

研究报告

滇池金线鲃肠道产细菌素细菌的筛选鉴定及细菌素 LSP01 的抑菌作用

辛维岗^{#1,2}, 江宇航^{#1,2}, 陈诗雨^{1,2}, 徐美余^{1,2}, 周红兵³, 张麒麟^{*1,2}, 林连兵^{*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

3 宜良健之源食品有限公司, 云南 昆明 650500

辛维岗, 江宇航, 陈诗雨, 徐美余, 周红兵, 张麒麟, 林连兵. 滇池金线鲃肠道产细菌素细菌的筛选鉴定及细菌素 LSP01 的抑菌作用[J]. 微生物学通报, 2022, 49(1): 242-255

Xin Weigang, Jiang Yuhang, Chen Shiyu, Xu Meiyu, Zhou Hongbing, Zhang Qili, Lin Lianbing. Screening and identification of bacteriocin-producing bacteria in the intestines of *Sinocyclocheilus grahami* in Dianchi and the antibacterial effect of bacteriocin LSP01[J]. Microbiology China, 2022, 49(1): 242-255

摘要:【背景】细菌素是微生物在生长过程中产生的一类具有抑菌作用的蛋白质或多肽类物质, 可有效抑制或杀灭多种病原微生物。滇池金线鲃(*Sinocyclocheilus grahami*)是云南滇池特有鱼种, 长期生存在滇池恶劣的生态环境中, 其肠道内可能存在着大量产细菌素的微生物资源。【目的】从滇池金线鲃肠道内筛选产细菌素菌株, 并对其所产细菌素的抑菌特性及机制进行探究。【方法】对滇池金线鲃肠道细菌进行分离鉴定, 利用牛津杯双层平板法筛选具有抑菌活性的产细菌素菌株, 测定抑菌活性最佳菌株的细菌素酶敏感性、酸碱与高温耐受性、最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)与抑菌广谱性等抑菌特性, 并借助细胞膜通透性、2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfonyl)-2h-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT)实验及扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)观察等实验探究细菌素的抑菌机制。【结果】从滇池金线鲃肠道中共筛选得到 5 株产细菌素细菌, 隶属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)和乳杆菌属(*Lactobacillus*)。其中, 菌株 S01 所产细菌素(LSP01)的抑菌活性最佳, 抑菌圈直径可达到(29.21±0.25) mm, 对多种蛋白酶敏感, 在 100 °C 和 pH 10.0 处理后抑菌活性仍维持在 60%以上, 并对大肠杆菌(*Escherichia coli*)、福氏志贺氏菌(*Shigella flexneri*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)等 12 株不同类型的革兰氏阳性及阴性致病菌具有良好的抑制效果。此外, LSP01 对嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)的 MIC 仅为 11.06 µg/mL,

基金项目: 国家自然科学基金(31760042)

[#]对本文贡献相同

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31760042)

[#]These authors equally contributed to this work

***Corresponding authors:** E-mail: ZHANG Qilin: zhangql@kust.edu.cn; LIN Lianbing: linlb@kmust.edu.cn

Received: 2021-03-23; **Accepted:** 2021-06-24; **Published online:** 2021-09-22

经 LSP01 处理后的嗜水气单胞菌细胞膜通透性上升、细胞代谢活性下降、细胞结构出现破裂, 致其死亡。【结论】滇池金线鲃肠道产细菌素细菌资源较为丰富, 尤其是菌株 S01 所产生细菌素(LSP01) 具有抑菌活性高、稳定性好、抑菌谱广等特性, 能够明显破坏嗜水气单胞菌的细胞结构、降低代谢活性及细胞膜通透性, 显示出了良好的替代抗生素应用潜能。

关键词: 滇池金线鲃; 肠道产细菌素细菌; 唾液乳杆菌; 嗜水气单胞菌; 抑菌作用

Screening and identification of bacteriocin-producing bacteria in the intestines of *Sinocyclocheilus grahami* in Dianchi and the antibacterial effect of bacteriocin LSP01

XIN Weigang^{#1,2} JIANG Yuhang^{#1,2} CHEN Shiyu^{1,2} XU Meiyu^{1,2} ZHOU Hongbing³
ZHANG Qilin^{*1,2} LIN Lianbing^{*1,2}

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

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

3 Yiliang Jianzhiyuan Food Limited Company, Kunming 650500, Yunnan, China

Abstract: [Background] Bacteriocin is a kind of protein or polypeptide substances with antibacterial effect produced during the growth of microorganisms, which can effectively inhibit or kill for various foodborne pathogens. *Sinocyclocheilus grahami* is one of specific fish species in Dianchi, Yunnan. *S. grahami* survive in harsh ecological environment with long-term in Dianchi, intestines of which might contain a large amount of bacteriocin-producing microorganism resources. **[Objective]** The bacteriocin-producing strains were screened from the intestinal tract of the *S. grahami* in Dianchi and the antibacterial properties as well as mechanisms of the bacteriocin-producing strains were explored. **[Methods]** The intestinal bacteria of *S. grahami* in Dianchi were isolated and identified. The antibacterial effect of the bacteriocin-producing strains was screened by the Oxford cup double-layer method. The antibacterial properties including enzyme sensitivity, acid-base and high temperature tolerance, determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) and antibacterial spectrum of the best strains were determined. The antibacterial mechanism of the bacteriocin was explored through cell membrane permeability, XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfonyl)-2h-tetrazolium-5-carboxanilide) experiments, and scanning electron microscopy analysis. **[Results]** A total of 5 strains of bacteriocin-producing bacteria were screened from the intestinal tract of the *S. grahami* in Dianchi, and they all belonged to the *Bacillus* and *Lactobacillus*. Among them, the antibacterial activity of bacteriocin (LSP01) produced by strain S01 was the best, inhibition zone of which reached to (29.21±0.25) mm. The produced bacteriocin was sensitive to a variety of proteases and maintained more than 60% antibacterial activity after treatment at 100 °C and pH 10.0. LSP01 was also presented a good antibacterial effect against other 12 Gram-positive and Gram-negative pathogenic bacteria, e.g. *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, and *Staphylococcus aureus* etc. In addition, the MIC of LSP01 against *Aeromonas hydrophila*

was 11.06 $\mu\text{g/mL}$. After treatment with LSP01, the permeability of the cell membrane of *A. hydrophila* was increased, the metabolic activity of the cells was decreased, and the cell structure was ruptured, resulting in the death of *A. hydrophila*. **[Conclusion]** The bacteriocin resources in the intestines of *S. graham* in Dianchi are abundant, especially the bacteriocin (LSP01) produced by strain S01 has the characteristics of high antibacterial activity, good stability, and broad antibacterial spectrum, which can destroy the cell structure of *A. hydrophila*, reduce metabolic activity and cell membrane permeability, suggesting potential for alternative antibiotics.

