

一株拮抗单增李斯特菌的蒙氏肠球菌 A9-1A 的筛选及其细菌素抗菌活性分析

叶庆磊^{1,2}, 张颖², 刘子豪², 冯瑞珍², 蔡佳怡², 蔡佳¹, 张菊梅², 吴清平², 陈谋通^{*2}

1 广东海洋大学 水产学院, 广东 湛江 524088

2 广东省科学院微生物研究所 华南应用微生物国家重点实验室 广东省微生物安全与健康重点实验室 国家卫健委微生物食品营养与安全科技创新平台, 广东 广州 510070

叶庆磊, 张颖, 刘子豪, 冯瑞珍, 蔡佳怡, 蔡佳, 张菊梅, 吴清平, 陈谋通. 一株拮抗单增李斯特菌的蒙氏肠球菌 A9-1A 的筛选及其细菌素抗菌活性分析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(12): 5177-5192.

YE Qinglei, ZHANG Ying, LIU Zihao, FENG Ruizhen, CAI Jiayi, CAI Jia, ZHANG Jumei, WU Qingping, CHEN Moutong. *Enterococcus mundtii* A9-1A with antagonistic effect on *Listeria monocytogenes*: screening and characterization of antimicrobial activity of its bacteriocin[J]. Microbiology China, 2024, 51(12): 5177-5192.

摘要:【背景】单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*), 简称单增李斯特菌, 是一种重要的食源性致病菌, 易感人群感染后致死率可达 20%–30%。【目的】筛选高效拮抗单增李斯特菌的乳酸菌菌株, 并探究其细菌素的理化特性及对单增李斯特菌的杀伤作用。【方法】采用牛津杯法筛选高效拮抗单增李斯特菌的产细菌素乳酸菌菌株; 通过形态特征、16S rRNA 基因序列分析及平均核苷酸一致性分析进行菌株分类学鉴定; 并进一步分析其细菌素的理化特性; 利用激光共聚焦显微镜和扫描电子显微镜表征细菌素粗提物对单增李斯特菌的拮抗作用。【结果】筛选获得一株高效拮抗单增李斯特菌的菌株 A9-1A, 其抑菌圈大小为 37.56 mm, 仅对李斯特菌属(*Listeria*)和粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)具有拮抗作用, 经形态特征、16S rRNA 基因序列分析和平均核苷酸一致性分析鉴定为蒙氏肠球菌(*Enterococcus mundtii*); 其产生的细菌素粗提物能够耐受强酸强碱(pH 2.0–11.0)、高温(37–121 °C)环境, 对淀粉酶和脂肪酶不敏感, 但对蛋白酶敏感, 最低抑菌浓度为 16 µg/mL, 激光共聚焦显微镜和扫描电子显微镜结果表明细菌素粗提物通过损伤细胞的细胞膜并形成孔洞, 造成细胞内容物泄漏, 从而杀死单增李斯特菌。【结论】分离筛选到一株高效拮抗单增李斯特菌的产细菌素蒙氏肠球菌 A9-1A, 其细菌素粗提物具有耐受强酸强碱和高温的特性, 具有在食品生产过程中高效防控单增李斯特菌污染的潜在应用前景。

关键词: 单增李斯特菌; 蒙氏肠球菌; 细菌素; 拮抗机制

资助项目: 国家自然科学基金(32222068, 32072326); 广东省基础与应用基础研究基金(2022B1515020068)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32222068, 32072326) and the Basic and Applied Basic Research Foundation of Guangdong Province (2022B1515020068).

*Corresponding author. E-mail: cmttoon@163.com

Received: 2024-04-07; Accepted: 2024-06-06; Published online: 2024-08-20

***Enterococcus mundtii* A9-1A with antagonistic effect on *Listeria monocytogenes*: screening and characterization of antimicrobial activity of its bacteriocin**

YE Qinglei^{1,2}, ZHANG Ying², LIU Zihao², FENG Ruizhen², CAI Jiayi², CAI Jia¹, ZHANG Jumei², WU Qingping², CHEN Moutong^{*2}

1 College of Fisheries, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, Guangdong, China

2 State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Safety and Health, National Health Commission Science and Technology Innovation Platform for Nutrition and Safety of Microbial Food, Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510070, Guangdong, China

Abstract: [Background] *Listeria monocytogenes* is a major food-borne pathogen, causing the mortality rate of 20%–30% in susceptible populations. [Objective] To screen the lactic acid bacteria with antagonistic effect on *L. monocytogenes* and explore the physicochemical properties and killing effect of the bacteriocin produced by the isolate on *L. monocytogenes*. [Methods] The bacteriocin-producing lactic acid bacteria with antagonistic effect on *L. monocytogenes* were screened by the Oxford cup method. The strain screened out was identified based on morphological characteristics, 16S rRNA gene sequencing, and average nucleotide identity (ANI). The physicochemical properties of the bacteriocin produced by the strain were analyzed and the antagonistic effect of the bacteriocin crude extract on *L. monocytogenes* was characterized by laser confocal microscopy and scanning electron microscopy. [Results] A strain A9-1A with strong antagonistic effect on *L. monocytogenes* was obtained, with the inhibition zone diameter of 37.56 mm and antagonistic effects on *Listeria* and *Enterococcus faecalis*. It was identified as *Enterococcus mundtii*. The bacteriocin produced by this strain could tolerate strong acids and alkali (pH 2.0–11.0) and high temperatures (37–121 °C). It was not sensitive to amylase and lipase but sensitive to proteases. The minimum inhibitory concentration of the bacteriocin crude extract was 16 µg/mL. The results of confocal laser scanning microscopy and scanning electron microscopy showed that the bacteriocin crude extract damaged the cell membrane and led to the formation of holes, causing the leakage of cell contents and thereby killing *L. monocytogenes*. [Conclusion] A bacteriocin-producing strain *E. mundtii* A9-1A with strong antagonistic effect on *L. monocytogenes* was screened out. Its bacteriocin could tolerate strong acids and alkali and high temperatures, demonstrating the application potential in the prevention and control of *L. monocytogenes* contamination in food production.

Keywords: *Listeria monocytogenes*; *Enterococcus mundtii*; bacteriocin; antagonism mechanism

细菌素是一类由细菌核糖体产生的具有抑菌活性小肽^[1], 芽孢杆菌属(*Bacillus*)、链霉菌属(*Streptomyces*)和乳酸菌(*Lactobacillus*, LAB)

均可以产生细菌素^[2]。乳酸菌细菌素具有安全、高效、不易产生耐药性等优点, 在食品防腐保鲜等领域具有极大的应用潜力, 受到人们的广

泛关注^[3]。根据细菌素的结构,可以将细菌素分为三大类,分别是I类、II类和III类^[4-5]。其中,IIa类细菌素含有保守的结构域,抑菌谱较窄,主要对李斯特菌属(*Listeria*)具有高效的拮抗作用^[1]。Rogers等^[6]最早报道由乳酸乳球菌产生的乳酸链球菌素(nisin),随着温度和pH升高,其抑菌活性也会下降^[7]。一些大分子热不稳定细菌素,通常在100℃或更低温度处理30s内即失活,导致其应用范围具有局限性^[8]。

单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*),简称单增李斯特菌,是一种重要的食源性致病菌,被世界卫生组织列为四大食源性致病菌之一^[9]。Chen等^[10]前期对我国各类食品中单增李斯特菌进行风险识别研究发现,华南地区2011–2012年间567份零售生鲜食品样本中大约22%的样本呈单增李斯特菌阳性,75%阳性样本的污染水平在0.3–10 MPN/g。前期研究结果显示,我国食品和临床样本中均分离出多重耐药菌株、强毒力菌株和血清型,表明我国消费者存在接触并感染单增李斯特菌的潜在风险,对我国公共卫生安全构成重大威胁^[11-12]。近年来,国外因单增李斯特菌污染食品造成的安全事件屡见不鲜,2017–2018年,Smith等^[13]报道南非香肠由于污染单增李斯特菌造成重大食品安全事故,导致1060人感染,造成216人死亡。2016–2020年韩国出口的金针菇造成美国和加拿大共48人感染^[14],并且各种食品源的单增李斯特菌分离株耐药性呈现上升趋势^[15-18]。因此,亟须寻找替代抗生素的绿色高效防控单增李斯特菌新方法。

本研究基于课题组前期建立的西藏传统发酵食品及其环境样品的乳酸菌菌种资源库^[19-21],利用牛津杯法筛选高效拮抗单增李斯特菌的产细菌素乳酸菌菌株^[22],通过形态特征、16S rRNA基因序列分析及平均核苷酸一致性分析进行菌

株分类学鉴定,并测定其细菌素粗提物的理化特性,初步探讨其对单增李斯特菌的杀伤作用,以期高效绿色防控单增李斯特菌污染提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 样品

本研究用到的蒙氏肠球菌 A9-1A、乳酸菌菌株、致病菌标准菌株、单增李斯特菌 ATCC 19115、不同序列型(sequence type, ST)单增李斯特菌及生物被膜形成能力强的单增李斯特菌 1516-2LM 均保藏于广东省科学院微生物研究所。

