

# 发酵肠中一株细菌的 16S rDNA 鉴定及抗菌肽 Surfactin 对其芽孢灭活的效果

黄现青, 孟静南, 宋莲军, 乔明武

(河南农业大学食品科学技术学院, 河南省食品加工与流通安全控制工程技术研究中心, 河南郑州 450002)

**摘要:** 经过杀菌的发酵肠, 仍有部分会变质, 为探究其原因并进行控制而进行了以下试验。从商业发酵肠中分离获得 1 株耐热芽孢菌株 B1, 为构建控制技术, 提高发酵肠安全水平, 对该芽孢菌进行鉴定, 并研究抗菌肽 surfactin 对其芽孢生长曲线的影响及盐类对 surfactin 灭活芽孢效果的影响。采用 16S rDNA 序列分析对该菌进行鉴定, 并研究了不同浓度的 NaCl 和 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 对 surfactin 灭活芽孢效果的影响。结果表明, 该菌属蜡样芽孢杆菌属, 同源性相似度达 99%, 仅有 surfactin 对芽孢作用时, 不同浓度 (20、25、30、35 μg/mL) 的 surfactin 对其芽孢没有显著的杀灭作用, 与 NaCl 和 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 协同作用时, 3%、5%、9% 的 NaCl 可配合 50 μg/mL 和 100 μg/mL 的 surfactin 可有效杀灭芽孢, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 无此效果。该菌属于蜡样芽孢杆菌属, NaCl 与 surfactin 共同作用可有效杀灭蜡样芽孢杆菌的芽孢, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 无显著作用。

**关键词:** 发酵肠; 16S rDNA; 蜡样芽孢杆菌; 芽孢; 抗菌肽 surfactin

文章编号: 1673-9078(2019)02-126-133

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.2.018

## Identification of a Microorganism Strain Isolated from the Fermented Sausage by 16S rDNA Sequence Analysis and Effect of Antibacterial Peptide Surfactin on Spore Inactivation

HUANG Xian-qing, MENG Jing-nan, SONG Lian-jun, QIAO Ming-wu

(Henan Engineering and Technology Research Center of Safety Control of Food Processing and Circulation, College of Food Science and Technology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** To control the spoilage of fermented sausages after sterilization and assure safety of fermented sausage were, the microbes in spoiled sausages were detected and a microorganism strain B1 was isolated from the commercial fermented sausage. 16S rDNA sequence analysis showed that the B1 strain belongs to *Bacillus cereus*. The effect of antibacterial peptide surfactin on the spore growth curve and the effects of two salts NaCl and Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O on surfactin inactivation of spore were studied. No significant inactivating effect of surfactin with different concentrations (20~35 μg/mL) on the spores was found. However, the combined use of surfactin (50 and 100 μg/mL) and NaCl (3%, 5% and 9%) showed inactivation effects. The combined use of surfactin with Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O had no such effect.

**Key words:** fermented sausage; 16S rDNA; *Bacillus cereus*; spore; antibacterial peptide surfactin

发酵香肠是指将绞碎的肉和脂肪与糖、食盐、发酵剂、香辛料等混合, 再灌进肠衣, 经过微生物发酵而制成的具有典型发酵风味的肉制品<sup>[1]</sup>。发酵肠具有营养价值高、耐贮藏、风味独特等特点, 深受全国各地消费者的喜爱<sup>[2]</sup>。本研究所用的发酵肠在上述工艺基础之上, 以发酵肠的 pH=5.2 为发酵终点, 然后对乳酸菌灭活 (90 °C, 20 min)。为了确定灭菌后的发

酵肠中是否存在活菌影响发酵肠的安全, 作者所在的课题组对灭菌后的发酵肠进行了活菌检验, 并发现了一株芽孢菌, 然后对这株芽孢菌进行 16S rDNA 序列分析技术鉴定。

芽孢, 又称内生孢子, 是细菌休眠体<sup>[3]</sup>。产芽孢细菌在营养条件缺乏时, 在细胞内形成圆形或椭圆形的芽孢休眠体。芽孢含水量极低, 抗逆性强, 能经受高温、紫外线, 电离辐射以及多种化学物质灭杀等<sup>[4]</sup>。肉制品中残存的具有萌发能力的芽孢对肉制品的货架期和安全构成严重威胁, 尤为严重的是残留的病源性芽孢菌芽孢的影响<sup>[5]</sup>。目前, 国内外芽孢控制技术主

收稿日期: 2018-10-31

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31671916)

