DOI:10.3969/j.issn. 1673–1689.2017.06.014

一株拮抗 O157:H7 放线菌的筛选鉴定及发酵培养基

石 慧[1]， 张俊红[2]， 李汝琴[1]， 胡凤杰[1]， 肖 畅[1]

（1. 武汉设计工程学院 食品与生物科技学院，湖北 武汉 430205；2. 华中农业大学 园艺林学学院，湖北 武汉 430070）

摘要： 为了筛选到拮抗 O157:H7 的放线菌并做形态和生理生化鉴定，先采用管碟法检测抑菌能力，筛选到 2 株明显拮抗 O157:H7 的放线菌 AM–8 和 AM–10，并鉴定为放线菌目链霉菌科链霉菌属菌种。再用单因素试验筛选到抗菌物质产量最高的碳源玉米粉和氮源蛋白胨。响应面法优化 AM–8 的发酵培养基，最终确定发酵培养基为：玉米粉 20.10 g/L，蛋白胨 2.00 g/L，K_2HPO_4 0.50 g/L，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.50 g/L，NaCl 5.92 g/L，$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g/L，$CaCO_3$ 1.89 g/L。

关键词： 放线菌；拮抗；筛选鉴定；响应面法；发酵培养基

中图分类号：Q 933　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1673—1689(2017)06—0657—10

Screening and Identification of An Antagonistic O157:H7 Actinomycetes and Study of Its Fermentation Medium

SHI Hui[1]， *ZHANG Junhong*[2]， *LI Ruqin*[1]， *HU Fengjie*[1]， *XIAO Chang*[1]

（1. School of Food and Biotechnology, Wuhan Institute of Design and Sciences, Wuhan 430205, China;
2. School of Horticultre & Forestry Sciences, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China）

Abstract: The purpose of this paper is to screen actinomycetes to inhabit the growth of O157:H7, and identify them by Morphological and physiological identification ,then optimize the fermentation medium of producing antibacterial substance. The antibacterial ability of the actinomycetes were detected by the method of tube plate detection. We obtained two actinomycete strains AM-8 and AM-10 which restrained O157:H7, and the genus were identified as Streptomyces. In the single factor test, the highest yield of antibacterial substances occured in the medium with corn flour as carbon source, and pep-tone as nitrogen source. After optimization of fermentation medium by response surface method, The optimum fermentation medium of AM-8 was: corn flour 20.10 g/L, peptone 2.00 g/L, K_2HPO_4 0.50 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.50 g/L, NaCl 5.92 g/L, F_2SO_4 0.01 g/L, $CaCO_3$ 1.89 g/L.

Keywords: actinomycetes, antagonistic, screening and identification, response surface method, fermentation medium

收稿日期： 2015–06–23

基金项目： 武汉设计工程学院(原华中农业大学楚天学院)重点科研基金项目(K201403)。

作者简介： 石 慧(1977—)，女，湖北省鄂州人，理学硕士，副教授，主要从事应用微生物学方面的研究。E–mail:ann.black@163.com

引用本文： 石慧，张俊红，李汝琴，等. 一株拮抗 O157:H7 放线菌的筛选鉴定及发酵培养基的研究 [J]. 食品与生物技术学报,2017,36(06):657–666.

O157:H7 是一种重要的人畜共患的食原性病原菌[1],主要通过被污染的水和食物传播。感染者在数日的潜伏期后，会出现剧烈的腹痛和便血等,部分患者可发展为溶血性尿毒综合症(HUS)、血栓性血小板减少性紫癜等,严重的甚至可能死亡。1982年该菌株从一位食用汉堡包发生食物中毒的病人粪便里分离得到且命名[2],之后在多个国家流行和爆发,特别是欧洲国家、加拿大、美国和日本[3]。现有的抗生素治疗常常产生副作用使患者产生并发症而发生危险。抗生素的毒副作用和致病菌的耐药性都要求抗生素不断更新换代[4]。放线菌一直是抗生素、酶和酶抑制剂等有用生理活性物质的主要产生菌[5],也是 2/3 天然抗生素的产生菌[6]。在过去的半个多世纪,抗生素的发现及工业化生产为人类健康及卫生事业做出了重大贡献[7]。平板霉素的发现及新的作用机制,又掀起一波从放线菌资源中寻找和研究新抗生素的新浪潮[8]。本研究旨在找到一种放线菌产生的新的抗菌物质可以抑制 O157:H7,且减少毒副作用和耐药性。

