

# 一株抗 G<sup>-</sup> 菌和酵母菌的乳酸乳球菌的 分离鉴定与抗菌活性

黄新风 江梦天 邵小虎 李小华 李 林\*

(华中农业大学农业微生物学国家重点实验室 湖北 武汉 430070)

**摘 要:** 以 G<sup>+</sup> 菌金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)作为指示菌, 通过抑菌筛选法从生牛奶中初筛得到具有抑菌活性的 14 株细菌菌株, 然后通过个体形态与培养特征观测、部分生理生化反应、G + C mol%测定、16S rDNA 序列比对分析、PCR 扩增特异性 *N*-乙酰胞壁酸水解酶基因和序列对比分析等鉴定, 确定其中的一株具有较高抑菌活性的分离株为乳酸乳球菌乳酸亚种(*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*)菌株, 命名为 MB191。对多种 G<sup>+</sup> 细菌、G<sup>-</sup> 细菌、酵母菌和丝状真菌的对峙培养抗性测定结果表明, MB191 除对供试 G<sup>+</sup> 细菌具有较高的抑菌活性以外, 还对丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)、荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)等 G<sup>-</sup> 细菌和汉逊德巴利酵母(*Debaryomyces hansenii*)等具有明显的抑菌活性。乳酸乳球菌的这一特性目前尚未见文献报道。  
**关键词:** 乳酸乳球菌, 鉴定, 抑菌活性, 革兰氏阴性菌, 酵母菌

## Identification and Characterization of a *Lactococcus lactis* Strain with the Distinctive Antimicrobial Activity Against Gram-negative Bacteria and a Yeast

HUANG Xin-Feng JIANG Meng-Tian SHAO Xiao-Hu LI Xiao-Hua LI Lin\*

(State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China)

**Abstract:** Using the Gram-positive *Staphylococcus aureus* as the indicator bacterium, fourteen antibacterial strains were initially obtained by the bilayer-media screening method from the raw milk samples, and one isolate was found to exhibit the higher antibacterial activity against the indicator. This isolate was further studied on its individual and cultural morphology features, partial physiological and biochemical reaction activities, G+C content, the sequence features of the 16S rDNA and the species-specific *N*-acetylmuraminidase gene (*acmA*), consequently, it was identified as the *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strain, named as MB191. An evaluation of the antimicrobial spectra of MB191 was subsequently performed, it showed the remarkable activities against not only the tested Gram-positive bacteria, but also several Gram-negative bacteria including *Pseudomonas syringae* and *P. fluorescens*, as well as the yeast *Debaryomyces hansenii*, which was a distinctive feature that was not reported prior to this study.

**Keywords:** *Lactococcus lactis*, Identification, antibacterial activity, Gram-negative bacteria, Yeast

微生物的繁殖侵蚀及其代谢产物的毒性是导致食品和果蔬发生腐败变质的主要因素。采用常规物理防治方法(如低温、真空、辐射和加热等)往往在使用上受到一定的限制,且应用成本也较高;而使用化学防腐剂则可能存在对人和动物潜在的毒性,同时,连续使用化学防腐剂也容易导致微生物产生抗药性。与物理和化学方法不同,生物杀菌剂是利用食品级生物本身或者其代谢产物来进行食品和果蔬病原微生物的防治,具有安全、无毒和有效的优点,因而近年来越来越受到重视。其中,乳酸类细菌由于可以产生特异性杀菌活性成分而成为食品微生物领域的一个研究热点。

乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)是乳球菌属(*Lactococcus*)中重要的一个种,也是已知的对人体及动物无致病性和无定殖力的、在食品和医药医疗领域具有重要应用价值的食品级细菌<sup>[1]</sup>。乳酸乳球菌菌株一般能够产生多种有机酸、双乙酰、过氧化氢、细菌素和类细菌素等具有抑菌活性的代谢产物,其中,属于羊毛硫抗生素(Lantibiotics)家族的乳酸链球菌素(Nisin)为该菌产生的一种多肽抗生素,结构上含有羊毛硫氨酸等特殊氨基酸,其成熟多肽由34个氨基酸组成,有2种天然异构体,即Nisin A和Nisin B<sup>[2,3]</sup>。已报道乳酸链球菌素对许多革兰氏阳性菌,包括利斯特氏菌属(*Listeria*)、梭菌属(*Clostridium*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)和芽胞杆菌属(*Bacillus*)等在内的多种腐败菌和食品病原菌具有强烈的抑制作用<sup>[4-6]</sup>。此外,研究表明乳酸链球菌素可被人体消化道中的消化酶降解,不会改变人体肠道内的正常菌群<sup>[7]</sup>,因此在食品和医药业具有很大的应用潜力。除产生乳酸链球菌素外,乳酸乳球菌还能够产生一种特异性的N-乙酰胞壁质酶(N-Acetylmuraminidase),为该菌的一种自溶素蛋白<sup>[8]</sup>,其编码基因*acmA*基因序列信息已被用作乳酸乳球菌菌种鉴定的一项重要特征<sup>[9]</sup>。本研究以革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)作为指示菌,通过特异性抑菌筛选途径从生牛奶中分离筛选1株具有明显抑菌性能的菌株,并通过形态特征的观测、生理生化特征的测定以及分子生物学鉴定技术,将该分离菌株鉴定为乳酸乳球菌乳酸亚

种(*L. lactis* subsp. *lactis*)菌株。进一步的抗菌活性谱测定结果表明,该菌株对2种革兰氏阴性菌和1种酵母菌表现出明显的抑菌活性,这一抑菌活性目前在国内外尚未见于文献报道。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和培养基

**1.1.1 菌株:**用于形态学观测和生理生化试验的标准参照菌株乳酸乳球菌乳酸亚种 AS1.2829,购自中国典型培养物保藏中心(CCTCC);丁香假单胞菌茭白致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. *zizaniae*) ATCC35026 菌株,购自美国模式菌株保藏中心(ATCC);用于G+C mol%测定的标准参照菌株为大肠杆菌(*Escherichia coli*) K<sub>12</sub>菌株,由美国耶鲁大学CGSC(The Coli Genetic Stock Center)惠赠;用于乳酸乳球菌分离菌株 MB191 抑菌谱测定的金黄色葡萄球菌、枯草芽胞杆菌(*B. subtilis*)、苏云金芽胞杆菌(*B. thuringiensis*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)为本实验室保藏菌株;汉逊德巴利酵母(*Debaryomyces hansenii*)、鲁氏裂殖酵母(*Schizosaccharomyces rouxii*)、拜耳接合酵母(*Zygosaccharomyces bailii*)、马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)、法尔皮有孢汉生酵母(*Hanseniaspora valbyensis*)、桔青霉(*Penicillium citrinum*)、梨孢镰刀菌(*Fusarium poae*)和互隔交链孢霉(*Alternaria alternata*)为瑞典农业大学 Schnürer 教授惠赠。

**1.1.2 培养基:**分离培养基:蔗糖 10 g,酵母提取物 10 g,蛋白胨 10 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 g, NaCl 2 g, MgSO<sub>4</sub> 0.2 g,琼脂 15 g,加H<sub>2</sub>O至1 L,调节pH 6.8后以1×10<sup>5</sup> Pa灭菌30 min,用于筛选具抑菌活性的细菌菌株及常规培养;休和利夫森二氏培养基<sup>[10]</sup>,用于葡萄糖发酵试验;LB(Luria-Bertani)培养基<sup>[11]</sup>,用于供试细菌的培养和DNA制备时的细菌培养;PDA培养基<sup>[12]</sup>,用于供试酵母菌和霉菌的培养。

### 1.2 方法

**1.2.1 抑菌活性菌株的分离:**采用双层平板法进行分离。下层培养基采用分离培养基,与生牛奶样品

(约 15 : 1, V/V)制备平板下层, 在 28°C 中培养 48 h 后, 倒上层 LB 平板(约 8 mL), 涂布指示菌金黄色葡萄球菌后, 置 28°C 中培养 48 h 继续培养 48 h, 挑取产生抑菌圈的单菌落进行划线分离纯化, 并以金黄色葡萄球菌作为指示菌测定其抑菌活性大小。