Keywords: *Sinocyclocheilus grahami*; intestinal bacteriocin-producing bacteria; *Lactobacillus salivarius*; *Aeromonas hydrophila*; antibacteria effect

滇池金线鲃(*Sinocyclocheilus grahami*)是云南滇池(Dianchi)特有鱼种, 营半穴居生活, 长期以来作为一种经济鱼类被广泛养殖和食用, 并被列为“云南四大名鱼”之首^[1]。近几十年来, 由于滇池生态环境受到影响, 致使滇池金线鲃数量大幅下降, 濒临灭绝。尽管滇池金线鲃目前已实现了人工繁育^[2], 但在过去较长一段时间中仍一直生活在有污染的滇池环境中, 其肠道菌群可能产生更多抗菌活性物质以提高自身免疫力, 帮助机体适应环境变化^[3-4]。特别是鱼类长期生活在水体环境中, 更易受到致病细菌的侵害, 其肠道菌群可能为了有效地帮助鱼类抵抗病毒、致病性细菌和真菌的入侵, 具有更为丰富的产抗菌活性细菌资源^[5]。因此, 滇池金线鲃为了更好地适应生存环境, 其肠道内可能存在着多种高活性抑制致病菌的细菌素菌种资源。

细菌素是乳酸菌、芽孢杆菌等益生菌生长到稳定期后通过核糖体合成并分泌到环境中的一类具有抑菌活性的蛋白或者多肽, 具有安全、高效及可降解等特性^[6]。近年来, 随着饲喂抗生素种类和剂量的不断增加, 已经造成了农业养殖过程中诸多超级细菌的出现以及抗生素耐受现象的广泛频发^[7-9]。值得注意的是, 我国农业农村部明确指出将于 2020 年 7 月全面禁止抗生素在农业养殖端的使用, 以保证食品安全和有效减缓抗生素的滥用。然而抗生素禁用后将会造成畜牧

养殖过程中牲畜易生病、致死率上升、养殖效率低、经济收益率下降等问题, 这使得寻找具有安全、高效、可广泛应用等特点的新型抗生素替代品迫在眉睫。此外, 目前虽已经报道了部分抑制致病性细菌的细菌资源, 但针对抑制鱼类重要病原菌嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)等的细菌资源较为匮乏^[10-11], 特别是来源于环境较为恶劣的鱼类肠道具有潜在高抑菌活性的细菌资源。

本研究以云南滇池特有鱼类滇池金线鲃作为试验材料, 筛选其肠道内产细菌素菌种资源, 初步确定其抑菌活性成分, 通过最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)、温度及酸碱耐受性、抑菌广谱性等抑菌特性, 并结合细胞膜通透性、2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfonyl)-2h-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT)还原性实验、扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)等探讨细菌素(LSP01)的抑菌作用, 以期进一步扩充细菌素菌种资源, 也为了解滇池金线鲃肠道内菌群结构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*)、

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、福氏志贺氏菌(*Shigella flexneri*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、霍乱沙门氏菌(*Salmonella choleraesuis*)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)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;产酸克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytoca*)、维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)、土生拉乌尔菌(*Raoultella terrigena*)均前期分离自滇池金线鲃肠道,由昆明理工大学高校饲用抗生素替代技术工程研究中心保存。试验前利用无菌新鲜 LB 液体培养基将指示菌浓度调整为 10^6 – 10^7 CFU/mL 备用。

1.2 主要试剂和仪器及培养基

盐酸、氢氧化钠、75%乙醇、胃蛋白酶、胰蛋白酶、碱性蛋白酶、蛋白酶 K 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;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;冷冻干燥仪,日立公司。LB 营养培养基(25.0 g/L)、乳酸细菌培养基(MRS, 41.5 g/L)、哥伦比亚血琼脂培养基(CA, 39.0 g/L),上海汉尼生物技术有限公司。

1.3 滇池金线鲃肠道细菌的分离与纯化

滇池金线鲃由宜良健之源食品有限公司(云南,昆明)惠赠。首先,取 6 尾滇池金线鲃[(6.8±0.4) cm],实验前饥饿处理 24 h 后置于超净工作台上^[12]。75%乙醇浸泡 30 s,再用无菌水冲洗 3 次后迅速解剖收集肠道,使用无菌水反复冲洗肠道表面 3 次,置于装有 2 mL 无菌水(ddH₂O)的 4 mL 已灭菌 EP 管中,用研磨棒充分

研磨匀浆。取 10^{-3} 、 10^{-5} 、 10^{-7} 这 3 个梯度稀释液各 100 μ L,均匀涂布于 LB、MRS、CA 这 3 种培养基,置于 37 °C 恒温培养 24 h,挑取单菌落进行 4–5 次划线培养以获得纯培养。最后,将分离得到的菌株根据菌落形态特征和革兰氏染色结果进行初步鉴定并编号,置于–80 °C 冰箱中保存备用。

1.4 产细菌素细菌的筛选

将编号的各菌株以 2%的接种量接种于对应培养基中,于 37 °C、150 r/min 恒温培养 24 h 后,置于 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,弃去沉淀。通过 0.22 μ m 的微孔滤膜进一步去除菌体细胞,得到不同菌株的无细胞培养液。随后参照以往实验方法^[13],采用牛津杯双层平板法筛选得到具有抑制重要鱼类致病嗜水气单胞菌(10^7 CFU/mL)的产细菌素细菌。以等量高温灭活(1×10^5 Pa, 2 h)后的各菌株对应发酵液上清作为对照^[13],每组进行 3 次重复实验,以进一步明确各菌株的抑菌活性。后续研究选择抑菌活性最佳的菌株进行。

1.5 产细菌素细菌的 DNA 提取与菌种鉴定

将具有抑制嗜水气单胞菌的产细菌素细菌,按照基因组 DNA 提取试剂盒的操作说明进行细菌基因组 DNA 提取^[12]。16S rRNA 基因序列的 PCR 扩增利用引物 27F (5'-AGAGTTTGAT CMTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGGYTAC CTTGTTACGACTT-3')。PCR 反应体系(20 μ L): 2×Mix 10 μ L, DNA 模板(50 ng/ μ L) 1 μ L, 正、反向引物(5 μ mol/L)各 1 μ L, ddH₂O 补足至 20 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 50 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 扩增产物经琼脂糖电泳后送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。测序结果在 NCBI 数据库利用 BLAST 进行同源性比对,选取序列一致性在 99%以上的细菌种类作为目标物种。

1.6 细菌素的纯化与浓度测定

将筛选得到抑制嗜水气单胞菌活性最佳的菌株(唾液乳杆菌 S01)接种于 MRS 液体培养基中, 37 °C、150 r/min 恒温摇床中培养 24 h 后, 置于 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液。使用 0.22 μm 的微孔滤膜进一步去除菌体细胞, 将具有抑菌活性的无细胞上清液参照文献[6]的细菌素纯化方法, 通过 ÄKTA Pure 结合 Superdex 30 Increase 进行纯化。洗脱方法: 平衡体积为 2 个柱体积(column volume, CV), 在 pH 6.2 条件下洗脱, 洗脱体积为 1.5 CV, 通过 UV 280 nm 处检测细菌素含量, 流速设为 0.3 mL/min, 每 1.0 mL 为一管进行收集。随后, 借助牛津杯双层平板法测定收集液抑菌活性。收集初次纯化产物并将具有抑菌活性的洗脱液再次通过 Superdex 30 Increase 进行二次纯化, 并测定其抑菌活性。最后, 将收集测定得到的抑菌活性液体(以下简称 LSP01)进行冷冻干燥, 保存于 4 °C 冰箱中备用。细菌素蛋白浓度测定: 取 1 mg 干粉溶于 1 mL ddH₂O 中, 按照 BCA 蛋白检测试剂盒操作方法绘制标准曲线, 测定得到每毫升溶液中的蛋白含量, 实验重复 3 次。

