



研究报告

马尾松毛虫肠道产细菌素细菌的筛选及抑菌特性

江宇航^{1,2} 李宏伟^{1,2} 杨晓洁^{1,2} 林连兵^{1,2} 张麒麟^{*1,2}

1 昆明理工大学生命科学与技术学院 云南 昆明 650500

2 云南省高校饲用抗生素替代技术工程研究中心 云南 昆明 650500

摘要:【背景】细菌素是一类由细菌产生的抗菌肽活性物质,对多种致病菌有抑制和杀灭作用。昆虫是世界上种类最多、肠道菌群资源最为丰富且多样的动物类群之一。昆虫肠道很可能蕴含着丰富的产细菌素菌种资源。【目的】以马尾松毛虫(*Dendrolimus punctatus*)幼虫为研究材料,对其肠道细菌进行分离、培养和鉴定,获得对典型致病菌有明显抑制作用的产细菌素细菌,推测其抑菌物质,并对产高活性细菌素细菌的抑菌特性进行研究,进一步丰富产细菌素细菌的资源。【方法】采用传统细菌纯培养方法分离细菌,利用牛津杯法检测抑菌物质活性,结合菌落形态特征及 16S rRNA 基因序列确定产细菌素细菌种类;进一步排除有机酸和过氧化氢的干扰,初步证实抑菌物质有类蛋白性质。

【结果】从马尾松毛虫肠道中筛选得到 13 株产细菌素细菌,隶属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)和肠杆菌属(*Enterobacter*)。抑菌实验结果显示:13 株产细菌素细菌对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)两种重要病原指示菌有一定程度的抑制效果,尤其是解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) MW-1 产生的细菌素经不同温度和酸碱度处理后仍保持较好的抑菌活性,而且经单因素方差分析发现在 pH 7.0 和 37 °C 时抑菌活性最佳。【结论】马尾松毛虫肠道内存在多种产细菌素细菌且对重要病原菌有抑制作用。菌株 MW-1 细菌素具有高效的病原菌抑菌能力,所产细菌素对热和酸碱处理稳定性较好,显示了替代抗生素的应用潜力。

关键词: 马尾松毛虫, 产细菌素细菌, 菌种鉴定, 抑菌活性, 类蛋白细菌素, 解淀粉芽孢杆菌, 细菌素稳定性

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31960286, 31760042); Yunnan Provincial Fundamental Research Projects (202001AU070076)

***Corresponding author:** E-mail: zhangql@kust.edu.cn

Received: 20-02-2020; **Accepted:** 09-04-2020; **Published online:** 28-05-2020

基金项目: 国家自然科学基金(31960286, 31760042); 云南省基础研究专项(202001AU070076)

***通信作者:** E-mail: zhangql@kust.edu.cn

收稿日期: 2020-02-20; **接受日期:** 2020-04-09; **网络首发日期:** 2020-05-28

Screening and antibacterial activity of bacteriocin-producing bacteria in intestine of *Dendrolimus punctatus*

JIANG Yuhang^{1,2} LI Hongwei^{1,2} YANG Xiaojie^{1,2} LIN Lianbing^{1,2} ZHANG Qilin^{*1,2}

1 Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan 650500, China

2 Engineering Research Center for Replacement Technology of Feed Antibiotics of Yunnan College, Kunming, Yunnan 650500, China

Abstract: [Background] Bacteriocin is a group of antibacterial-peptide substance produced by bacteria, with an inhibition and killing effect on various pathogenic bacteria. Insect, as the most abundant animal groups, is one of animals containing the most abundant and diverse intestinal microbial community in the world. Insect intestines may contain a rich bacteriocin-producing bacteria resource. [Objective] Sampling *Dendrolimus punctatus* larvae as experimental materials, its intestinal bacteria were isolated, and these bacteria were further cultured and identified. Bacteriostatic bacteria with obvious inhibitory effect on typical pathogens were obtained. Bacteriostatic substance was preliminarily speculated, and bacteriocin-producing bacteria with high bacteriostatic activity were investigated to further enrich resources of the bacteriocin-producing bacteria. [Methods] The bacteria were isolated by traditional-pure culture method, activity of the bacteriostatic substance was detected by using Oxford cup method, and bacteriocin-producing species were determined by combining morphological characteristics and 16S rRNA gene sequences of colony; interference of organic acid and hydrogen peroxide was further eliminated, and the bacteriostatic substance was preliminarily demonstrated with protein-like properties. [Results] Thirteen strains of the bacteriocin-producing bacteria were screened from intestine of the *D. punctatus* larvae, which belong to genera *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Psychrobacter* and *Enterobacter*. Results of bacteriostatic experiments showed that these 13 strains have a certain degree of inhibitory effects on two species of typically pathogenic indicator bacteria, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. In particular, bacteriocin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* MW-1 maintained a good antibacterial activity after treating with different temperature and pH conditions, and an optimum bacteriostatic activity was obtained under pH 7.0 and 37 °C. [Conclusion] Many species of the bacteriocins-producing bacteria in the intestine of the *D. punctatus* larvae present antibacterial effects on important pathogens. The strain MW-1 with high bacteriostatic activity for pathogen shows potential to replace antibiotic, bacteriocin of which exhibited a good stability under heat, acids and alkaline treatments.

Keywords: *Dendrolimus punctatus*, bacteriocin-producing bacteria, identification of bacteria species, antibacterial activity, protein-like bacteriocin, *Bacillus amyloliquefaciens*, bacteriocin stability

细菌对抗生素的耐药性是全世界健康领域急需解决的主要问题之一^[1-2], 因此, 寻找具有广泛来源、安全高效、可广泛应用等特点的新型抗生素替代品迫在眉睫。细菌素是细菌在生长代谢过程中产生的一类天然大分子蛋白或小分子短肽, 对多种致病性细菌有明显的抑制或杀灭作用, 同时具有安全、高效、无残留等多重优势^[3]。随着人们的深入了解, 细菌素受到了广泛的关注^[4]。然而, 已有的产细菌素细菌存在菌种资源有限、抑菌特

性差、抑菌适用条件较单一等问题^[5-6]。目前大多数研究仅关注乳杆菌属(*Lactobacillus*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)的产细菌素细菌, 对于其他类群的产细菌素细菌关注较少^[7-8]。有研究表明, 葡萄球菌属(*Staphylococcus*)^[9]、肠球菌属(*Enterococcus*)^[10]等多个属的细菌也能产生高活性的细菌素, 具有一定的应用潜能, 但相关研究还较为缺乏^[11]。此外, 分离获得的产细菌素细菌主要是从鸡^[12]、牦牛^[13]等脊椎动物生活的环境与肠道中获得, 极少