作者简介: 黄现青 (1977-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 肉品科学与食品安全

要是化学、物理手段,如紫外线照射、高压、微波、高温、臭氧、电子束辐射等方法<sup>[6-13]</sup>这些方法在商业化上存在应用难、耗能高、安全性差等缺陷,在食品行业中广泛应用受到限制,例如辐照技术仅在干制蔬菜和医疗用品上进行商业化应用。在肉制品行业对芽孢的控制仍然采用高温处理,这种手段虽然在肉类食品卫生及安全水平中起到了积极的作用,但是仍然存在破坏肉制品营养价值、风味及理化特性、高耗能、安全性差等弊端,已经明显滞后于肉制品工业快速发展的技术需求,严重制约了肉制品产业的快速发展。利用生物防腐剂灭活芽孢是解决这一重大难题的发展趋势,也是近年来的研究热点之一, surfactin, 又称为表面活性素,是由微生物发酵产生的一种脂肽类抗菌物质,属于抗菌肽,是生物防腐剂的一种,研究结果表明其不仅具有广谱的抗菌效果<sup>[14-16]</sup>,还有一定的杀灭微生物芽孢效果<sup>[17]</sup>。

基于生物性制剂替代化学性制剂能减少化学性污染,既能满足显著提高肉类产品安全水平和延长货架期的技术要求,又符合环保、安全、高效的行业发展趋势。因此本论文研究 surfactin 对发酵肠中分离出的芽孢菌的芽孢的灭活动力学及盐类对 surfactin 灭活芽孢效果的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试验材料

供试菌株由商业发酵肠中分离,命名 B<sub>1</sub>, surfactin 购自 SIGMA-ALDRICH。

### 1.2 主要试剂与仪器

2×Turbo Master Mix, 南京诺唯赞生物科技有限公司; 27F 和 1492R, 苏州泓迅生物科技股份有限公司; 0.5TAE 缓冲液、草酸铵结晶紫染色液、卢戈氏(Logol) 碘液、95%乙醇、番红、LB 肉汤、平板计数琼脂和其它常规试剂均为分析纯。

一步式细菌 DNAout 试剂盒, 北京天恩泽基因科技有限公司; DYY-6C 型电泳仪, 北京市六一仪器厂; PCR 仪, 北京东胜创新生物科技有限公司; 凝胶成像分析系统, 上海勤翔科学仪器有限公司; UNICO UV-2000 紫外可见分光光度计, 上海凌仪实业有限公司; 高速冷冻离心机, 力康生物医疗科技有限公司; 3730xl 测序仪, 美国 Applied Biosystems 公司; GF-M2000 型酶标仪, 山东高密彩虹分析仪器有限公司。

### 1.3 主要培养基

LB 肉汤培养基: 酵母浸粉 5 g、蛋白胨 10 g、NaCl 10 g、去离子水 1 L、pH 7.0±0.1。

平板计数琼脂: 胰蛋白胨 5.0 g、酵母浸粉 2.5 g、葡萄糖 1.0 g、琼脂 15 g、去离子水 1 L, 然后在直径为 9 cm 平皿中加入 15 mL 平板计数琼脂培养基制备平板。接种后于 37 °C 培养箱或者恒温摇床 150 r/min 振荡培养。

## 1.4 试验方法

### 1.4.1 菌的分离培养及菌落形态观察

按照无菌要求,从商业发酵肠中取样,划线培养,然后再对单菌落进一步平板分离培养。对分离培养的菌落拍照,并进行革兰氏染色鉴定<sup>[18]</sup>。

### 1.4.2 生长曲线测定

取分离培养的菌株,接种于灭菌的 LB 肉汤培养基中,分别于 0、2、4、8、12、24、36、48、72、96 h 取样于 546 nm 测定吸光度值,绘制菌株 B<sub>1</sub> 的生长曲线。

### 1.4.3 菌株的分子鉴定

#### 1.4.3.1 基因组 DNA 提取

取处于对数生长期的菌株培养液 1.5 mL 置于 2 mL 灭菌 EP 管中,12000 r/min 离心 10 min 收集菌体;然后参照北京天恩泽基因科技有限公司的一步式细菌 DNAout 提取试剂盒说明书操作。

#### 1.4.3.2 16S rDNA 目标片段的 PCR 扩增引物设计

根据原核微生物 16S rDNA 保守序列,人工合成 1 对通用引物,引物名称序列如下: 27F (5'-AGAGTT TGATCCTGGCTCA-3')、1492R (5'-GGTTACCTTGTT ACGACTT-3')。

50 μL PCR 反应体系: 模版 DNA 20 ng; 2×Turbo Master Mix 25 μL; 27F (20P) 和 1492R (20P) 各 2 μL; 加 DD H<sub>2</sub>O 至 50 μL。

PCR 反应步骤: ①94 °C 热启动变性 5 min; ②94 °C 变性 30 s; ③55 °C 退火 30 s; ④72 °C 延伸 90 s; ⑤重复②、③、④35 次; ⑥72 °C 延伸 5 min, 使扩增产物完整。

#### 1.4.3.3 16S rDNA PCR 扩增产物检测

用 0.5TAE 配制 1.2% 琼脂糖凝胶, 0.5TAE 为电泳缓冲液。以 DL 2.000 Marker 为分子量标准, 180 V 电泳 20 min。用 EB 染色 5 min 后紫外检测仪检测,并用凝胶成像系统拍照记录。

#### 1.4.3.4 DNA 序列测定及分析

将 PCR 反应扩增出的 16S rDNA 片段电泳分离纯化后,测序,利用 BLAST 软件将测得的基因序列与 GenBank 数据库进行序列比对分析,获得相似性最高

