

研究报告

肠膜明串珠菌细菌素抗金黄色葡萄球菌的生物学特性分析

王嘉悦¹, 潘果¹, 钟忻桐¹, 苏惠¹, 路雨¹, 李国江^{1,2,3}, 董文龙^{*1,2,3}

1 吉林农业科技学院 动物科技学院, 吉林 吉林 132109

2 吉林省预防兽医学重点实验室, 吉林 吉林 132109

3 吉林省猪生态养殖及疫病防控科技创新中心, 吉林 吉林 132109

王嘉悦, 潘果, 钟忻桐, 苏惠, 路雨, 李国江, 董文龙. 肠膜明串珠菌细菌素抗金黄色葡萄球菌的生物学特性分析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(9): 3562-3571.

WANG Jiayue, PAN Guo, ZHONG Xintong, SU Hui, LU Yu, LI Guojiang, DONG Wenlong. Biological characterization of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* inhibiting *Staphylococcus aureus*[J]. Microbiology China, 2024, 51(9): 3562-3571.

摘要:【背景】金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是导致全球耐药负担加重的重要原因, 乳酸菌细菌素是治疗致病性细菌感染的一种新型的手段, 具有广阔的应用前景。【目的】筛选抑制金黄色葡萄球菌的乳酸菌细菌素。【方法】采用琼脂扩散法筛选产细菌素的乳酸菌; 通过 16S rRNA 基因测序鉴定菌株, 并利用 MEGA 11 构建系统发育树; 排除酸和过氧化氢影响后, 经生物学特性分析确定菌株细菌素的抗酶解性、pH 稳定性和稳定性; 测定菌株的生长曲线、产酸能力并观察其生长特性; 对菌株进行模拟胃液耐受能力的检测。【结果】从延吉南瓜中分离获得一株肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*) WJY-6, 该菌株分泌的细菌素对不同源金黄色葡萄球菌表现出抑菌效果, 并且具有良好的抗酶解性, 在 100 °C 和 121 °C 处理后抑菌活性仍能维持在 35% 以上, 该细菌素在 pH 3.0–5.0 条件下抑菌活性最佳; 该菌株培养 8 h 时 pH 值下降到 5.0 以下, 抑菌效果稳步增加, 在 18 h 进入生长稳定期; 该菌株在模拟胃液中有极强的存活能力, 并能够大幅增殖。【结论】肠膜明串珠菌 WJY-6 有着极强的产酸能力, 在模拟胃液中耐受能力良好, 其所分泌的细菌素具备优异的理化特性, 并且对金黄色葡萄球菌存在显著的抑制活性, 有望成为防治金黄色葡萄球菌感染相关疾病的新型替代抗生素产品。

关键词: 金黄色葡萄球菌; 乳酸菌; 肠膜明串珠菌; 细菌素; 生物学特性

资助项目: 吉林省科技创新平台补助项目(YDZJ202302CXJD038)

This work was supported by the Science and Technology Innovation Platform Subsidy Project of Jilin Province (YDZJ202302CXJD038).

*Corresponding author. E-mail: dongwenlong9@163.com

Received: 2023-12-28; Accepted: 2024-02-18; Published online: 2024-04-07

Biological characterization of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* inhibiting *Staphylococcus aureus*

WANG Jiayue¹, PAN Guo¹, ZHONG Xintong¹, SU Hui¹, LU Yu¹, LI Guojiang^{1,2,3},
DONG Wenlong^{*1,2,3}

¹ Animal Science and Technology College, Jilin Agricultural Science and Technology University, Jilin 132109, Jilin, China

² Jilin Provincial Key Laboratory of Preventive Veterinary Medicine, Jilin 132109, Jilin, China

³ Science and Technology Innovation Center of Pig Ecological Breeding and Disease Control, Jilin 132109, Jilin, China

Abstract: [Background] *Staphylococcus aureus* is a key reason for the increase in the global drug resistance burden. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria are a new method to treat pathogenic bacterial infections and has broad application prospects. [Objective] To screen the bacteriocins of lactic acid bacteria that inhibit *S. aureus*. [Methods] The agar diffusion method was used to screen the bacteriocin-producing lactic acid bacteria. Strains were identified by 16S rRNA gene sequencing and a phylogenetic tree was constructed using MEGA 11. After the effects of acids and hydrogen peroxide were excluded, the anti-enzymolysis property, pH stability, and thermostability of the bacteriocin produced by this strain were characterized. The growth curve, acid production capacity, and tolerance to simulated gastric fluid of the strain were studied. [Results] A strain named *Leuconostoc mesenteroides* WJY-6 was isolated from pumpkin in Yanji. It secreted a bacteriocin showing inhibitory effects on *S. aureus* from different sources. The bacteriocin exhibited a good anti-enzymolysis property and maintained over 35% of the inhibitory effect after being treated at 100 °C and 121 °C. The bacteriocin showcased the strongest inhibitory activity at pH 3.0–5.0. The strain entered a stable growth phase after 18 h, with the pH dropping below 5.0 after 8 h, which steadily improved the inhibitory effect. The strain showed strong survival ability and proliferated actively in the simulated gastric fluid. [Conclusion] *L. mesenteroides* WJY-6 has a strong acid production ability and good tolerance to simulated gastric fluid. Moreover, it secretes a bacteriocin with excellent physical and chemical properties and inhibitory effect on *S. aureus*. The bacteriocin is expected to become a new alternative of antibiotics for the prevention and treatment of *S. aureus*.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; lactic acid bacteria; *Leuconostoc mesenteroides*; bacteriocins; biological characteristics