有人关注其他动物类群肠道中的产细菌素细菌资源。对产细菌素细菌类群及其来源范围关注的局限性,阻碍了人们对产细菌素细菌资源的挖掘和认识。

昆虫是地球上分布最广、环境适应能力最强以及物种数目最多的动物类群^[14-15]。许多昆虫肠道中具有与其他动物类群相似或独特的肠道菌群。此外,昆虫作为无脊椎动物,不具备完善的由B细胞和T细胞介导的获得性免疫系统,使得昆虫更易遭到致病性微生物的侵害^[16]。研究发现,昆虫,尤其是对环境有极好适应性的重大农业和林业害虫,其自身和肠道内细菌能分泌某些免疫物质或抗菌肽蛋白,有效地帮助昆虫抵抗病毒、致病性细菌和真菌的入侵^[17]。可见,昆虫肠道中具有丰富的益生菌资源,很可能包含多种产细菌素的细菌种类。因此,本文以我国秦岭至淮河以南各省广泛分布的历史性森林害虫马尾松毛虫(*Dendrolimus punctatus*) (鳞翅目枯叶蛾科松毛虫属,又名毛辣虫)幼虫为实验材料,筛选其肠道中具有产细菌素能力的细菌,对其抑菌效果进行评价,初步推断细菌素成分,并探索部分抑菌活性较强菌种其细菌素的最佳抑菌条件,以期进一步丰富产细菌素细菌资源,也为后续挖掘和深入研究昆虫肠道内产细菌素细菌资源提供有价值的参考信息。

1 材料与方法

1.1 菌株

病原指示菌株:大肠杆菌(*Escherichia coli*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)均由昆明理工大学高校饲用抗生素替代技术工程研究中心提供,试验前利用无菌新鲜LB液体培养基将两种指示菌浓度调整为 1.0×10^8 CFU/mL备用。

1.2 主要试剂和仪器及培养基

盐酸、75%乙醇、胃蛋白酶、氢氧化钠、胰蛋白酶、结晶紫、蛋白酶K、碘液和过氧化氢酶,上海源叶生物科技有限公司。细菌基因组DNA提取

试剂盒、PCR试剂和引物,生工生物工程(上海)股份有限公司。

酸碱度pH计,雷磁-上海仪电科学仪器有限公司;台式高速离心机,Eppendorf公司;体式显微镜,奥林巴斯股份有限公司;落地式超净工作台,上海苏坤实业有限公司;恒温培养箱,三洋电器股份有限公司;恒温摇床,上海捷呈实验仪器有限公司;超低温冰箱,赛默飞世尔科技有限公司。

LB 营养培养基^[12] 25.0 g/L,乳酸细菌培养基(Lactic Acid Bacteria Culture Medium, MRS)^[3] 41.5 g/L,牛肉膏蛋白胨培养基(Beef Extract Peptone Medium, NA)^[18] 18.0 g/L,哥伦比亚血琼脂培养基(Columbia Blood Agar Medium, CA)^[18] 39.0 g/L,上海汉尼生物技术有限公司。

1.3 产细菌素菌株的分离纯化

供试虫源于2019年7月采自贵州省天柱县,4-5龄健康幼虫。经*cox1*分子标记进一步确认其种名后,于超净工作台上利用无菌水对50头马尾松毛虫幼虫体表进行冲洗3次,放置于装有75%乙醇的无菌烧杯中浸泡2 min进行体表消毒,再利用无菌水冲洗3次。解剖镜下迅速收集肠道,放置于装有600 μ L无菌水的1.5 mL已灭菌EP管中,用研磨棒充分研磨匀浆,无菌水补齐至1 mL。迅速利用无菌水梯度稀释至 10^{-1} 、 10^{-3} 、 10^{-5} 、 10^{-7} 这4个梯度,取各梯度稀释液100 μ L,均匀涂布于LB、NA、MRS、CA这4种培养基上,设置3个重复。涂布后的平板置于37 $^{\circ}$ C恒温培养24 h后,利用无菌接种环挑取单菌落于平板上划线,第一轮初步纯化后,再照此重复3次进一步纯化,共计纯化4次后获得最终纯培养菌株。由于所分离和培养菌株分类地位及最适培养温度未知,因此根据文献[19]选择37 $^{\circ}$ C作为分离、培养菌株和完成后续试验的温度条件。最后,将单菌落根据表型特征进行初步鉴定并编号,置于装液量为5 mL的无菌EP管中,于37 $^{\circ}$ C、150 r/min恒温摇床培养12 h,

在 50% 的甘油中于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温保存。

1.4 产细菌素细菌的无细胞培养液(无菌发酵液)的制备

将获得的单菌落培养液以 1% 的接种量接种于装液量为 200 mL 的无菌锥形瓶中, 参照以往类似研究^[12,18-19], 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 恒温摇床培养 24 h, 利用对应细菌筛选液体培养基将其菌液稀释至 1.0×10^6 CFU/mL, 取稀释液 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min, 弃沉淀、收集上清。通过 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 的微孔滤膜去除菌体细胞, 得到不同菌株的无细胞培养液(无菌体发酵液), 密封放置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

1.5 产细菌素菌株的筛选

采用牛津杯双层平板法筛选, 对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌 2 种病原指示菌株有拮抗作用的产细菌素细菌进行初选。以 LB 固体培养基和 100 μL 指示菌与 4 mL LB 半固体培养基的混合液配制成 LB 双层平板, 用无菌镊子夹取直径 8.0 mm 牛津杯水平放置于 LB 双层平板上, 吸取各菌株无细胞培养液 200 μL 加入牛津杯中, 于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温冰箱中静置 3–4 h, 使其充分扩散后, 再于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 12 h, 观察有无透明抑菌圈。用游标卡尺准确测量并记录抑菌圈直径, 具有抑菌效果的菌株确定为产细菌素细菌, 进行下游实验。以等量的各菌株对应高温灭活的无细胞培养液作为对照(200 μL)。然后, 对初选获得的产细菌素细菌再进行 3 次独立重复实验, 以进一步通过复选确认其抑菌效果。

1.6 产细菌素细菌的菌种鉴定

1.6.1 形态学鉴定

将筛选获得的各产细菌素细菌单菌落, 利用肉眼初步观察菌落表观形态。挑取单菌落均匀涂布于载玻片上, 革兰氏染色后, 置于 40 倍显微镜物镜下观察其显微形态, 初步确定各产细菌素细菌的分类地位。

