆菌通过二次二因子回归通用旋转组合试验评价了  $Hg^{2+}$ 、 $Cd^{2+}$  和  $Cr^{6+}$  的单一毒性及其联合毒性。

联合作用指数法是应用发光细菌法,研究有毒物质联合毒性的主要方法。联合作用指数法是将观测的混合物效应和期望的效应定量关联起来的方法,尽管混合物中各物质的毒性不同,但对发光细菌的作用方式是相似的,因而一种毒物产生的毒性可被一定量的另一毒物所代替,当毒物的有效浓度以相同的单位表示时,混合物的有效浓度为各毒物的有效浓度之和。目前,评价混合物毒性常用的联合作用指数法主要有:等毒性单位法(TU)、加和指数法(AI)、混合毒性指

**基金项目:**国家自然科学基金项目(编号:31201375);湖南省自然科学基金项目(编号:2015JJ3077)

**作者简介:**刘霞(1976—),女,湖南农业大学副教授,博士。

E-mail:liuxiaspr@aliyun.com

**收稿日期:**2015-11-27

数法(MTI)和相似指数λ法等。其中TU与AI偏重于预测混合物的联合毒性,可以用具体的数字定量描述所测有毒物质的联合毒性,并且这两种方法简单快速。应用不同种方法对有毒物质的联合毒性进行研究,有利于研究结果之间的比较<sup>[12]</sup>,保证研究结果的准确性。

本研究拟采用明亮发光杆菌作为受试生物,研究农产品中可能含有的Pb<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>、Hg<sup>2+</sup>3种重金属单一毒性,在单一重金属毒性的研究基础上,分别应用TU与AI两种方法对Pb<sup>2+</sup>+Cd<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>+Hg<sup>2+</sup>、Pb<sup>2+</sup>+Hg<sup>2+</sup>、Pb<sup>2+</sup>+Cd<sup>2+</sup>+Hg<sup>2+</sup>4种重金属混合体系的联合毒性进行了评价,旨在为Pb<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>、Hg<sup>2+</sup>3种重金属的联合毒性提供基础数据,也为农产品食用安全性的快速筛查提供试验依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

#### 1.1.1 材料与试剂

明亮发光杆菌冻干粉试剂(502)冻干粉:北京滨松光子技术股份有限公司;

96孔白色酶标板:上海卧宏生物科技有限公司;

胰蛋白酶生化试剂、酵母提取物生化试剂、氯化钠、丙三醇、氢氧化钠、盐酸、硝酸铅、氯化镉、氯化汞:分析纯,国药集团上海化学试剂有限公司;

试验用水均为超纯水。

#### 1.1.2 主要仪器设备

多功能酶标仪:Thermo Scientific Varioskan Flash型,赛默飞世尔科技有限公司;

荧光光谱仪:F-7000型,日立公司;

可见分光光度计:722S型,上海欣茂仪器有限公司;

精密pH计:testo205,德国德图公司。

### 1.2 菌种的培养

根据前期的优化工作,将明亮发光杆菌于20℃,120 r/min恒温摇床培养箱内,经16 h摇床培养至对数生长期中期,测

其OD值为0.2,菌落数为10<sup>6</sup> CFU/mL的发光杆菌做为受试菌。

### 1.3 单一毒性的测定

根据预试验结果,将待测的重金属配置成一系列不同浓度的溶液,所有溶液均用3% NaCl溶液定容。然后分别将100 μL菌液与100 μL重金属溶液加入96孔白色酶标板中,空白为100 μL菌液与100 μL的3% NaCl混合溶液,4次平行,标准偏差不得超过15%。将酶标仪振板设置成back-ground,转速600 r/min,振幅1 mm,振板时间4 min,测定30 min时的发光强度。根据式(1)将菌液发光强度转化为相对发光抑制率。以重金属溶液浓度为横坐标,以相对发光抑制率为纵坐标建立工作曲线,根据线性回归方程求出EC<sub>50</sub>(半数发光抑制率)所对应的浓度。以菌种半数发光抑制率来衡量各重金属对明亮发光杆菌的毒性大小。

$$R = \frac{CL - SL}{CL} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

R——相对发光抑制率,%;