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是一种革兰氏阳性病原菌,属于葡萄球菌属(*Staphylococcus*),广泛存在于土壤、水、空气及食品中^[1]。近年来,畜禽粪便污染所引发的人畜

共患病传播与感染问题日益突显。研究发现,畜禽养殖过程中抗生素的广泛应用使得动物体内耐药菌株数量不断攀升。例如,众所周知的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant

Staphylococcus aureus, MRSA), 以及随后出现的耐万古霉素金黄色葡萄球菌 (vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*, VRSA)^[2], 这些耐药菌随着粪便和污水排放, 甚至被用作农用有机肥料, 使得携带耐药基因的菌株进入环境。抗药性基因可能通过“土壤-植物-动物-人”的食物链途径进入人体, 对人类健康产生严重影响^[3]。与金黄色葡萄球菌感染相关的疾病, 包括猪的急性、亚急性或慢性乳腺炎, 乳房脓肿病, 坏死性葡萄球菌皮炎; 在奶牛身上, 此类感染可导致乳房纤维化、脓肿发炎并形成坚实肿块, 从而引发轻度至重度乳腺炎; 在羊感染金黄色葡萄球菌后, 病原体可通过损伤或破裂的皮肤、黏膜、汗腺及毛囊等途径进入体内, 对消化系统造成严重损害, 一旦感染, 治疗效果甚微^[4]。现如今多重耐药菌株的出现已经产生了严重的临床后果, 给临床治疗带来极大困难。

乳酸菌作为生命健康发展的重要微生物, 能够通过多种途径维持肠道微生物稳态。它会在发酵过程中产生许多重要的生物活性化合物, 如肽、胞外多糖、细菌素、淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶和乳酸^[5]。乳酸菌产生一种能抑制或杀死其他微生物的肽或蛋白质, 这类物质称为乳酸菌素^[6]。这类物质多数具有广谱抗菌作用, 会抑制肠道腐败菌的生长和繁殖, 提高动物机体免疫力和抗病力等多种生物学功能^[7]。乳酸菌素对金黄色葡萄球菌、沙门氏菌(*Salmonella*)、志贺氏菌(*Shigella*)等有明显抑制作用, 是国内外公认的安全生物防腐剂^[8]。而肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)作为兼性厌氧的一类革兰氏阳性细菌, 是明串珠菌属的重要菌种, 具有良好的益生特性, 如降低肠道疾病发生率、增加有益菌群、增强机体免疫力等^[9]。肠膜明串珠菌能在胃肠道中存活并具有较高的生物活性, 在发酵乳、食品、保健品及动物饲料等方面具有良

好的应用前景^[10]。现有研究多聚焦于肠膜明串珠菌在现实生活中的应用, 鲜少有肠膜明串珠菌所产细菌素抑制不同源金黄色葡萄球菌的研究。因此, 本研究拟从采集的南瓜样品中分离出产细菌素的乳酸菌, 以金黄色葡萄球菌为指示菌, 进一步研究细菌素的生物学特性, 并对其潜在的益生特性进行分析, 旨在为防治金黄色葡萄球菌感染的相关疾病提供理论依据与应用价值^[11]。

1 材料与方法

1.1 样品

南瓜样本采集自通化梅河口市某市场; 金黄色葡萄球菌 P2 (牛源)、金黄色葡萄球菌 TXY-1 (猪源)、金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 由吉林农业科技学院动物科技学院动物微生物与免疫研究室保存。

1.2 主要试剂和仪器

胃蛋白酶、胰蛋白酶和蛋白酶 K, 北京酷来博科技有限公司; 菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 乳酸(分析纯), 国药集团化学试剂有限公司; 氢氧化钠(分析纯), 天津市永大化学试剂有限公司; 氯化钠溶液, 吉林省都邦药业股份有限公司; DNA 提取试剂盒, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; 恒温培养箱, Thermo 公司; 全自动高压灭菌锅, 博讯科技股份有限公司; PCR 仪, 上海皓庄仪器有限公司; 分光光度计, 艾本德股份公司; 旋转蒸发器, 上海鹰迪仪器设备有限公司; 微型离心机, 长沙东旺实验仪器有限公司; 台式离心机, 盐城市凯特实验仪器有限公司; 水浴锅, 湖南力辰仪器科技有限公司。