1.2 培养基

MRS 培养基、TSA 培养基和 TSB 培养基,广东环凯生物科技有限公司。

1.3 主要试剂和仪器

PCR 试剂盒、细菌基因组 DNA 纯化试剂盒、PBS 缓冲液和 *FastPfu* Master Mix, 广东环凯生物科技有限公司; GoldView 核酸染料, 北京普博欣生物科技有限责任公司; 电泳级琼脂糖, Biowest 公司; AMT DNA-Seq Kit, 广州吉格生物科技有限公司; NextSeq 550 Reagent Kit, Illumina 公司; LIVE/DEAD BacLight™ 细菌活力检测试剂盒, 英潍捷基(上海)贸易有限公司; 脂肪酶、 α -淀粉酶、 β -淀粉酶、胃蛋白酶和胰蛋白酶, 上海源叶生物科技有限公司; 过氧化氢酶, 上海腾准生物科技有限公司; 蛋白酶 K, 深圳市凯联生物技术有限公司; 风味蛋白酶、复合蛋白酶和碱性蛋白酶, 诺维信生物技术有限公司; 16S rRNA 基因引物由北京六合华大基因科技有限公司合成。

数显游标卡尺, 桂林广陆数字测控有限公司; pH 计, 上海仪电仪器有限公司; PCR 仪, Biometra 公司; 高压灭菌锅, Zealway 公司; 光学显微镜, 奥林巴斯有限公司; 全自动酶标仪,

伯腾仪器有限公司；荧光定量仪、场发射扫描电子显微镜，Thermo Fisher Scientific 公司；Agilent 2100 生物分析仪，安捷伦科技有限公司；NextSeq 550 基因测序仪，Illumina 公司；激光共聚焦扫描显微镜，ZEISS 公司；电子分析天平，赛多利斯科学仪器(北京)有限公司。

1.4 产细菌素乳酸菌的筛选

利用牛津杯法进行产细菌素乳酸菌的筛选^[22]。将活化好的乳酸菌菌株按 1% 的接种量接种到 MRS 液体培养基中，37 °C 静置培养 24 h，培养后的发酵液经 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min 收集上清液，用 1 mol/L 的氢氧化钠调整 pH 值至 6.0–6.2，再用 0.22 μm 滤膜过滤除菌。将活化好的单增李斯特菌按 1% 的接种量接种到 TSB 液体培养基中，37 °C 静置培养 24 h，然后用生理盐水将浓度稀释至 1×10^6 CFU/mL，取 100 μL 1×10^6 CFU/mL 的单增李斯特菌涂布于 TSB 固体培养基上，向牛津杯中加入 200 μL 制备好的乳酸菌发酵上清液，于 4 °C 扩散 4 h，然后放入 37 °C 培养箱中培养 24 h，利用游标卡尺测量抑菌圈大小。

对具有抑菌活性的菌株进行排除过氧化氢和蛋白酶敏感试验，使用 1 mol/L 的氢氧化钠和 1 mol/L 的盐酸将乳酸菌发酵液上清 pH 值调至 7.0 ± 0.1 ，然后加入过氧化氢酶使其终浓度为 1 mg/mL，40 °C 处理 2 h 后 100 °C 灭活 10 min。用 1 mol/L 的氢氧化钠和 1 mol/L 的盐酸将发酵液上清 pH 值调至 7.5 ± 0.1 ，然后加入蛋白酶 K 使其终浓度为 1 mg/mL，55 °C 处理 2 h 后 100 °C 灭活 10 min。处理结束后将 pH 值调回 6.0–6.2，以未做处理的发酵上清液作为对照，采用牛津杯法测定其抑菌活性。

1.5 产细菌素乳酸菌的鉴定

将筛选得到的目标菌株 A9-1A 划线接种于 MRS 固体培养基，于 37 °C 倒置培养 24 h 后观

察菌株的形态并进行革兰氏染色，然后用显微镜(油镜 100×)进行观察。将目标菌株接种于 MRS 液体培养基中，37 °C 静置培养 24 h 后于 4 °C、10 000 r/min 离心 1 min 去除上清液，收集菌体沉淀，然后参照细菌基因组 DNA 纯化试剂盒操作说明书提取 DNA。以提取的基因组 DNA 为模板，用细菌 16S rRNA 基因的通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 进行扩增。PCR 反应体系：上、下游引物(10 μmol/L) 各 1 μL，DNA 模板(50 ng/μL) 1 μL，2×FastPfu Master Mix 12.5 μL，ddH₂O 9.5 μL。PCR 反应条件：95 °C 3 min；95 °C 15 s，55 °C 15 s，72 °C 30 s，30 个循环^[23]。将 PCR 产物送至深圳华大基因科技有限公司进行序列测定。将获得的序列在 NCBI 数据库中比对分析，利用 MEGA 11.0 软件基于邻接法(1 000 次 bootstrap 检验)构建系统发育树^[24]。

使用细菌基因组 DNA 纯化试剂盒提取菌株 A9-1A 的 DNA，随后使用 AMT DNA-Seg Kit 进行测序文库的构建，经 Agilent 2100 生物分析仪质检合格后，使用 NextSeq 550 Reagent Kit 上机测序。将高质量的读长用 SPAdes v.3.6.2 软件进行组装，使用 Prokka 对拼接后的基因组序列进行注释，导出基因组信息。使用 pyani (<https://github.com/widdowquinn/pyani>) 软件对组装好的全基因组数据与 NCBI 上已发表的菌株进行全基因组平均核苷酸一致性(average nucleotide identity, ANI)分析，若与参考菌株序列的 ANI 值 > 95%，则判定为同一菌种^[25]。

1.6 细菌素粗提物的理化特性分析

利用硫酸铵沉淀法^[26]提取发酵液中的细菌素，将菌株 A9-1A 活化后按照 1% 的接种量接种于 MRS 培养基中，37 °C 静置培养 24 h 获得含有细菌素的发酵液，将发酵液于 4 °C、10 000 r/min

离心 10 min 收集上清液。然后向发酵液上清中加入硫酸铵至终浓度达到 80%，于 4 °C 过夜使细菌素沉淀，然后在 4 °C、10 000 r/min 条件下离心 10 min 获得细菌素粗提物沉淀，将其置于 -80 °C 冰箱预冻 2 h，然后转移至真空冷冻干燥机中 -30 °C、0.01 mbar 干燥 48 h，获得干燥的固体粉末状细菌素粗提物。通过牛津杯法对其进行 pH、温度、酶的耐受性和储存稳定性分析，利用游标卡尺测量抑菌圈大小，并计算其相对抑菌率，相对抑菌率(%)=处理组抑菌圈直径/对照组抑菌圈直径×100^[27]。

pH 耐受性:以 pH 6.0 处理的细菌素粗提物溶液作为对照组，将 1 mg/mL 的细菌素粗提物溶液分别用 1 mol/L 的盐酸和 1 mol/L 氢氧化钠溶液调整 pH 值至 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0、13.0，37 °C 处理 2 h，再将 pH 值调回 6.0–6.2，利用牛津杯法测定抑菌活性。**温度耐受性:**以 37 °C 处理的细菌素粗提物溶液作为对照，将 1 mg/mL 的细菌素粗提物溶液分别置于 37、50、60、70、80、90、100、121 °C 处理 30 min，取出后放至室温，利用牛津杯法测定抑菌活性。**酶的耐受性:**以未经酶处理的细菌素粗提物溶液作为对照组，将 1 mg/mL 的细菌素粗提物溶液分别用 1 mol/L 氢氧化钠和 1 mol/L 盐酸调整 pH 至酶的最适 pH，加入过氧化氢酶、 α -淀粉酶、 β -淀粉酶、脂肪酶、蛋白酶 K、胃蛋白酶、胰蛋白酶、风味蛋白酶、复合蛋白酶、碱性蛋白酶使溶液中酶终浓度为 1 mg/mL，在酶的最适温度下处理 2 h，然后 100 °C 灭活 10 min，将 pH 调回 6.0–6.2，用牛津杯法测定其抑菌活性。**储存稳定性:**将菌株 A9-1A 活化后按照 1% 的接种量接种于 MRS 培养基中，37 °C 静置培养 24 h 获得含有细菌素的发酵液，将发酵液于 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min 收集上清液，用 0.22 μ m 滤膜过滤

除菌。将无菌的含有细菌素的发酵上清液于常温下储存，以第 1 天的发酵上清液作为对照组，每隔 1 d 通过牛津杯法测定其抑菌活性。

1.7 细菌素粗提物的抑菌活性分析

抑菌谱:选择不同的致病菌标准菌株及本实验室前期分离的不同 ST 型单增李斯特菌作为指示菌，将菌株活化后，调整其浓度至 1×10^6 CFU/mL，在相应的平板进行涂布，利用牛津杯法测定细菌素粗提物对不同致病菌和不同 ST 型单增李斯特菌的抑菌活性。

最小抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC):将细菌素粗提物配制成 512 μ g/mL 的母液，再以 2 倍稀释法配制终浓度为 1、2、4、8、16、32、64、128、256、512 μ g/mL 的溶液。以单增李斯特菌 ATCC 19115 为指示菌，采用牛津杯法测定其抑菌活性，有抑菌效果的最低浓度即为细菌素粗提物的 MIC。