1 材料与方法

1.1 材料

土样:采自武汉汤逊湖及周边土壤;菌种:大肠杆菌 O157:H7;培养基:高氏 1 号培养基;LB 培养液;种子培养基(g/L):可溶性淀粉 15、葡萄糖 10、黄豆饼粉 15、蛋白胨 5、酵母粉 5、硝酸钾 2.5、氯化钠 2、碳酸钙 4、甘氨酸 5;pH 7.2~7.5)[9];发酵基础培养液 1(高氏 1 号液体培养基);发酵基础培养液 2(g/L):玉米粉 20、蛋白胨 1、K_2HPO_4 0.5、$MgSO_4\cdot 7H_2O$ 0.5、NaCl 0.5、$FeSO_4\cdot 7H_2O$ 0.01。

1.2 方法

1.2.1 放线菌的分离 取 10^{-2} 土样稀释液 0.1 mL 涂布在高氏 1 号培养基上,28 ℃培养 5 d,观察到培养基上多个不同的疑似放线菌的菌落。划线分离纯培养,28 ℃培养 5 d 得到单菌落。

1.2.2 拮抗放线菌的筛选 将不同单菌落在高氏 1 号斜面上培养后制成孢子悬液，取 100 μL 孢子悬液,以 O157:H7 为敏感菌,用管碟法[10]测定各菌种的抑菌情况。

1.2.3 拮抗放线菌的鉴定

1)拮抗放线菌的形态鉴定:挑出具有拮抗能力的菌种,采用印片染色法染色[11],在油镜下观察各菌种的个体形态并拍照。观察各菌种在高氏 1 号培养基上的单菌落形态并拍照。

2)拮抗放线菌的生理生化鉴定[12]:对筛选到的具有拮抗能力的菌株做牛奶凝固、产淀粉酶、产纤维素、产蛋白酶试验,分别测试对 L-阿拉伯糖、D-果糖、D-木糖、葡萄糖、肌醇、蔗糖以及甘露醇的利用情况及产硫化氢试验。

1.2.4 链霉菌 Am-8 的发酵培养 经鉴定,抑菌能力最强的 Am-8 为链霉菌,划线接种在高氏 1 号平板上,28 ℃静置培养 5 d。将单菌落接种在 100 mL 种子培养基中,28 ℃、165 r/min 培养 48 h。以 10% 接种体积分数将培养好的菌液接入下文中提到的各种发酵培养基中,28 ℃、165 r/min 摇床培养 6 d 备用。

1.2.5 拮抗放线菌发酵液中抑菌物质的测定 8 000 r/min 离心各发酵液 5 min,再用 0.2 μm 无菌过滤器过滤 Am-8 发酵液,以过夜培养的大肠杆菌 O157:H7 为敏感菌,在 LB 平板上用管碟法测定无菌发酵液的抑菌能力,并测量各抑菌圈直径,无菌发酵液点样量为 200 μL。

1.2.6 链霉菌 Am-8 发酵培养基中碳源、氮源的筛选试验[13] 以发酵基础培养液 1 为基础,改变碳源或氮源的种类,碳源分别为可溶性淀粉、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、玉米粉,添加量均为 20 g/L。氮源分别为硝酸钾、蛋白胨、酵母膏、黄豆饼粉、麸皮,添加量均为 1 g/L。各配制 5 组培养基,发酵培养 6 d 后,测定发酵液中抑菌物质的活性,比较不同碳源和氮源对抗菌物质产生的影响。