1.3 培养基

MRS 肉汤培养基、MRS 琼脂培养基和 MH

琼脂培养基购自青岛高科技工业园海博生物技术有限公司。

1.4 乳酸菌菌株的分离纯化

取南瓜置于 MRS 肉汤培养基中, 37 °C、120 r/min 振荡培养 24 h。取 MRS 肉汤培养基对菌液进行 10 倍系列稀释后均匀涂布于 MRS 琼脂培养基, 37 °C 恒温培养过夜。选取单菌落用平板划线法纯化后进行革兰氏染色, 油镜下观察菌体形态。挑取单菌落接种至 MRS 肉汤培养基中, 37 °C、120 r/min 摇床增殖培养 24 h 后于 -20 °C 保存备用。

1.5 菌株 WJY-6 的 16S rRNA 基因鉴定

利用 DNA 提取试剂盒提取菌株 WJY-6 的基因组, 采用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 对模板 DNA 进行 16S rRNA 基因片段的 PCR 扩增^[12]。PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳进行检测, 回收目标片段, 送生工生物工程(长春)股份有限公司进行测序。将测序结果与 NCBI 数据库比对, 选取与目标序列具有较高相似性的序列, 利用 MEGA 11^[13]构建系统发育树。

1.6 菌株 WJY-6 无菌发酵上清液的制备

依据文献[14-16]所述方法制备无菌发酵上清液。将菌株 WJY-6 以 0.5% 的接种量接于 200 mL MRS 肉汤培养基, 37 °C、120 r/min 振荡培养 24 h, 6 000 r/min 离心 15 min, 初步得到发酵上清液。经直径 50 mm、孔径 0.2 μm 的微孔过滤膜抽滤除菌, 进一步得到无菌发酵上清液。

1.7 菌株 WJY-6 发酵上清液抗菌效果测定

参考文献[17]采用牛津杯琼脂扩散法将金黄色葡萄球菌 ATCC 25923、金黄色葡萄球菌 P2 和金黄色葡萄球菌 TXY-1 分别涂布在 MH 固体培养基上, 平板内打孔(直径约为 8 mm)加入 200 μL 无菌发酵上清液, 室温静止, 37 °C 恒温

培养 18 h, 测抑菌圈直径。

1.8 排除有机酸的干扰

将纯化后的菌株在 MRS 肉汤培养基中培养 24 h, 依照 1.6 方法得到无菌发酵上清液, 用 1 mol/L 氢氧化钠和 1 mol/L 乳酸调节 pH 值为 4.0 的 MRS 肉汤培养基, 以未调节 pH 值的无菌发酵上清液作为对照, 进行有机酸排除试验^[15]。

1.9 排除过氧化氢的作用

取 1 mL 无菌发酵上清液于 1.5 mL EP 管中, 用适量的过氧化氢酶处理后, 37 °C 水浴 2 h。以未经处理的无菌发酵上清液为对照, 金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 为指示菌, 采用牛津杯琼脂扩散法验证上清液的抑菌效果。

1.10 菌株 WJY-6 细菌素生物学特性的测定

1.10.1 蛋白酶对细菌素的影响

取 5 管 1 mL 的无菌发酵上清液加入胃蛋白酶、胰蛋白酶、蛋白酶 K、木瓜蛋白酶和菠萝蛋白酶并分别调节 pH 值为 2.0、8.0、10.0、6.0、7.0, 使酶的终浓度为 1 mg/L^[18], 于 37 °C 水浴温育 4 h 后取出, 于 100 °C 沸水浴 10 min。以未加酶的无菌发酵上清液为对照组, 进行抑菌试验^[15]。

1.10.2 细菌素中抑菌物质的热稳定性测定

取 5 管 1 mL 的无菌发酵上清液分别于 40、60 和 80 °C 水浴 2 h; 100 °C 及 121 °C 分别加热 20 min 和 15 min, 以原无菌发酵上清液作为对照。抑菌试验方法见 1.7。

1.10.3 菌株 WJY-6 细菌素的 pH 稳定性测定

将菌株 WJY-6 的无菌发酵上清液 pH 值分别调节为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0, 于 37 °C 处理 4 h, 用未处理的无菌发酵上清液作为对照组, 进行牛津杯琼脂扩散试验, 观察抑菌直径。

1.11 菌株 WJY-6 的发酵特性

1.11.1 生长曲线的测定

将菌株 WJY-6 接种到 4 mL MRS 肉汤培养基中, 37 °C、120 r/min 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.5 时作为种子液, 其中留存 2 mL MRS 肉汤培养基

为空白对照。将种子液全部接种于 200 mL MRS 肉汤培养基中, 37 °C、120 r/min 摇床培养 36 h, 每隔 2 h 取 2 mL 菌液, 在 600 nm 波长处测定样品的光密度(*OD*)值。根据所得数据绘制菌株的生长曲线。

1.11.2 产酸能力的测定

将菌株 WJY-6 接种于 200 mL MRS 肉汤培养基中, 37 °C、120 r/min 摇床培养 24 h, 每隔 2 h 取样测 pH, 绘制菌株不同时期的 pH 曲线图。

1.11.3 WJY-6 细菌素抑菌曲线的测定

试验菌种子液接种于 200 mL MRS 肉汤培养基中, 37 °C、120 r/min 摇床发酵培养 36 h, 每隔 2 h 取发酵培养液 2 mL (共 18 管), 均进行 24 °C、12 000 r/min 离心 2 min, 取上清液, 测定其抑菌圈直径(mm), 指示菌为金黄色葡萄球菌 ATCC 25923。