CL——对照管光强,RLU;

SL——样品管光强,RLU。

### 1.4 二元、三元重金属的联合毒性的测定

根据1.3获得的单一重金属EC<sub>50</sub>相对应的各种重金属的离子质量浓度(表1),采用等毒性比的混合方法,即混合物中各重金属的毒性比(TR)等于1,将Pb<sup>2+</sup>+Cd<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>+Hg<sup>2+</sup>、Pb<sup>2+</sup>+Hg<sup>2+</sup>二元混合体系,Pb<sup>2+</sup>+Cd<sup>2+</sup>+Hg<sup>2+</sup>三元混合体系,分别按等毒性比配置联合毒性试验中,各混合溶液的质量浓度,每种混合体系设置6个质量浓度组,由最大浓度进行稀释,其中一组为空白对照(ω=3% NaCl溶液)。待测液的质量浓度见表2。测定同1.3,然后分别通过TU与AI,对Pb<sup>2+</sup>+Cd<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>+Hg<sup>2+</sup>、Pb<sup>2+</sup>+Hg<sup>2+</sup>二元混合体系和Pb<sup>2+</sup>+Cd<sup>2+</sup>+Hg<sup>2+</sup>三元混合体系的联合毒性进行评价。

表1 单一重金属毒性EC<sub>50</sub>

Table 1 EC<sub>50</sub> of single heavy metal toxicity

样品	EC <sub>50</sub> /(mg·L <sup>-1</sup> )	相关性(r)	线性回归方程	离子质量浓度/(mg·L <sup>-1</sup> )
HgCl <sub>2</sub>	1.3	0.988 99	y=3.583 72+35.630 35x	1.0
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	13.7	0.963 45	y=11.565 17+2.812 08x	8.6
CdCl <sub>2</sub>	53.6	0.961 44	y=6.203 57+0.816 54x	32.9

表2 二元、三元混合体系质量浓度配比

Table 2 The concentration of binary and trinary mixture of heavy metals

混合体系	空白对照	1	2	3	4	5	6
Pb <sup>2+</sup> +Cd <sup>2+</sup>	0/0	1.075/4.112 5	2.15/8.225	4.3/16.45	6.45/24.675	8.6/32.9	17.2/65.8
Cd <sup>2+</sup> +Hg <sup>2+</sup>	0/0	4.112 5/0.125	8.225/0.25	16.45/0.5	24.675/0.75	32.9/1.0	65.8/2.0
Pb <sup>2+</sup> +Hg <sup>2+</sup>	0/0	1.075/0.125	2.15/0.25	4.3/0.5	6.45/0.75	8.6/1.0	17.2/2.0
Pb <sup>2+</sup> +Cd <sup>2+</sup> +Hg <sup>2+</sup>	0/0/0	1.075/4.112 5/0.125	2.15/8.225/0.25	4.3/16.45/0.5	6.45/24.675/0.75	8.6/32.9/1.0	17.2/65.8/2.0

## 2 结果与讨论

### 2.1 重金属单一毒性

相同的试验条件下,按重金属的离子浓度计算,其毒性大小顺序为  $\text{Hg}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Cd}^{2+}$  (表 1)。

### 2.2 等毒性单位法评价重金属联合毒性

在明亮发光杆菌毒性测试中,随着重金属质量浓度的增加,相对发光强度值(RLU)下降。通常将 RLU 下降到起始数值的 50% 时的重金属物质质量浓度定义为 1 个毒性单位(TU)<sup>[13]</sup>。因此,参照文献[14]对于重金属的单一体系,1 TU 对应于其  $EC_{50}$ 。毒性单位按式(2)计算:

$$TU = \frac{\rho}{EC_{50}}, \quad (2)$$

式中:

$TU$ ——毒性单位;

$\rho$ ——单一体系中重金属离子质量浓度,mg/L;