1.7 细菌素 LSP01 的抑菌特性

1.7.1 细菌素 LSP01 酶敏感性

分别向细菌素 LSP01 中加入终浓度为 1 mg/mL 的不同蛋白酶溶液(胃蛋白酶、胰蛋白酶、碱性蛋白酶、蛋白酶 K、木瓜蛋白酶、过氧化氢酶), 于 37 °C 恒温水浴 2 h 后, 80 °C 水浴 10 min 使酶变性失活。以未加酶处理的细菌素溶液作为对照, 实验重复 3 次。

1.7.2 细菌素 LSP01 的热、酸碱稳定性分析

将细菌素 LSP01 溶液分别按以下处理进行细菌素的热、酸碱稳定性测定: (1) 0、37、60、80、100、121 °C 处理 30 min 后, 自然冷却至室温; (2) 以 1 mol/L 的 HCl 或 NaOH 溶液调节 pH 值为 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0, 分别置于

37 °C 温育 2 h 后调回 pH 6.5。以未经处理的细菌素 LSP01 溶液作为对照, 实验重复 3 次。

1.7.3 细菌素 LSP01 抑菌谱评估

基于牛津杯双层平板法检测细菌素 LSP01 溶液对 12 种指示致病菌株(大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、福氏志贺氏菌、铜绿假单胞菌、霍乱沙门氏菌、副溶血弧菌、无乳链球菌、产酸克雷伯氏菌、维氏气单胞菌、嗜水气单胞菌、弗氏柠檬酸杆菌、土生拉乌尔菌)的抑制效果。以灭活后(1×10^5 Pa, 2 h)的细菌素 LSP01 溶液作为对照实验, 实验重复 3 次。

1.7.4 细菌素 LSP01 的 MIC 值测定

细菌素 LSP01 对嗜水气单胞菌的 MIC 值测定参照文献[9]。首先, 将细菌素 LSP01 (1.0 mg/mL) 在无菌 PBS (pH 7.2) 中连续稀释, 并将 10 μL 的不同浓度稀释液与 90 μL 含嗜水气单胞菌(10 μL) 的 LB 培养基混合, 在 37 °C 孵育 24 h 后, 于 OD₆₀₀ 处测定吸光度, 每组重复 3 次。LSP01 的 MIC 定义为: 细菌素 LSP01 处理嗜水气单胞菌, 在 37 °C 培养 24 h 后测定能够完全抑制指示菌生长的浓度, 实验重复 3 次。

1.8 细菌素 LSP01 抗嗜水气单胞菌的抑菌机制

1.8.1 细胞通透性测定

细菌素 LSP01 作用于嗜水气单胞菌后的细胞膜通透性的测定: 将 1.0 mL 嗜水气单胞菌(10^7 CFU/mL) 添加到 24 孔板中, 加入终浓度为 0.5 mg/mL 的细菌素 LSP01 溶液, 利用 LB 液体培养基补齐至 2 mL, 置于 37 °C 恒温培养箱中孵育 20 min; 将处理后的嗜水气单胞菌于 8 000 r/min 离心 5 min, 收集得到菌体; 利用 0.85% 的氯化钠溶液悬浮后, 再于 8 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, 重复此步骤 3 次; 清洗后的菌体中再加入 100 μL 0.85% 的氯化钠溶液, 按照 ABP 试剂盒(ABP biosciences, Rockville, USA)的步骤加入 NucView Green 和 Propidium

Lodide 染料各 1.0 μL , 黑暗处染色 15 min, 置于荧光倒置显微镜下观察。以未加细菌素 LSP01 相同处理的嗜水气单胞菌菌体作为对照, 实验重复 3 次。

1.8.2 XTT 还原实验

细菌素 LSP01 作用于嗜水气单胞菌后的代谢活性的测定: 根据 XTT 分析试剂盒的操作说明, 将 100 μL 浮游嗜水气单胞菌(10^7 CFU/mL) 添加到 96 孔板中, 加入终浓度为 0.5 mg/mL 的细菌素 LSP01 溶液, 利用 LB 液体培养基补齐至 200 μL , 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中孵育 1 h; 然后将 10 μL 的 XTT 染色剂添加到每个孔中, 再于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 其中 XTT 反应和介质的吸光度分别在 450 nm 和 600 nm 处测量; 最后根据试剂盒操作说明, 以 XTT 反应的吸光度(OD_{450})减去介质的吸光度(OD_{600}), 得到嗜水气单胞菌的最终代谢活性。以未加细菌素 LSP01 相同处理混合物作为对照, 实验重复 3 次。

1.8.3 扫描电子显微镜观察

细菌素 LSP01 作用于嗜水气单胞菌后的显微结构观察: 将嗜水气单胞菌活化至对数期(10^7 CFU/mL), 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、4 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, PBS (pH 7.4)洗脱 3 次; 实验组中加入 1.0 mL 终浓度为 0.5 mg/mL 的细菌素 LSP01 溶液, 对照组加入灭活的 1.0 mL 终浓度为 0.5 mg/mL 的细菌素 LSP01 溶液, 均分别置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h 后, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、4 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 2 mL PBS 洗脱 3 次; 利用 2 mL 的 2.5%戊二醛溶液固定 6 h 以上, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、4 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体, PBS 洗脱 3 次; 利用 1.0 mL 的 30%、50%、60%、70%、80%、90%乙醇按次序分别梯度脱水 1 次, 再利用无水乙醇脱水 2 次, 每次脱水 20 min; 将脱水后的菌体均匀涂布到 10 mm \times 10 mm 硅片上(反光面), 自然干燥 24 h, 将含有菌体的硅片用双

面胶固定到样品台上, 按顺序放入离子溅射金仪器中 250 s 后取出, 进行 SEM 观察。

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 \pm 标准差(SD)方式呈现。利用 Origin 9.0 和 IBM SPSS 25.0 统计软件分别对数据进行整理分析。数据对之间显著性检验利用 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)测验差异显著性。显著性水平阈值 $P=0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 滇池金线鲃肠道细菌的分离

依据菌落大小、形状及颜色等表观特征, 从滇池金线鲃肠道中分离获得了 84 株细菌, 其中 LB 培养基上 33 株、MRS 培养基上 15 株、CA 培养基上 36 株。大部分单菌落呈圆形、椭圆形, 部分为圆饼状; 菌落表面饱满, 少部分出现凹陷、褶皱; 菌落颜色大部分为白色、乳白色, 少部分为淡黄色。