1.12 菌株 WJY-6 模拟胃液耐受能力的测定

将菌株接种至 5 mL MRS 肉汤培养基中, 37 °C、120 r/min 振荡培养 24 h, 5 000 r/min 离心 15 min, 用 5 mL 无菌生理盐水对菌体进行重悬、振荡后作为原液备用; 取 0.5 mL 原液加入 4.5 mL pH 值为 2.0、2.5 和 3.0 的模拟胃液(0.2% NaCl、0.35% 胃蛋白酶)中, 于 37 °C 恒温培养 18 h, 测其溶液 *OD*₆₀₀ 值, 作为试验组。取原液 0.5 mL 加入 4.5 mL PBS 中, 37 °C 恒温培养 18 h, 测其培养液 *OD*₆₀₀ 值, 作为对照组。

1.13 数据分析

上述所有测得的数据均包含 3 次生物学重复, 以平均值形式呈现; 试验所得数据利用 Origin 2021 软件对试验结果进行统计分析。抑菌活性(%)=试验组抑菌圈/对照组抑菌圈×100; 生长率(%)=(试验组 *OD* 值 - 对照组 *OD* 值)/对照组 *OD* 值×100。

2 结果与分析

2.1 菌株形态学特征

菌株 WJY-6 在 MRS 固体培养基上菌落形态呈圆形或豆形, 表面光滑, 乳脂白色, 不产生任何色素的密集菌落(图 1A); 镜检为革兰氏阳性菌, 菌体呈球状, 聚集态出现, 有些成对或以短链排列(图 1B)。

2.2 16S rRNA 基因鉴定结果

筛选到的菌株 WJY-6 经测序后得到的序列进行 BLAST 比对, 发现菌株 WJY-6 与 *Leuconostoc mesenteroides* 相似性高达 99.24%。运用邻接法构建系统发育树, 结果表明菌株 WJY-6 与 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* strain CBA3607 (CP046062.1) 处于同一分支, 因此可以确定筛选出的菌株 WJY-6 为肠膜明串珠菌(图 2)。

2.3 菌株 WJY-6 细菌素的抗菌活性分析

2.3.1 菌株 WJY-6 细菌素粗提物的抑菌性能干扰因素排除

为了排除抑菌物质为有机酸和过氧化氢, 对 1.6 中的无菌发酵上清液进行了排酸和过氧化氢酶试验, 以金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 为指示菌, 发现菌株 WJY-6 发酵上清液具有较强的抑菌活

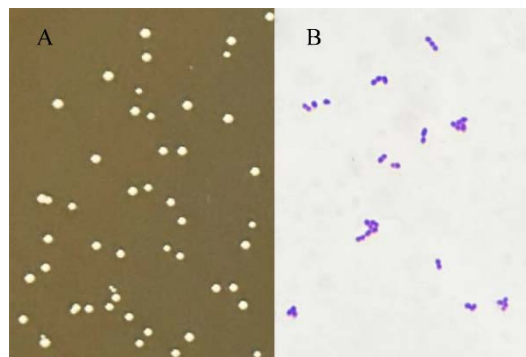


图 1 菌株 WJY-6 的菌落形态(A)和革兰氏染色镜检图(B)

Figure 1 Colony morphology (A) and Gram staining microscopy image (B) of strain WJY-6.

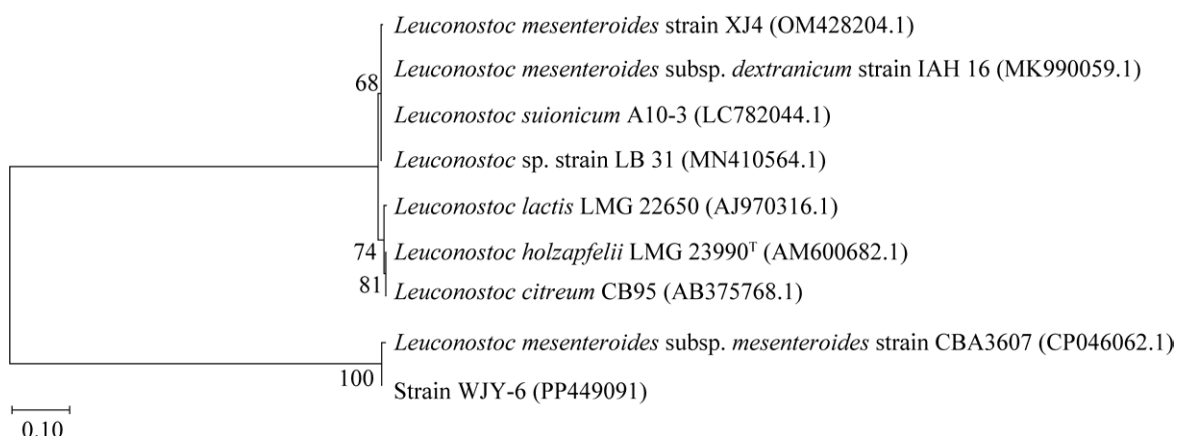


图2 菌株 WJY-6 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 括号中的序号代表 GenBank 登录号；分支点上的数字代表该分支的 bootstrap 值；左下角的距离标尺代表生物间差异数值的单位长度

Figure 2 Phylogenetic tree of strain WJY-6 constructed 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 distance scale in the lower left corner represents the unit length of the biological difference values.