菌株, 然后对该菌进行初步分类<sup>[19]</sup>。

#### 1.4.3.5 芽孢菌悬液的制备<sup>[20]</sup>

将分离纯化后的菌种接入液体培养基, 37 °C、150 r/min 震荡培养至对数生长期, 然后接种含有 0.001% MnCl<sub>2</sub> 的营养琼脂平板上, 于 37 °C 培养 5 d, 至于室温放置 1~3 d, 镜检芽孢达 95% 以上, 用无菌 0.03 M 磷酸盐缓冲液 (pH=7.2) 洗下, 转入含有玻璃珠的瓶内, 振摇 5 min。将滤液放 80 °C 水浴 10 min 后, 离心 (5000 r/min, 15 min), 取沉淀物加无菌磷酸盐缓冲液 (pH=7.2) 配成 10<sup>9</sup> CFU/mL 芽孢菌悬液置 4 °C 冰箱备用, 使用前 (70 °C, 30 min) 灭活繁殖体。

#### 1.4.3.6 敏感性测试

牛津杯法<sup>[21]</sup>: 取浓度为 10<sup>5</sup> CFU/mL 的测试菌株芽孢菌悬液 1.0 mL 涂布 LB 琼脂平板, 然后将灭菌的牛津杯置于培养皿中。加入 0.2 mL 的 20、25、30、35 μg/mL 的 Surfactin 加入牛津杯中。将平板置于 37 °C 恒温箱中培养, 24 h 后取出观察, 测量抑菌圈的大小。

#### 1.4.3.7 最小抑菌浓度 (Minimal Inhibitory Concentrations, MIC) 测定

按照液体倍比稀释<sup>[22,23]</sup>的方法用酶标板对 Surfactin MIC 进行测定。

#### 1.4.4 数据统计与分析

采用 Excel 分别计算每个样品吸光度的平均值及标准差, 并作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 细菌的染色鉴定、生长曲线测定及菌落形态观察

#### 形态观察

经革兰氏染色, 在显微镜油镜下观察到菌体为大杆状, 呈革兰氏染色阳性。生长曲线测定呈典型“S”形, 菌落特征在普通琼脂平板上其菌落不透明、表面粗糙、似毛玻璃状或融蜡状, 边缘不整齐, 其孢子呈椭圆形。其生长曲线和菌落形态如图 1。

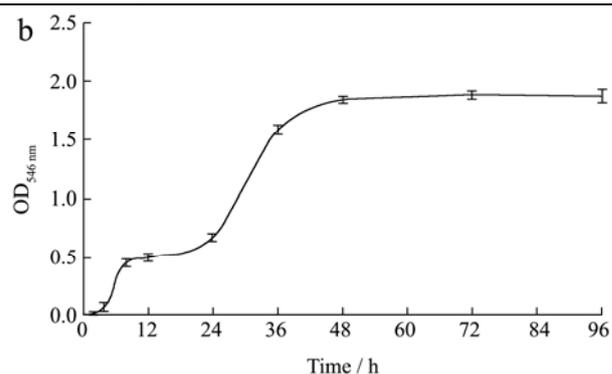
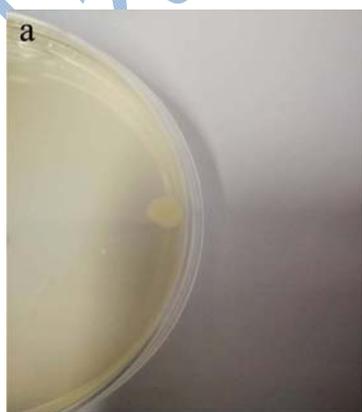


图 1 菌落形态 (a) 及生长曲线 (b)

Fig.1 Colony morphology (a) and growth curve of bacterial strain (b)

### 2.2 菌株的分子鉴定

#### 2.2.1 PCR 扩增产物检测结果

将从该菌中提取到的基因组 DNA 进行 PCR 扩增后经过 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 得到 1 条大小 1500 bp 左右的条带 (图 2)。

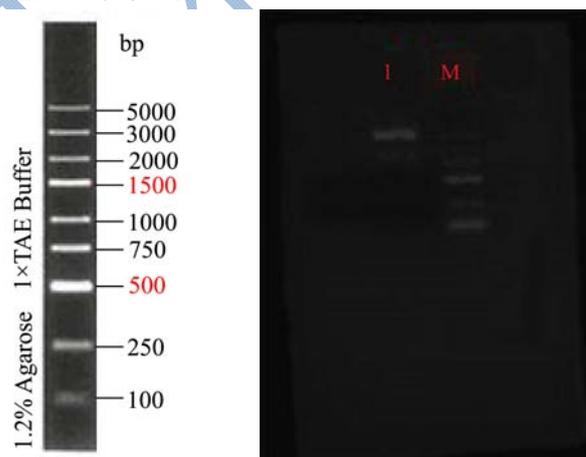


图 2 PCR 扩增产物检测

Fig.2 Detection of PCR amplification product

#### 2.2.2 16S rDNA 测序结果

将 B1 菌 16S rDNA 的 PCR 反应产物送至苏州泓迅生物科技股份有限公司进行测序, 测得 16S rDNA 全部序列共 1437 bp (图 3)。

使用 NCBI 网站对 B1 菌株的 16S rDNA 序列与数据库中各种菌的 16S rDNA 序列进行比对, 并使用 BLAST 在 GenBank 中进行同源性搜索, 所得结果中相似性最高的前 8 株菌株比较结果如表 1。