$EC_{50}$ ——单一体系中重金属半致死离子质量浓度,即在单一体系中重金属的毒性单位=1 TU,mg/L。

对于多元混合体系,混合体系的毒性单位按式(3)计算:

$$TU_{mix} = \frac{\rho A}{\rho A} + \frac{\rho B}{\rho B}, \quad (3)$$

式中:

$TU_{mix}$ ——混合体系的毒性单位;

$\rho A, \rho B$ ——分别为混合体系中其中一个重金属的离子质量浓度,mg/L;

$\rho A, \rho B$ ——分别为单一体系中其中一个重金属的半致死

死离子质量浓度,mg/L。

根据表 2 的质量浓度配比和表 1 的  $EC_{50}$  计算出  $TU_{mix}$ , 以混合体系的毒性单位为  $x$  轴、混合体系发光抑制率为  $y$  轴绘制工作曲线,通过其线性回归方程,计算出混合体系中重金属的毒性单位( $EC_{50mix}$ )。

假设混合体系中各重金属的联合毒性为加和作用,那么混合体系中  $TU_{mix}$  相当于 1 TU。因此,当实际混合体系中  $EC_{50mix} > 1$  TU 时,说明混合重金属毒性变弱,那么两者或三者间为拮抗作用;当  $EC_{50mix} < 1$  TU 时,说明混合重金属毒性变强,那么两者或三者间为协同作用。

采用等毒性单位法重金属混合体系毒性效应试验结果见图 1。在重金属的二元和三元混合体系中,随着混合重金属离子浓度的增加,其发光抑制率越大,且不同的  $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$  二元和三元混合物对明亮发光杆菌的联合毒性明显不同。在一定的等毒性配比范围内,其线性关系良好,  $R^2 > 0.96$ 。  $\text{Pb}^{2+} + \text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+} + \text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+} + \text{Hg}^{2+}$  二元混合体系和  $\text{Pb}^{2+} + \text{Cd}^{2+} + \text{Hg}^{2+}$  三元体系的  $EC_{50mix}$  见表 3。由表 3 可知:  $\text{Pb}^{2+} + \text{Cd}^{2+}$  属于协同作用,即  $\text{Pb}^{2+}$  的存在增加了  $\text{Cd}^{2+}$  的毒性,而  $\text{Cd}^{2+}$  的存在也增加了  $\text{Pb}^{2+}$  的毒性,重金属毒性的这种协同作用对农产品有着重大的安全隐患。  $\text{Cd}^{2+} + \text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+} + \text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+} + \text{Cd}^{2+} + \text{Hg}^{2+}$  均为拮抗作用。联合毒性的判断是建立在单一毒性的  $EC_{50}$  基础上的,以等毒性单位法研究联合毒性可以快速方便地判断出二元以及三元混合物之间的相互作用关系。