性，而 pH 值为 4.0 的 MRS 肉汤培养基无抑菌活性，可推断抑菌活性物质并非酸类，而后发现加入了过氧化氢酶后抑菌活性无明显变化，由此说明菌株 WJY-6 所产细菌素的抗菌作用并非是过氧化氢产生。

2.3.2 菌株 WJY-6 细菌素的蛋白酶稳定性

菌株 WJY-6 细菌素经胃蛋白酶、胰蛋白酶、蛋白酶 K、木瓜蛋白酶和菠萝蛋白酶处理 4 h 后，胰蛋白酶与蛋白酶 K 令菌株 WJY-6 细菌素活性有较明显降低，而菌株 WJY-6 所产细菌素能极好抵御木瓜蛋白酶、胃蛋白酶和菠萝蛋白酶的水解，保持良好的抑菌活性。根据结果显示菌株 WJY-6 所产细菌素具有较强的蛋白酶稳定性，可初步判定为一种抗酶解细菌素(表 1)。

2.3.3 菌株 WJY-6 细菌素的 pH 稳定性

分别调整无菌发酵上清液 pH 并于 37 °C 条件下维持 4 h，采用牛津杯法分析其抑菌活性的变化。pH 梯度试验进行了大范围 pH 测定的抑菌活性试验，发现只有 3.0–5.0 时出现抑菌圈(表 1)。

2.3.4 菌株 WJY-6 细菌素的热稳定性

分别以不同温度对细菌素进行处理，分析其对上述金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 的抑菌圈直径影响，由表 1 可知，菌株 WJY-6 无菌发酵上清液中的抑菌物质对高温有较强的抵抗力，100 °C 处理 20 min，上清液对金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 依旧有良好的抑菌活性，抑菌圈直径在 17 mm 左右。表明菌株 WJY-6 发酵液物质具有极强的热稳定性，其发酵液中的抑菌物质适合需要高温处理的食品使用，有较高的研究和应用潜力。

2.4 菌株 WJY-6 的生长曲线、产酸特性及抑菌曲线

本试验测定了菌株 WJY-6 36 h 的生长变化情况，培养约 8 h 开始进入对数生长期，并于 18 h 后进入稳定期。该菌株的产酸能力强，在培养 4 h 时，pH 值下降到 5.5 左右，到 8 h 时，pH 下降到 5.0 以下，并且在此时菌株 WJY-6 的无菌发酵上清液开始具有抑菌活性，在进入生长稳定期 6 h 后抑菌活性基本稳定。菌株所产细菌素抑制作用在 26 h

表 1 各种酶、pH、温度对 WJY-6 细菌素抑菌活性的影响

Table 1 Effect of various enzymes, pH, and temperature on the antibacterial activity of WJY-6 bacteriocins

Item	Diameter of inhibition zone
Enzyme treatment	
Control group	++++
Trypsin	++
Pepsin	++++
Proteinase K	++
Pineapple protease	++++
Papain	++++
Acid and alkali treatment	
Control group	++++
3.0	++++
4.0	++++
5.0	+
6.0	-
7.0	-
Temperature disposing	
Control group (°C)	++++
40	++++
60	+++
80	++
100	++
121	+

++++: ≥ 25 mm; +++: 20–25 mm; ++: 15–19 mm; +: 9–14 mm; -: 无抑菌圈

++++: ≥ 25 mm; +++: 20–25 mm; ++: 15–19 mm; +: 9–14 mm; -: No inhibition circle.

达到最高水平, 32 h 后进入衰亡, 所以将 26 h 作为产细菌素 WJY-6 的最佳发酵时间(图 3)。

2.5 菌株 WJY-6 模拟胃液耐受能力

乳酸菌在动物胃肠道中增殖的瓶颈是胃液的低酸、胃蛋白酶对菌体的破坏作用。结果显示, 菌株 WJY-6 在不同 pH 的模拟胃液中均有一定的耐受能力, 其中试验组菌株在模拟胃液 (pH 3.0) 中处理 18 h 生长率较高(表 2), 说明该

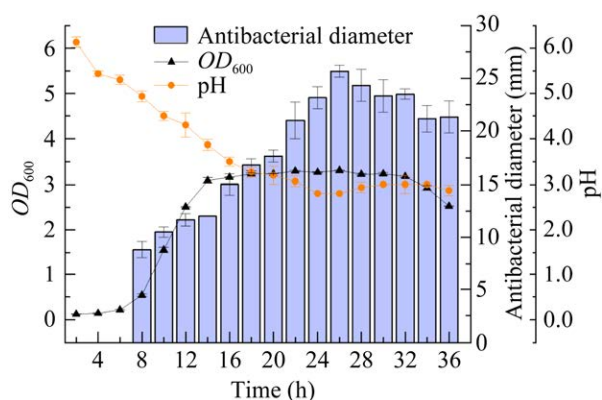


图 3 菌株 WJY-6 的生长曲线及抑菌曲线

Figure 3 Growth curve and antibacterial curve of strain WJY-6.