从表 1 可以看出, 通过 16S rDNA 序列同源性比较, 该菌株与 GenBank 中 8 株蜡样芽孢杆菌的 16S rDNA 序列相似性均达到 99%, 而且分值最高的大都为都蜡样芽孢杆菌。根据同源性比较结果, 可以初步确认 B1 菌为蜡样芽孢杆菌。根据 16S rDNA 序列同源性, 从 GenBank 中选择了 20 个菌株的 16S rDNA 基

因序列，应用 Clustalx 和 MEGA 7.0 软件进行多重比较后构建的系统发育树如图 4。由图 4 可知，B1 菌与蜡样芽孢杆菌 *Bacillus cereus* Chi 和 *Bacillus cereus*

DZ4 在一个分支中，且 B1 和枯草芽孢杆菌 *Bacillus cereus* Chi 的亲缘关系最近。故由形态和分子鉴定结果确定 B1 菌株为蜡样芽孢杆菌。

```

1 GCAGCTATACATGCAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATAGAAGTTAGCGG 59
60 CGGACGGGTGAGTAACACGTTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACC 119
120 GGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGC 179
180 TGTCACTTATGGATGGACCCGCTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAG 239
240 GCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC 299
300 AGACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGC 359
360 AACGCCGCTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAATACTGTTGTTAGGGAAGAACAA 419
420 GTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACGAGAAAGCCACGGCTAACTAC 479
480 GTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAA 539
540 GCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTC 599
600 ATTGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGA 659
660 AATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTAAGTAC 719
720 ACTGAGCGCGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTA 779
780 AACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAA 839
840 GCACTCCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAGGAATTGACGGGGGCCCG 899
900 CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG 959
960 ACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTACAGGTGGTG 1019
1020 CATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAGTCCCGAACGAGCGCAACC 1079
1080 CTTGATCTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCG 1139
1140 GAGGAAGTGGGGATGACGTCAAATCATATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGC 11993
1200 TACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGT 1259
1260 TCTCAGTTCG GATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGCTGGAACTGCTAGTAATCGC 1319
1320 GGATCAGCATCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCGTCAACCAC 1379
1380 GAGAGTTTGTAAACCCGAAGTGGTGGGTAACCTTTTGAGCCAGCCGCTAAGTGA 1437
    
```

图 3 B1 菌 16S rDNA 碱基序列

Fig.3 16S rDNA sequence of B1 strain

表 1 菌株 16S rRNA 序列同 NCBI Blast 中细菌菌株同源性比较

Table 1 Homology comparisons of 16S rDNA sequence between the strain and some bacteria in genbank

菌种名	中文名	菌株名	登录号	分值	相似性
<i>Bacillus cereus</i>	蜡样芽孢杆菌	DZ4	HQ143564.1	2628	99%
<i>Bacillus cereus</i>	蜡样芽孢杆菌	Chi	GQ280806.1	2627	99%
<i>Bacillus cereus</i>	蜡样芽孢杆菌	SH06	KP027636.1	2627	99%
<i>Bacillus cereus</i>	蜡样芽孢杆菌	CP1	JX544748.1	2627	99%
<i>Bacillus cereus</i>	蜡样芽孢杆菌	Ye33	KY317953.1	2625	99%
<i>Bacillus cereus</i>	蜡样芽孢杆菌	Se07	JN700112.1	2623	99%
<i>Bacillus cereus</i>	蜡样芽孢杆菌	9 julio	KM349186.1	2623	99%
<i>Bacillus cereus</i>	蜡样芽孢杆菌	Cr-50	JF895490.1	2621	99%