1.6.2 分子鉴定

按细菌基因组 DNA 提取试剂盒的操作步骤,

提取各产细菌素细菌新鲜培养液的 DNA。以提取获得的细菌基因组 DNA 为模板, 选择 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3')两条通用引物对 16S rRNA 基因序列进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(25 μL): 2×Mix 12.5 μL , DNA 模板(50 ng/ μL) 2 μL , 正、反向引物(5 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μL , ddH₂O 补足 25 μL 。PCR 反应条件: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $52\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 50 s, 30 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 扩增产物经 1.5% 的琼脂糖电泳检测后, 送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。测序结果提交至 GenBank 数据库, 采用 BLAST 在线服务器与细菌数据库进行比对后, 选取得分最高、序列一致性在 99% 以上的已知细菌种类确定为目标物种, 确定各产细菌素细菌的种类。

1.7 抑菌物质确定

1.7.1 有机酸和过氧化氢的排除

为了排除有机酸的干扰, 通过 pH 计测定各产细菌素细菌无细胞培养液的 pH 值, 选择对应最低 pH 值相同的乳酸和乙酸 2 种有机酸溶液, 以抑菌拮抗作用较好的指示菌为抑制对象, 分别观察 2 种酸是否具有抑菌效果。实验以未添加酸的无细胞培养液为对照。实验独立重复 3 次, 记录分析抑菌圈直径, 判断有机酸是否有抑菌作用。

为排除过氧化氢的干扰, 首先将各产细菌素细菌的无细胞培养液上清 pH 均调至 7.0, 加入终浓度为 0.5 mg/mL 的过氧化氢酶, 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴处理 2 h, 以未加过氧化氢酶的无细胞培养液为对照。实验独立重复 3 次。利用牛津杯双层平板法, 以抑菌拮抗作用较好的指示菌为抑制对象进行抑菌试验, 记录分析抑菌圈直径, 判断过氧化氢是否产生抑菌作用。

1.7.2 蛋白类抑菌物质的确定

为验证各产细菌素菌株所产生的细菌素为类蛋白, 分别向各产细菌素菌株的无细胞培养液上清中添加蛋白酶 K、胃蛋白酶和胰蛋白酶, 使其终

浓度为 1 mg/mL, 于 37 °C 恒温水浴 2 h 后, 再置于 80 °C 恒温水浴 15 min, 使蛋白酶失活。以未处理的无细胞培养液为对照, 设置 3 组平行。将各产细菌素菌株进行病原指示菌的抑菌试验, 记录分析抑菌圈直径, 判断抑菌活性物质是否有类蛋白性质, 实验独立重复 3 次。

1.8 细菌素的热、酸碱稳定性测定

将抑菌活性最佳菌株的发酵上清液分别按以下处理进行细菌素粗蛋白液的热、酸碱稳定性测定: (1) 37、50、60、70、80、90、100 °C 处理 30 min, 冷却至室温; (2) 以 1 mol/L 的 HCl 或 NaOH 溶液调节 pH 为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0, 37 °C 温育 24 h 后, 调回 pH 6.5。采用牛津杯法对病原指示菌进行抑菌试验, 以经相同处理的高温灭活无细胞培养液为对照, 同时进行单因素方差分析及多重比较, 每组设置 3 个重复。

1.9 数据分析

所有测得的数据均包含 3 次生物学重复, 以平均值±标准差(SD)方式呈现。利用 Microsoft Excel 2007 和 IBM SPSS 22.0 统计软件分别对数据进行整理分析。数据对间显著性检验利用 *t* 检验(Student's *t* Test)进行; 采用 One-Way ANOVA 进行单因素方差分析和最小显著差异法(Least-Significant Difference, LSD)测验不同 pH 和温度处理下细菌素活力间多重比较的差异显著性。显著性水平阈值 $P=0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离

依据菌落大小、颜色、形状等表观特征, 从 50 份样品中共分离获得 168 株纯培养物, 其中 LB 培养基上 66 株、NA 培养基上 32 株、MRS 培养基上 25 株、CA 培养基上 45 株。大部分单菌落形状呈圆形、椭圆形, 部分呈饼状; 菌落颜色大部分呈乳白色、白色, 少部分呈黄色、淡黄色; 有的单菌落在发酵过程中还可形成菌膜, 在振荡摇匀后呈

絮状悬浮于试管内。

2.2 产细菌素菌株的筛选

初筛发现有 13 株菌对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌 2 种指示菌有明显的抑菌作用(表 1)。抑菌结果显示: 在各菌株对照组抑菌圈大小基本一致、无抑菌圈的情况下, 所有 13 个菌株对金黄色葡萄球菌的抑菌圈范围在 11.35±0.21 mm (MW-8)–24.26±0.49 mm (MW-1)之间; 对大肠杆菌的抑菌圈范围在 10.72±0.14 mm (MW-63)–22.31±0.58 mm (MW-1)之间, 其中 MW-1 对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌作用均最佳, 因此选该菌株为后续主要研究对象。此外, 13 株菌中有 10 株产生的细菌素对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径比大肠杆菌的抑菌圈直径大, 对金黄色葡萄球菌具有更好的抑菌效果, 因此选择金黄色葡萄球菌为后续研究的病原指示菌。除 MW-1 外, 与对照相比, MW-2、MW-4 和 MW-26 这 3 株芽孢杆菌属细菌对 2 种指示菌也有极明显的抑制作用($P<0.01$), 尤其对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径均在 20 mm 以上, 排名第 2–4 位。MW-8 对大肠杆菌的抑菌效果也极佳, 仅次于 MW-1, 可达 21.62±0.36 mm。相反, MW-32、MW-35、MW-60、MW-63、MW-69 和 MW-79 这 6 个菌株抑菌活性相对较弱, 但与对照相比也存在显著差异($P<0.05$), 透明抑菌圈极为明显。

2.3 产细菌素菌株的鉴定

2.3.1 形态学鉴定

对 13 株产细菌素细菌革兰氏染色后发现: MW-1、MW-2、MW-4 和 MW-26 这 4 株菌为革兰氏阳性菌, 菌落直径较大, 菌落边缘不规则, 均有芽孢产生; MW-32、MW-35、MW-60、MW-69、MW-63 和 MW-79 这 6 株菌为革兰氏阳性菌, 菌落呈球状, 显微形态观察到各细胞之间呈葡萄串状排列; MW-3 和 MW-7 这 2 株菌菌落颜色呈黄色, 为革兰氏阴性菌, 显微形态观察到细胞呈直杆状; MW-8 同属革兰氏阴性菌, 菌落呈白色, 显微观察到细胞呈球杆状, 无鞭毛、无芽孢。部分