参照 Zhao 等^[28]的方法稍作修改测定细菌素粗提物对单增李斯特菌的时间杀伤曲线，将培养至对数期 ($OD_{600}=0.6$) 的单增李斯特菌用 TSB 培养基稀释至 1×10^6 CFU/mL 左右，实验组中加入细菌素粗提物溶液使其终浓度为 64 μ g/mL，对照组中加入等量体积生理盐水，于 37 °C 静置培养 6 h，每隔 1 h 取 1 mL，用生理盐水进行 10 倍梯度稀释，然后取 100 μ L 稀释液涂布 TSA 培养基，培养 24 h 后进行菌落计数。以时间为横坐标，菌体浓度为纵坐标，绘制时间-杀伤曲线。同时进行不同处理时间下细菌素粗提物对单增李斯特菌的抑制率分析，抑制率(%)=(对照组的菌落数-实验组的菌落数)/对照组的菌落数×100^[29]。

1.8 细菌素粗提物的拮抗机理

向 TSB 液体培养基中加入细菌素粗提物，使其终浓度为 0、16、32、64、160、320、1 600、3 200 μ g/mL，按 1% 接种量接种活化好的菌株

1516-2LM, 再分别取 200 μL 加入 96 孔板中, 静置培养 24 h 后采用结晶紫染色法测定生物被膜的形成量^[19]。

参照王凤婷等^[30]的方法并稍作修改, 将活化好的菌株 1516-2LM 按 1% 接种量接种至含不同浓度细菌素粗提物的 TSB 液体培养基中作为初始培养液。将无菌细胞爬片($\Phi=14\text{ mm}$)放入 24 孔板中, 再加入 1.5 mL 初始培养液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 24 h。去除菌液, 用 PBS 清洗爬片 3 次并转移至新的 24 孔板, 分别吸取 7.2 μL SYTO 9 染液和 7.2 μL 碘化丙啶(propidium iodide, PI)染液于 4.8 mL PBS 中形成混合染液, 并取 800 μL 混合染液加入 24 孔板中, 室温避光染色 25 min, 最后用 PBS 洗去多余染液, 进行激光共聚焦显微镜观察。

参照 Ali 等^[31]的方法利用电子扫描显微镜分析细菌素粗提物对单增李斯特菌的拮抗作用。将活化好的菌株 1516-2LM 按 1% 接种量接种到 TSB 液体培养基中, 静置培养 6 h 后加入细菌素粗提物使其终浓度分别为 16、32、64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 处理 3 h 后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、5 000 r/min 离心 10 min, 弃掉上清液收集菌体。用 PBS 反复清洗 3 次菌体, 再用 2.5% 戊二醛溶液固定过夜。固定结束后用 0.1 mol/L PBS (pH 7.0) 清洗 6 次, 再分别用 30%、50%、70%、80%、90%、100% 乙醇梯度脱水, 用叔丁醇置换 3 次, 样品干燥后喷金, 最后送至华南应用微生物国家重点实验室进行电子扫描显微镜表征。

1.9 数据处理与统计分析

所有实验均进行 3 次重复, 每次重复测定 3 个平行, 数据结果的表示均为平均值 \pm 标准差。采用 GraphPad Prism 9.5.0 和 Microsoft Excel 2022 统计分析, 采用单因素方差分析进行多组间比较, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 产细菌素乳酸菌的筛选结果

如图 1A 所示, 利用牛津杯法筛选到一株高效拮抗单增李斯特菌的乳酸菌分离株 A9-1A, 抑菌圈大小为 37.56 mm。如图 1B 和图 1C 所示, 在将发酵液的 pH 值调整至 6.0 并经过氧化氢酶处理后, 抑菌活性未发生显著变化, 表明有效的抑菌物质不是菌株产生的有机酸和过氧化氢。如图 1D 所示, 经蛋白酶 K 处理后, 抑菌圈消失, 完全失去抑菌活性。因此, 推测其主要的抑菌成分为蛋白类细菌素。

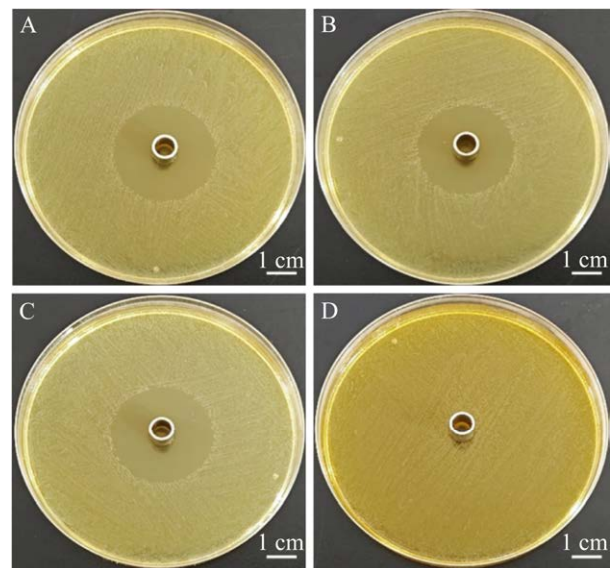


图 1 产细菌素菌株的筛选及验证 A: 初筛时具有抑菌活性的发酵上清液. B: pH 6.0 的发酵上清液. C: 经过氧化氢酶处理的发酵上清液. D: 经蛋白酶 K 处理的发酵上清液

Figure 1 Screening and verification of bacteriocin-producing strains. A: The antibacterial activity of crude fermentation supernatant. B: The antibacterial activity of fermentation supernatant (adjusted to pH 6.0). C: The antibacterial activity of catalase-treatment fermentation supernatant. D: The antibacterial activity of protease k-treated fermentation supernatant.

2.2 产细菌素乳酸菌的鉴定结果

如图 2A 和图 2B 所示,菌株 A9-1A 在 MRS 固体培养基上菌落形态较小,白色圆润光滑,不透明,圆形凸起,边缘整齐,革兰氏染色后油镜(100×)观察呈球形,革兰氏染色阳性。如图 2C 所示,从 NCBI 上选取 9 株肠球菌的 16S rRNA 基因序列,利用 MEGA 11.0 软件构建系统发育树,结果表明,菌株 A9-1A 为蒙氏肠球菌(*Enterococcus mundtii*)。如图 2D 所示,ANI 结果表明,其与蒙氏肠球菌 15-1A 聚于同一分支,亲缘关系较近,表明菌株 A9-1A 为蒙氏肠球菌。

2.3 细菌素粗提物的理化特性分析结果

如图 3A 所示,细菌素粗提物在 pH 7.0 时相对抑菌率最大为 105.06%,在 pH 2.0–9.0 时抑菌活性变化不显著,在 pH 10.0 和 11.0 时,抑菌活性降低,相对抑菌率分别为 88.29%和 64.68%。在 pH 12.0 和 13.0 时,抑菌活性完全消失。表明细菌素粗提物对强酸具有良好的耐受能力,但对强碱的耐受性相对较差。如图 3B 所示,相较于对照组,50–100 °C对细菌素粗提物的活性影响不大,抑菌活性无显著变化,在 121 °C处理后,抑菌活性下降,但相对抑制率仍有 81.05%,表明细菌素粗提物具有良好的耐高温特性,且能够耐受 121 °C高温。如图 3C 所示,细菌素粗提物经过氧化氢酶、脂肪酶、 α -淀粉酶、 β -淀粉酶处理后抑菌活性未发生显著变化,经蛋白酶处理后抑菌活性消失,表明细菌素粗提物对蛋白酶敏感,对其他酶类不敏感。如图 3D 所示,含有细菌素的发酵上清液在常温条件下储存 31 d,其抑菌活性无明显变化,均保持在 33–36 mm 之间,相对抑菌率保持在 97.55%–104.29%之间,说明发酵上清液中的细菌素在常温条件储存 31 d 仍保持稳定的拮抗活性。

2.4 细菌素粗提物的抑菌活性分析结果

如表 1 所示,细菌素粗提物仅对李斯特菌属和粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)有拮抗作用,对其他致病菌无拮抗作用,其抑菌谱较窄。对 45 种 ST 型的单增李斯特菌菌株几乎都能够抑制,抑制率达 95% (76/80),并且对多重耐药的单增李斯特菌菌株仍有拮抗作用。

如图 4A 所示,随着细菌素粗提物浓度降低,细菌素粗提物对单增李斯特菌的抑菌效果减弱,当细菌素粗提物浓度为 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,平板上的抑菌圈完全消失,当其浓度为 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,可以观察到抑菌圈的直径为(10.38 \pm 0.59) mm。因此其最低抑菌浓度为 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。如图 4B 所示,经细菌素粗提物处理后的单增李斯特菌数量在 0–2 h 内迅速下降,抑制率达 99.03%,2–6 h 抑制速率变缓,抑制率均在 99%以上,表明其对单增李斯特菌具有良好的拮抗效果。

2.5 细菌素粗提物的拮抗机理分析

2.5.1 细菌素粗提物对生物被膜的拮抗作用

如图 5 所示,当细菌素粗提物浓度低于 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,对单增李斯特菌生物被膜无拮抗作用,当细菌素粗提物浓度高于 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,对单增李斯特菌生物被膜有拮抗作用,表明其抑制单增李斯特菌生物被膜形成的效果较弱,需要较高浓度的细菌素粗提物才能抑制单增李斯特菌的生物被膜。