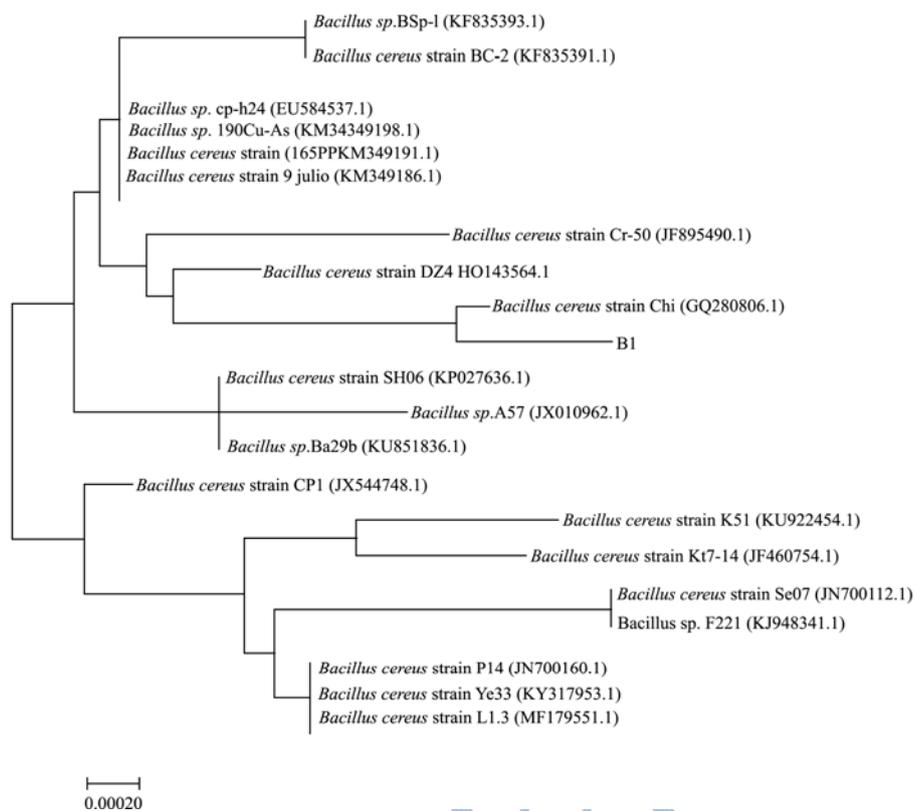


图4 基于16S rDNA基因序列B1的Neighbour-joining系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences showing the position of B1

### 2.3 Surfactin对蜡样芽孢杆菌芽孢的杀灭动力学

学

将制备好的芽孢菌悬液加入含有LB肉汤的酶标板中，并加入surfactin，使其最终浓度为20、25、30、35 μg/mL，于恒温震荡培养箱中培养（37℃，150 r/min），并在培养的0、2、4、8、12、24、36、48、72、96 h测OD<sub>546 nm</sub>值，绘制生长曲线如图5。

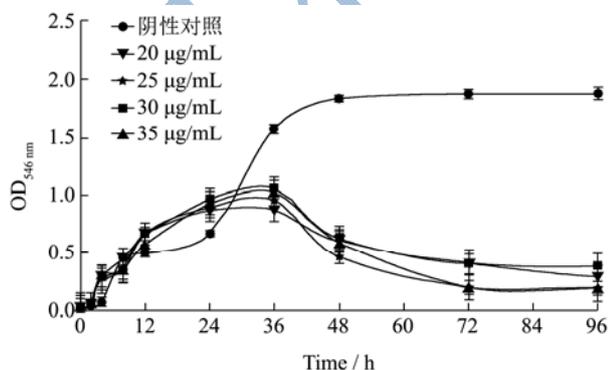


图5 Surfactin对蜡样芽孢杆菌芽孢灭活动力学曲线

Fig.5 Effect of surfactin on the spore of *Bacillus cereus* growth curve

由图5可知，与阴性对照相比，在培养的前36 h，加入surfactin的并不能有效杀灭芽孢，牛津杯实验结

果也显示surfactin浓度为20、25、30、35 μg/mL时，平板上并不能形成可见的抑菌圈，这表明该浓度的surfactin对芽孢较弱的作用源于surfactin的浓度较低。最小抑菌浓度（MIC）测定实验结果显示surfactin对芽孢的MIC范围在250~300 μg/mL，可验证该结论。而在芽孢萌发后surfactin对菌体有较明显的杀灭作用，在培养36 h之后，加入surfactin的分组吸光度开始下降，这表明菌液浓度在下降且降到较低水平，意味着菌体结构遭到破坏，这表明surfactin对菌体产生的作用不是抑制菌不能生长而是会破坏菌体结构从而达到杀灭菌体。

### 2.4 NaCl和Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O对surfactin灭活芽孢效果的影响

将制备好的芽孢菌悬液分别加入含有NaCl（浓度为1%、3%、5%、9%）和Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O（浓度为0.1%、0.3%、0.5%、0.9%）的灭菌LB肉汤，并加入surfactin，使其最终浓度为50 μg/mL和100 μg/mL，于恒温震荡培养箱中培养（37℃，150 r/min），并在培养的0、2、4、6、8、10、12、24、28、36 h分别测OD<sub>546 nm</sub>值，绘制生长曲线如图6和图7。