**1.2.2 分离菌株抑菌活性的测定:** 从牛奶样品中初筛分离菌株的抑菌活性大小是以金黄色葡萄球菌作为指示菌测定其抑菌圈直径大小来进行判定。将相同浓度的指示菌涂布平板, 然后将分离菌株培养后调整其菌体的  $OD_{600}$  为 1, 取 100  $\mu$ L 菌悬液于用打孔器制作的相同规格的灭菌圆形滤纸片, 置于指示菌平板上, 培养 48 h 后测定其抑菌圈直径大小。实验重复 3 次计算其平均值。测定分离菌株对细菌的抑菌活性谱时, 先采用液体分离培养基培养分离菌株, 和用 LB 平板涂布指示菌, 分别在 28°C 中培养 24 h 后, 在指示菌平板上放入无菌牛津杯, 再分别加入 100  $\mu$ L 浓度约为  $OD_{600}$  1 的分离细菌悬液进行对峙培养, 观测牛津杯周围是否形成抑菌圈及其抑菌圈大小, 计算抑菌圈直径与牛津杯直径的比值 ( $R$  值); 而测定对酵母菌和真菌孢子抑菌活性时, 是将分离菌株和酵母菌或真菌孢子悬液等体积混合(其浓度为  $10^6$  CFU/mL), 加入到牛津杯中在 28°C 中继续培养 48 h 后, 观测牛津杯周围是否出现培养物及其直径大小。

**1.2.3 分离菌株的形态观察与生理生化特征测定:** 菌株的简单染色、革兰氏染色后的光学显微镜观察和扫描电镜(JSM-6390/LV 型, 日本 NTC)观察, 以及葡萄糖发酵试验、接触酶活性、45°C 和 6.5% NaCl 生长试验、穿刺培养试验等生理生化特征的测定均按照文献[10]的方法进行。

**1.2.4 G+C mol%测定:** 制备待测菌株的总 DNA 并用苯酚/氯仿/异戊醇混合液进行抽提纯化<sup>[11]</sup>, 使其  $OD_{230} : OD_{260} : OD_{280}$  接近于 0.454 : 1 : 0.515, 然后按热变性法<sup>[13]</sup>, 用 Beckman DU800 型分光光度计测定该 DNA 的熔解温度( $T_m$  值), 以大肠杆菌  $K_{12}$  菌株作为标准参考菌株, 按公式  $G+C \text{ mol}\% = 51.2 + 2.08 \times (T_{m, \text{未知菌}} - T_{m, K_{12}}) \times (0.1 \times \text{SSC 溶液})$  计算待测菌株的 G+C mol % 含量。

**1.2.5 总 DNA 制备、PCR 反应扩增 16S rDNA 与序列分析:** 待测菌株的 16S rDNA 采用引物对 PC3: 5'-CTAHAGGGTATCTAATCCT-3'和 P0: 5'-GAGTTT

GATCMTGGCTCAG-3' (其中通用碱基 H 为 A 或 C 或 T; M 为 A 或 C)进行 PCR 反应扩增。PCR 反应条件为 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 45 s, 30 个循环。用 0.8%琼脂糖电泳检测 PCR 产物, 并用快速凝胶回收试剂盒(北京博大泰克生物基因技术有限公司)回收扩增产物, 然后由北京三博远志生物科技有限公司进行测序。测序结果在 GenBank 数据库在线进行 Blast 和聚类分析。

**1.2.6 分离菌株 *acmA* 基因的 PCR 反应扩增与序列分析:** 用于待测菌株中扩增 *acmA* 的引物是参照乳酸乳球菌乳酸亚种 II1403 菌株的 *acmA* 基因序列(GenBank 登录号为 AE005176)进行设计, 其上游引物为 P M1: 5'-TCCATGGCAGTTTCTCGTATTAA-3'; 下游引物为 P M2: 5'-TAAGATCTACGAAGATATTG ACCAA-3'。扩增 *acmA* 的 PCR 反应程序为 94°C 5 min; 94°C 30 s, 53°C 60 s, 72°C 90 s, 25 个循环; 72°C 10 min。PCR 扩增产物经纯化回收后, 由北京三博远志生物科技有限公司进行测序。测序结果在 GenBank 数据库进行 Blast 分析。

## 2 结果

### 2.1 具抑菌活性菌株的初筛与活性比较测定

从牛奶场未加工处理的生牛奶样品中初筛得到对指示菌金黄色葡萄球菌具有抑菌活性的细菌菌株 14 株, 经进一步划线分离纯化后比较测定其抑菌活性, 发现其中的 1 株分离株对指示菌的抑菌活性相对较强, 本研究用于进一步的鉴定和抑菌活性谱测定, 命名为 MB191。