2.5.2 激光共聚焦扫描显微镜观察

利用激光共聚焦扫描显微镜表征细菌素粗提物处理前后细胞膜的完整性,SYTO 9 能对所有待测细菌进行标记,而 PI 只能渗透进入到细胞膜受损的菌体,所以活细胞呈绿色荧光,细胞膜损伤的细胞呈红色。如图 6 所示,对照组的生物被膜结构致密,表现出蜂窝状结构,几乎全都是活菌。经细菌素粗提物处理后生物被膜数量略有减少,结构变得稀疏,生物被膜松

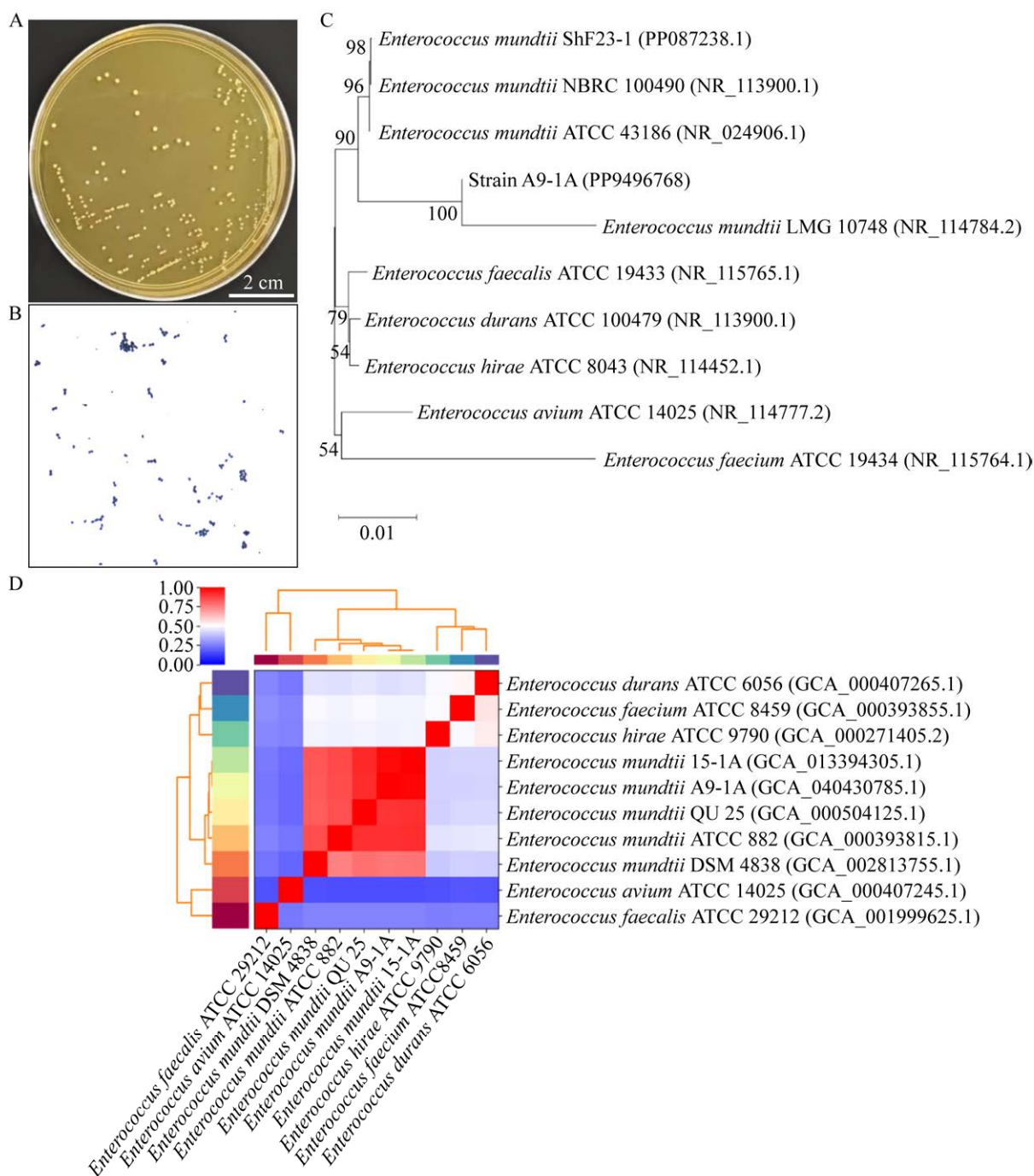


图2 菌株 A9-1A 的鉴定 A: 菌落形态. B: 革兰氏染色(1 000×). C: 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树. 括号中的序号代表 GenBank 登录号; 分支点上的数字代表该分支的 bootstrap 值; 标尺表示进化距离. D: 平均核苷酸一致性分析

Figure 2 Identification of strain A9-1A. A: Colony morphology. B: Gram staining (1 000×). C: Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence. The serial number in brackets represents the GenBank accession number; The number on the branch point indicates the bootstrap value of the branch; The ruler represents evolutionary distances. D: Average nucleotide identity.

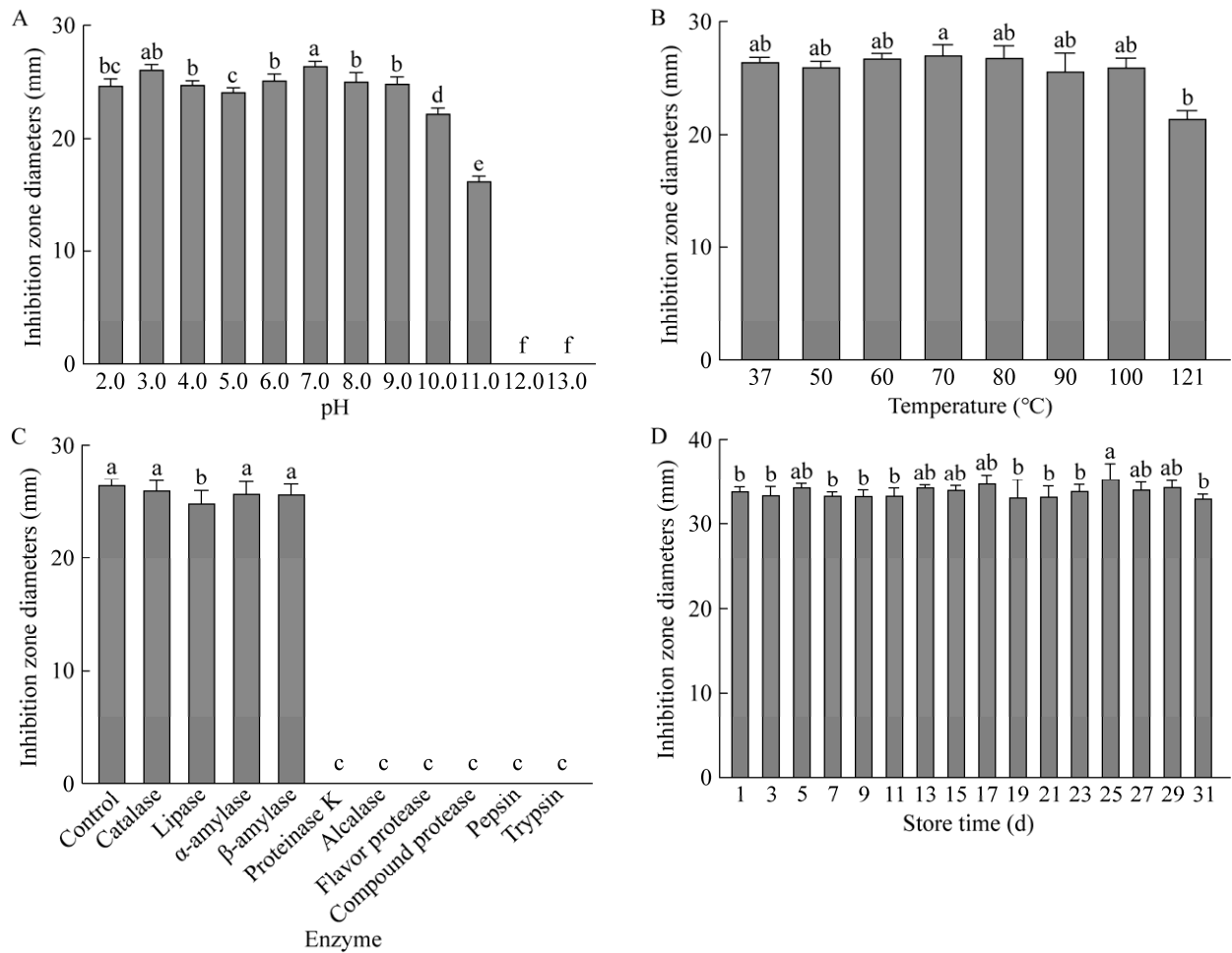


图 3 不同条件下细菌素粗提物的抑菌稳定性 A: pH. B: 温度. C: 酶. D: 储存时间. 不同小写字母表示各处理间差异显著性($P<0.05$). 下同

Figure 3 Antibacterial stability of bacteriocin crude extracts under different conditions. A: pH. B: Temperature. C: Enzyme. D: Store time. Different lowercase letters indicate significant differences between treatments ($P<0.05$). The same below.