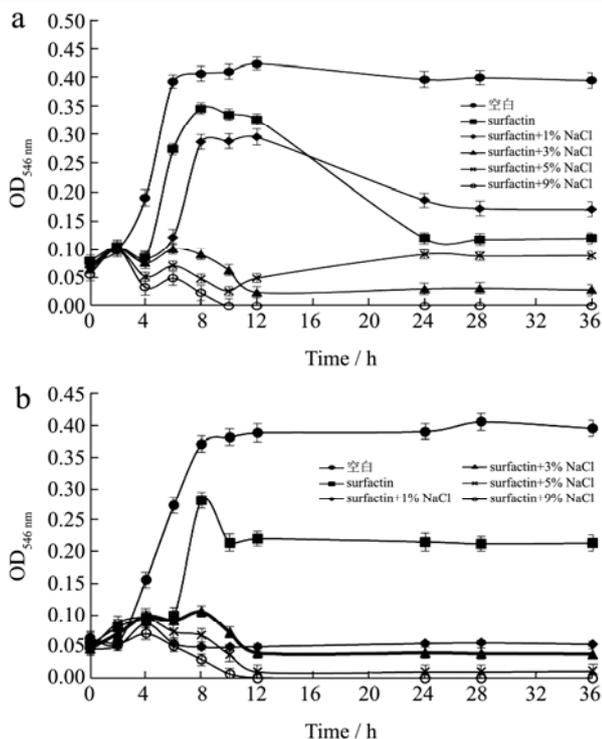


图6 NaCl对surfactin灭活蜡样芽孢杆菌芽孢效果的影响  
Fig.6 Effect of NaCl on surfactin inactivation spore of *Bacillus cereus*

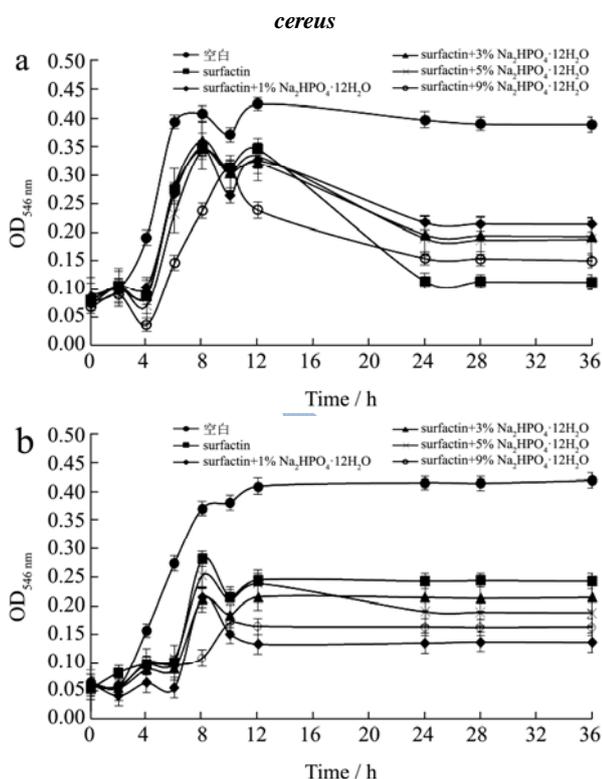


图7 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O对surfactin灭活蜡样芽孢杆菌芽孢效果的影响  
Fig.7 Effect of Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O on surfactin inactivation spore of *Bacillus cereus*

由图6a可知,在50 µg/mL的surfactin条件下,1%的NaCl对surfactin灭活蜡样芽孢效果与只添加

surfactin效果差异不大,这表明1%的NaCl对surfactin灭活蜡样芽孢效果的影响不明显,但没有单独的surfactin效果好。而3%、5%、9%的NaCl对surfactin灭活蜡样芽孢的影响效果显著,9%的NaCl效果最好,其次为3%,然后为5%。这三种浓度的NaCl可以从添加时就与surfactin共同作用,使芽孢培养液一直处于较低的吸光度值。这可能与NaCl溶液产生的渗透压有关。由图6b可知,在100 µg/mL的surfactin下,单独的surfactin组并不能从一开始有效抑制芽孢的萌发,而四种浓度的NaCl与surfactin共同作用,可使芽孢培养液的吸光度值一直处于较低,这表明芽孢的生长一直受到抑制,浓度处于不变或降低状态,说明1%、3%、5%、9%的NaCl对surfactin灭活蜡样芽孢效果的影响都比较显著,可作为surfactin灭活芽孢的辅助剂。

由图7a可知在surfactin浓度为50 µg/mL时,Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O对surfactin灭活蜡样芽孢效果影响不明显;由图7b可知,在surfactin浓度为100 µg/mL,含有Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O的培养液的吸光度值均略低于surfactin组,但培养液的吸光度值还是会先上升再下降,这表明在一定程度上,Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O可以同surfactin协同作用抑制菌体,但对芽孢的杀灭作用较弱。

### 3 讨论

在香肠发酵过程中,乳酸菌发酵糖的发酵产物为乳酸,随着发酵时间的延长,发酵肠的水分和pH都会下降,这种环境在一定程度上能抑制微生物的生长,此外,大多数乳酸菌能够产生细菌素,也可以抑制病原微生物<sup>[24]</sup>。但本研究所用的发酵肠在发酵一段时间之后,对乳酸菌进行灭活。在这样低酸性(pH>4.6)条件下真空度不足且长期储存在嗜温性温度下,发酵肠中的内容物有可能因为嗜温性需氧芽孢菌的生长繁殖而发生变质<sup>[25]</sup>。例如枯草芽孢杆菌<sup>[26]</sup>、巨大芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、肠膜芽孢杆菌等都属于这一类细菌,本研究的研究结论也可证明该观点。

