

ϵ -聚赖氨酸发酵过程污染微生物的分离与鉴定

田波 陈旭升 任喜东 毛忠贵*

(江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】研究 ϵ -聚赖氨酸发酵过程中污染微生物的种类。【方法】采用稀释涂布法、划线法、环境胁迫法和液体营养富集法等对污染样本进行微生物的分离与纯化,通过菌落形态和显微观察,再结合 16S rRNA 基因序列分析,确定分离菌株的系统发育地位,并对分离菌株的 ϵ -聚赖氨酸耐受性进行考察。【结果】液体营养富集法实现了污染微生物的分离,通过 16S rRNA 基因序列分析鉴定其为一株 *Acinetobacter bereziniae*,并证实该菌能在高浓度 ϵ -聚赖氨酸条件下生长。【结论】*Acinetobacter bereziniae* 是 ϵ -聚赖氨酸发酵过程中的主要污染微生物,这为后期发酵污染防治提供了一定的指导作用。

关键词: 链霉菌, 分离, 鉴定, *Acinetobacter bereziniae*

Isolation and identification of contamination microorganisms in ϵ -poly-L-lysine fermentation process

TIAN Bo CHEN Xu-Sheng REN Xi-Dong MAO Zhong-Gui*

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] To solve the problem of contamination during ϵ -poly-L-lysine (ϵ -PL) fermentation, contamination microorganisms were screened and identified in this study. [Methods] Many strategies, like dilution coated plate, streak plate method, environmental stress method and liquid nutrient enrichment method, were performed to screen microorganisms from contaminated sample. Then the phylogenetic position of the isolate was determined through colony and microscopic morphology observation and 16S rRNA gene sequence analysis. Subsequently, the ϵ -PL tolerance of the isolate had evaluated. [Results] Contamination microorganisms were screened using liquid nutrient enrichment method isolated and identified as *Acinetobacter bereziniae* by 16S rRNA gene sequence analysis. Meanwhile, this isolate could tolerant high concentration of ϵ -PL. [Conclusion] *Acinetobacter bereziniae* was identified as the dominate contamination microorganism in ϵ -PL fermentation. And this find is helpful for the treatment of contamination microorganism in the process of ϵ -PL fermentation.

Keywords: Streptomyces, Isolation, Identification, *Acinetobacter bereziniae*

基金项目: 江苏省科技支撑计划社会发展项目(No. BE2012616)

*通讯作者: Tel: 86-510-85918307; 信箱: maozg@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2014-11-25; 接受日期: 2015-02-12; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-03-17

1977年,日本学者 Shima 等在小白链霉菌(*Streptomyces albulus*)的培养液中发现了 ϵ -聚赖氨酸(ϵ -Poly-L-lysine, ϵ -PL)^[1],它是由 25–35 个 L-赖氨酸单体通过 α -COOH 和 ϵ -NH₂ 脱水缩合而成的同型氨基酸聚合物^[2]。 ϵ -PL 作为一种多阳离子聚合物,对革兰氏阴性细菌和革兰氏阳性细菌具有较强的抑制活性,同时对酵母等真菌和病毒也具有一定抑制能力^[3]。目前 ϵ -PL 主要作为一种优良的生物食品防腐剂被广泛用于日本、韩国、美国 and 欧洲等国家和地区的食品加工领域。2014 年 4 月,我国也将 ϵ -PL 批准为食品添加剂新品种^[4]。

ϵ -PL 发酵一般采用两阶段 pH 控制策略。Kahar 等首先控制发酵 pH 高于 5.0,使菌体大量繁殖,其次控制 pH 在 4.0 附近,进行 ϵ -PL 的合成,在 96 h 后补加葡萄糖和硫酸铵,发酵 192 h,最终产量达到了 48.3 g/L^[5]。江南大学陈旭升等根据 *Streptomyces* sp. M-Z18 的发酵特性,建立了新的两阶段 pH 控制发酵工艺,发酵 192 h 产量达 30.11 g/L^[6]。目前 ϵ -PL 发酵水平已经达到 40 g/L 以上,正推向产业化阶段。

染菌是发酵工艺中最棘手的问题之一,在纯种发酵过程中染菌现象屡见不鲜^[7-9],抗生素生产行业中染菌也是最为关注的焦点之一^[10-11]。本研究室在 5 L 发酵罐上利用 *Streptomyces* sp. M-Z18 进行好氧发酵生产 ϵ -PL 时也常出现染菌问题,以致影响研究的正常进行。对污染微生物种属上的认识将有利于发酵过程中的防治控制,尤艳华^[12]采用稀释涂布平板法对盾壳霉双相发酵过程中污染微生物进行分离,得到 10 株细菌;曹文伟等^[13]采用相同方法从红霉素发酵液中分离到 45 株污染细菌,其中 39 株为芽孢杆菌属。本文以 5 L 发酵罐好氧发酵时污染样本为研究对象,建立了一种 *Streptomyces* sp. M-Z18 发酵后期污染生物的分离方法。分析污染微生物的种属、来源,为实验室研究、中试及大生产发酵过程污染的防治及研究污染微生物的耐高浓度 ϵ -PL 机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 发酵异常样本