代表性菌株的菌落形态见图 1。最后，根据《常见细菌系统鉴定手册》^[20]初步判定，13 株菌中包含葡萄球菌属、泛菌属和芽孢杆菌属等多个种属的细菌，具体描述见表 2。

2.3.2 分子鉴定

将 13 株产细菌素菌株的 16S rRNA 基因序列提交到 NCBI，通过在线 BLAST 工具在 GenBank 数据库中与所有已收录的细菌 16S rRNA 基因序列进行相似性比较，选取相似性在 99%以上且比对得分最高的已知细菌种类确定目标物种。结果显示，13 株产细菌素菌株中有 4 株为芽孢杆菌属中的解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)、纺锤形赖氨酸芽孢杆菌(*Lysinibacillus fusiformis*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)；6 株为葡萄球菌属中的表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)、华纳氏葡萄球菌(*Staphylococcus warneri*)和巴氏葡萄球菌(*Staphylococcus pasteurii*)；2 株为肠杆菌属(*Enterobacter*)中的聚团肠杆菌(*Enterobacter agglomerans*)；1 株为嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)中的嗜冷杆菌(*Psychrobacter pulmonis*)，如表 2 所示。

表 1 产细菌素菌株的抑菌活性

Table 1 Bacteriostatic activity of bacteriocin-producing bacteria strains

菌株	金黄色葡萄球菌	对照组	P 值	大肠杆菌	对照组	P 值
Strains	<i>Staphylococcus aureus</i> (mm)	Control group (mm)	P values	<i>Escherichia coli</i> (mm)	Control group (mm)	P values
MW-1	24.26±0.49	8.36±0.12	0.000	22.31±0.58	8.27±0.09	0.000
MW-2	23.10±0.57	8.12±0.06	0.000	16.31±0.24	8.03±0.01	0.001
MW-3	16.36±0.36	8.04±0.02	0.001	18.65±0.61	8.16±0.06	0.000
MW-4	22.52±0.62	8.12±0.05	0.000	20.36±0.42	8.18±0.08	0.000
MW-7	12.39±0.45	8.23±0.09	0.023	17.28±0.39	8.15±0.06	0.000
MW-8	11.35±0.21	8.12±0.04	0.029	21.62±0.42	8.06±0.02	0.000
MW-26	21.36±0.36	8.06±0.02	0.000	19.25±0.35	8.24±0.11	0.000
MW-32	16.86±0.25	8.14±0.03	0.000	14.26±0.47	8.17±0.06	0.006
MW-35	16.23±0.72	8.06±0.02	0.001	15.35±0.24	8.20±0.08	0.002
MW-60	15.24±0.53	8.21±0.06	0.002	13.65±0.23	8.09±0.02	0.012
MW-63	15.38±0.19	8.12±0.05	0.002	10.72±0.14	8.26±0.11	0.039
MW-69	16.52±0.29	8.24±0.07	0.001	15.23±0.36	8.29±0.10	0.002
MW-79	16.48±0.26	8.16±0.06	0.001	13.29±0.16	8.07±0.03	0.013

注：表中所示数据包含牛津杯直径 8.00 mm；n=9，为 3 次生物学重复中每次的样本总量。下同

Note: The data shown in the table include Oxford cup diameter of 8.00 mm; The n=9 is the total number of samples in three biological replicates, and each biological replicate contains three technical replicates. The same below

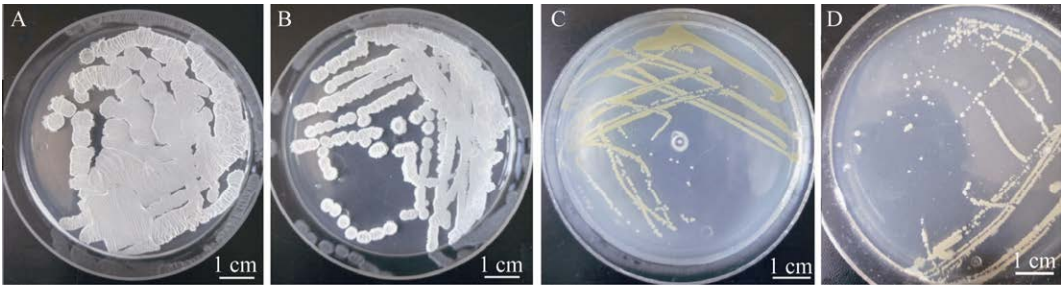


图 1 部分产细菌素菌株菌落形态

Figure 1 Colony morphology of several bacteriocin-producing bacteria strains

Note: A: MW-2; B: MW-1; C: MW-3; D: MW-32

表 2 产细菌素菌株的形态学与分子鉴定
Table 2 Morphological and molecular identification of bacteriocin-producing bacteria strains

菌株 Strains	表形 Morphological characteristics of bacterial colony	显微形态 Micromorphology of bacteria	分子鉴定 Molecular identification	序列一致性 Sequence identity (%)	GenBank 登录号 GenBank accession No.
MW-1	白色、椭圆形、菌落表面有褶皱，边缘不规则 White, oval, colony surface with fold and irregular edge	有内生芽孢，芽孢呈卵圆形，细胞形态呈杆状，为革兰氏阳性菌 With endophytic spores, oval spores, and rod-shaped cells, Gram-positive bacteria	解淀粉芽孢杆菌 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	100	MF581449
MW-2	淡黄色、圆形，菌落表面较为平整 Light yellow, round, and relatively flat colony surface	有芽孢、细胞形态呈杆状，为革兰氏阳性菌 With spores, rod-shaped cells, Gram-positive bacteria	纺锤形赖氨酸芽孢杆菌 <i>Lysinibacillus fusiformis</i>	99	MH085463
MW-4, MW-26	白色、圆形，菌落表面有褶皱，边缘不规则 White, round, colony surface with fold and irregular edge	有芽孢，细胞形态呈直杆状，为革兰氏阳性菌 With spores, straight-rod cell shape, Gram-positive bacteria	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	100	KY484338
MW-3, MW-7	黄色、圆形，菌落表面光滑，边缘整齐 Yellow, round, colony with surface smooth and neat edge	细菌形态呈直杆状，为革兰氏阴性菌 Straight-rod bacteria, Gram-negative	聚团肠杆菌 <i>Enterobacter agglomerans</i>	99	AF130934
MW-8	白色，球状、菌落表面光滑 White, sphericity, colony with smooth surface	细菌形态呈球杆状，为革兰氏阴性菌 Rod-shaped bacteria, Gram-negative	嗜冷杆菌 <i>Psychrobacter pulmonis</i>	99	KU364058
MW-32, MW-35, MW-60, MW-69	白色，球状，菌落表面光滑，边缘整齐 White, sphericity, colony with surface smooth, neat edge	细菌呈葡萄串状排列，为革兰氏阳性菌 With arranged clusters of grapes, Gram-positive	表皮葡萄球菌 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	100	MN511770
MW-63	白色，球状，菌落表明光滑，边缘整齐 White, sphericity, colony with surface smooth and neat edge	细胞形态呈球状，葡萄串状排列，为革兰氏阳性菌 With spherical cells, arranged clusters of grapes, Gram-positive	巴氏葡萄球菌 <i>Staphylococcus pasteurii</i>	99	KT003275
MW-79	白色、球状，菌落表面湿润，边缘整齐 White, sphericity, wet colony surface with neat edge	细菌呈葡萄串状排列，为革兰氏阳性菌 With arranged clusters of grapes, Gram-positive	华纳氏葡萄球菌 <i>Staphylococcus warneri</i>	99	KT211483