表 1 细菌素粗提物抑菌谱

Table 1 Antibacterial spectrum of bacteriocin crude extracts

Strain No.	Sequence type	Diameter of inhibition circle	Strain No.	Sequence type	Diameter of inhibition circle
<i>Bacillus cereus</i> CMCC63301	/	-	<i>Listeria monocytogenes</i> 668-1LM	1 166	++
<i>Bacillus cereus</i> ATCC14579	/	-	<i>Listeria monocytogenes</i> 819-1LM	155	++
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	/	-	<i>Listeria monocytogenes</i> 819-2LM	87	+++
<i>Cronobacter muytjensii</i> ATCC51329	/	-	<i>Listeria monocytogenes</i> 834-1LM	87	+++
<i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC25944	/	-	<i>Listeria monocytogenes</i> 849-1LM	8	++
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212	/	+	<i>Listeria monocytogenes</i> 869-1LM	8	++
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	/	-	<i>Listeria monocytogenes</i> 919-4LM	9	++

(待续)

(续表 1)

Strain No.	Sequence type	Diameter of inhibition circle	Strain No.	Sequence type	Diameter of inhibition circle
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC46117	/	-	<i>Listeria monocytogenes</i> 91LM	299	++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CMCC10104	/	-	<i>Listeria monocytogenes</i> 1452-1LM	1	+++
<i>Salmonella Enterica</i> ATCC50335	/	-	<i>Listeria monocytogenes</i> 1974-2LM	120	++
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC14028	/	-	<i>Listeria monocytogenes</i> 2252-1LM	296	++
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC29213	/	-	<i>Listeria monocytogenes</i> 2524-1LM	619	++
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538	/	-	<i>Listeria monocytogenes</i> 2724-1LM	204	+
<i>Yersinia enterocolitica</i> CMCC52204	/	-	<i>Listeria monocytogenes</i> 2851-1	3	++
<i>Listeria grayi</i> ATCC19120	/	+++	<i>Listeria monocytogenes</i> 2902-2	330	++
<i>Listeria innocua</i> ATCC33090	/	++	<i>Listeria monocytogenes</i> 2972-1	87	++
<i>Listeria ivanovii</i> ATCC19119	/	+++	<i>Listeria monocytogenes</i> 3072-1	378	++
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC19115	/	+++	<i>Listeria monocytogenes</i> 4275-1	199	++
<i>Listeria seeligeri</i> CICC21671	/	+++	<i>Listeria monocytogenes</i> 801-4LM	121	++
<i>Listeria weshimeri</i> CICC21672	/	+++	<i>Listeria monocytogenes</i> 822-1LM	307	++
<i>Listeria monocytogenes</i> 1188-3LM	1	+++	<i>Listeria monocytogenes</i> 1048-1	378	++
<i>Listeria monocytogenes</i> 1194-3LM	804	-	<i>Listeria monocytogenes</i> 1132-3	2	-
<i>Listeria monocytogenes</i> 1194-4LM	805	-	<i>Listeria monocytogenes</i> 1297-1	515	++
<i>Listeria monocytogenes</i> 1584-1LM	807	++	<i>Listeria monocytogenes</i> 1298-1	297	++
<i>Listeria monocytogenes</i> 2084-1LM	120	++	<i>Listeria monocytogenes</i> 1348-2	515	++
<i>Listeria monocytogenes</i> 3239-1LM	325	++	<i>Listeria monocytogenes</i> 1368-1	767	++
<i>Listeria monocytogenes</i> 3938-2LM	429	++	<i>Listeria monocytogenes</i> 1542-1	11	++
<i>Listeria monocytogenes</i> 1219-1LM	14	++	<i>Listeria monocytogenes</i> 1544-1	2	++
<i>Listeria monocytogenes</i> 1269-1LM	7	++	<i>Listeria monocytogenes</i> 1743-1	506	++
<i>Listeria monocytogenes</i> 1299-1LM	155	++	<i>Listeria monocytogenes</i> 1794-1	288	++
<i>Listeria monocytogenes</i> 1384-1LM	310	+++	<i>Listeria monocytogenes</i> 1795-1	288	++
<i>Listeria monocytogenes</i> 1384-2LM	5	+++	<i>Listeria monocytogenes</i> 2047-1	11	++
<i>Listeria monocytogenes</i> 1384-3LM	310	++	<i>Listeria monocytogenes</i> 2094-1	199	++
<i>Listeria monocytogenes</i> 1386-1LM	5	++	<i>Listeria monocytogenes</i> 230-3	504	+++
<i>Listeria monocytogenes</i> 1519-3LM	14	++	<i>Listeria monocytogenes</i> 2392-1	391	++
<i>Listeria monocytogenes</i> 1520-1LM	3	+++	<i>Listeria monocytogenes</i> 2517-1	705	++
<i>Listeria monocytogenes</i> 1569-1LM	7	++	<i>Listeria monocytogenes</i> 2644-1	705	++
<i>Listeria monocytogenes</i> 1619-1LM	59	++	<i>Listeria monocytogenes</i> 2694-1	37	++
<i>Listeria monocytogenes</i> 1869-1LM	299	+	<i>Listeria monocytogenes</i> 3244-2	325	++
<i>Listeria monocytogenes</i> 1969-2LM	91	+	<i>Listeria monocytogenes</i> 3718-1	323	+++
<i>Listeria monocytogenes</i> 1996-1	121	++	<i>Listeria monocytogenes</i> 431-1	330	++
<i>Listeria monocytogenes</i> 1997-1LM	91	+	<i>Listeria monocytogenes</i> 897-1	307	++
<i>Listeria monocytogenes</i> 2049-2LM	20	++	<i>Listeria monocytogenes</i> 1333-2*	515	-
<i>Listeria monocytogenes</i> 268-2LM	621	++	<i>Listeria monocytogenes</i> 2568-1*	9	++
<i>Listeria monocytogenes</i> 2919-1LM	224	++	<i>Listeria monocytogenes</i> 1945-3*	602	+++
<i>Listeria monocytogenes</i> 3546-1LM	9	++	<i>Listeria monocytogenes</i> 833-1*	9	++
<i>Listeria monocytogenes</i> 3797-3LM	37	++	<i>Listeria monocytogenes</i> 466-3*	8	++
<i>Listeria monocytogenes</i> 3950-1LM	619	++	<i>Listeria monocytogenes</i> 4245-18*	9	++
<i>Listeria monocytogenes</i> 570-1LM	101	+++	<i>Listeria monocytogenes</i> 2152-1*	8	++
<i>Listeria monocytogenes</i> 598-1LM	1 166	++	<i>Listeria monocytogenes</i> 1966-1*	602	++

/ : 未知; * : 多重耐药菌; - : 无抑制作用; + : 10-20 mm; ++ : 20-30 mm; +++ : >30 mm

/ : Unknown; * : Multidrug-resistant bacteria; - : No inhibitory effect; + : 10-20 mm; ++ : 20-30 mm; +++ : >30 mm.

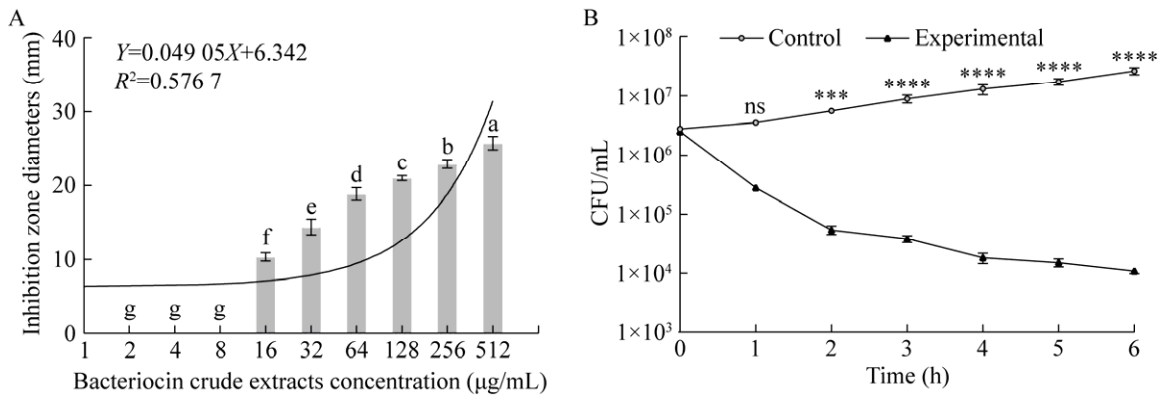


图 4 细菌素粗提物抑菌活性分析 A: 最小抑菌浓度. B: 时间-杀伤曲线. ns: 不显著; ***: $P<0.001$; ****: $P<0.0001$

Figure 4 Analysis of antibacterial activity of bacteriocin crude extracts. A: Minimum inhibitory concentration. B: Time-killing curve. ns: Non-significant; ***: $P<0.001$; ****: $P<0.0001$.