实验室 5 L 发酵罐发酵中后期(第 5、6 天后)染菌样本 1、2、3 和 4。

1.2 主要试剂和仪器

ϵ -PL 样品,日本 JNC 公司,纯度 98%以上;其他试剂均为国药集团分析纯试剂。PCR 扩增仪、凝胶成像系统,美国 Bio-Rad 公司;聚合酶链式反应(PCR)所用的 DNA 聚合酶、dNTPs,大连 TaKaRa 公司。上游引物 27F:5'-AGAGTTTGATCGTGGCTCAG-3',下游引物 1429R:5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3',生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3 培养基及培养条件

Streptomyces sp. M-Z18 菌体生长培养条件参考文献[6]。细菌为牛肉膏蛋白胨、Luria-Bertani (LB) 培养基^[14]。

1.4 污染微生物的分离纯化及鉴定

1.4.1 样本的预处理:超净工作台无菌取样到已灭菌的具盖 15 mL 离心管中,1 600×g 离心 4 min 除去大量链霉菌菌体,上清液于 4 °C 保存。取上清液进行简单显微镜观察,判定样本中污染微生物的基本形态及种类,同时测定各样本中 ϵ -PL 的含量^[15]及 pH 值。

1.4.2 污染微生物的分离:分别取 1 mL 4 °C 保存的上清液到 LB 液体培养基中进行富集培养,于 30 °C、200 r/min 培养。分别于 24、72 h 取富集培养液,10 倍稀释法稀释后取样涂布至牛肉膏蛋白胨及 LB 培养基上,3 个平行。同时分别取 4 °C 保存的上清液 10 倍稀释法稀释涂布在贝纳特、牛肉膏蛋白胨、LB 培养基上,37 °C 培养 48 h 观察菌落特征,并采用平板划线法进行纯化^[14]。

1.4.3 分类鉴定:根据“Bergey's Manual of Determinative Bacteriology”(9th edition)^[16]细菌分类标准,借助光学显微镜、扫描电镜等对分离菌株的营养细胞进行观察,扫描电镜样品的预处理主要包括表面清洁、固定、漂洗和脱水等过程:(1)用无

水乙醇进行清洗,之后用 3%戊二醛溶液固定,再用四氧化二锇固定。(2) 干燥除去乙醇,减少表面张力对样品表面的影响。(3) 酒精梯度脱水之后,再用磷酸异戊酯过渡,干燥后用扫描电子显微镜观察。根据上述观察的形态特征,结合 16S rRNA 基因对分离得到的菌株进行鉴定。

1.4.4 分子鉴定: 采用细菌基因组提取试剂盒抽提菌株总 DNA; 用细菌通用引物 27F 和 1492R 对菌株总 DNA 进行 16S rRNA 基因扩增^[17]。PCR 反应使用 50 μ L 体系: 1 ng DNA 模板 3 μ L, 10 \times PCR mix 25 μ L, 5 U/ μ L *Taq* DNA 酶 0.5 μ L, 上下游引物 2 μ mol/L 各 0.5 μ L, ddH₂O 20 μ L^[18]。PCR 程序为: 95 $^{\circ}$ C 10 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 54 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 105 s, 共 29 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 结束后经琼脂糖凝胶电泳检测,符合测序要求后将 16S rRNA 基因片段送上海生工生物技术公司进行测序。利用 NCBI 中 BLAST 在线比对所测菌株的 16S rRNA 基因序列,将其与从 GenBank 数据库中获得的其他亲缘关系相近种属的 16S rRNA 基因,采用 ClustalX 2.0 软件进行多序列匹配排列(Multiple alignments),用系统发生推断软件包 MEGA 6.0 进行系统发育分析。在 Kimura-2-parameter 模型的基础上,用 Neighbor-Joining (N-J)法构建分子系统树,自举分析(Bootstrap) 1 000 次重复检测分子系统树的置信度,缺失和不确定的位点在计算中被省略^[19-20]。