### 2.2 分离菌株 MB191 的鉴定

**2.2.1 细菌形态与培养性状:** 对 MB191 菌株形态进行了染色镜检和扫描电镜观察(图 1), 发现 MB191 菌株呈球形或卵圆形, 无鞭毛, 无芽胞, 革兰氏染色阳性, 不形成荚膜, 通常成对, 或可形成短链状。在分离培养基上生长较为缓慢, 所生长菌落呈乳白色, 圆形隆起, 表面光滑, 在分离培养基添加 0.04%溴甲酚紫的平板上培养时, 菌落可由紫色变成黄色; 在液体培养基中生长时, 有时发生菌体凝聚现象。以上菌体形态和培养特征符合文献[10]所描述的“革兰氏阳性好氧和兼性厌氧球菌”类型细菌的特征, 本研究按照该文献中的本类型细菌检索表进行后续鉴定。

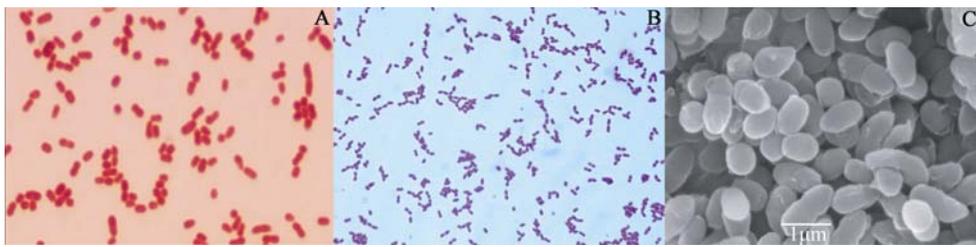


图 1 分离菌株 MB191 的简单染色、革兰氏染色和扫描电镜观察的形态

Fig. 1 Microscopic photograph of MB191 strain by simple stain, gram stain and SEM observation

Note: A: Simple stain (25×100); B: Gram (10×100); C: SEM (×20000).

**2.2.2 生理生化特性:** MB191 菌株经穿刺接种连续培养 72 h, 仅在穿刺线靠近培养基上部有较少生长, 但培养基水平面无生长, 因此判定 MB191 为不运动的微好氧菌; 以乳酸乳球菌 AS1.2829 作为测定的标准参照菌株, 对 MB191 菌株其它部分生理生化特征的测定结果见表 1, 可见 MB191 的测定特征与标准

菌株相一致。

**2.2.3 G+C mol%测定:** 经测定 MB191 的热变性曲线, 该菌株的平均  $T_m$  值为 66.9°C, 而相同条件下测定的标准菌株大肠杆菌 K<sub>12</sub> 菌株的平均  $T_m$  值为 73.7°C, 由此可计算出分离菌株 MB191 的 G+C mol%值为 37.1%。根据文献[10]的检索表, 分离菌株 MB191 可鉴定到乳球菌属。

**2.2.4 16S rDNA 扩增、序列测定与聚类分析:** 以 MB191 的总 DNA 为模板, 以细菌 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增, 得到约 750 bp 的扩增产物。经对扩增产物测序, 并将所测定的序列从 GenBank 数据库中进行 Blast 分析后发现, MB191 扩增产物与已发表的乳酸乳球菌几个亚种菌株的 16S rDNA 序列具有较高的相似性, 其中与乳酸亚种的菌株 II1403 相似性最高, 达到 99%, 其次是乳脂亚种的两个菌株, 相似性分别达到 98%和 97%; 而与其它细菌种则序列相似性较小(90%或以下)。对 Blast 结果中 MB191 具有最高相似性的 10 个近缘种群进行聚类分析(图 2), 结果表明, MB191 明显可归属于乳酸乳球菌, 且与乳酸亚种更为接近。根据以上形态学特征、生理生化特征、G+C mol%含量测定、16S rDNA 序列分析的结果以及该菌株具有明显的抑菌活