目前surfactin研究主要集中在抗菌、抗病毒、抗寄生虫等方面,但关于其灭活芽孢效果及其机理研究较少。因此本研究初步进行surfactin对芽孢灭活的研究,研究结果发现,浓度过低的surfactin并不能有效杀灭芽孢,当其浓度达到100 µg/mL同时配合NaCl溶液,能够有效的杀灭芽孢,但Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O没有此作用,这可能与Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O的浓度较低有一定的影响。本研究通过液体倍比稀释法测得的surfactin对蜡样芽孢杆菌的芽孢的MIC值在范围250~300

$\mu\text{g/mL}$ , 但有研究表明<sup>[20]</sup>脂肽对蜡样芽孢杆菌的芽孢的 MIC 值为  $156.25 \mu\text{g/mL}$ , 这可能与该研究所用的脂肽有关, 该研究的脂肽主要包括 surfactin 和 fengycin 两种抗菌肽。

## 4 结论

4.1 该菌株为革兰氏阳性大杆菌, 生长曲线符合典型“S”形生长曲线, 经 16S rDNA 鉴定该菌为蜡样芽孢杆菌。

4.2  $20$ 、 $25$ 、 $30$ 、 $35 \mu\text{g/mL}$  的 surfactin 不能有效杀灭蜡样芽孢杆菌的芽孢, 但  $3\%$ 、 $5\%$ 、 $9\%$  的 NaCl 可与  $50 \mu\text{g/mL}$  和  $100 \mu\text{g/mL}$  的 surfactin 有效杀灭蜡样芽孢杆菌的芽孢。

## 参考文献

- [1] 张元生, 许益民. 微生物在肉类加工中的应用[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001  
ZHANG Yuan-sheng, XU Yi-min. Application of microorganisms in meat processing [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2001
- [2] 帅瑾. 传统自然发酵四川香肠中乳酸菌的分离、鉴定及其应用[D]. 四川农业大学, 2013  
SHUAI Jin. Isolation, Identification and application of lactic acid bacteria from traditional natural fermentation sausage in Sichuan [D]. Sichuan Agricultural University, 2013
- [3] Claus D, Berkley RCW. Genus *Bacillus* Cohn 1872, 174AL [C] // Sneath P H A, Mair N S, Sharpe M E, Holt JG (ed). Bergey's manual of systematics bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986, 2: 1105-1139
- [4] 王阶平, 刘波, 刘国红, 等. 芽孢杆菌系统分类研究最新进展[J]. 福建农业学报, 2017, 32(7): 784-800  
WANG Jie-ping, LIU Bo, LIU Guo-hong, et al. Recent advancements in taxonomy of bacillus-like bacteria [J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2017, 32(7): 784-800
- [5] Ahn J, Balasubramaniam V M, Yousef A E. Inactivation kinetics of selected aerobic and anaerobic bacterial spores by pressure-assisted thermal processing [J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 113(3): 321-329
- [6] Cho M, Gandhi V, Hwang T M, et al. Investigating synergism during sequential inactivation of MS-2 phage and *Bacillus subtilis* spores with UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> followed by free chlorine [J]. Water Research, 2011, 45(3): 1063-1070
- [7] De Lamo-Castellvi S, Ratphitagsanti W, Balasubramaniam VM, et al. Inactivation of *Bacillus amyloliquefaciens* spores by a combination of sucrose laurate and pressure-assisted thermal processing [J]. Journal of Food Protection, 2010, 73(11): 2043-2052
- [8] Handler F A, Edmonds J M. Quantitative analysis of effects of UV exposure and spore cluster size on deposition and inhalation hazards of *Bacillus* spores [J]. Aerosol Science and Technology, 2015, 49(11): 1121-1130
- [9] Margosch D, Ehrmann M A, Buckow R, et al. High-pressure-mediated survival of *Clostridium botulinum* and *Bacillus amyloliquefaciens* endospores at high temperature [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(5): 3476-3481
- [10] 刘洁, 林影, 吴晓英, 等. 高静压对枯草杆菌芽孢灭活作用的研究[J]. 工业微生物, 2008, 4: 35-39  
LIU Jie, LIN Ying, WU Xiao-ying, et al. Study on the inactivation of *Bacillus subtilis* spores by high static pressure [J]. Industrial Microbiology, 2008, 4: 35-39
- [11] 张永吉, 刘文君, 张琳. 氯对紫外线灭活枯草芽孢杆菌的协同作用[J]. 环境科学, 2006, 2: 329-332  
ZHANG Yong-ji, LIU Wen-jun, ZHANG Lin. Synergistic disinfection of *Bacillus subtilis* spores by UV irradiation and chlorine [J]. Environmental Science, 2006, 2: 329-332
- [12] 许能锋, 林立旺, 徐文体, 等. 邻苯二甲醛杀灭枯草杆菌黑色变种芽孢效果及其影响因素的研究[J]. 中国消毒学杂志, 2005, 2: 125-127, 124  
XU Neng-feng, LIN Li-wang, XU Wen-ti, et al. Study on efficacy of ortho-phthalaldehyde in killing spores of *Bacillus subtilis* var. *niger* and its influencing factors [J]. Chinese Journal of Disinfection, 2005, 2: 125-127, 124
- [13] 曾庆梅, 潘见, 谢慧明, 等. 超高压灭活枯草芽孢杆菌 (AS1.140) 的参数优化[J]. 农业工程学报, 2005, 4: 158-162  
ZENG Qing-mei, PAN Jian, XIE Hui-ming, et al. Parameter optimization of inactivated *Bacillus subtilis* (AS1.140) by ultra-high pressure [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2005, 4: 158-162
- [14] 高晓平, 胡惠, 黄现青. Surfactin 抑制乳中大肠杆菌 O157 活性研究[J]. 食品科学, 2009, 30(11): 91-94  
GAO Xiao-ping, HU Hui, HUANG Xian-qing. Sterilization effect of Surfactin on *Escherichia coli* O157 in fresh milk [J]. Food Science, 2009, 30(11): 91-94
- [15] 黄现青, 别小妹, 吕凤霞, 等. 枯草芽孢杆菌 fmbJ 产脂肽抑制点青霉效果及其桃防腐试验[J]. 农业工程学报, 2008, 1: 263-267  
HUANG Xian-qing, BIE Xiao-mei, LYU Feng-xia, et al. Inhibitory effect of lipopeptides from *Bacillus subtilis* fmbJ on *Penicillium notatum* and its antiseptic to peach [J].

- Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2008, 1: 263-267
- [16] 黄现青, 别小妹, 陆兆新, 等. 抗微生物脂肽体外抗 PRV 和 PPV 的研究[J]. 中国病毒学, 2006, 5: 426-429  
HUANG Xian-qing, BIE Xiao-mei, LU Zhao-xin, et al. *In vitro* assays of an antimicrobial lipopeptide produced by *Bacillus subtilis* fmb J against pseudorabies virus and porcine parvovirus [J]. *Virologica Sinica*, 2006, 5: 426-429
- [17] Huang X, Lu Z, Bie X, et al. Optimization of inactivation of endospores of *Bacillus cereus* by antimicrobial lipopeptides from *Bacillus subtilis* fmbj strains using a response surface method [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 74(2): 454-461
- [18] 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: 256-323  
DONG Xiu-zhu, CAI Miao-ying. *Common Bacterial System Identification Manual* [M]. Beijing: Science Press, 2001: 256-323
- [19] Macrae A. The use of 16S rDNA methods in soil microbial ecology [J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2000, 31(2): 77-82
- [20] 黄现青. *Bacillus subtilis* fmbJ 产生的脂肽抗微生物效果及安全性评价[D]. 南京农业大学, 2006  
HUANG Xian-qing. Antimicrobial effect and safety of lipopeptide produced by *Bacillus subtilis* fmbj [D]. Nanjing Agricultural University, 2006
- [21] 范秀容, 沈萍. 微生物学实验方法[M] 北京: 高等教育出版社, 1980, 58-76  
FAN Xiu-rong, SHEN Ping. *Microbiology Experimental Method* [M]. Beijing: Higher Education Press, 1980, 58-76
- [22] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M] 北京: 人民卫生出版社, 1982, 1063-1114  
XU Shu-yun, BIAN Ru-lian, Chen Xiu. *Experimental Methodology of Pharmacology* [M]. Beijing: People's Medical Publishing House (PMPH), 1982, 1063-1114
- [23] 马绪荣, 苏德模. 药品微生物学检验手册[M] 北京: 科学出版社, 2001, 210-215  
MA Xu-rong, SU De-mo. *Drug Microbiology Testing Manual* [M]. Beijing: Science Press, 2001, 210-215
- [24] 郑乾魏. 发酵肠优质乳酸菌的分离、筛选与鉴定[D]. 河北农业大学, 2014  
ZHEN Qian-wei. *Selecting isolation and identification of the lactic acid bacteria from the natural fermented sausages*. [D]. Agricultural University of Hebei, 2014
- [25] 陈忠杰, 李存法, 王璐. 引起罐藏食品腐败变质的微生物探讨[J]. 郑州牧业工程高等专科学校学报, 2012, 32(1): 19-21  
CHEN Zhong-jie, LI Cun-fa, WANG Lu. Discussion on microorganisms causing spoilage and deterioration of canned food [J]. *Modern Animal Husbandry*, 2012, 32(1): 19-21
- [26] 黄现青, 王玉芬, 赵改名, 等. 一株玉米肠致腐菌的 16S rDNA 鉴定及其防腐剂复配优化[J]. 中国农业科学, 2010, 43(24): 5112-5120  
HUANG Xian-qing, WANG Yu-fen, ZHAO Gai-ming, et al. Identification of A Microorganism Strain Isolated from the Corn Sausage by 16S rDNA Sequence Analysis and Optimization of Preservative Mixture. [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43(24): 5112-5120