1.4.5 分离菌株的验证: 将分离菌株与 *Streptomyces* sp. M-Z18 按照摇瓶发酵工艺^[6]进行共培养,72 h 后平板划线培养观察菌落特征; 将分离菌株于 M3G 培养基中培养 24 h 后分别接种 3 mL 到不同 pH 的 RSM 培养基中培养^[6],考察其 pH 耐受性,培养 72 h 后 620 nm 下测定 OD。发酵污染一般在发酵中后期,此时发酵 pH 控制在 3.8, ϵ -PL 产量在 20 g/L 以上。为进一步验证分离菌株的聚赖氨酸耐受性,将其于 M3G 培养基中培养 24 h,取 3 mL 接种至分别含 12、24、36、48 g/L ϵ -PL pH 3.8 的 RSM 培养基中培养 72 h,再用培养液直接点接种平板观察是

否有菌落生长。

2 结果与分析

2.1 污染样本基本性质

经过测定,每个污染样本中 ϵ -PL 含量在 30 g/L 左右, pH 在 3.80 左右,从该结果可以分析污染微生物具有一定的耐酸能力和很强的 ϵ -PL 耐受能力。在显微镜下观察污染样本结果见图 1,可以看到似球杆状的污染微生物分散在放线菌菌丝中。

2.2 常规分离-稀释涂布平板法

按照 1.4.2 方法,对污染微生物进行分离。牛肉膏蛋白胨培养基 37 $^{\circ}$ C 培养 48 h 的菌落特征均为淡黄色,似细菌培养物,但该单菌落与培养基生长紧密,不易挑起,从菌落特征分析,初步得出不同批次所污染的微生物可能是相同种属的; 分别挑选菌落特征大小不一的淡黄色似细菌培养物于牛肉膏蛋白胨培养基平板上划线纯化,37 $^{\circ}$ C 培养 48 h 的菌落特征见图 2A,单菌落呈淡黄色,似细菌; 在 LB 平板上划线纯化培养 5 d 的菌落特征如图 2B 所示,出现中间凹陷,似梅花状,与典型的细菌菌落特征不一致; 对梅花状培养物进行番红简单染色见图 2C,发现所分离得到的似细菌培养物不是纯培

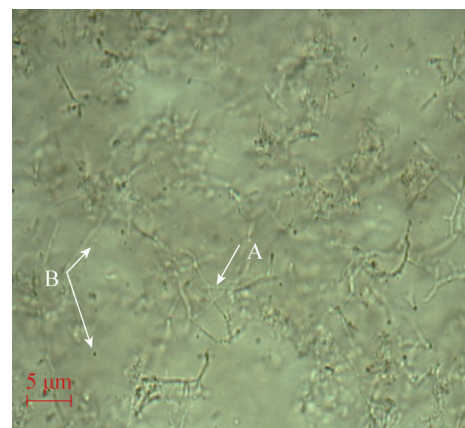


图 1 污染样本显微镜镜检图(400 \times)

Figure 1 Microscopic examination of the contamination sample (400 \times)

注: A: 污染微生物; B: *Streptomyces* sp. M-Z18 菌丝。

Note: A: Contamination microorganisms; B: Mycelium of *Streptomyces* sp. M-Z18.

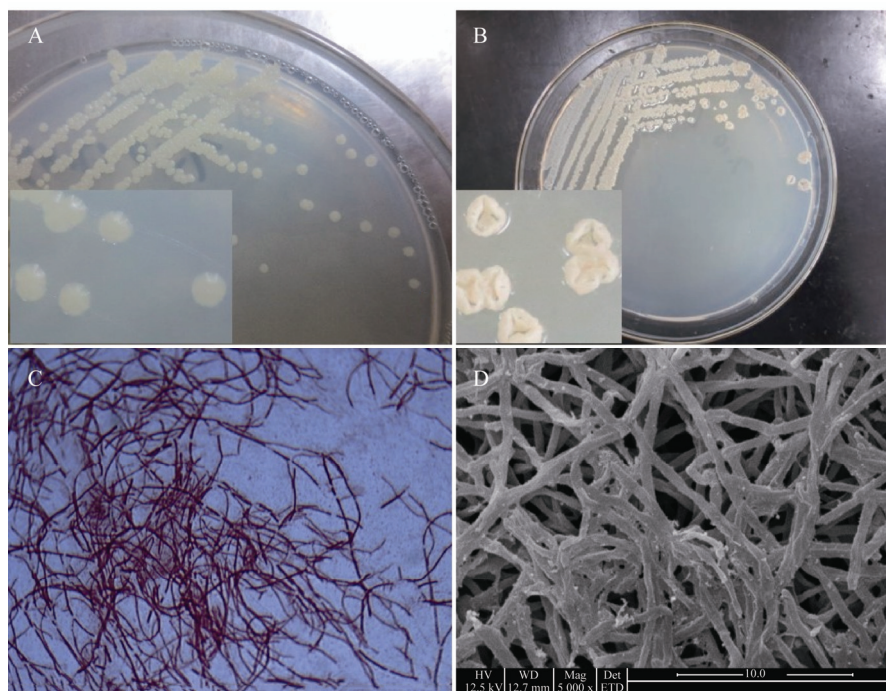


图2 培养物特征

Figure 2 Morphological characteristics of colony

注：A：牛肉膏蛋白胨平板培养物；B：LB 平板培养物；C：培养物简单染色观察；D：培养物扫描电镜照片。

Note: A: Mixed culture on beef extract peptone plate; B: Cultures on LB plate; C: Microscope observation of contaminated simple cultures (400×); D: Scanning electron microscope observation of cultures (10 000×).