2.4 产细菌素菌株的抑菌物质研究

与 13 株产细菌素菌株的无细胞培养液上清最低 pH (5.1)值一致的乳酸和乙酸 2 种有机酸，分别对金黄色葡萄球菌进行抑菌拮抗。结果显示，与未添加有机酸的无细胞培养液对照组明显的抑制指示菌效果(表 1)相比($P<0.05$)，2 种酸分别对各个产细菌素菌株处理组均未显示抑菌效果(无明显抑菌圈出现)，表明有机酸并非抑菌物质，可初步排除有机酸的干扰。过氧化氢酶对产细菌素细菌的

无细胞培养液上清处理后，其抑菌圈直径与未加过氧化氢酶的对照相比，抑菌圈直径未发生显著减小($P>0.05$)，可初步排除过氧化氢的干扰。此外，利用蛋白酶 K、胰蛋白酶和胃蛋白酶等蛋白酶类物质分别对各产细菌素菌株进行处理后，发现其抑菌活性均有显著下降($P<0.05$)且对一种或多种蛋白酶敏感。其中，菌株 MW-1、MW-2、MW-4、MW-26 和 MW-60 这 5 株菌对 3 种蛋白酶均敏感；MW-8 对胰蛋白酶和胃蛋白酶敏感；

MW-3 和 MW-7 对蛋白酶 K 和胰蛋白酶敏感；MW-32、MW-35、MW-69 和 MW-79 这 4 株菌对蛋白酶 K 和胃蛋白酶敏感；MW-63 仅对蛋白酶 K 敏感，结果见表 3。

2.5 解淀粉芽孢杆菌细菌素的稳定性测定

将 MW-1 培养液上清在不同温度 and 不同 pH 值条件下分别对金黄色葡萄球菌进行抑菌拮抗实验。结果显示：在过酸(pH 3.0)和过碱(pH 11.0)处理后，MW-1 细菌素仍保持一定的抑菌活性。在 pH 3.0 条件下，对病原指示菌的抑菌圈直径为

16.07±0.21 mm；在 pH 11.0 条件下，对病原指示菌的抑菌圈直径为 12.36±0.02 mm，相比其他 pH 条件显著达到最低($P<0.05$)，但仍保持明显的抑菌活性。此外，细菌素在 pH 3.0–11.0 之间均具有明显的抑菌活性(抑菌圈直径均在 12 mm 以上)，经单因素方差分析发现在 pH 7.0 时抑菌圈直径相较其他 pH 条件显著达到最大($P<0.05$)，为 23.24±0.52 mm (图 2A，表 4)。在 100 °C 高温处理 30 min 后，MW-1 细菌素对病原指示菌的抑菌圈直径为 12.24±0.04 mm，达到所有温度处理中最小的抑菌

表 3 产细菌素细菌的抑菌物质确定(抑菌圈直径，mm)

Table 3 Determination of bacteriostatic substances produced by bacteria (bacteriostatic diameters (mm))

菌株 Strains	过氧化氢酶 Catalase	蛋白酶 K Protease K	胰蛋白酶 Trypsin	胃蛋白酶 Pepsin	对照 Control
MW-1	22.65±0.41	8.36±0.12**	8.19±0.10**	8.16±0.17**	24.16±0.32
MW-2	21.85±0.36	8.12±0.09**	16.35±0.11*	8.37±0.14**	23.04±0.52
MW-3	18.58±0.28	10.14±0.21*	8.26±0.13**	15.25±0.29	18.56±0.42
MW-4	21.79±0.48	8.35±0.11**	8.12±0.12**	8.14±0.14**	22.64±0.28
MW-7	17.14±0.56	9.36±0.14**	8.32±0.21**	15.35±0.19	17.32±0.48
MW-8	20.26±0.45	17.25±0.23	8.25±0.18**	8.32±0.14**	21.62±0.42
MW-26	20.64±0.22	8.16±0.17**	8.32±0.26**	8.36±0.25**	21.21±0.21
MW-32	16.02±0.46	10.65±0.21*	14.38±0.20	8.25±0.10**	16.74±0.68
MW-35	15.32±0.26	9.85±0.13*	12.78±0.15	8.28±0.12**	16.29±0.19
MW-60	15.03±0.52	12.20±0.25*	8.26±0.12**	13.14±0.12*	15.21±0.56
MW-63	15.14±0.63	8.21±0.23**	13.59±0.10	15.06±0.13	15.32±0.13
MW-69	16.36±0.32	12.24±0.14*	14.35±0.32	10.65±0.10*	16.46±0.35
MW-79	16.08±0.25	9.92±0.25*	15.25±0.10	8.16±0.11**	16.53±0.31

注：n=9；*和**分别表示该组数据与菌株对应的对照数据间差异显著和极显著($P<0.05$ ， $P<0.01$)

Note: n=9; *, ** indicate significant or extremely significant difference of this data relative to that of its corresponding control