表 2 菌株 WJY-6 模拟胃液耐受能力的检测结果

Table 2 Detection results of simulated gastric acid tolerance of strain WJY-6

pH	OD ₆₀₀ of the control group	OD ₆₀₀ of the experimental group	Growth rate (%)
2.0	0.76	0.89	17.11
2.5	0.80	0.93	16.25
3.0	0.76	0.90	18.42

菌株不仅适应模拟胃液的环境, 还能利用该环境进行繁殖。此外, 菌株 WJY-6 还可以耐受不同 pH 值条件(2.0、2.5 和 3.0)下的胃液环境。

3 讨论

耐药性已成为全球性挑战, 因此寻求或研发新一代抗菌药物显得尤为关键^[19]。就金黄色葡萄球菌等机会性病原体而言, 轻则导致轻度感染, 重则危及生命。这明确指出了对抗生素替代品的迫切需求^[20]。细菌素(抗菌肽)代表了一种潜在替代疗法, 通常无毒且靶谱相对较窄, 对许多共生体和大部分哺乳动物细胞无影响^[21]。多项涉及细菌素(如乳酸链球菌素、表皮霉素、默西酸素和溶葡萄球菌素等)的研究表明, 它们在动物模型中可消除或治疗多种金黄色葡萄球菌感

染,从而保护家畜免受病原体侵害^[14]。从医学角度讲,细菌素具有替代抗生素作为抗菌药物的潜力。彭书东等^[22]提出的包埋技术有助于增强细菌素的抗菌效果,从而有效解决现有细菌素抗菌谱狭窄和抗菌效果不稳定等问题;李平兰等^[23]认为我国针对乳酸菌细菌素的研究仍需深入,其在市场展现广泛的应用潜力。

本实验主要以肠膜明串珠菌 WJY-6 为研究对象,其分泌的肠膜明串珠菌素在抑制病原菌和生物防治方面具有显著的优点。de Paula 等^[24]表示肠膜明串珠菌的一些菌株具有分泌细菌素的能力,其中绝大多数属于 IIa 类,并表现出对李斯特菌(*Listeria* spp.)的抑制作用。Daba 等^[25]从干酪中分离出一株肠膜明串珠菌 UL5,经研究表明此株菌产生的细菌素对单核球增多性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)具有抑制作用,并且能够与其他益生菌共存。Hastings 等^[26]和 Wulijideligen 等^[27]均证实肠膜明串珠菌产生的细菌素抑制了李斯特菌生长。然而,关于肠膜明串珠菌素在防治不同源金黄色葡萄球菌感染方面的应用报道较为匮乏。因此,研究并实施针对金黄色葡萄球菌感染的有效预防措施具有重要意义。

本研究根据形态特征,结合 16S rRNA 基因序列分析鉴定菌株 WJY-6 为肠膜明串珠菌。经抗菌效果测定,WJY-6 所产细菌素对不同来源的金黄色葡萄球菌具有显著抑制效果,并能够在 121 °C 的高温下存活,在 pH 3.0–5.0 的强酸环境下,其抑菌效果尤为显著。另外,菌株 WJY-6 具备卓越的耐酸特性,经过 18 h 的模拟胃液处理,生长率均维持在 17% 左右,极为稳定,这一结果与孙胜军等^[28]对菌株 SI03、CC04 和 DD05 的模拟胃液试验结果存在差异,据此可推断 WJY-6 具备在胃液环境下存活的潜力。此外,在生长曲线测定中,菌株 WJY-6 具备较强的产

酸能力。菌株培养进入 12 h 时,pH 值已下降到 4.0 以下,这与孙昊等^[29]对 8 株不同乳酸菌产酸测定试验结果基本一致。然而,该菌株在 37 °C 条件下培养 24–32 h 所产的细菌素对金黄色葡萄球菌表现出最强的抑菌活性,与孙庆申等^[30]对植物乳杆菌 L3 抑菌动力学曲线研究结果不同。实验数据表明,肠膜明串珠菌所产抗菌活性产物可作用于动物体内,初步判定菌株 WJY-6 分泌的物质是一种新型抗不同动物源金黄色葡萄球菌的细菌素。有望成为替代抗生素治疗动物源细菌感染的新型药物。后续还可对该细菌素的毒力因子进行研究,为防治金黄色葡萄球菌病奠定基础。

4 结论

本研究首次揭示了肠膜明串珠菌 WJY-6 所产细菌素对不同源金黄色葡萄球菌的抑菌活性,采用牛津杯琼脂扩散法测定出细菌素具有良好的抗酶解性、耐高温性以及较宽泛的酸碱适应性。在此基础上,我们通过观察 WJY-6 的生长特性和检测其模拟胃液耐受能力挖掘出该菌株具有做益生菌的潜力。总体而言,这项研究为治疗金黄色葡萄球菌感染提供了新的抗菌来源。