养物，而是混生培养物，菌落中链霉菌占了绝大部分，污染微生物的量较少；培养物显微镜观察发现污染微生物细胞分泌似淀粉状物质；电镜观察见图2D，显示放线菌菌丝不饱满，且有白色附着物，白色附着物可能为污染微生物。有文献报道黏细菌因为其特殊的代谢产物和生长速率，分离比较困难^[21-23]。两者可能有相似之处。

使用传统的稀释涂布法来分离纯化ε-聚赖氨酸发酵过程污染微生物已不能奏效^[24]，必须寻找一种新的分离方法，主要从两方面进行：(1) 改变培养条件，使得污染微生物代谢途径改变，胞外分泌物减少或者不产，主要采用了施加盐浓度、pH 环境压力策略；(2) 抑制链霉菌生长，污染微生物生长不受抑制，主要采用了在培养基中添加聚赖氨酸(中性 pH 下链霉菌生长受到抑制)、抗生素、极端 pH、更换培养基组成等策略。通过上述两个方面的尝试

没有实现对污染微生物的有效分离。

2.3 液体富集法分离污染微生物

观察混生培养物在贝纳特琼脂平板上生长特征时，发现污染微生物与 *Streptomyces* sp. M-Z18 表现出生长速率差异，见图 3。有地方出现 *Streptomyces* sp. M-Z18 白色菌丝且不生长孢子的培养物，而有的地方是黄色培养物，培养 15 d 左右时不再出现混生培养物难以挑起的现象，分析可能是污染微生物作用于放线菌菌丝，使菌丝断裂、自溶，这与发酵中后期染菌后出现的菌丝断裂，菌体自溶加速现象一致。

刮取图 3 底层培养物到贝纳特液体培养基中进行富集培养，48 h 后采用 10 倍稀释涂布平板法进行分离，对平板上单菌落划线纯化得到纯培养物。对 4 个发酵污染样本重复 3 次实验，得到的纯培养物分别命名为 X-20-1、X-20-2、X-20-3、X-20-4。

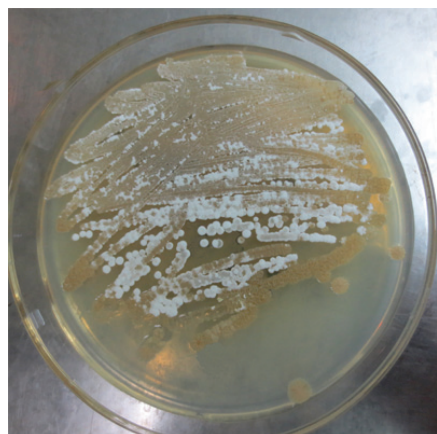


图3 污染样本在贝特纳琼脂平板上培养特征(15 d)
Figure 3 Culture characteristics of pollution samples on benater agar plate (15 d)

2.4 分离菌株的简单鉴定结果

从纯培养物菌落特征初步判定4株菌为同种,因此以X-20-1菌株进行简单鉴定。X-20-1的基本形态特征如图4A所示,菌落为米白色,挑起时稍黏稠,对X-20-1进行简单染色显示菌体形态为短杆状;革兰氏染色显微镜观察显示为革兰氏阴性菌,见图4B;透射电镜观察见图4C,发现X-20-1细菌分泌胞外物质。胞外分泌物使X-20-1与链霉菌胶黏在一起导致两者很难分开,与前期尝试了很多分离方法没有进行有效分离的原因相一致。

2.5 4株菌的分子鉴定

将分离得到4株细菌的16S rRNA基因序列(X-20-1、X-20-2、X-20-3和X-20-4的登录号依次为KP056314、KP222740、KP222742和KP222741)与NCBI数据库中的已知序列进行BLAST比对,确定与4株菌株亲缘关系最近的均为*Acinetobacter bereziniae*。按照1.4.4所述方法,构建的系统进化树如图5所示,4株菌的16S rRNA基因与不动杆菌属*Acinetobacter bereziniae* ATCC 17924的一致性达100%,在系统进化树上处于同一分支。