项目 Items	特征 Characteristics	
	MB191	<i>L. lactis</i> AS1.2829
10°C 培养下生长 Growth at 10°C	+	+
45°C 培养下生长 Growth at 45°C	-	-
1%NaCl 下生长 Growth with 1% NaCl	+	+
6.5%NaCl 下生长 Growth with 6.5% NaCl	-	-
接触酶反应 Catalase reaction	-	-
氧化酶反应 Oxidase reaction	-	-
发酵葡萄糖产酸 Acid production from glucose	+	+
发酵葡萄糖产气 Gas production from glucose	-	-

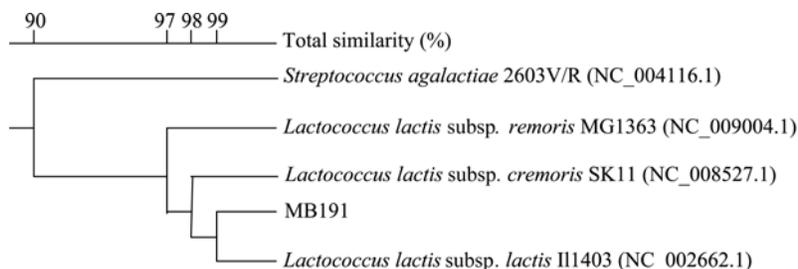


图 2 MB191 菌株及 Blast 分析的近缘种的聚类分析结果

Fig. 2 Cluster analysis of MB191 and some homologous strains based on the 16S rDNA sequences

MB191	MEVSR IKVKNRHLKKKARPLAFYKEATKFKAGAVI IAGTILTTTHELLLCCTSEMVCAATNSTEAF IESIA	70
II1403	MEVSR IKVKNRHLKKKARPLAFYKEATKFKAGAVI IAGTILTTTHELLLCCTSEMVCAATNSTEAF IESIA	70
MB191	ASAKPVAESNGL YFSVM IACAT IESNWGSSCI SRAPFY YNL FGIQGYCGKSVVFKTCEYI NGKWVTKDMP	140
II1403	ASAKPVAESNGL YFSVM IACAT IESNWGSSCL SRAPFY YNL FGIQGYCGKSVVFKTCEYI NGKWVTKDMP	140
MB191	FRVYP SFNCSFQCNAYV LKTTNFNGFYYAKAWRANA ATYCAATAAL TGKYATDFNYGASLNRI ISCYNL	210
II1403	FRVYP SFNCSFQCNAYV LKTTNFNGFYYAKAWRANA ATYCAATAAL TGKYATDFNYGASLNRI ISCYNL	210
MB191	TRFDGASSAGT SNSGGSTATNINNSNTSSITTYTVKS GDTLWGISCKYGISVAQIC SANNLKSTVIYIGQ	280
II1403	TRFDGASSAGT SNSGGSTATNINNSNTSSITTYTVKS GDTLWGISCKYGISVAQIC SANNLKSTVIYIGQ	280
MB191	KLVLT TSSSSSNINSSTSSGNSA PTTTPTTSVTEAKP ASCTTIKVKSGDTLWGL SVKYKTTIACLKSWNH	350
II1403	KLVLT TSSSSSNINSSTSSGNSA PTTTPTTSVTEAKP ASCTTIKVKSGDTLWGL SVKYKTTIACLKSWNH	350
MB191	LNSET I F IGCNI IVSCSAGSSSSSTGSSSASTSSTSNSSAASNTSIHKVVKGETI WGLSCKSGSEFIASIK	420
II1403	LNSET I F IGCNI IVSCSAGSSSSSTGSSSASTSSTSNSSAASNTSIHKVVKGETI WGLSCKSGSEFIASIK	420
MB191	AWNHL SSET I IGCYLR I	438
II1403	AWNHL SSET I IGCYLR I	438

图3 MB191 菌株的 *acmA* 基因编码氨基酸的 Blast 分析

Fig. 3 Blast analysis of amino acid sequences encoded by *acmA* genes of MB191 and *L. lactis* subsp. *lactis* II1403