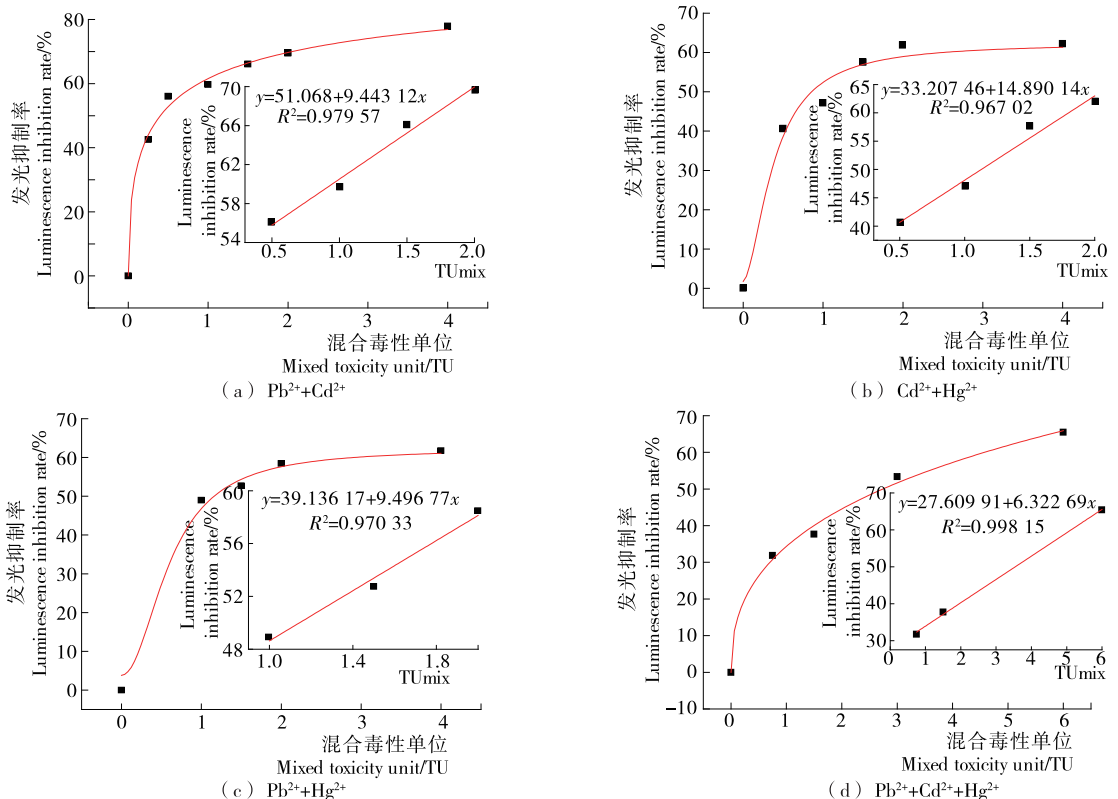


图 1 各混合体系的毒性效应及线性关系

Figure 1 Toxic effect and linear relationship for heavy metals mixture

表3 等毒性单位法评价重金属混合体系的联合毒性

Table 3 Toxicity evaluation of heavy metals mixture based on the toxic unit method

混合体系	线性回归方程	相关性( <i>r</i> )	毒性单位(TU)	评价
Pb <sup>2+</sup> + Cd <sup>2+</sup>	$y = 51.068 + 9.443 12x$	0.979 57	-0.113 1	协同作用
Cd <sup>2+</sup> + Hg <sup>2+</sup>	$y = 33.207 46 + 14.890 14x$	0.967 02	1.127 8	拮抗作用
Pb <sup>2+</sup> + Hg <sup>2+</sup>	$y = 39.136 17 + 9.496 77x$	0.970 33	1.144 0	拮抗作用
Pb <sup>2+</sup> + Cd <sup>2+</sup> + Hg <sup>2+</sup>	$y = 27.609 91 + 6.322 69x$	0.998 15	3.541 2	拮抗作用

2.3 加和指数法评价重金属的联合毒性

根据单一重金属毒性和混合体系毒性的 EC<sub>50</sub> 值。参照文献[15],生物毒性相加作用之和按式(4)计算:

$$S = \frac{Am}{An} + \frac{Bm}{Bn} + \frac{Cm}{Cn}, \quad (4)$$

式中:

S——生物毒性相加作用之和;

Am、Bm、Cm——混合毒性的 EC<sub>50</sub> 值,mg/L;

An、Bn、Cn——a、b、c 单一体系中各重金属的 EC<sub>50</sub> 值,mg/L。

再由 S 求得相加指数 AI,当 S ≤ 1, AI = 1/S - 1; 当 S > 1, AI = 1 - S。

用 AI 判断混合体系的联合毒性,当 AI = 0,为毒性相加作用; AI < 0,为拮抗作用; AI > 0,为协同作用。

采用加和指数法重金属混合体系的毒性效应试验结果见图 2。由图 2 可知,在一定的等毒性质量浓度范围内,发光抑制率与混合体系的质量浓度成正比。由表 4 可知,当 Pb<sup>2+</sup> + Cd<sup>2+</sup> 共存时,其 S = 0.148。因 S < 1, AI = 1/0.148 -