2.6 分离菌株X-20-1的验证

4株菌均为*Acinetobacter bereziniae*,因此以X-20-1进行以下实验。按照1.4.5的方法,对*Streptomyces* sp. M-Z18与X-20-1共培养物平板划线,在LB与贝纳特平板菌落形态见图6,结果显示,在两种平板上混合共培养后划线的菌落特征分别与没有分开前的菌落特征一致。同时测定两株菌摇瓶共培养结束时pH值为3.0, ϵ -PL为1.6 g/L,而纯种发酵 ϵ -PL为1.74 g/L,显示X-20-1的污染对*Streptomyces* sp. M-Z18纯种发酵有一定的影响。

对X-20-1菌株的pH及聚赖氨酸耐受性验证结果见图7,结果显示X-20-1在pH 3.5–9.0能正常生长,最适生长pH为5.0。在不同pH条件下,X-20-1

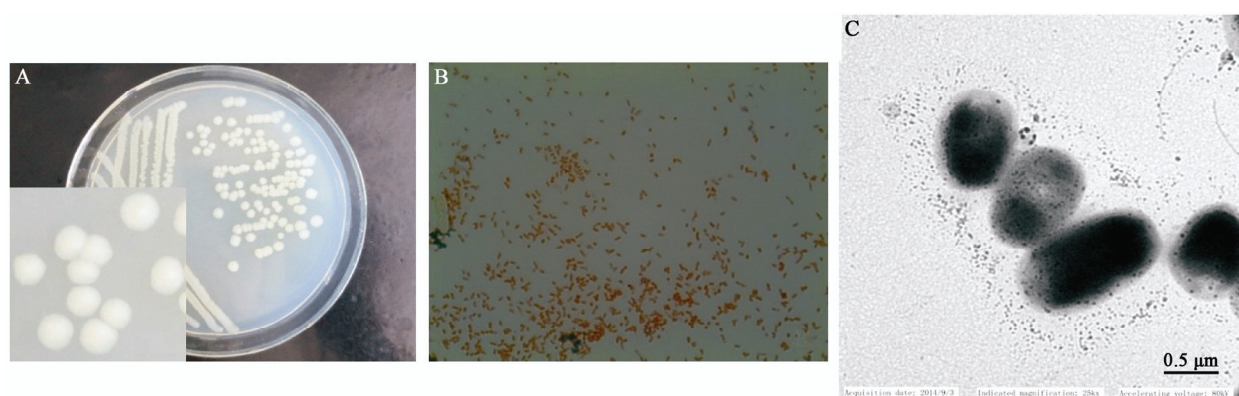


图4 X-20-1形态特征

Figure 4 Morphological characteristics of X-20-1

注: A: 菌落特征(4 d); B: 革兰氏染色(1 000 \times); C: 扫描电镜照片(25 000 \times).

Note: A: X-20-1 colony morphology (4 d); B: Gram staining (1 000 \times); C: Transmission electron microscope observation (25 000 \times).

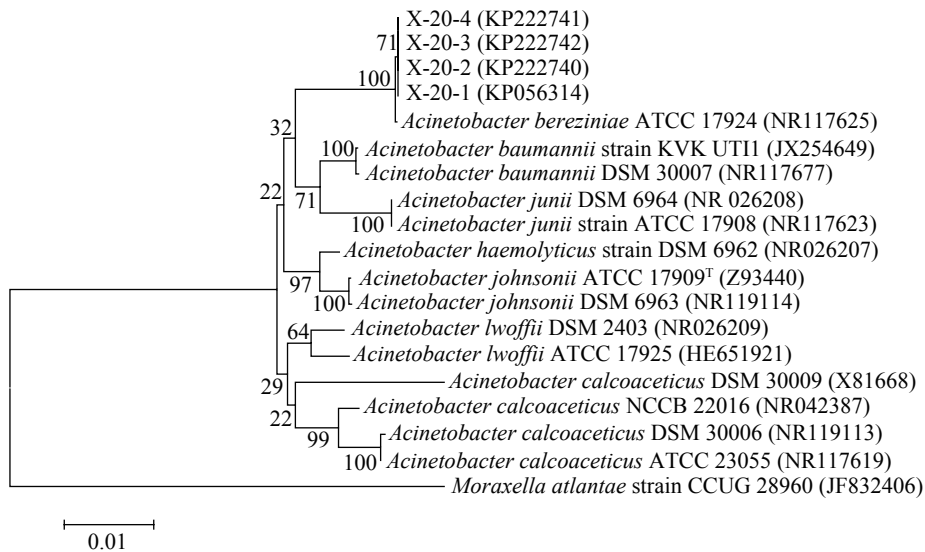


图5 基于16S rRNA基因用MEGA 6.0构建的N-J进化树
Figure 5 N-J phylogenetic tree diagram based on 16S rRNA gene sequence