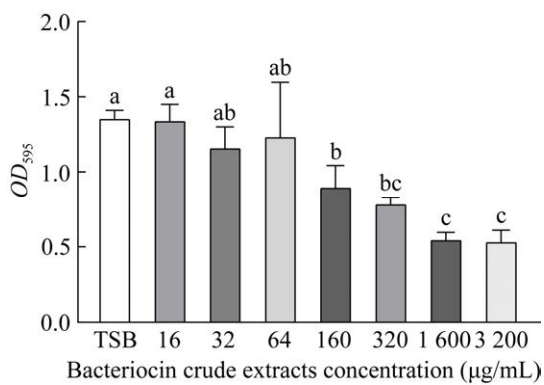


图 5 不同浓度细菌素粗提物对生物被膜的影响
Figure 5 Effects of different concentrations of bacteriocin crude extracts on biofilm.

散程度和死细胞数量随着细菌素粗提物浓度增高而显著增加,表明细菌素粗提物对单增李斯特菌生物被膜具有较好的防控作用。

2.5.3 扫描电子显微镜观察

如图 7 所示,未经细菌素粗提物处理的单增李斯特菌呈规则的短杆状,细胞表面轮廓清晰且平滑整齐,没有孔洞,菌体呈现良好的完整性,经细菌素粗提物处理 3 h 后细胞变形,出现褶皱,细胞膜出现空洞,部分细胞甚至出现破裂、内容物泄漏的现象。随着细菌素粗提物浓度的增加,细胞受损情况越严重。表明细

菌素粗提物作用具有浓度依赖性,其拮抗作用可能通过破坏细胞膜,形成孔洞使细胞内容物泄漏,从而造成菌体死亡。

3 讨论

本研究筛选获得了一株高效拮抗单增李斯特菌的乳酸菌菌株,经过形态学鉴定、16S rRNA 基因序列分析及平均核苷酸一致性分析,鉴定其为蒙氏肠球菌。在排除酸、过氧化氢的影响后,发酵液仍具有较强的抑菌活性,而经蛋白酶 K 处理后,抑菌活性消失,实验结果表明,该抑菌活性物质为细菌素。Nisin 在酸性条件下稳定,但在碱性条件下会失活^[32],由屎肠球菌产生的肠球菌素 A 和肠球菌素 B 在 121 °C 处理后失去活性^[33],耐久肠球菌产生的肠球菌素 L50A 和 L50B 在 pH 9.0 时抑菌活性显著降低,在 pH 11.0 时,抑菌活性完全消失^[34]。对蒙氏肠球菌 A9-1A 细菌素的理化特性分析显示,在 pH 2.0–11.0 和 121 °C 条件下均有良好的抑菌活性,并且能够在常温条件下储存 31 d 抑菌活性也不会降低,因此表明其在拮抗单增李斯特菌具有潜在应用潜力。

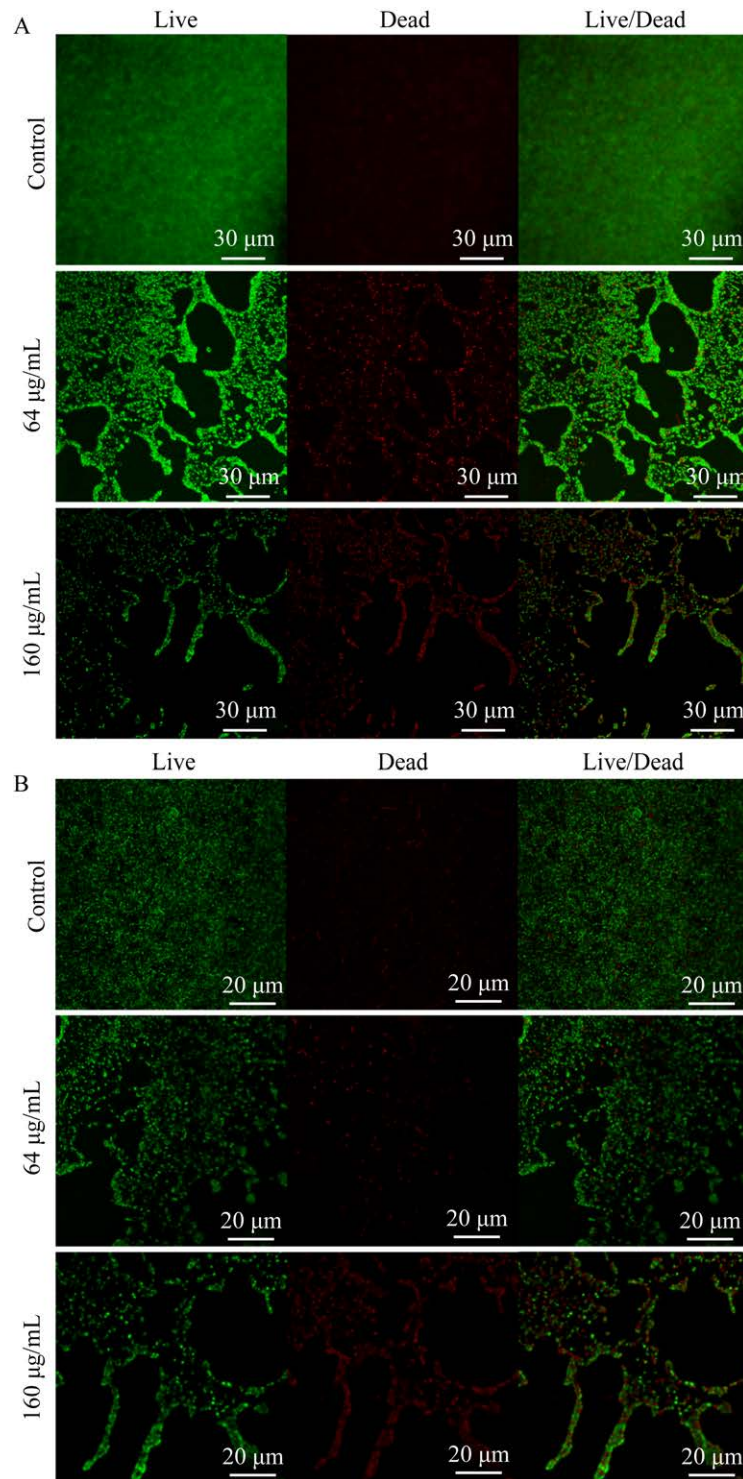


图 6 激光共聚焦显微镜下不同浓度细菌素粗提物处理后单增李斯特菌生物被膜的情况 A: 物镜倍数 40×. B: 物镜倍数 63×

Figure 6 The biofilm of *L. monocytogenes* after treatment with different concentrations of bacteriocin crude extracts under laser confocal microscope. A: Objective magnification 40×. B: Objective magnification 63×.

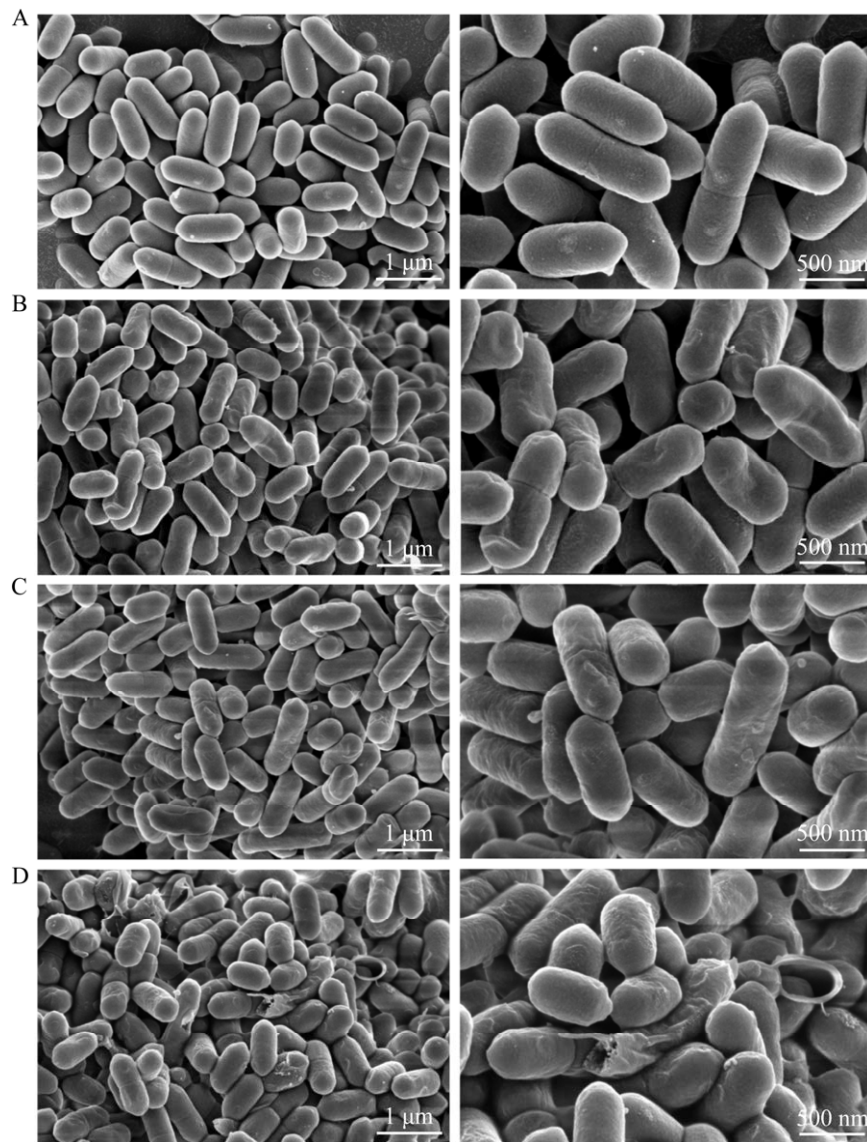


图 7 扫描电镜下不同浓度细菌素粗提物处理后单增李斯特菌细胞形态变化 A: 对照组. B: 16 $\mu\text{g/mL}$. C: 32 $\mu\text{g/mL}$. D: 64 $\mu\text{g/mL}$.