1 = 5.757, AI > 0,因此两者毒性为协同作用。当 Cd<sup>2+</sup> + Hg<sup>2+</sup> 共存时,其 S = 2.564。因 S > 1, AI = 1 - 2.564 = -1.564, AI < 0,故为两者毒性为拮抗作用。当 Pb<sup>2+</sup> + Hg<sup>2+</sup> 共存时,其 S = 1.903。因 S > 1, AI = 1 - 1.903 = -0.903, AI < 0,故两者毒性为拮抗作用。当 Pb<sup>2+</sup> + Cd<sup>2+</sup> + Hg<sup>2+</sup> 三者共存时,其 S = 3.746。因 S > 1, AI = 1 - 3.746 = -2.746, AI < 0,故三者毒性为拮抗作用。

通过上述两种方法对下 Pb<sup>2+</sup> + Cd<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup> + Hg<sup>2+</sup>、Pb<sup>2+</sup> + Hg<sup>2+</sup> 二元混合体系和 Pb<sup>2+</sup> + Cd<sup>2+</sup> + Hg<sup>2+</sup> 三元体系的联合毒性的评价,所得结果完全一致,说明采用细菌发光抑制试验评价有毒物质的联合毒性是可靠的。Cd<sup>2+</sup> + Hg<sup>2+</sup>、Pb<sup>2+</sup> + Hg<sup>2+</sup>、Pb<sup>2+</sup> + Cd<sup>2+</sup> + Hg<sup>2+</sup> 均为拮抗作用,可能是各种重金属与发光杆菌中的酶存在结合位点的竞争,但重金属对于细菌细胞的毒性作用机制至今还未有明确的解释,有待进一步的研究。本试验也说明在混合体系中不同重金属之间存在明显的相互作用,故对于多种重金属污染的农产品,不能以单一重金属的含量去评价其食用的安全性。