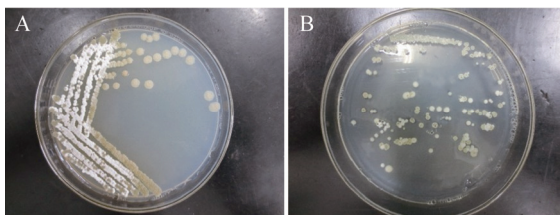


图6 X-20-1与M-Z18混合共培养后平板划线菌落图
Figure 6 Colony morphology of mixed culture strain X-20-1 and M-Z18

注：A：贝纳特琼脂平板培养特征；B：LB平板培养特征。

Note: A: X-20-1 colony morphology on benater agar plate; B: X-20-1 colony morphology on LB agar plate.

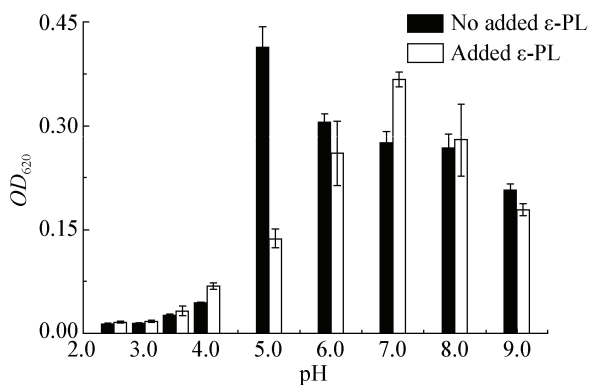


图7 菌株X-20-1在不同pH下的生长情况
Figure 7 The strain of X-20-1 growth on the grad of culture medium pH value

在含2.4 g/L ε-PL的培养基中也能正常生长。

分离菌株的ε-PL耐受性结果见图8,在与发酵条件相同的条件下,X-20-1在添加有不同浓度ε-PL的液体培养基中菌株量的浓度较一致,培养基浑浊明显,结果表明X-20-1能在48 g/L ε-PL下正常生长。

3 讨论

采用稀释涂布平板法、环境胁迫等方法没有实现对ε-聚赖氨酸发酵过程污染微生物的分离,分析原因是污染微生物细胞壁分泌某些似淀粉状胞外附属物,使污染微生物黏附在放线菌菌丝上。最后采用液体富集法实现有效分离,经分子生物学鉴定为不动杆菌属 *Acinetobacter bereziniae* 菌。污染微生物的有效分离为后期实验室研究、中试及大生产发酵过程污染的防治,以及研究污染微生物的耐高浓度聚赖氨酸机制打下基础。污染微生物对 *Streptomyces* sp. M-Z18 纯种的发酵有一定的影响。分析其原因可能有: X-20-1 污染后附着在 *Streptomyces* sp. M-Z18 菌丝体上,影响菌丝的正常生长,导致菌丝生长不饱满,污染微生物的附着加剧在低 pH 条件下时菌丝的自溶;同时 X-20-1 会与

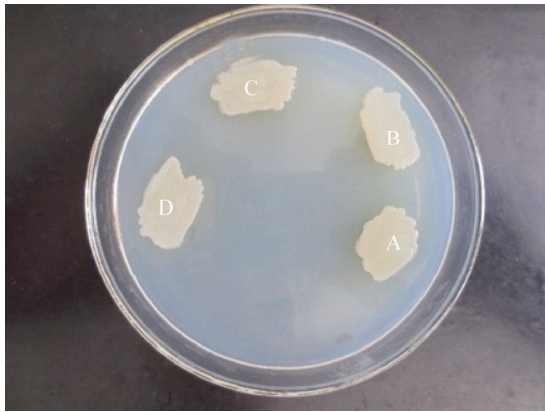


图8 菌株 X-20-1 在不同 ϵ -PL 浓度下的生长情况(72 h)
Figure 8 Strain of X-20-1 of growth situation under different concentrations of ϵ -PL (72 h)

Note: A: 12 g/L ϵ -PL; B: 24 g/L ϵ -PL; C: 36 g/L ϵ -PL; D: 48 g/L ϵ -PL.