REFERENCES

- [1] 张志宏,杨娇,张海鹏,钟佑宏,王鹏.一株金黄色葡萄球菌噬菌体的裂解谱特异性和分子分类研究[J].微生物学报,2021,61(7): 2043-2052.
ZHANG ZH, YANG J, ZHANG HP, ZHONG YH, WANG P. Host range and molecular classification of a *Staphylococcus aureus* bacteriophage[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(7): 2043-2052 (in Chinese).
- [2] FRANCOZ D, WELLEMANS V, DUPRÉ JP, ROY JP, LABELLE F, LACASSE P, DUFOUR S. Invited review: a systematic review and qualitative analysis of treatments other than conventional antimicrobials for

- clinical mastitis in dairy cows[J]. Journal of Dairy Science, 2017, 100(10): 7751-7770.
- [3] 宁自林, 储卫华. 畜禽养殖环境金黄色葡萄球菌耐药性及毒力因子分析[J]. 湖北畜牧兽医, 2017, 38(12): 7-9.
- NING ZL, CHU WH. Analysis of drug resistance and virulence factors of *Staphylococcus aureus* in the livestock farming environment[J]. Hubei Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2017, 38(12): 7-9 (in Chinese).
- [4] SHARUN K, DHAMA K, TIWARI R, GUGJOO MB, YATOO MI, PATEL SK, PATHAK M, KARTHIK K, KHURANA SK, SINGH R, PUVVALA B, Amarpal, SINGH R, SINGH KP, CHAICUMPA W. Advances in therapeutic and management approaches of bovine mastitis: a comprehensive review[J]. The Veterinary Quarterly, 2021, 41(1): 107-136.
- [5] PRADHAN P, TAMANG J P. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally prepared dry starters of the Eastern Himalayas[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2021, 37: 1-13.
- [6] COTTER PD, ROSS RP, HILL C. Bacteriocins: a viable alternative to antibiotics?[J]. Nature Reviews Microbiology, 2013, 11: 95-105.
- [7] JAYANEGARA A, MAKAR HPS, BECKER K. Evaluation of lacticin addition on gas production kinetics and rumen methanogenesis *in vitro*[J]. Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture, 2014, 39(1): 30-36.
- [8] GEBRU YA, SBHATU DB. Isolation and characterization of probiotic LAB from kimchi and spontaneously fermented teff (*Eragrostis tef* (zucc.) trotter) batter: their effects on phenolic content of teff during fermentation[J]. BioMed Research International, 2020, 2020: 4014969.
- [9] SU X, ZHAO LX, LIU Q, LI WC, MENGHE B, LIU WJ. Genome and functional diversity of *Leuconostoc mesenteroides* from different habitats and geographic locations[J]. Food Bioscience, 2023, 55: 102834.
- [10] GU MK, NGUYEN HT, CHO JH, SUH JW, CHENG JH. Characterization of *Leuconostoc mesenteroides* MJM60376 as an oral probiotic and its antibiofilm activity[J]. Molecular Oral Microbiology, 2023, 38(2): 145-157.
- [11] O'SHEA RS, DASARATHY S, McCULLOUGH AJ, Practice Guideline Committee of the American Association for the Study of Liver Diseases, Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. Alcoholic liver disease[J]. Hepatology, 2010, 51(1): 307-328.
- [12] 于文慧, 涂会鑫, 张涵, 华文静, 董文龙. 抗多杀性巴氏杆菌植物乳杆菌细菌素的生物学特性研究[J]. 中国微生态学杂志, 2023, 35(2): 152-155, 160.
- YU WH, TU HX, ZHUANG H, HUA WJ, DONG WL. Biological characterization of bacteriocins in *Lactobacillus plantarum* against *Pasteurella multocida*[J]. Chinese Journal of Microecology, 2023, 35(2): 152-155, 160 (in Chinese).
- [13] TAMURA K, STECHER G, KUMAR S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11[J]. Molecular Biology and Evolution, 2021, 38(7): 3022-3027.
- [14] 黄奕雯, 刘悦欣, 陶政, 张学良, 王萍. 鸡源乳酸菌细菌素的分离筛选及鉴定[J]. 中国兽医杂志, 2017, 53(9): 23-27.
- HUANG YW, LIU YX, TAO Z, ZHANG XL, WANG P. Isolation and identification of bacteriocin producing *Lactobacillus* from chicken[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2017, 53(9): 23-27 (in Chinese).
- [15] XU C, FU YY, LIU F, LIU ZJ, MA JG, JIANG R, SONG CN, JIANG ZM, HOU JC. Purification and antimicrobial mechanism of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus rhamnosus* 1.0320[J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 137: 110338.
- [16] 罗宝龙, 魏军林, 黄丽丽, 张艳, 倪永清. 猪源产细菌素芽孢杆菌的筛选及抑菌特性[J]. 微生物学通报, 2018, 45(6): 1342-1349.
- LUO BL, WEI JL, HUANG LL, ZHANG Y, NI YQ. Selection and antibacterial activity of bacteriocin-producing Bacilli from swine[J]. Microbiology China, 2018, 45(6): 1342-1349 (in Chinese).
- [17] 谢芳, 杨承剑, 唐艳, 农皓如, 曾庆坤. 水牛乳中乳酸菌的分离及其抑菌特性研究[J]. 食品工业, 2016, 37(12): 172-175.
- XIE F, YANG CJ, TANG Y, NONG HR, ZENG QK. Isolation lactic acid bacteria and study on the antibacterial activity in the buffalo milk[J]. The Food Industry, 2016, 37(12): 172-175 (in Chinese).
- [18] ABANOZ HS, KUNDUHOGLU B. Antimicrobial activity of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* KT11 against some pathogens and antibiotic-resistant bacteria[J]. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 2018, 38(5): 1064-1079.
- [19] MASIP J, GERMÀ LLUCH JR. Alcohol, health and cardiovascular disease[J]. Revista Clinica Espanola, 2021, 221(6): 359-368.