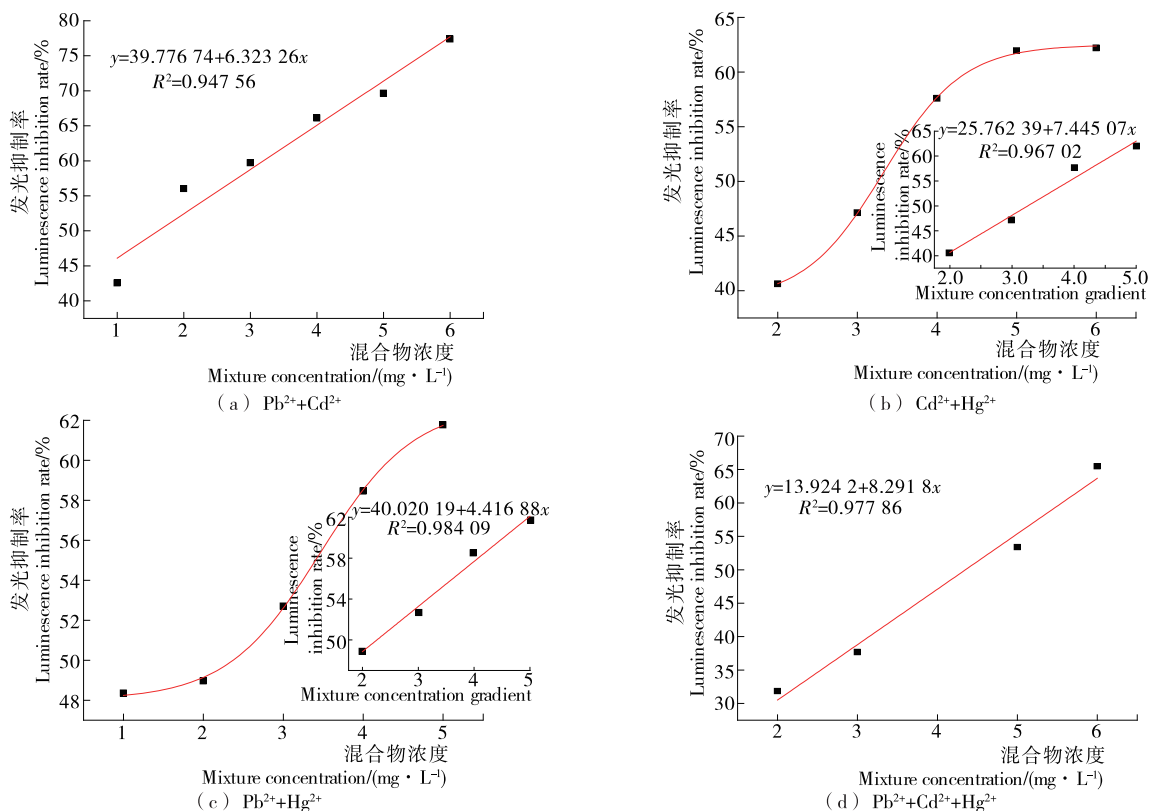


图2 各混合体系的毒性效应及线性关系

Figure 2 Toxic effect and linear relationship for mixturr

表 4 加和指数法评价重金属混合体系的联合毒性

Table 4 Toxicity evaluation of heavy metals mixture based on the additive index method

混合体系	S 值	AI 值	评价
$Pb^{2+} + Cd^{2+}$	0.148	5.757	协同作用
$Cd^{2+} + Hg^{2+}$	2.564	-1.564	拮抗作用
$Pb^{2+} + Hg^{2+}$	1.903	-0.903	拮抗作用
$Pb^{2+} + Cd^{2+} + Hg^{2+}$	3.746	-2.746	拮抗作用

### 3 结论

本试验以明亮发光杆菌为受试生物,分别通过等毒性单位法与加和指数法研究了食品中  $Pb^{2+}$ 、 $Cd^{2+}$ 、 $Hg^{2+}$  3 种重金属的二元、三元混合体系的联合毒性,两种方法所得结果一致,即  $Pb^{2+} + Cd^{2+}$  的联合毒性作用方式为协同作用; $Cd^{2+} + Hg^{2+}$ 、 $Pb^{2+} + Hg^{2+}$ 、 $Pb^{2+} + Cd^{2+} + Hg^{2+}$  联合毒性作用方式均为拮抗作用,说明使用该方法评价有毒物质的联合毒性是准确的。

#### 参考文献

- [1] 杨肖娥,余剑东,倪吾钟,等. 农业环境质量与农产品安全[J]. 中国农业科技导报, 2002, 4(4): 3-10.
- [2] Kelly C J, Tumsaroj N, Lajoie C A. Assessing wastewater metal toxicity with bacterial bioluminescence in bench-scale wastewater treatment system[J]. Water Research, 2004, 38(2): 423-431.
- [3] 吴淑杭,凌云,赵瑜,等. 生物发光法在农产品安全性检测中的应用前景[J]. 农业环境科学学报, 2006, 25(增刊): 421-424.
- [4] 李林茂,赖泽锋,李苏宁,等. 利用斑马鱼胚胎初步评价单壁碳

纳米管的生物毒性[J]. 广西医科大学学报, 2013, 30(3): 332-336.

- [5] 季静,肖斌,李杨,等. 两种不同剂型毒死蜱对四种环境生物毒性评价[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(9): 1 681-1 686.
- [6] 穆希岩. 苯醚甲环唑对斑马鱼毒性及作用机制研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2015: 30-32.
- [7] 周斯芸. 利用鱼类等水生生物进行毒性评价研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2014: 28-38.
- [8] Prakash J, Mimalakhandan N, Sun B, et al. Toxicity of binary mixtures of organic chemicals to microorganisms[J]. Water Research, 1996, 30(6): 1 459-1 463.
- [9] 李真,苗晶晶,潘鲁青. 6 种重金属的发光菌毒性效应及其海洋生物物种敏感度分析[J]. 海洋环境科学, 2015, 34(2): 176-183.
- [10] 卢俊荣. 生物毒性检测技术在农产品检测中的应用研究[J]. 莆田学院学报, 2011, 18(2): 74-77.
- [11] 吴淑杭,周德平,徐亚同,等. 重金属汞、镉和铬对明亮发光杆菌的生物毒性[J]. 农业环境科学学报, 2011, 30(12): 2 446-2 450.
- [12] 张亚辉,刘征涛,刘树深. 混合物联合毒性的评价方法[C]//中国毒理学会环境与生态毒理专业委员会成立大会论文集. 北京: 中国毒理学会, 中国环境科学研究院, 2008: 481-486.
- [13] Fulladosa E, Murat J C, Martinez M, et al. Effect of pH on arsenate and arsenide toxicity to luminescent bacteria (*Vibrio fischeri*) [J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2004, 46(2): 176-183.
- [14] 熊蔚蔚,吴淑杭,徐亚同,等. 等毒性配比法研究镉、铬和铅对淡水发光细菌的联合毒性[J]. 生态环境, 2007, 16(4): 1 085-1 087.
- [15] 王银秋,张迎梅,赵东芹. 重金属镉、铅、锌对鲫鱼和泥鳅的毒性[J]. 甘肃科学学报, 2003, 15(1): 35-38.