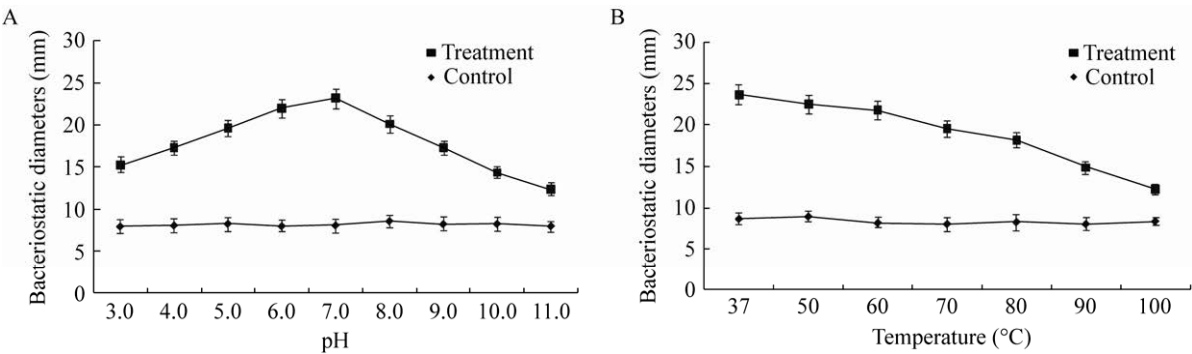


图 2 解淀粉芽孢杆菌细菌素的酸碱稳定性(A)和热稳定性(B)

Figure 2 Stability of bacteriocin from *Bacillus amylolyticus* for acid, alkali (A) and temperature (B)

注：每一个处理点上，处理组和对照组间两两比较均具有差异显著性($P<0.05$)

Note: At each treatment point, there was significant difference between treatment and control groups ($P<0.05$)

圈直径, 仍具有明显抑菌效果; 经 80 °C 处理 30 min 后, 抑菌圈直径从 37 °C 的 24.26±0.49 mm 显著下降到了 18.39±0.23 mm; 在 37–100 °C 范围内, 经单因素方差分析发现抑菌效果在 37 °C 相较于其他温度条件显著达到最佳抑菌效果($P<0.05$), 抑菌圈直径呈现出随处理温度的升高而降低的趋势, 而且在高温区段(80–100 °C)中下降的幅度最大(图 2B, 表 5)。

3 讨论与结论

本研究从马尾松毛虫幼虫肠道样本中通过不同细菌培养基共筛选获得 13 株具有产细菌素能力的细菌。经形态学和 16S rRNA 基因序列分子鉴定后, 发现这些细菌分别隶属于芽孢杆菌属、葡萄球菌属、肠杆菌属以及嗜冷杆菌属等。它们中的绝大多数(如芽孢杆菌属、葡萄球菌属以及肠杆菌属)已在其他松毛虫(云南松毛虫幼虫, *Dendrolimus houi*)

表 4 解淀粉芽孢杆菌细菌素酸碱稳定性的单因素方差分析及多重比较

Table 4 Single factor analysis of variance and multiple comparison of acid-base stability of bacteriocin from *Bacillus amylolyticus*

pH 组 pH groups		平均值 Mean values	标准误 Standard errors (SE)	P 值 P values	95% 置信区间 95% Confidence limits	
					上限 Upper limit	下限 Lower limit
pH 5.0 vs.	pH 6.0	−2.340	0.676	0.003	−1.664	−3.016
	pH 7.0	−3.560	1.027	0.000	−2.533	−4.587
	pH 8.0	−0.460	0.132	0.118	−0.328	−0.592
	pH 9.0	2.320	0.670	0.005	2.990	1.650
pH 6.0 vs.	pH 7.0	−1.220	0.350	0.035	−0.870	−1.570
	pH 8.0	1.880	0.545	0.003	2.425	1.335
	pH 9.0	4.660	1.346	0.000	6.006	3.314
pH 7.0 vs.	pH 8.0	3.100	0.895	0.034	3.995	2.205
	pH 9.0	5.880	1.696	0.000	7.576	4.184
pH 8.0 vs.	pH 9.0	2.780	0.802	0.001	3.582	1.978

注: 多重比较分析采用最小显著差异方法
Note: Multiple comparison analysis was done by the LSD method

表 5 解淀粉芽孢杆菌细菌素热稳定性的单因素方差分析及多重比较

Table 5 Single factor analysis of variance and multiple comparison of thermostability of bacteriocin from *Bacillus amylolyticus*

T _m 组 T _m groups		平均值 Mean values	标准误 Standard errors (SE)	P 值 P values	95% 置信区间 95% Confidence limits	
					上限 Upper limit	下限 Lower limit
37 °C vs.	50 °C	1.120	0.323	0.026	1.443	0.797
	60 °C	1.860	0.539	0.006	2.399	1.321
	70 °C	4.070	1.176	0.000	5.246	2.894
	80 °C	5.490	1.586	0.000	7.076	3.904
50 °C vs.	60 °C	0.740	0.216	0.033	0.956	0.524
	70 °C	2.950	0.853	0.001	3.803	2.097
	80 °C	4.370	1.262	0.000	5.632	3.108
60 °C vs.	70 °C	2.210	0.637	0.000	2.847	1.573
	80 °C	3.630	1.047	0.000	4.677	2.583
70 °C vs.	80 °C	1.420	0.410	0.008	1.830	1.010

注: 多重比较分析采用最小显著差异方法
Note: Multiple comparison analysis was done by the LSD method

肠道菌群中被报道^[21]。随着研究者对产细菌素细菌和细菌代谢抑菌物相关的深入研究,发现芽孢杆菌属中存在着多种产高活性细菌素种类的细菌,以往研究^[22]从白蚁(*Termite*)成虫肠道中分离获得一株产细菌素的蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*),其对金黄色葡萄球菌和李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)等常见致病菌显示了较好的抑制效果;一种名为“美菊素”的新型细菌素从枯草芽孢杆菌中被鉴定^[23],其具有高稳定性,能够对蜡样芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和志贺氏菌(*Shigella*)等革兰氏阳性致病菌有明显抑制作用,有广泛应用于食品、医疗等行业中替代抗生物素的潜力。因此,未来对昆虫肠道中芽孢杆菌属细菌应关注其产高效细菌素的潜力。表皮葡萄球菌、巴氏葡萄球菌和溶葡萄球菌(*Staphylococcus dissolve*)等葡萄球菌属的多种细菌也能够产生一种称为“葡萄球菌素”的细菌素,其对多种致病菌能起到很好的抑制作用^[24]。大量研究发现:表皮葡萄球菌、巴氏葡萄球菌和华纳氏葡萄球菌等产羊毛硫葡萄球菌素的葡萄球菌通常是一类生物安全菌^[25-26],而且这些葡萄球菌属细菌也在本研究中分离得到并具有较好抑菌特性的细菌素。嗜冷杆菌属具有产细菌素能力的细菌,目前在部分专利中已有报道^[27];在以往研究中,肠杆菌属的细菌(阴沟肠杆菌, *Enterobacter cloacae*)也已被发现产细菌素的能力^[28]。因此,本研究进一步明确了嗜冷杆菌和肠杆菌的产细菌素能力。以上证据也表明松毛虫肠道中具有丰富的产细菌素细菌资源。此外,细菌素是产细菌素细菌资源的价值所在,本研究中各产细菌素菌株抑菌活性对供试蛋白酶中的一种或多种具有敏感性,因此初步确定细菌素可能为类蛋白质,而且这些细菌素成分多样、复杂,可确定不是同一种类蛋白质。当然,对于其确切的成分仍需要采用多种实验手段进一步证实,例如对其纯化以及蛋白胶和质谱鉴定等。