Streptomyces sp. M-Z18 竞争某些限制性营养, 及污染微生物代谢产生某些胞外蛋白都会干扰生产菌株的正常代谢。生物膜是由细菌和自身分泌的胞外基质组成^[25], 文献[26]报道 *Acinetobacter bereziniae* 同属菌鲍曼不动杆菌能够形成生物膜, 推测分泌的胞外黏质物可能是生物膜, Thurnheer 等^[27]的研究表明大分子在渗透入生物膜时要通过迂曲的途径, 同时 Raad 等^[28]研究表明生物膜是带负电荷的, 会吸收带正电荷的大分子形成屏障, 推测 *Acinetobacter bereziniae* 在 pH 3.8 时能耐受 48 g/L 以上的聚赖氨酸的机制可能为: 生物膜阻碍带正电荷的 ϵ -聚赖氨酸吸附到细胞膜上, 而 ϵ -聚赖氨酸吸附到细胞膜上, 破坏膜结构完整性是其发挥抑菌作用的基础^[29]。

参考文献

- [1] Shima S, Saka H. Polylysine produced by *Streptomyces*[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1977, 41(9): 1807-1809
- [2] Shima S, Sakai H. Poly-L-lysine produced by *Streptomyces*. part III. chemical studies[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1981, 45(11): 2503-2508
- [3] Shih IL, Shen MH, Van YT. Microbial synthesis of poly (ϵ -lysine) and its various applications[J]. Bioresource Technology, 2006, 97(9): 1148-1159
- [4] Notice on the approval of ϵ -polylysine, etc. four new varieties of food additives[EB/OL]. 2014, <http://www.nhfpc.gov.cn/sps/s7890/201404/a93467d652c24a75a6de637abde31f30.shtml> (in Chinese)
关于批准 ϵ -聚赖氨酸等4种食品添加剂新品种等的公告[EB/OL]. 2014, <http://www.nhfpc.gov.cn/sps/s7890/201404/a93467d652c24a75a6de637abde31f30.shtml>
- [5] Kahar P, Iwata T, Hiraki J, et al. Enhancement of ϵ -polylysine production by *Streptomyces albulus* strain 410 using pH control[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2001, 91(2): 190-194
- [6] Chen XS, Li S, Liao LJ, et al. Production of ϵ -poly-L-lysine using a novel two-stage pH control strategy by *Streptomyces* sp. M-Z18 from glycerol[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2011, 34(5): 561-567
- [7] Chen L. Citric acid submerged fermentation and bacteria pollution[J]. Science and Technology Information, 2010(22): 767-768 (in Chinese)
陈雷. 柠檬酸深层发酵与杂菌污染研究[J]. 科技信息, 2010(22): 767-768
- [8] Li J, Yang GW, Wang DM, et al. Isolation for the bacterial contamination on fermentation of cyclodextrin glucosyl transferase and analysis by 16S rDNA[J]. China Food Additives, 2011(3): 65-68 (in Chinese)
李皎, 杨国武, 汪大敏, 等. β -环状糊精葡萄糖基转移酶发酵染菌的分离和16S rDNA 分析[J]. 中国食品添加剂, 2011(3): 65-68
- [9] Ren SG, Chen GQ, Xu ZF. The analysis and processing of bacteria pollution during the industrial production of lactic acid[J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2006(1): 58-59 (in Chinese)
任石苟, 陈岗庆, 许志芳. 乳酸发酵大生产染菌分析及处理[J]. 农产品加工学刊, 2006(1): 58-59
- [10] Guo SL, Zhang YQ. The reason analysis and solving method for bacteria infection in the antibiotic production[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2009, 43(7): 54-56 (in Chinese)
郭胜利, 张燕青. 抗生素生产中发酵罐染菌的原因分析及解决途径[J]. 中国兽药杂志, 2009, 43(7): 54-56
- [11] Zhong SH, Xu MC, Chen Y. Controlling of bacterial-infection in the fermentation process of jinggangmeisu[J]. Journal of Natural Science of Hunan Normal University, 2005, 28(2): 76-79 (in Chinese)
钟世华, 徐满才, 陈媛. 井冈霉素发酵工艺中染菌的控制[J]. 湖南师范大学自然科学学报, 2005, 28(2): 76-79
- [12] You YH. Analysis and control of contamination in the process of double-phase fermentation of *Coniothyrium minitans*[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2011 (in Chinese)
尤艳华. 盾壳霉双相发酵过程中污染微生物的分析及其控制[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2011
- [13] Cao WW, Zhang DM, Rao KY. The identification of contaminating bacteria isolated from the fermentation broth of Erythromycin and its effects on fermentation of Erythromycin[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 1994, 19(1): 6-11 (in Chinese)
曹文伟, 张德明, 饶可扬. 红霉素发酵液中污染细菌的分离与鉴定及其对红霉素发酵的影响[J]. 中国抗生素杂志, 1994, 19(1): 6-11
- [14] Shen P, Chen XD, Wei YB. Microbiology Experiment[M]. Beijing: Higher Education Press, 2009: 28-34 (in Chinese)
沈萍, 陈向东, 卫扬保. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2009: 28-34
- [15] Itzhaki RF. Colorimetric method for estimating polylysine and polyarginine[J]. Analytical Biochemistry, 1972, 50(2): 569-574
- [16] Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume Two, The *Proteobacteria*, Part C: The *Alpha*-, *Beta*-, *Delta*-, and *Epsilonproteobacteria*[M]. 2nd Edition. New York: Springer, 2005: 426-440
- [17] Brunel B, Givaudan A, Lanois A, et al. Fast and accurate identification of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* species by restriction analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes[J].

- Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(2): 574-580
- [18] Bie XM, Lu ZX, Fang YW. Identification of a microorganism strain producing the antimicrobial substance with 16S rDNA sequence analysis[J]. Food Science, 2007, 27(11): 466-470 (in Chinese)
别小妹, 陆兆新, 房耀维, 等. 利用 16S rDNA 序列分析鉴定一株产抗菌物质的微生物菌株[J]. 食品科学, 2007, 27(11): 466-470
- [19] Hu Y, Mu X, Luo D, et al. Genetic variability of the invasive snail *Pomacea canaliculata* in South China based on mitochondrial 16S rDNA sequences[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2014, 57: 203-209
- [20] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731-2739
- [21] Li YZ, Li J. Isolation and identification of Myxobacteria[J]. Microbiology China, 1997, 24(4): 237-240 (in Chinese)
李越中, 李健. 粘细菌的分离与纯化[J]. 微生物学通报, 1997, 24(4): 237-240
- [22] Zhang XJ, Li ZK, Tan ZY, et al. Isolation and identification of Myxobacteria in the salinealkaline soils of Akesu in Xinjiang[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(2): 160-168 (in Chinese)
张鲜姣, 黎志坤, 谭志远, 等. 新疆阿克苏地区盐碱地粘细菌分离鉴定[J]. 微生物学报, 2012, 52(2): 160-168
- [23] Zhao ZY, Zhang XJ, Tan ZY, et al. Isolation and identification of cultivable myxobacteria in the rhizosphere soils of medicinal plants[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2013, 53(7): 657-668 (in Chinese)
赵智颖, 张鲜姣, 谭志远, 等. 药用植物根系土壤可培养粘细菌的分离鉴定[J]. 微生物学报, 2013, 53(7): 657-668
- [24] Xu W. Study of the separation, identification and bioactivity of Myxobacteria[D]. Baoding: Master's Thesis of Hebei University, 2013 (in Chinese)
徐文. 粘细菌的分离纯化、鉴定及生物活性物质的筛选研究[D]. 保定: 河北大学硕士学位论文, 2013
- [25] Costerton JW, Cheng K, Geesey GG, et al. Bacterial biofilms in nature and disease[J]. Annual Reviews in Microbiology, 1987, 41(1): 435-464
- [26] Sun S, Zhang LP. Study on biofilm-formation ability of clinical strains of *Acinetobacter baumannii*[J]. Chinese Journal of Microecology, 2012, 23(12): 1107-1109 (in Chinese)
孙珊, 张莉萍. 鲍曼不动杆菌临床菌株生物膜形成能力的研究[J]. 中国微生态学杂志, 2012, 23(12): 1107-1109
- [27] Thurnheer T, Gmür R, Shapiro S, et al. Mass transport of macromolecules within an *in vitro* model of supragingival plaque[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(3): 1702-1709
- [28] Raad I, Alrahan A, Rolston K. *Staphylococcus epidermidis*: emerging resistance and need for alternative agents[J]. Clinical Infectious Diseases, 1998, 26(5): 1182-1187
- [29] Bo T, Liu M, Zhong C, et al. Metabolomic analysis of antimicrobial mechanisms of ϵ -Poly-L-lysine on *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(19): 4454-4465

征订启事

欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于 1974 年, 是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办, 国内外公开发行, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 基础微生物学研究, 农业微生物学研究, 工业微生物学研究, 医学微生物学研究, 食品微生物学研究, 环境微生物学研究, 微生物功能基因组研究, 微生物蛋白组学研究, 微生物模式菌株研究, 微生物工程与药物研究, 微生物技术成果产业化及微生物教学研究改革等。

本刊为中国自然科学核心期刊。曾获国家优秀科技期刊三等奖, 中国科学院优秀科技期刊三等奖, 北京优秀科技期刊奖, 被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

自 2008 年本刊已经全新改版, 由双月刊改为月刊, 发表周期缩短, 内容更加丰富详实。欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买, 2015 年每册定价 58 元, 全年 696 元, 我们将免邮费寄刊。

邮购地址: (100101) 北京朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/WSWXTBCN>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: M413

<http://journals.im.ac.cn/WSWXTBCN>