(上接第 15 页)

- [8] Saraiva M A F, Nes I F, Baracat-Pereira M C, et al. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* PD6. 9[J]. Journal of Microbiology and Antimicrobials, 2014, 6(5): 79-87.
- [9] Pasteris S E, Pingitore E V, Ale C E, et al. Characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* CRL 1584 isolated from a *Lithobates catesbeianus* hatchery[J]. World J. Microbiol Biotechnol, 2014, 30(3): 1 053-1 062.
- [10] 吴清平,黄静敏,张菊梅,等. 细菌素的合成与作用机制[J]. 微生物学通报, 2010, 37(10): 1 519-1 524.
- [11] Desriac F, Defer D, Bourgougnon N, et al. Bacteriocin as weapons in the marine animal-associated bacteria warfare: inventory and potential applications as an aquaculture probiotic [J]. Mar Drugs, 2010, 8(4): 1 153-1 177.
- [12] 陈兵,田波,原韬,等. 酸菜发酵液中抑菌物质的提取与鉴定[J]. 食品与机械, 2011, 27(5): 123-125.
- [13] 孔保华,迟玉杰. Nisin 在大豆制品保鲜中的应用[J]. 食品与机械, 1997(2): 28-29.
- [14] 贺家亮,秦翠丽,康怀彬,等. 乳酸链球菌素在食品工业中的应用[J]. 食品与机械, 2004, 20(4): 61-63.
- [15] 丛建民. Nisin 在草莓保鲜中的应用研究[J]. 食品与机械, 2008, 24(2): 131-133.

- [16] 王凤翼,季瑛. 乳酸菌发酵豆乳最佳条件探讨[J]. 食品与机械, 1995(4): 14-15.
- [17] 于章龙,刘楚怡,李永歌,等. 酸浆豆腐中菌种抗高温损伤保护剂的研究[J]. 食品科技, 2010(7): 5-8.
- [18] 熊卫东,卫军. 利用豆渣、黄浆水发酵生产曲酸的研究[J]. 食品研究与开发, 2004, 25(4): 52-57.
- [19] 陈则华,李理. 利用大豆黄浆水的发酵研究[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(3): 42-46.
- [20] 刘平,李晓峰,谭新敏. 利用大豆黄浆水发酵生产维生素 B<sub>12</sub> 的工艺探索[J]. 陕西科技大学学报: 自然科学版, 2004, 21(4): 83-85.
- [21] 于海峰,徐国华,卢松,等. 酸浆中嗜酸乳杆菌在豆腐废水发酵中的条件研究[J]. 发酵科技通讯, 2011, 40(1): 21-23.
- [22] 刘冬梅,李理,杨晓泉,等. 用牛津杯法测定益生菌的抑菌活力[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(3): 110-111.
- [23] 张小美,楼秀玉,顾青. 1 株产细菌素乳酸菌的鉴定和细菌素的分离纯化[J]. 中国食品学报, 2013, 13(12): 181-187.
- [24] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组,译. 北京: 科学出版社, 1984.
- [25] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [26] 凌代文,东秀珠. 乳酸菌的分类鉴定及实验基础[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.