2.2 产细菌素菌株的筛选

通过牛津杯双层平板法筛选得到 5 株对嗜水气单胞菌具有较高抑菌活性的菌株(图 1、表 1)。结果显示, 5 株菌对嗜水气单胞菌的抑菌直径范围在(12.89 \pm 0.17) mm–(29.21 \pm 0.25) mm 之间, 与对照相比均存在显著差异($P<0.05$)。乳酸菌属中的菌株 S49、S61 和 S01 对嗜水气单胞菌的抑菌活性分别为(18.90 \pm 0.26) mm、(18.32 \pm 0.37) mm 和(29.21 \pm 0.25) mm, 其中菌株 S01 的抑菌活性最佳, 因此选择该菌株作为后续主要研究对象。此外, 芽孢杆菌属中的菌株 S31 和 S22 抑菌活性次之, 分别为(12.89 \pm 0.17) mm 和(15.56 \pm 0.38) mm。

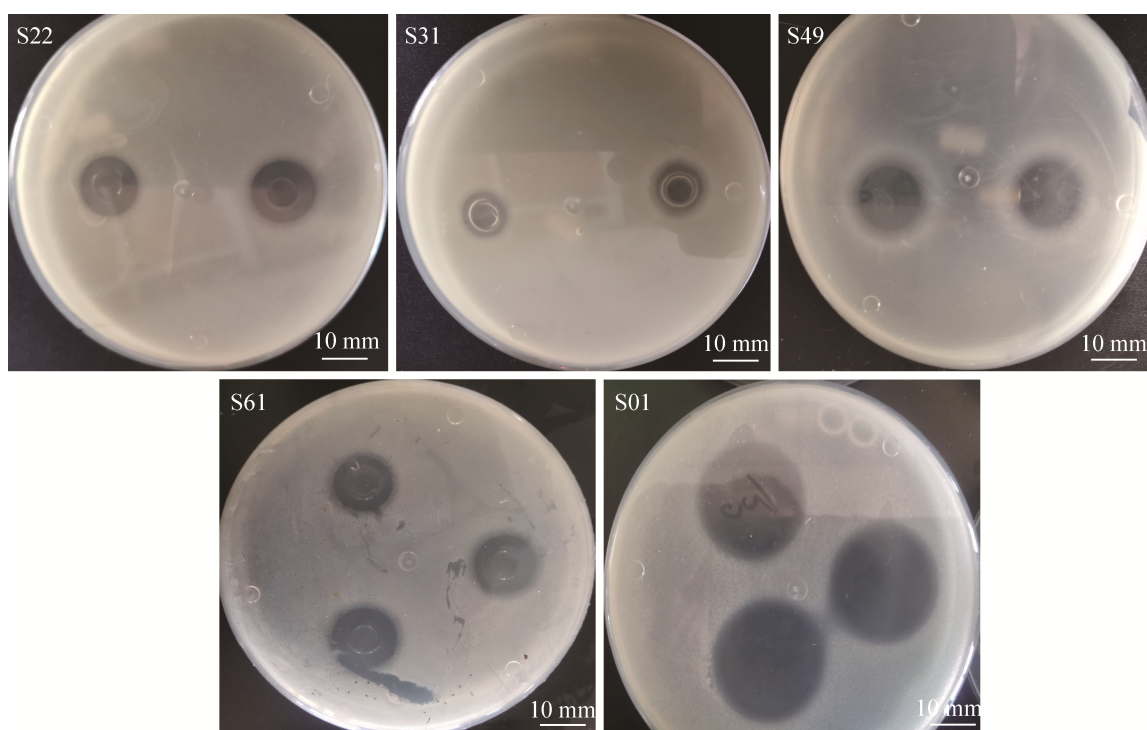


图 1 滇池金线鲃肠道产细菌素菌株的抑菌效果图

Figure 1 Inhibition effect of bacteriocin-producing bacteria in the intestine of *Sinocyelocheilus grahami* in Dianchi.

表 1 产细菌素菌株的抑菌活性

Table 1 Bacteriostatic effect of bacteriocin producing strains

编号	菌株	抑菌圈直径	对照组
No.	Strain	Diameter of bacteriostatic zone (mm)	Control group (mm)
S22	<i>Bacillus subtilis</i>	15.56±0.38*	8.05±0.07
S31	<i>Bacillus subtilis</i>	12.89±0.17*	8.02±0.03
S49	<i>Lactobacillus sakei</i>	18.90±0.26*	8.07±0.06
S61	<i>Lactobacillus sakei</i>	18.32±0.37*	8.04±0.06
S01	<i>Lactobacillus salivarius</i>	29.21±0.25*	8.06±0.05

注：*：差异显著($P<0.05$)

Note: *: Significant difference ($P<0.05$).

2.3 产细菌素细菌鉴定

经牛津杯双层平板法筛选后，将获得的 5 株具有明显抑制嗜水气单胞菌活性细菌的 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% 以上的细菌种类确定为目标物种。经 16S rRNA 基因序列分子鉴定后，发现 5 株菌

属于 2 个属的 3 个不同种细菌，分别是芽孢杆菌属中的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和乳杆菌属中的唾液乳杆菌(*Lactobacillus salivarius*)、沙克乳杆菌(*Lactobacillus sakei*)。

2.4 细菌素 LSP01 的抑菌特性

2.4.1 细菌素 LSP01 酶敏感性

将抑菌活性最佳菌株 S01 产生的抑菌活性物质 LSP01 经多种酶溶液处理后，使用牛津杯

双层平板法进行抑菌效果检测, 结果如图 2 所示。结果发现, 经过氧化氢酶处理后的 LSP01, 抑菌圈直径与未加过氧化氢酶的对照相比, 抑菌圈直径并未显著减小($P>0.05$), 排除了过氧化氢是主要的抑菌活性物质。蛋白酶 K 和木瓜蛋白酶处理后, LSP01 抑菌活性分别显著下降了 35.26% 和 25.38% ($P<0.05$); 经碱性蛋白酶、胃蛋白酶和胰蛋白酶处理后, LSP01 抑菌活性也发生了显著下降($P<0.05$), 而且抑菌活性均低于 30%。

2.4.2 细菌素 LSP01 热、酸碱耐受性测试

对获得的细菌素 LSP01 进行热稳定性与酸碱耐受测试。结果发现, LSP01 在 0 °C 处理 30 min 后抑菌活性未发生明显变化; 在 37–121 °C 范围内处理 30 min 后, 随着温度的升高抑菌活性逐渐下降, 在高温区段(80、100、121 °C)中活性损失的幅度最大; 在 80 °C 时抑菌活性为 $81.93\% \pm 2.79\%$, 与对照组相比出现了显著差异($P<0.05$); 在 121 °C 时抑菌活性最低, 仅为 $45.36\% \pm 1.86\%$ (图 3A)。此外, 在过酸(pH 2.0)和过碱(pH 10.0)处理后 LSP01 仍保持较高抑菌活性, 在 pH 2.0–6.0 时 LSP01 对嗜水气单胞菌