性, 鉴定 MB191 为乳酸乳球菌, 且为乳酸亚种疑似菌株。

**2.2.5 *N*-乙酰胞壁酸水解酶基因(*acmA*)的扩增与序列测定:** 以乳酸乳球菌 MB191 总 DNA 为模板和以引物 PM1/PM2 进行 PCR 扩增, 电泳结果显示得到 1320 bp。经 Blast 分析, 该片段序列与 GenBank 中登记的乳酸乳球菌乳酸亚种 II1403 菌株的 *acmA* 基因(GenBank 登录号为 AE005176)有 99% 的序列相似性, 仅存在 12 个核苷酸和 5 个氨基酸的差异(图 3); 但与乳酸乳球菌乳脂亚种(*L. lactis* subsp. *cremoris*) MG1363 菌株的 *acmA* 基因的序列相似性仅 83%。根据以上实验结果, 将分离菌株 MB191 鉴定为乳酸乳球菌乳酸亚种(*L. lactis* subsp. *lactis*)的菌株。

### 2.3 MB191 的抑菌谱及其抑菌效果

选取不同的革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌、酵母菌和丝状真菌作为指示菌, 对 MB191 的抑菌活性进行了调查, 结果发现, MB191 对供试革兰氏阳性菌均表现抑菌活性, 且对 2 株革兰氏阴性菌和 1 株酵母菌也有抑菌活性(图 4)。采用对峙法对 MB191 抑菌谱及抑菌活性的大小进行了初步测定, 结果见表 2。

## 3 讨论

乳酸乳球菌由于可产生乳酸链球菌素而受到广泛重视。迄今, 乳酸乳球菌已报道有乳酸亚种、乳

脂亚种和霍氏亚种(*L. lactis* subsp. *hordniae*), 但这 3 个亚种在菌体形态和生理生化特征上极为相似, 采用常规鉴定方法进行亚种的鉴定比较困难。Garde 等发现采用特异引物进行 PCR 扩增该菌的 *acmA* 基因时, 乳酸亚种和乳脂亚种可出现不同的扩增产物: 乳酸亚种扩增产物除有 1131 bp 的 *acmA* 片段外, 还出现 1 个约 700 bp 的额外扩增子(Amplicon), 而乳脂亚种则仅有 1131 bp 的 *acmA* 片段<sup>[9]</sup>, 因此认为通过扩增 *acmA* 基因和检测扩增产物谱带, 是一种快速鉴别乳酸亚种和乳脂亚种的方法。但是, 本研究在扩增 MB191 菌株的 *acmA* 基因时, 并未发现额外的

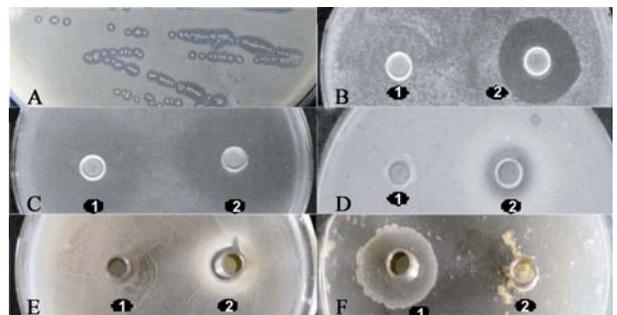


图4 MB191 菌株对几种细菌和酵母菌生长的抑菌作用  
Fig. 4 Inhibitory effect of MB191 against several tested bacteria and a yeast

注: A: 金黄色葡萄球菌; B: 丁香假单胞菌; C: 荧光假单胞菌; D: 枯草芽胞杆菌; E: 苏云金芽胞杆菌; F: 汉逊德巴利酵母; 1: 阴性对照; 2: MB191 悬液, 或指示菌 + MB191 混合液。

Note: A: *S. aureus*; B: *P. syringae*; C: *P. fluorescens*; D: *B. subtilis*; E: *B. thuringiensis*; F: *Debaryomyces hansenii*; 1: the negative control; 2: MB191 culture suspension, or the mixed cultures of MB191 with the indicators.

表 2 MB191 对供试细菌、酵母菌和丝状真菌的抑制效果  
Table 2 Inhibitory effect of MB191 against the tested bacteria, yeasts and fungi