获得高活性产细菌素细菌的同时,其细菌素是

否具有良好抑菌活性也是值得考虑的问题^[29-30]。本研究通过对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌这2种代表性病原菌的抑菌试验,初步探讨了各菌株产细菌素的抑菌活性:13株产细菌素细菌对病原指示菌有不同程度的抑菌效果。值得注意的是,解淀粉芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌均具备较高活性,这分别与罗宝龙等^[19]从猪源分离得到的枯草芽孢杆菌,以及 Ayed 等^[31]从土壤中分离得到的解淀粉芽孢杆菌对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌效果相似。本研究中,大多数菌株为革兰氏阳性菌,它们均显示了对金黄色葡萄球菌比大肠杆菌更好的抑菌效果;少数菌株为革兰氏阴性菌,对大肠杆菌的抑菌效果好于金黄色葡萄球菌,表明马尾松毛虫肠道中非厌氧可培养细菌以革兰氏阳性菌居多。另外,抑菌结果与不同革兰氏性质细菌来源的细菌素通常对相同性质菌株的抑制效果更好的规律相一致,进一步表明实验结果的可靠性。

本研究选取抑菌活性最佳的解淀粉芽孢杆菌为代表,对其细菌素的稳定性进一步进行评估。该菌株产生的细菌素具有较好的活性和一定程度的耐酸碱性能,pH 7.0时具有最佳抑菌效果。这个现象可能与该解淀粉芽孢杆菌的生长特性有一定的相关性,因为本研究中对该菌的初始培养条件进行优化时,发现其生长最适 pH 也在 7.0 左右。可见,细菌素也是解淀粉芽孢杆菌对环境适应性进化的生物学基础之一。该菌株细菌素活性最适温度为 37 °C,但随温度升高仍具有一定活性,显示了其较宽的应用温度范围。此外,解淀粉芽孢杆菌无细胞培养液对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径可达 25 mm 左右,超过大部分已报道^[19,22]的芽孢杆菌产生的细菌素对金黄色葡萄球菌的抑制作用,也进一步表明马尾松毛虫肠道中分离的解淀粉芽孢杆菌具有优良的抑菌性能。

本文首次对马尾松毛虫肠道内产细菌素细菌进行分离,筛选出多株产较高抑菌活性细菌素的菌株,并初步推测细菌素具有类蛋白质性质,进一

步以解淀粉芽孢杆菌细菌素为代表探讨了其温度和酸碱耐受性。研究结果将进一步丰富人们对森林重大害虫肠道菌群的认识, 也为开发产细菌素菌种资源提供了新途径。由于培养条件的限制, 尚未对马尾松毛虫肠道中厌氧细菌进行筛选。再者, 肠道是厌氧环境, 厌氧菌的数量较为庞大, 因此挖掘肠道厌氧菌是将来极有必要开展的工作。由于分离培养法无法准确地模拟出昆虫肠道菌完全的生长环境, 大量的肠道细菌种类还无法体外培养, 导致不少极具价值的产细菌素细菌资源被忽视。随着基于高通量测序的肠道微生物多样性和宏基因组测序技术的发展, 人们正在从海量的基因组学数据中探索细菌的生物学特性, 从而开发出匹配的培养基。如 2015 年, 有研究者在 *Nature Communications* 上发表了根据 16S rRNA 基因序列直接对目标菌株进行培养基预测的数据库 (<http://komodo.modelseed.org/default.htm>)^[32], 为挖掘及利用肠道微生物资源提供了新的思路。因此, 利用近年来开发的资源, 配制多种个性化、有针对性的培养基筛选昆虫肠道产细菌素细菌将是一项极有意义的工作。

REFERENCES

- [1] Chung PY, Khanum R. Antimicrobial peptides as potential anti-biofilm agents against multidrug-resistant bacteria[J]. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 2017, 50(4): 405-410
- [2] Graham CE, Cruz MR, Garsin DA, et al. *Enterococcus faecalis* bacteriocin EntV inhibits hyphal morphogenesis, biofilm formation, and virulence of *Candida albicans*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(17): 4507-4512
- [3] Li HW, Xiao Y, Zhang GL, et al. Isolation, identification and analysis of potential bacteriostatic substances of *Lactobacillus* against *Salmonella cholerae*[J]. *Journal of Microbiology*, 2020, 40(4): 25-59 (in Chinese)
李宏伟, 肖瑶, 张关令, 等. 抑制猪霍乱沙门氏菌的乳酸菌的分离、鉴定及潜在抑菌物质分析[J]. *微生物学杂志*, 2020, 40(4): 25-59
- [4] Aspri M, O'Connor PM, Field D, et al. Application of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* isolated from donkey milk, in the bio-control of *Listeria monocytogenes* in fresh whey cheese[J]. *International Dairy Journal*, 2017, 73: 1-9
- [5] Anacarso I, Gigli L, Bondi M, et al. Isolation of two lactobacilli, producers of two new bacteriocin-like substances (BLS) for potential food-preservative use[J]. *European Food Research and Technology*, 2017, 243(12): 2127-2134
- [6] Yin X, Heeney D, Srisengfa Y, et al. Bacteriocin biosynthesis contributes to the anti-inflammatory capacities of probiotic *Lactobacillus plantarum*[J]. *Beneficial Microbes*, 2018, 9(2): 333-344
- [7] Wang Y, Shang N, Qin YX, et al. The complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* LPL-1, a novel antibacterial probiotic producing class IIa bacteriocin[J]. *Journal of Biotechnology*, 2018, 266: 84-88
- [8] Salazar F, Ortiz A, Sansinenea E. Characterisation of two novel bacteriocin-like substances produced by *Bacillus amyloliquefaciens* ELI149 with broad-spectrum antimicrobial activity[J]. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2017, 11: 177-182
- [9] Moon GS, Kang CH, Pyun YR, et al. Isolation, identification, and characterization of a bacteriocin-producing *Enterococcus* sp. from kimchi and its application to kimchi fermentation[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2004, 14(5): 924-931
- [10] Oliveira MM, Ramos ETA, Drechsel MM, et al. Gluconacin from *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 is an active bacteriocin against phytopathogenic and beneficial sugarcane bacteria[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2018, 125(6): 1812-1826
- [11] Phumisantiphong U, Siripanichgon K, Reamtong O, et al. A novel bacteriocin from *Enterococcus faecalis* 478 exhibits a potent activity against vancomycin-resistant enterococci[J]. *PLoS One*, 2017, 12(10): e0186415
- [12] Huang YW, Liu YX, Tao Z, et al. Isolation and identification of bacteriocin producing *Lactobacillus* from chicken[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2017, 53(9): 23-27 (in Chinese)
黄奕雯, 刘悦欣, 陶政, 等. 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
- [13] Zhou YY, Kong XY, Wu M, et al. Screening and identification of lactic acid bacteria producing bacteriocin from yak[J]. *Journal of Southwest University for Nationalities (Natural Science Edition)*, 2017, 43(4): 331-337 (in Chinese)
周晏阳, 孔雪英, 吴梅, 等. 牦牛源产细菌素的乳酸菌的筛选鉴定[J]. *西南民族大学学报: 自然科学版*, 2017, 43(4): 331-337
- [14] Chowanski S, Adamski Z, Lubawy J, et al. Insect peptides-perspectives in human diseases treatment[J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2017, 24(29): 3116-3152
- [15] Jiang YH, Cai SB, Li HW, et al. Isolation and identification of intestinal fungus and screening of cellulolytic fungus in *Dendrolimus houi* (Lepidoptera: Lasiocampidae)[J].

- Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2020, 26(6): 1-10 (in Chinese)
- 江宇航, 蔡赛波, 李宏伟, 等. 云南松毛虫肠道真菌的分离鉴定及降解纤维素真菌的筛选[J]. 应用与环境生物学报, 2020, 26(6): 1-10
- [16] Almasia NI, Molinari MP, Maroniche GA, et al. Successful production of the potato antimicrobial peptide Snakin-1 in baculovirus-infected insect cells and development of specific antibodies[J]. BMC Biotechnology, 2017, 17(1): 75
- [17] Qiu TT, Xie XC, Shi Y, et al. Advances in research and development of insect antibacterial peptide[J]. Pharmaceutical Biotechnology, 2015, 22(6): 545-548 (in Chinese)
- 裘婷婷, 谢辛慈, 施莹, 等. 昆虫抗菌肽的研究与开发进展[J]. 药物生物技术, 2015, 22(6): 545-548
- [18] Wang LX, Chen W, Xie GL, et al. Isolation and identification of intestinal bacteria and screening of cellulolytic bacteria in *Proisotoma ananevae* (Collembola: Isotomidae)[J]. Acta Entomologica Sinica, 2018, 61(7): 835-842 (in Chinese)
- 王立秀, 陈伟, 谢桂林, 等. 阿南原等跳肠道细菌的分离鉴定及降解纤维素细菌的筛选[J]. 昆虫学报, 2018, 61(7): 835-842
- [19] Luo BL, Wei JL, Huang LL, et al. Selection and antibacterial activity of bacteriocin-producing *Bacilli* from swine[J]. Microbiology China, 2018, 45(6): 1342-1349 (in Chinese)
- 罗宝龙, 魏军林, 黄丽丽, 等. 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
- [20] Dong XZ, Cai MY. Common Bacterial System Identification Manual[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese)
- 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
- [21] Sun YH, Zhou KY, Xiong Z. Screening and identification of cellulase-producing strains from intestinal canal of *Dendrolimu houi* and research on cellulase characterization[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2012, 27(S1): 254-258 (in Chinese)
- 孙佑赫, 周开艳, 熊智. 云南松毛虫肠道产纤维素酶菌株的筛选鉴定及酶学性质[J]. 华北农学报, 2012, 27(S1): 254-258
- [22] Chauhan AK, Maheshwari DK, Bajpai VK. Isolation and preliminary characterization of a bacteriocin-producer *Bacillus* strain inhibiting methicillin resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Acta Biologica Hungarica, 2017, 68(2): 208-219
- [23] Lee SG, Chang HC. Purification and characterization of mejucin, a new bacteriocin produced by *Bacillus subtilis* SN7[J]. LWT, 2018, 87: 8-15
- [24] Wang YL, Yang ZJ, Chen DJ. Research progress of *Staphylococcin*[J]. World Clinical Drugs, 2008, 29(9): 554-559, 570 (in Chinese)
- 王永亮, 杨志钧, 陈代杰. 葡萄球菌素研究进展[J]. 世界临床药物, 2008, 29(9): 554-559, 570
- [25] Zhou D, Yang XF. Advance in staphylococcin and its potential application[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2017, 49(4): 122-129 (in Chinese)
- 周迪, 杨旭夫. 葡萄球菌素及其应用研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2017, 49(4): 122-129
- [26] Fontana MBC, de Bastos MDCF, Brandelli A. Bacteriocins Pep5 and epidermin inhibit *Staphylococcus epidermidis* adhesion to catheters[J]. Current Microbiology, 2006, 52(5): 350-353
- [27] Lu ZX, Xie LL, Ma ST, et al. Psychrophile capable of producing bacteriocin, bacteriocin and extraction method and application of bacteriocin: CN, CN108192841A[P]. 2018-06-22 (in Chinese)
- 路振香, 解璐璐, 马世堂, 等. 一种产细菌素的嗜冷菌、细菌素及其提取方法和应用: 中国, CN108192841A[P]. 2018-06-22
- [28] Pham TT, Ho THN, Nguyen VD. Screening for bacteriocin-like antimicrobial activity against shrimp pathogenic vibrios and molecular identification of marine bacteria from otter clam *Lutraria philippinarum*[J]. The Thai Journal of Veterinary Medicine, 2014, 44(3): 345-353
- [29] Lozo J, Mirkovic N, O'Connor PM, et al. Lactolisterin BU, a novel Class II broad-spectrum bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* BGBU1-4[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 83(21): e01519-17
- [30] de Giani A, Bovio F, Forcella M, et al. Identification of a bacteriocin-like compound from *Lactobacillus plantarum* with antimicrobial activity and effects on normal and cancerogenic human intestinal cells[J]. AMB Express, 2019, 9: 88
- [31] Ayed HB, Maalej H, Hmidet N, et al. Isolation and biochemical characterisation of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* An6[J]. Journal of Global Antimicrobial Resistance, 2015, 3(4): 255-261
- [32] Oberhardt MA, Zarecki R, Gronow S, et al. Harnessing the landscape of microbial culture media to predict new organism-media pairings[J]. Nature Communications, 2015, 6: 8493