的抑菌活性未发生显著下降($P>0.05$); 但随着 pH 值的逐渐上升, 在 pH 8.0–12.0 时抑菌活性出现了大幅度下降, 在 pH 12.0 时达到最低, 仅保持了 $38.92\% \pm 1.60\%$ 的抑菌活性, 与对照组相比存在显著差异($P<0.05$)(图 3B)。

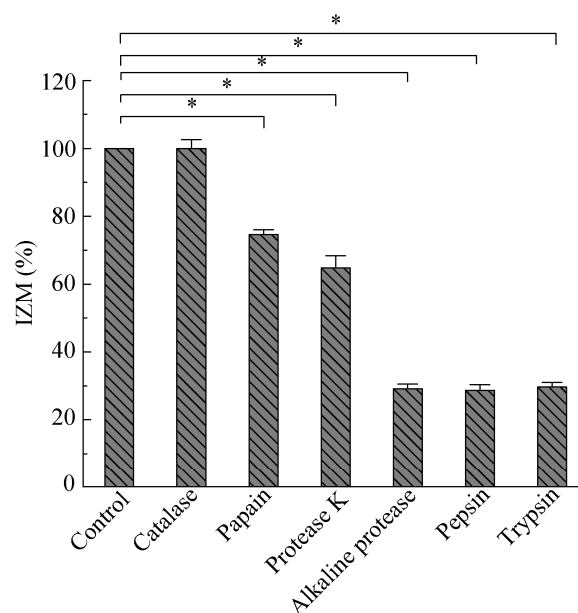


图 2 LSP01 的酶敏感性 *：显著下降($P<0.05$)

Figure 2 Enzyme sensitivity of LSP01. *: Significant decline ($P<0.05$).

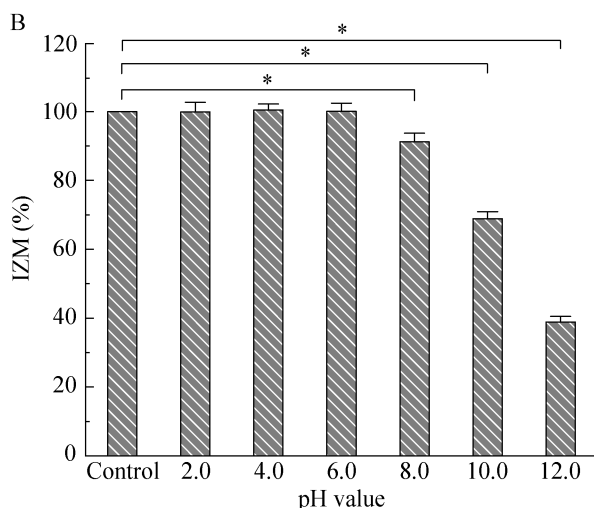
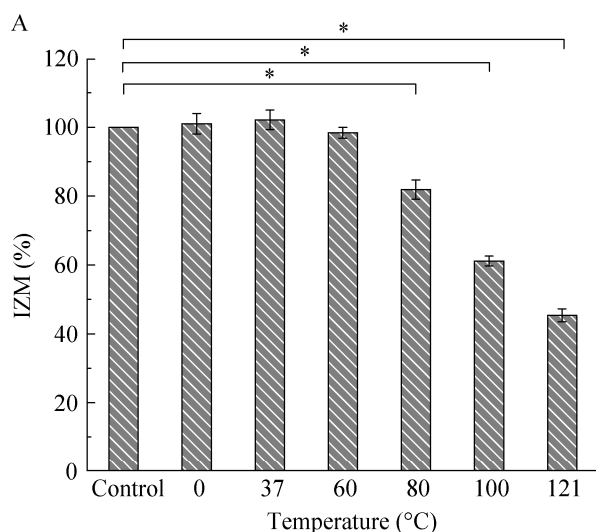


图 3 LSP01 的热稳定性(A)与酸碱耐受性(B) *：显著下降($P<0.05$)

Figure 3 Thermal stability (A) and acid-base tolerance (B) of LSP01. *: Significant decline ($P<0.05$).

2.4.3 细菌素 LSP01 的抗菌谱与 MIC 测定

将经过 ÄKTA Pure 及 Superdex 30 Increase 纯化得到的具有抑菌活性的细菌素 LSP01, 在进行冷冻干燥后溶出, 测定得到 LSP01 对嗜水气单胞菌的最小抑菌浓度为 11.06 $\mu\text{g/mL}$ 。同时, 对细菌素 LSP01 进行广谱抑菌效果测定。结果发现, LSP01 对所选择的 12 株重要鱼类、食源性 & 人畜共患致病菌显示出了不同程度的抑制效果。LSP01 对大肠杆菌、霍乱沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、福氏志贺氏菌等 4 种食源性致病菌的抑制效果较明显, 抑菌圈直径达到了 20 mm 以上, 尤其是 LSP01 对金黄色葡萄球菌的抑菌效果最好, 为 (26.36 ± 0.66) mm; LSP01 对铜绿假单胞菌、产酸克雷伯氏菌、土生拉乌尔菌这 3 种人畜共患致病菌的抑菌效果也均达到 24 mm 以上, 对产酸克雷伯氏菌抑菌最佳, 为 (27.16 ± 0.36) mm; 此外, LSP01 对 5 种典型鱼类致病菌副溶血弧菌、维氏气单胞菌、嗜水气单胞菌、弗氏柠檬酸杆菌、无乳链球菌表现出了相对更优的抑菌效果, 抑菌圈直径均达到 25 mm 以上(表 2)。

2.5 细菌素 LSP01 抗嗜水气单胞菌的抑菌机制

2.5.1 细胞膜通透性与 XTT 实验

将嗜水气单胞菌经 LSP01 处理后, 观察其细胞膜通透性变化。结果发现, 对照组(图 4A)中呈现出大面积的绿色荧光且几乎未检测到红色荧光出现, 而处理组(图 4B)中检测到大量红色、黄色荧光和少量绿色荧光。此外, 借助 XTT 实验测定细胞代谢活性, 结果发现, 经 LSP01 处理后的嗜水气单胞菌代谢活性显著下降 ($P < 0.05$), OD_{450} 减去 OD_{600} 吸光度值由 (1.093 ± 0.070) 下降至 (0.396 ± 0.090) (图 4C)。

2.5.2 SEM 观察细菌素 LSP01 对嗜水气单胞菌的作用

为进一步观察细菌素 LSP01 处理后嗜水气单胞菌的显微结构变化, 利用 LSP01 处理嗜水气单胞菌 1 h 后, 在 SEM 下观察嗜水气单胞菌菌体细胞显微形态变化(图 5)。结果显示, 对照组(图 5A、5B)中嗜水气单胞菌的菌体细胞呈现出均匀一致的短杆状结构, 菌体细胞边缘整齐, 轮廓清晰, 细胞结构完整丰满, 为典型嗜水气