Figure 7 The morphological changes of *L. monocytogenes* cells treated with different concentrations of bacteriocin crude extracts under scanning electron microscopy. A: Control. B: 16 $\mu\text{g/mL}$. C: 32 $\mu\text{g/mL}$. D: 64 $\mu\text{g/mL}$.

目前报道的一些肠球菌产生的细菌素不仅能拮抗单增李斯特菌，并且对革兰氏阳性和革兰氏阴性菌都具有抑菌活性^[31]，相较而言本研究报道的细菌素的抑菌谱较窄，仅对李斯特菌属和粪肠球菌有抑菌活性，对多重耐药的单增李斯特菌也有良好的抑菌活性。前期研究报道纯化的细菌素 BM1029 的 MIC 为 2–32 $\mu\text{g/mL}$ ，对

单增李斯特菌的 MIC 为 4 $\mu\text{g/mL}$ ^[35]，植物乳杆菌素 LPL-1 的 MIC 为 16 $\mu\text{g/mL}$ ^[36]，细菌素 LS2 的 MIC 在 75–90 $\mu\text{g/mL}$ 之间^[37]。本研究报道的细菌素粗提物对单增李斯特菌的最小抑菌浓度为 16 $\mu\text{g/mL}$ ，与目前报道的一些细菌素最低抑菌浓度相比属于中等偏上水平，这种情况可能与本研究中采用细菌素粗提物进行 MIC 浓度测定

有关。但利用牛津杯法测定其粗发酵液抑菌圈大多处于 20–40 mm 之间, 表明其具有良好的拮抗单增李斯特菌的能力, 纯化后的细菌素 MIC 应小于 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。许多细菌能够形成复杂结构的生物被膜抵抗外界压力^[38], 单增李斯特菌生物被膜能够增强其对不利环境的耐受性, 可以有效减弱细菌素的杀伤作用, 这可能是因为生物被膜的形成使细菌素无法有效接触菌体, 从而减弱了细菌素的杀伤能力。根据激光共聚焦显微镜和扫描电子显微镜结果可以发现细菌素能使单增李斯特菌细胞膜形成孔洞, 破坏细胞的完整性, 导致细胞内蛋白、核酸等内容物泄漏, 从而导致细胞死亡。目前研究发现的细菌素基本都是通过这种方式对目标菌进行抑制, 但使细胞膜形成孔洞的方式却不相同, 如 IIa 类的细菌素 lactococcin A 可以结合细胞膜上的甘露糖磷酸转移系统(Man-PTS), 从而在细胞膜上形成孔洞^[1]。Microcin E492 可被靶细菌细胞膜外膜上的铁载体受体识别, 通过外膜受体 TonB 进入内膜, 然后在细胞膜的内膜形成孔洞^[1,39]。本研究报道的细菌素破坏细胞膜形成孔洞的机制尚不明确, 需要进一步的研究。

4 结论

本研究筛选获得了一株高效拮抗单增李斯特菌的产细菌素蒙氏肠球菌 A9-1A, 其产生的细菌素在强酸、强碱和高温条件下均保持稳定的拮抗能力, 能够有效抑制李斯特菌属和粪肠球菌, 且对多重耐药的单增李斯特菌也有良好的抑菌效果。该细菌素高效拮抗单增李斯特菌可能通过破坏细胞壁和细胞膜的完整性使细胞膜通透性增强, 造成细胞内容物泄漏, 从而杀伤单增李斯特菌细胞。本研究结果表明蒙氏肠球菌 A9-1A 产生的细菌素在食品生产过程中具有绿色安全高效防控单增李斯特菌污染的潜在应用前景。

REFERENCES

- [1] 滕坤玲, 钟瑾. 益生菌产生的细菌素及其功能机制[J]. 微生物学报, 2022, 62(3): 858-868.
TENG KL, ZHONG J. Functions and mechanisms of bacteriocins produced by probiotics[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(3): 858-868 (in Chinese).
- [2] 陆兆新, 孟凡强. 植物乳杆菌素合成及其调控机制的研究进展[J]. 南京农业大学学报, 2018, 41(5): 784-792.
LU ZX, MENG FQ. Research advance on regulatory mechanism of plantaricin synthesis in *Lactobacillus plantarum*[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2018, 41(5): 784-792 (in Chinese).
- [3] 杜琨. 乳酸菌细菌素抑菌特性及在食品中的应用研究进展[J]. 中国酿造, 2022, 41(7): 16-20.
DU K. Research advances of antimicrobial properties of bacteriocins from lactic acid bacteria and the application in food[J]. China Brewing, 2022, 41(7): 16-20 (in Chinese).
- [4] ALVAREZ-SIEIRO P, MONTALBÁN-LÓPEZ M, MU DD, KUIPERS OP. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(7): 2939-2951.
- [5] SOLTANI S, HAMMAMI R, COTTER PD, REBUFFAT S, BEN SAID L, GAUDREAU H, BÉDARD F, BIRON E, DRIDER D, FLISS I. Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: toxicity aspects and regulations[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2021, 45(1): fuaa039.
- [6] ROGERS LA. The inhibiting effect of streptococcus lactis on lactobacillus bulgaricus[J]. Journal of Bacteriology, 1928, 16(5): 321-325.
- [7] 许晓燕, 彭珍, 熊世进, 肖沐岩, 黄涛, 熊涛. 乳酸乳球菌乳亚种 NCU036018 细菌素的分离纯化及其抗菌机制[J]. 食品科学, 2022, 43(16): 209-216.
XU XY, PENG Z, XIONG SJ, XIAO MY, HUANG T, XIONG T. Screening of bacteriocin-producing lactic acid bacteria: isolation and purification of and antibacterial mechanism of bacteriocin[J]. Food Science, 2022, 43(16): 209-216 (in Chinese).
- [8] COTTER PD, HILL C, ROSS RP. Bacteriocins: developing innate immunity for food[J]. Nature Reviews Microbiology, 2005, 3: 777-788.
- [9] 王真, 方太松, 王园, 赵婕秀, 李卓思, 秦晓杰, 王翔, 董庆利. 单核细胞增生李斯特菌生物被膜交叉污染评估进展[J]. 食品科学, 2022, 43(23): 277-286.
WANG Z, FANG TS, WANG Y, ZHAO JX, LI ZS, QIN XJ, WANG X, DONG QL. Progress in