- [20] 赵晓彤, 周铁忠, 李欣南. 我国动物源细菌耐药性监测现状与耐药性控制策略分析[J]. 现代畜牧兽医, 2012(12): 45-48.
- ZHAO XT, ZHOU TZ, LI XN. Analysis of the current situation of bacterial drug resistance monitoring and drug resistance control strategy of animal origin in China[J]. Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2012(12): 45-48 (in Chinese).
- [21] KLAENHAMMER TR. Bacteriocins of lactic acid bacteria[J]. Biochimie, 1988, 70(3): 337-349.
- [22] 彭书东, 李键, 刘士健, 张玉, 王洪伟, 赵欣, 索化夷. 乳酸菌细菌素生物合成机制、抑菌机制及应用研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(6): 236-242.
- PENG SD, LI J, LIU SJ, ZHANG Y, WANG HW, ZHAO X, SUO HY. Research progress on biosynthesis, antibacterial mechanism and application of lactic acid bacteria bacteriocin[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(6): 236-242 (in Chinese).
- [23] 李平兰, 张麓, 江汉湖. 乳酸菌细菌素研究进展[J]. 微生物学通报, 1998, 25(5): 295-298.
- LI PL, ZHANG C, JIANG HH. Research progress of bacteriocin in lactic acid bacteria[J]. Microbiology China, 1998, 25(5): 295-298 (in Chinese).
- [24] de PAULA AT, JERONYMO-CENEVIVA AB, TODOROV SD, PENNA ALB. The two faces of *Leuconostoc mesenteroides* in food systems[J]. Food Reviews International, 2015, 31(2): 147-171.
- [25] DABA H, PANDIAN S, GOSSELIN JF, SIMARD RE, HUANG J, LACROIX C. Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57(12): 3450-3455.
- [26] HASTINGS JW, STILES ME, von HOLY A. Bacteriocins of leuconostocs isolated from meat[J]. International Journal of Food Microbiology, 1994, 24(1-2): 75-81.
- [27] WULIJIDELIGEN AT, HARA K, ARAKAWA K, NAKANO H, MIYAMOTO T. Production of bacteriocin by *Leuconostoc mesenteroides* 406 isolated from Mongolian fermented mare's milk, airag[J]. Animal Science Journal, 2012, 83(10): 704-711.
- [28] 孙胜军, 张棒棒, 黄仪, 张雨蒙, 孟欣欣, 陈秋鹏, 姬权力, 李思强, 李恩中. 鸡肠源益生乳酸菌的分离鉴定、益生效果及其发酵条件优化研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2021(21): 95-101, 155.
- SUN SJ, ZHANG BB, HUANG Y, ZHANG YM, MENG XX, CHEN QP, JI QL, LI SQ, LI EZ. Separation, identification, probiotic effects and fermentation conditions optimization of probiotic *Lactobacillus* from chicken intestine[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2021(21): 95-101, 155 (in Chinese).
- [29] 孙昊, 唐海峰, 刘欢, 崔子杭, 盘赛昆, 侯晓月, 杨杰. 卤水中耐酸耐盐产细菌素乳酸菌的筛选[J]. 中国饲料, 2023(19): 37-44.
- SUN H, TANG HF, LIU H, CUI ZH, PAN SK, HOU XY, YANG J. Screening of acid and salt tolerant bacteriocin-producing lactic acid bacteria in brine[J]. China Feed, 2023(19): 37-44 (in Chinese).
- [30] 孙庆申, 王钰涵, 韩德权, 张炎, 韩晓云. 酸菜中具有抑菌活性乳酸菌的分离鉴定及其产细菌素特性[J]. 食品科学技术学报, 2022, 40(4): 64-73.
- SUN QS, WANG YH, HAN DQ, ZHANG Y, HAN XY. Isolation and identification of lactic acid bacteria with antibacterial activity in pickles and their bacteriocin production characteristics[J]. Journal of Food Science and Technology, 2022, 40(4): 64-73 (in Chinese).