表 2 LSP01 细菌素抑菌谱

Table 2 Antibacterial spectrum of bacteriocin LSP01

菌株	抑菌圈直径	对照组
Strain	Diameter of bacteriostatic zone (mm)	Control group (mm)
<i>Escherichia coli</i>	21.24 \pm 0.31	8.06 \pm 0.11
<i>Salmonella choleraesuis</i>	22.31 \pm 0.34	8.02 \pm 0.07
<i>Shigella flexneri</i>	25.67 \pm 0.23	8.07 \pm 0.09
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24.11 \pm 0.14	8.03 \pm 0.04
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	25.14 \pm 0.35	8.01 \pm 0.07
<i>Staphylococcus aureus</i>	26.36 \pm 0.66	8.03 \pm 0.08
<i>Streptococcus agalactiae</i>	27.47 \pm 0.24	8.06 \pm 0.11
<i>Klebsiella oxytoca</i>	27.16 \pm 0.36	8.01 \pm 0.07
<i>Aeromonas veronii</i>	25.54 \pm 0.43	8.03 \pm 0.13
<i>Aeromonas hydrophila</i>	29.21 \pm 0.25	8.06 \pm 0.07
<i>Citrobacter freundii</i>	25.77 \pm 0.38	8.09 \pm 0.07
<i>Raoultella terrigena</i>	24.12 \pm 0.16	8.03 \pm 0.12

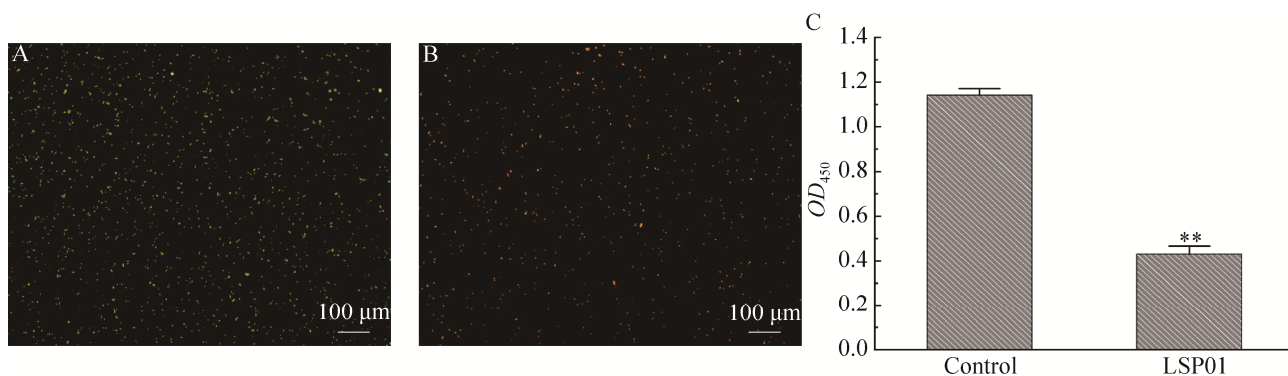


图 4 LSP01 对细胞膜通透性(A、B)和细胞还原力的影响(C) **：显著下降($P<0.01$)

Figure 4 The effect of LSP01 on cell membrane permeability (A, B) and cell reducing power (C). **: Significant decline ($P<0.01$).

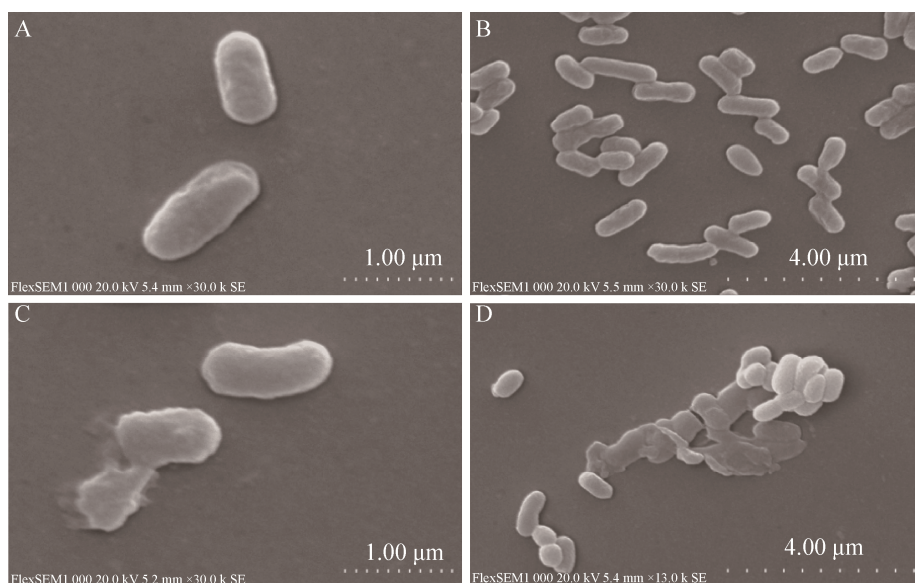


图 5 LSP01 作用前后的嗜水气单胞菌的 SEM 观察 A1 和 A2：对照；B1 和 B2：处理

Figure 5 SEM observation of *Aeromonas hydrophila* before and after LSP01. A1, A2: Control; B1, B2: Treatment.

单胞菌显微细胞形态；而实验组(图 5C、5D)中嗜水气单胞菌菌体细胞有明显内容物溶出，菌体轮廓模糊，菌体出现孔洞，而且大部分菌体结构明显被破坏，出现菌体破裂。

3 讨论与结论

本研究以滇池金线鲃的保护与资源开发为导向^[6]，从其肠道中分离获得产细菌素菌株，经

形态观察和 16S rRNA 基因序列分子鉴定发现产细菌素菌株主要是芽孢杆菌属和乳杆菌属细菌。这一结果与目前诸多鱼类肠道中挖掘得到的肠道菌群产细菌素细菌资源具有相似性^[14-15]，由此也说明乳酸菌属和芽孢杆菌属的细菌对于维持鱼类肠道细菌平衡和健康具有重要作用。同时，筛选得到的产高活性细菌素细菌中，主要是以乳酸菌属为主，其中唾液乳杆菌 S01 所产细菌素

LSP01 显示出了良好的抑菌效果,推测可能是由于嗜水气单胞菌与唾液乳杆菌两者都来自滇池金线鲃肠道中且长期对抗的结果^[16-17]。虽然筛选获得的芽孢杆菌比乳酸菌对指示菌的抑菌活性较差,但仍表现出较高的抑菌活性^[17-20],显现出滇池金线鲃肠道来源的产细菌素细菌具有高效抑制嗜水气单胞菌的能力。因此,本研究在挖掘滇池金线鲃肠道产细菌素菌种资源的同时,也为利用功能性益生菌对滇池金线鲃肠道健康的构建及保护滇池金线鲃提供了一定的理论基础。