供试菌株 The tested strains	抑制效果 Inhibitory effect (D/d)*
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	+++
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	++
苏云金芽孢杆菌 <i>Bacillus thuringiensis</i>	++
丁香假单胞菌 <i>Pseudomonas syringae</i>	+++
荧光假单胞菌 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	+++
恶臭假单胞菌 <i>Pseudomonas putida</i>	-
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	-
马克斯克鲁维酵母菌 <i>Kluyveromyces marxianus</i>	-
汉逊德巴利酵母 <i>Debaryomyces hansenii</i>	+
酿酒酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-
鲁氏裂殖酵母 <i>Schizosaccharomyces rouxii</i>	-
拜耳接合酵母 <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	-
法尔皮有孢汉生酵母 <i>Hanseniaspora valbyensi</i>	-
桔青霉 <i>Penicillium citrinum</i>	-
梨孢镰刀菌 <i>Fusarium poae</i>	-
互隔交链孢霉 <i>Alternaria alternate</i>	-

注: \* 符号说明: -:  $D/d - 1 \leq 0$ ; +:  $0 < D/d - 1 < 1$ ; ++:  $1 < D/d - 1 < 2$ ; +++:  $D/d - 1 \geq 2$ . D 和 d 分别为抑菌圈直径和牛津杯直径 (mm).

Note: \* Symbols: -:  $D/d - 1 \leq 0$ ; +:  $0 < D/d - 1 < 1$ ; ++:  $1 < D/d - 1 < 2$ ; +++:  $D/d - 1 \geq 2$ . D: The diameter (mm) of the inhibitory zone; d: The diameter (mm) of the Oxford microplate.

扩增产物(这一情况在文献[9]中也存在), 难以用该法进行快速的亚种鉴定。为此, 本研究采用了以形态学特征、生理生化特征为主, 并结合 G + C mol% 测定、16S rDNA 序列测定与聚类分析以及特异性 *acmA* 基因的扩增与序列分析比较等多重方法, 将所分离的高抑菌活性菌株鉴定为乳酸乳球菌乳酸亚种, 此一系统鉴定方法目前国内尚很少报道。本室进一步对 MB191 菌株的 *acmA* 基因进行了基因剔除效果观测, 发现突变株可形成较长链状, 此结果与 Buist 等<sup>[8]</sup>的报道结果相似(结果另文报道), 而利用 *acmA* 的编码产物作为运载蛋白, 已实现了在乳酸乳球菌表面展示一种葡聚糖酶<sup>[14]</sup>, 这些工作进一步支持了对于 MB191 的鉴定。

乳酸类细菌可产生多种抑菌或杀菌活性物质, 如羊毛硫抗生素(如Nisin)<sup>[2,3,5]</sup>、小分子热稳定的非羊毛硫氨酸类多肽<sup>[15]</sup>、大分子热不稳定的蛋白质等<sup>[2]</sup>, 其中羊毛硫抗生素因对葡萄球菌、利斯特氏菌、微

球菌(*Micrococcus* spp.)、分枝杆菌(*Mycobacterium* spp.)和棒杆菌(*Corynebacterium* spp.), 以及芽孢杆菌和梭菌等革兰氏阳性菌具有明显抗菌活性而一直受到重视, 其作用机制是通过与肽聚糖合成的前体物相结合而使细胞膜形成穿孔并抑制细胞壁的合成, 从而致死目标细菌<sup>[2,16]</sup>。近年来亦陆续发现某些乳酸细菌如棒状乳杆菌(*Lactobacillus coryniformis*), 对构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)、烟曲霉(*A. fumigatus*)和普通青霉(*P. commune*)等丝状真菌, 以及胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*)有抑菌活性<sup>[17,18]</sup>; 某些乳酸菌对部分植物与果蔬病原菌, 如野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris*)、胡萝卜软腐欧文氏菌(*Erwinia carotovora*)等亦表现出抑菌活性(研究认为乳酸菌代谢产生的有机酸与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>是主要的活性物质)<sup>[19]</sup>。但是, 迄今尚未有乳酸乳球菌抑制革兰氏阴性菌的报道。本研究首次报道了所分离的乳酸乳球菌具有对 2 种革兰氏阴性菌以及 1 株酵母菌的抑菌活性, 但其抑菌活性物质与抑菌机制有待于深入探究。目前, 本室通过HPLC分离特定抑菌活性物质和体外抑菌试验的工作正在进行之中。