- cross-contamination assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm[J]. Food Science, 2022, 43(23): 277-286 (in Chinese).
- [10] CHEN MT, WU QP, ZHANG JM, YAN ZA, WANG J. Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from retail-level ready-to-eat foods in South China[J]. Food Control, 2014, 38: 1-7.
- [11] WU S, WU QP, ZHANG JM, CHEN MT, YAN ZA, HU HJ. *Listeria monocytogenes* prevalence and characteristics in retail raw foods in China[J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0136682.
- [12] CHEN MT, CHENG JH, WU QP, ZHANG JM, CHEN YT, XUE L, LEI T, ZENG HY, WU S, YE QH, BAI JL, WANG J. Occurrence, antibiotic resistance, and population diversity of *Listeria monocytogenes* isolated from fresh aquatic products in China[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2215.
- [13] SMITH AM, TAU NP, SMOUSE SL, ALLAM M, ISMAIL A, RAMALWA NR, DISENYENG B, NGOMANE M, THOMAS J. Outbreak of *Listeria monocytogenes* in South Africa, 2017–2018: laboratory activities and experiences associated with whole-genome sequencing analysis of isolates[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2019, 16(7): 524-530.
- [14] PEREIRA E, CONRAD A, TESFAI A, PALACIOS A, KANDAR R, KEARNEY A, LOCAS A, JAMIESON F, ELLIOT E, OTTO M, KURDILLA K, TIJERINA M, SON I, PETTENGILL JB, CHEN Y, FOX T, LANE C, AGUILLON R, HUFFMAN J, LOW MSF, et al. Multinational outbreak of *Listeria monocytogenes* infections linked to enoki mushrooms imported from the republic of Korea 2016–2020[J]. Journal of Food Protection, 2023, 86(7): 100101.
- [15] CHEN MT, CHENG JH, WU QP, ZHANG JM, CHEN YT, ZENG HY, YE QH, WU S, CAI SZ, WANG J, DING Y. Prevalence, potential virulence, and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* isolates from edible mushrooms in Chinese markets[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1711.
- [16] CHEN MT, CHENG JH, ZHANG JM, CHEN YT, ZENG HY, XUE L, LEI T, PANG R, WU S, WU HM, ZHANG SH, WEI XH, ZHANG YX, DING Y, WU QP. Isolation, potential virulence, and population diversity of *Listeria monocytogenes* from meat and meat products in China[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 946.
- [17] CHEN MT, CHEN YT, WU QP, ZHANG JM, CHENG JH, LI F, ZENG HY, LEI T, PANG R, YE QH, BAI JL, WANG J, WEI XH, ZHANG YX, DING Y. Genetic characteristics and virulence of *Listeria monocytogenes* isolated from fresh vegetables in China[J]. BMC Microbiology, 2019, 19(1): 119.
- [18] CHEN YT, CHEN MT, WANG J, WU QP, CHENG JH, ZHANG JM, SUN QF, XUE L, ZENG HY, LEI T, PANG R, YE QH, WU S, ZHANG SH, WU HM, LI WZ, KOU XY. Heterogeneity, characteristics, and public health implications of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and pasteurized milk in China[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 642.
- [19] 林若钦, 张颖, 李婧怡, 梁馨文, 程健恒, 胡文艳, 吴清平, 陈谋通, 张菊梅. 发酵乳杆菌 CSC-19 胞外粗多糖提取物抑制单核细胞增生李斯特菌生物被膜形成能力的研究[J]. 微生物学报, 2023, 63(1): 376-386.
- LIN RQ, ZHANG Y, LI JY, LIANG XW, CHENG JH, HU WY, WU QP, CHEN MT, ZHANG JM. Extracellular crude polysaccharide of *Limosilactobacillus fermentum* CSC-19 inhibits the biofilm formation of *Listeria monocytogenes*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(1): 376-386 (in Chinese).
- [20] LI HX, XIE XQ, LI Y, CHEN MT, XUE L, WANG J, ZHANG JM, WU S, YE QH, ZHANG SH, YANG RS, ZHAO H, WU L, LIANG TT, DING Y, WU QP. *Pediococcus pentosaceus* IM96 exerts protective effects against enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection *in vivo*[J]. Foods, 2021, 10(12): 2945.
- [21] 吴清平, 商燕燕, 李滢, 谢新强, 丁郁, 王涓, 薛亮, 陈谋通, 张菊梅, 叶青华, 吴诗, 陈惠元, 吴军林. 一株产溶菌酶并高效拮抗多药耐药幽门螺杆菌的植物乳杆菌 LP1Z 及其应用: CN202210263672.6[P]. 2022-04-15.
- WU QP, SHANG YY, LI Y, XIE XQ, DING Y, WANG J, XUE L, CHEN MT, ZHANG JM, YE QH, WU S, CHEN HY, WU JL. A *Lactiplantibacillus plantarum* LP1Z strain producing lysozyme and effectively antagonizing multidrug-resistant *Helicobacter pylori* and its application: CN202210263672.6[P]. 2022-04-15 (in Chinese).
- [22] 夏俊芳, 郑素慧, 翟少华, 张志东, 苏金花, 艾赛提, 武运. 一株拮抗酿酒葡萄灰霉病的枯草芽孢杆菌 T3 筛选、鉴定及抑菌分析[J]. 食品工业科技, 2020, 41(23): 99-105, 113.
- XIA JF, ZHENG SH, ZHAI SH, ZHANG ZD, SU JH, AI ST, WU Y. Screening and identification of antagonistic *Bacillus subtilis* T3 against wine grape gray mold and analysis of its antimicrobial activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(23): 99-105, 113 (in Chinese).
- [23] 潘洁明, 玉烨, 陈韦唯, 贝永建, 辛桂瑜, 蒋媛媛, 刘瑶, 牙彩娜, 赖洁玲. 香蕉炭疽菌拮抗菌 HSL3-29

- 的分离鉴定及防治效果[J]. 微生物学通报, 2024, 51(3): 898-909.
- PAN JM, YU Y, CHEN WW, BEI YJ, XIN GY, JIANG YY, LIU Y, YA CN, LAI JL. Isolation, identification, and biocontrol effect of a bacterial strain HSL3-29 against *Colletotrichum musae*[J]. Microbiology China, 2024, 51(3): 898-909 (in Chinese).
- [24] TAMURA K, STECHER G, KUMAR S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11[J]. Molecular Biology and Evolution, 2021, 38(7): 3022-3027.
- [25] PRITCHARD L, GLOVER RH, HUMPHRIS S, ELPHINSTONE JG, TOTH IK. Genomics and taxonomy in diagnostics for food security: soft-rotting enterobacterial plant pathogens[J]. Analytical Methods, 2016, 8(1): 12-24.
- [26] 顾雅昕, 乔柱, 郭行, 王欣, 伊扬磊, 单媛媛, 刘变芳, 周元, 吕欣. 发酵乳杆菌 LBM97 所产细菌素提取方法的优化及比较[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(19): 111-116.
- GU YX, QIAO Z, GUO X, WANG X, YI YL, SHAN YY, LIU BF, ZHOU Y, LYU X. Optimization and comparison of extraction methods of bacteriocin produced by *Lactobacillus fermentum* LBM97[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(19): 111-116 (in Chinese).
- [27] 娄向弟, 周强, 贺江, 张向向, 王永慧, 熊建华, 郁彦彦. 贝莱斯芽孢杆菌 PJP10 的抑菌物质稳定性及活性代谢产物挖掘[J]. 微生物学通报, 2024, 51(3): 935-949.
- LOU XD, ZHOU Q, HE J, ZHANG XX, WANG YH, XIONG JH, GAO YY. Stability evaluation and genome mining of antimicrobial metabolites of *Bacillus velezensis* PJP10[J]. Microbiology China, 2024, 51(3): 935-949 (in Chinese).
- [28] ZHAO DY, WANG Q, LU FX, BIE XM, ZHAO HZ, LU ZX, LU YJ. A novel class IIb bacteriocin-plantaricin EmF effectively inhibits *Listeria monocytogenes* and extends the shelf life of beef in combination with chitosan[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(7): 2187-2196.
- [29] 王鸿博. 屎肠球菌 BZ2 产细菌素对单增李斯特氏菌的作用机制及应用研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2022.
- WANG HB. Mechanism and application of bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BZ2 against *Listeria monocytogenes*[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia Agricultural University, 2022 (in Chinese).
- [30] 王凤婷, 靳盼盼, 刘芳, 孙芝兰, 王道营, 张芳, 许晓曦, 徐为民. 食源性阴沟肠杆菌生物膜形成能力[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(4): 943-948.
- WANG FT, JIN PP, LIU F, SUN ZL, WANG DY, ZHANG F, XU XX, XU WM. Biofilm formation ability of a food-borne *Enterobacter cloacae*[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2018, 34(4): 943-948 (in Chinese).
- [31] ALI ZI, SAUDI AM, ALBRECHT R, TALAAT AM. The inhibitory effect of nisin on *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis and its effect on mycobacterial cell wall[J]. Journal of Dairy Science, 2019, 102(6): 4935-4944.
- [32] de ARAUZ LJ, JOZALA AF, MAZZOLA PG, VESSONI PENNA TC. Nisin biotechnological production and application: a review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2009, 20(3/4): 146-154.
- [33] KASIMIN ME, SHAMSUDDIN S, MOLUJIN AM, SABULLAH MK, GANSAU JA, JAWAN R. Enterocin: promising biopreservative produced by *Enterococcus* sp.[J]. Microorganisms, 2022, 10(4): 684.
- [34] DU LH, LIU F, ZHAO P, ZHAO T, DOYLE MP. Characterization of *Enterococcus durans* 152 bacteriocins and their inhibition of *Listeria monocytogenes* in ham[J]. Food Microbiology, 2017, 68: 97-103.
- [35] YAN H, AIZHAN R, LU YY, LI X, WANG X, YI YL, SHAN YY, LIU BF, ZHOU Y, LÜ X. A novel bacteriocin BM1029: physicochemical characterization, antibacterial modes and application[J]. Journal of Applied Microbiology, 2021, 130(3): 755-768.
- [36] WANG Y, QIN YX, ZHANG Y, WU RY, LI PL. Antibacterial mechanism of plantaricin LPL-1, a novel class IIa bacteriocin against *Listeria monocytogenes*[J]. Food Control, 2019, 97: 87-93.
- [37] LIU YX, LI ZF, LV YJ, DONG B, FAN ZC. *Chlamydomonas reinhardtii*-expressed multimer of Bacteriocin LS2 potently inhibits the growth of bacteria[J]. Process Biochemistry, 2020, 95: 139-147.
- [38] 宋雪艳, 刘志欢, 谢翠萍, 刘莹营, 杨永亚, 刘建华. 细菌生物被膜形成的调控机制与消除方法[J]. 动物医学进展, 2022, 43(3): 112-115.
- SONG XY, LIU ZH, XIE CP, LIU YY, YANG YY, LIU JH. Regulation mechanism and elimination method of bacterial biofilm formation[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2022, 43(3): 112-115 (in Chinese).
- [39] COTTER PD, ROSS RP, HILL C. Bacteriocins: a viable alternative to antibiotics?[J]. Nature Reviews Microbiology, 2013, 11: 95-105.