细菌素的抑菌特性优良与否,往往决定着该细菌素的应用潜能^[6,21]。本研究以滇池金线鲃肠道内病原菌嗜水气单胞菌作为指示菌,评估抑菌活性最佳菌株 S01 所产 LSP01 的抑菌特性。结果发现,LSP01 经过氧化氢酶处理后,其抑菌活性并未发现明显下降($P>0.05$),排除了过氧化氢酶的干扰^[6]。经过多种蛋白酶溶液处理后,LSP01 对嗜水气单胞菌的抑菌活性显著下降,推测唾液乳杆菌所产生的 LSP01 是一类蛋白质^[13]。同时,LSP01 在 pH 值低于 8.0 和温度低于 80 °C 处理后,抑菌活性未出现显著下降,显示出了较宽泛的酸碱、热耐受能力^[22-23]。LSP01 经过 pH 值高于 8.0 和温度高于 80 °C 处理后,抑菌活性随着 pH 值和温度的上升而快速下降,在 pH 12.0 和温度为 121 °C 时达到最低,与对照相比分别仅保留了 $45.36\%\pm 1.86\%$ 和 $38.92\%\pm 1.60\%$,受到了碱和高温条件的影响。这可能是由于 LSP01 是一类蛋白或多肽,在过碱和高温处理后,蛋白结构被破坏致使其变性失活^[24-25]。虽然细菌素 LSP01 受到了过碱和高温的影响,但相比其他细菌素同 pH 值和温度处理后,其残留抑菌活性明显优于目前所发现的大多数细菌素^[26-27],显示出了良好的应用潜能。另外,LSP01 的 MIC 仅为 11.06 $\mu\text{g/mL}$,这与 De Sousa 等报道的经典人源抗菌肽 LL-37 (MIC 值为 250 $\mu\text{g/mL}$) 和大多数细

菌源抗菌肽抑制嗜水气单胞菌的 MIC 值相比更低^[28-30]。此外,利用不同类型致病菌评估细菌素 LSP01 的抑菌谱后发现,细菌素 LSP01 不仅能够对鱼类致病菌显示出良好的抑菌活性,对于人畜共患致病菌和食源性致病菌也能够有效抑制,抑菌圈直径均高于 20 mm,显示出了良好的广谱抑菌特性^[31-32]。因此,本研究从滇池金线鲃肠道细菌中获得的 LSP01,具有抑菌活性高、酸碱耐受性及热稳定性强等特点,还能够有效地抑制多种病原菌,显示出了优良的应用潜能。

嗜水气单胞菌是一种原发条件性病原菌,在鱼类养殖与生存过程中危害极大^[10]。本研究为进一步了解 LSP01 对嗜水气单胞菌所造成的抑制或杀灭机制,首先,以终浓度为 0.5 mg/mL 的 LSP01 处理嗜水气单胞菌后,通过 NucView Green 和 Propidium Iodide 染色荧光显微观察处理后的嗜水气单胞菌在荧光显微镜视野下呈现出大量的红色和黄色荧光菌落。这代表 LSP01 处理后会提升指示菌细胞膜通透性,而细胞膜通透性上升可能也会对细胞内部结构造成极大破坏^[6];同时,XTT 实验显示以 0.5 mg/mL 的 LSP01 处理后细胞活性显著下降了 73% ($P<0.05$),而短杆乳酸菌 DF01 粗提物处理大肠杆菌和鼠伤寒沙门氏菌后细胞活力分别仅下降了 29% 和 30%^[33],这表明 LSP01 导致嗜水气单胞菌的细胞活性出现了大幅下降,表现出极强的抑制效果;此外,SEM 观察结果显示,LSP01 在嗜水气单胞菌细胞膜上形成孔道,使细胞液溶出,外部液体进入,甚至导致整个细胞破裂,最后造成细胞死亡^[6,8]。因此,LSP01 对嗜水气单胞菌主要是通过增加细胞膜通透性、降低代谢活性及破坏细胞结构等多方面协调发挥作用,从而导致嗜水气单胞菌受到抑制和杀伤。

本研究首次对滇池金线鲃肠道产细菌素细

菌进行分离鉴定, 获得了 5 株抑菌活性优良的产细菌素菌种, 在一定程度上丰富了对滇池金线鲃肠道内微生物资源的认识。同时, 挖掘得到的 LSP01 显示出了较强的抑菌活性和热、酸碱耐受能力, 对鱼类、食源性与人畜共患致病菌均具有良好的抑菌效果, 特别是 LSP01 能够通过破坏细胞结构、降低细胞膜通透性及细胞代谢活性等方式有效抑制或杀伤嗜水气单胞菌。研究结果在一定程度上丰富了人们对滇池特有鱼种肠道菌群的认识, 也为挖掘产细菌素菌种资源提供了新途径。此外, 本研究虽然得到了滇池金线鲃肠道内部分产细菌素菌种资源, 但动物肠道内为厌氧环境, 其肠道内极有可能还存在大量厌氧或兼性厌氧的微生物资源。下一步将使用更多具有特异性的培养基及培养设备结合高通量测序数据, 对滇池金线鲃肠道微生物资源进一步开发, 以得到更丰富的微生物资源, 也为滇池金线鲃的种质资源保护提供一定的研究基础。