## 参 考 文 献

- [1] Morello E, Bermudez-Humaran LG, Lull D, et al. *Lactococcus lactis*, an efficient cell factory for recombinant protein production and secretion. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2008, **14**: 48–58.
- [2] Bierbaum G, Sahl HG. Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. *Curr Pharm Biotechnol*, 2009, **10**: 2–18.
- [3] Cheigh CI, Pyun YR. Nisin biosynthesis and its properties. *Biotechnol Lett*, 2005, **27**: 1641–1648.
- [4] Mathur S, Singh R. Anticlotting resistance in food lactic acid bacteria – a review. *Int J Food Microbiol*, 2005, **105**: 281–295.
- [5] Lubelskia J, Rinkb R, Khusainova R, et al. Biosynthesis, immunity, regulation, mode of action and engineering of the model lantibiotic nisin. *Cell Mol Life Sci*, 2008, **65**: 455–476.
- [6] Siragusa S, Di Cagno R, Ercolini D, et al. Taxonomic structure and monitoring of the dominant population of lactic acid bacteria during wheat flour sourdough type I propagation using *Lactobacillus sanfranciscensis* starters. *Appl Environ Microbiol*, 2009, **75**: 1099–1109.
- [7] Drouault S, Corthier G, Ehrlich SD, et al. Survival, physiology, and lysis of *Lactococcus lactis* in the digestive tract.

- Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**(11): 4881–4886.
- [8] Buist G, Kok J, Leenhouts KJ, *et al.* Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the major peptidoglycan hydrolase of *Lactococcus lactis*, a muramidase needed for cell separation. *J Bacteriol*, 1995, **177**(6): 1554–1563.
- [9] Garde S, Babin M, Gaya P, *et al.* PCR amplification of the gene *acmA* differentiates *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris*. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**(11): 5151–5153.
- [10] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001, pp.242–260, 370–398.
- [11] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, *et al.* Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc., 1997, pp.2.4.1–2.4.5.
- [12] Harley-Prescott. Laboratory exercises in microbiology, the fifth ed. The McGraw-Hill Companies, 2002, p.447.
- [13] Marmur J, Doty P. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J Mol Biol*, 1962, **5**: 109–118.
- [14] 李小华, 黄新凤, 邵小虎, 等. 利用乳酸乳球菌 *Acma* 表面展示  $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶. 生物工程学报, 2009, **25**(1): 89–94.
- [15] 齐桂云, 周东坡, 雷红, 等. 乳酸杆菌小分子抗菌肽生物学性质的初步研究. 中国卫生检验杂志, 2006, **16**(2): 129–130.
- [16] Sablon E, Contreras B, Vandamme. Antimicrobial peptides of lactic acid bacteria: mode of action, genetics and biosynthesis. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2000, **68**: 21–60.
- [17] Magnusson J, Strom K, Roos S, *et al.* Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 2003, **219**: 129–135.
- [18] Magnusson J, Schnurer J. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**: 1–5.
- [19] Trias R, Baneras L, Montesinos E, *et al.* Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi. *Int Microbiol*, 2008, **11**: 231–236.

### 2009年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表(2-1)

序号	会议名称	主办单位	时间	人数	地点	联系人
1	致病菌微进化论坛	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	1月	80	北京	杨瑞馥 yangrf@nic.bmi.ac.cn
2	第十五届国际神经免疫, 病毒及药物学会 (SNIP) 年会	中国微生物学会病毒学专业委员会	4月	待定	湖北武汉	www.whcdc.org
3	2009国际医学真菌大会北京卫星会	中国微生物学会真菌学专业委员会	5月 29-31日	400	北京	www.fungalinfection.cn/is ham2009 何苗苗 010-65041809
4	第十二届全国微生物学教学科研研讨会	中国微生物学会基础、农业微生物学专业委员会	7月	100	湖北武汉	孙明 027-87283455
5	食品微生物监测技术与实验室质量管理	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	8月	100	山东青岛	杨瑞馥 yangrf@nic.bmi.ac.cn
6	第八届全国病毒学学术研讨会	中国微生物学会病毒学专业委员会	8月 17-19日	150	北京	王健伟 bdhy2009@163.com
7	全国第六届感染与免疫和生物制品学术研讨会	中国微生物学会医学微生物学与免疫学专业委员会	8月	100	吉林延吉	孟繁平
8	第三届病毒学国际学术会议	中国微生物学会病毒学专业委员会	9月	200	湖北武汉	刘芳 027-68754592
9	第十五届国际放线菌生物学大会	中国微生物学会	8月 20-25日	600	上海	白林泉 021-62932418