REFERENCES

- [1] Zhang YW, Wang XA, Yang JX, Pan XF. Growth performance and ploidy differences in reciprocal hybrids of Dianchi golden-line barbel (*Sinocyclocheilus grahami*) and barbless carp (*Cyprinus pellegrini*)[J]. Aquaculture Research, 2021, 52(3): 1332-1335
- [2] Yang J, Pan X, Li Z. Preliminary report on the successful breeding of the endangered fish *Sinocyclocheilus grahami* endemic to *Sinocyclocheilus grahami*[J]. Zoological Research, 2007, 28(3): 329-331
- [3] Zhang QL, Dong ZX, Luo ZW, Zhang M, Deng XY, Guo J, Wang F, Lin LB. The impact of mercury on the genome-wide transcription profile of zebrafish intestine[J]. Journal of Hazardous Materials, 2020, 389: 121842
- [4] Zhang QL, Li HW, Wu W, Zhang M, Guo J, Deng XY, Wang F, Lin LB. The response of microbiota community to *Streptococcus agalactiae* infection in zebrafish intestine[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2848
- [5] 张麒麟, 江宇航, 董志祥, 罗智文, 林连兵. 汞暴露对斑马鱼肠道菌群结构和肝脏抗氧化指标的影响[J]. 生态环境学报, 2020, 29(8): 1645-1653
- Zhang QL, Jiang YH, Dong ZX, Luo ZW, Lin LB. Effects of mercury exposure on intestinal flora structure and liver antioxidant ability in adult zebrafish[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2020, 29(8): 1645-1653 (in Chinese)
- [6] Li HW, Xiang YZ, Zhang M, Jiang YH, Zhang Y, Liu YY, Lin LB, Zhang QL. A novel bacteriocin from *Lactobacillus salivarius* against *Staphylococcus aureus*: isolation, purification, identification, antibacterial and antibiofilm activity[J]. LWT, 2021, 140: 110826
- [7] 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
- [8] 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, 2021, 137: 110338
- [9] Ma ZX, Lee S, Fan PX, Zhai YT, Lim J, Galvão KN, Nelson C, Jeong KC. Diverse β -lactam antibiotic-resistant bacteria and microbial community in milk from mastitic cows[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, 105(5): 2109-2121
- [10] Islam MS, Yang XW, Euler CW, Han XQ, Liu JH, Hossen MI, Zhou Y, Li JQ. Application of a novel phage ZPAH7 for controlling multidrug-resistant *Aeromonas hydrophila* on lettuce and reducing biofilms[J]. Food Control, 2021, 122: 107785
- [11] Tsheten T, Tshering D, Gyem K, Dorji S, Wangchuk S, Tenzin T, Norbu L, Jamtsho T. An outbreak of *Aeromonas hydrophila* food poisoning in Deptsang village, Samdrup Jongkhar, Bhutan, 2016[J]. Journal of Research in Health Sciences, 2016, 16(4): 224-227
- [12] 江宇航, 蔡赛波, 李宏伟, 林连兵, 张麒麟. 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): 1437-1442
- Jiang YH, Cai SB, Li HW, Lin LB, Zhang QL. Isolation and identification of intestinal fungus and screening of cellulolytic fungus in *Dendrolimus houi* (Lepidoptera: Lasiocampidae)[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2020, 26(6): 1437-1442 (in Chinese)
- [13] 江宇航, 李宏伟, 杨晓洁, 林连兵, 张麒麟. 马尾松毛虫肠道产细菌素细菌的筛选及抑菌特性[J]. 微生物学通报, 2021, 48(1): 123-134
- Jiang YH, Li HW, Yang XJ, Lin LB, Zhang QL. Screening and antibacterial activity of bacteriocin-producing bacteria in intestine of *Dendrolimus punctatus*[J]. Microbiology China, 2021, 48(1): 123-134 (in Chinese)
- [14] Guimarães MC, Silva Guimarães AIC, Natori MM, Alarcon MFF, Dias DDC, Ishikawa CM, Tapia-Paniagua S, Moriñigo MÁ, Moyano FJ, Tachibana L. Oral administration of *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum* modulates the gut microbiota and increases the amylase activity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Aquaculture International, 2021, 29(1): 91-104
- [15] Ma CC, Guo HY, Chang HB, Huang S, Jiang SM, Huo DX, Zhang JC, Zhu XP. The effects of exopolysaccharides and exopolysaccharide-producing *Lactobacillus* on the intestinal microbiome of zebrafish (*Danio rerio*)[J]. BMC Microbiology, 2020, 20(1): 300
- [16] Zhou SX, Xia Y, Zhu CM, Chu WH. Isolation of marine *Bacillus* sp. with antagonistic and organic-substances-degrading activities and its potential application as a fish probiotic[J]. Marine Drugs, 2018, 16(6): 196
- [17] Zhao HB, Cai CE, Liu XY, Jiao BH, Chen B, Cai MH, He PM. Secondary metabolites of Antarctic fungi antagonistic to aquatic pathogenic bacteria[J]. Open Life Sciences, 2018, 13(1): 11-21
- [18] Zhang Y, Yang JM, Liu Y, Wu YQ, Fang ZJ, Wang YL, Sun LJ, Deng Q, Gooneratne R, Xiao LX. A novel bacteriocin PE-ZYB1 produced by *Pediococcus pentosaceus* zy-B isolated from intestine of *Mimachlamys nobilis*: purification, identification and its anti-listerial action[J]. LWT, 2020, 118: 108760
- [19] Lü X, Miao LH, Ma HH, Bai FL, Lin Y, Sun MT, Li JR. Purification, characterization and action mechanism of plantaricin JY22, a novel bacteriocin against *Bacillus cereus* produced by *Lactobacillus plantarum* JY22 from golden carp intestine[J]. Food Science and Biotechnology, 2018, 27(3): 695-703
- [20] Luo LL, Yi LH, Chen JX, Liu BF, Lü X. Antibacterial mechanisms of bacteriocin BM1157 against *Escherichia coli* and *Cronobacter sakazakii*[J]. Food Control, 2021, 123: 107730
- [21] Yan H, Lu YY, Li X, Yi YL, Wang X, Shan YY, Liu BF, Zhou Y, Lü X. Action mode of bacteriocin BM1829 against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*[J]. Food Bioscience, 2021, 39: 100794
- [22] Meng FQ, Zhu XY, Zhao HZ, Nie T, Lu FX, Lu ZX, Lu YJ. A class III bacteriocin with broad-spectrum antibacterial activity from *Lactobacillus acidophilus* NX2-6 and its preservation in milk and cheese[J]. Food Control, 2021, 121: 107597
- [23] Ng ZJ, Zarin MA, Lee CK, Phapugrangkul P, Tan JS. Isolation and characterization of *Enterococcus faecium* DSM 20477 with ability to secrete antimicrobial substance for the inhibition of oral pathogen *Streptococcus mutans* UKMCC 1019[J]. Archives of Oral Biology, 2020, 110: 104617
- [24] Drider D, Fimland G, Héchard Y, McMullen LM, Prévost H. The continuing story of class IIa bacteriocins[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2006, 70(2): 564-582
- [25] Tamoliūnas K, Galamba N. Protein denaturation, zero entropy temperature, and the structure of water around hydrophobic and amphiphilic solutes[J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2020, 124(48): 10994-11006
- [26] Golneshin A, Gor MC, Williamson N, Vezina B, Van TTH, May BK, Smith AT. Discovery and characterisation of circular bacteriocin plantacyclin B21AG from *Lactiplantibacillus plantarum* B21[J]. Heliyon, 2020, 6(8): e04715

- [27] Zhao RX, Lu YQ, Ran JJ, Li G, Lei S, Zhu Y, Xu BC. Purification and characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus rhamnosus* zrx01[J]. Food Bioscience, 2020, 38: 100754
- [28] 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
- [29] Yi LH, Li X, Luo LL, Lu YY, Yan H, Qiao Z, Lü X. A novel bacteriocin BMP11 and its antibacterial mechanism on cell envelope of *Listeria monocytogenes* and *Cronobacter sakazakii*[J]. Food Control, 2018, 91: 160-169
- [30] De Sousa EL, Assane IM, Santos-Filho NA, Cilli EM, De Jesus RB, Pilarski F. Haematological, biochemical and immunological biomarkers, antibacterial activity, and survival in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* after treatment using antimicrobial peptide LL-37 against *Streptococcus agalactiae*[J]. Aquaculture, 2021, 533: 736181
- [31] Peng SD, Song JJ, Zeng WY, Wang HW, Zhang Y, Xin JW, Suo HY. A broad-spectrum novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* SHY 21-2 from yak yogurt: purification, antimicrobial characteristics and antibacterial mechanism[J]. LWT, 2021, 142: 110955
- [32] Ye PX, Wang JW, Liu MM, Li P, Gu Q. Purification and characterization of a novel bacteriocin from *Lactobacillus paracasei* ZFM54[J]. LWT, 2021, 143: 111125
- [33] Kim NN, Kim WJ, Kang SS. Anti-biofilm effect of crude bacteriocin derived from *Lactobacillus brevis* DF01 on *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*[J]. Food Control, 2019, 98: 274-280