1.2.7 发酵培养基的单因素试验 利用 Minitab 17 软件创建各因子的两水平预备试验,从发酵基础培养液 2 及 $CaCO_3$ 等培养基成分中筛选到玉米粉、蛋白胨、氯化钠和碳酸钙 4 个因素对抑菌物质的产生影响相对显著。考察该 4 个单因素对链霉菌 Am-8 产抗菌物质的影响,设置玉米粉质量浓度为 12、16、20、24、28、32 g/L;蛋白胨质量浓度为 2、4、6、8、10、12 g/L;氯化钠质量浓度为 3、4、5、6、7、8 g/L;碳酸钙质量浓度为 1、2、3、4、5、6 g/L。以发酵基础培养基 2 为基础,分别以上述 4 个因素的质量浓度为变量,共配置 24 种发酵培养基，发酵培养 6 d 后测定无菌发酵液的抑菌活性。

1.2.8 响应面法优化发酵培养基 以 X_1(玉米粉浓度)、X_2(氯化钠浓度)、X_3(碳酸钙质量浓度)为自变

量,运用 Minitab 17 软件程序,根据 Box–Behnken 实验设计原理,设计三因素三水平试验,其编码及取值见表 1,响应面试验组试验设计见表 2。

表 1 Box–Behnken 试验因素水平与取值

Table 1 Experimental variables and levels for Box–Behnken design

水平	因素/(g/L)		
	X_1	X_2	X_3
−1	16	5	1
0	20	6	2
1	24	7	3

表 2 Box–Behnken 试验设计

Table 2 Experimental design of Box–Behnken

标准序	X_1	X_2	X_3
1	−1	−1	0
2	1	−1	0
3	−1	1	0
4	1	1	0
5	−1	0	−1
6	1	0	−1
7	−1	0	1
8	1	0	1
9	0	−1	−1
10	0	1	−1
11	0	−1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

参照表 1–2,分别配制 15 组不同的发酵培养基,发酵培养 6 d 后,测定无菌发酵液的抑菌活性。以抑菌圈直径为响应值,通过 Minitab17 软件程序,并对方程进行回归分析和模型分析,做出多元线性回归方程和响应面,解出自变量的值,获得优化后的培养基成分的质量浓度。

2 结果与分析

2.1 放线菌的分离结果

将土样稀释液在高氏 1 号培养基上培养 5 d 后的生长结果见图 1。

在高氏 1 号培养基上长满了不同微生物菌落。其中有一些具有明显菌丝及孢子的菌落高度类似放线菌的菌落。

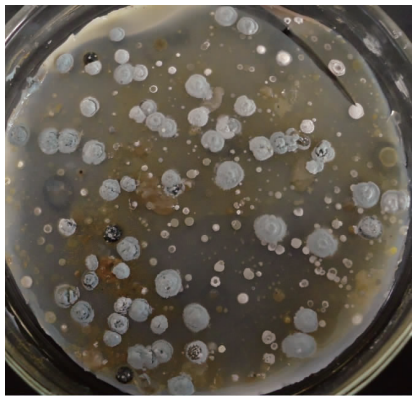


图 1 分离平皿上的放线菌菌落

Fig. 1 Colonies of actinomycetes on isolating plate

2.2 拮抗放线菌的筛选结果

用管碟法测定各种单菌落的孢子悬液的抑菌活性,结果见表 3。

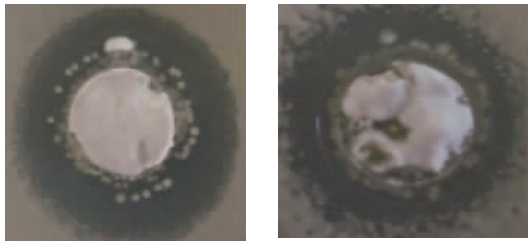
表 3 各放线菌菌株对 O157:H7 的抑菌试验结果

Table 3 Antibacterial test results of the strains of actinomycetes on O157:H7

序号	抑菌圈	序号	抑菌圈
AM–1	+	AM–11	–
AM–2	–	AM–12	+
AM–3	–	AM–13	–
AM–4	+	AM–14	–
AM–5	+	AM–15	+
AM–6	–	AM–16	–
AM–7	–	AM–17	–
AM–8	++	AM–18	+
AM–9	+	AM–19	–
AM–10	++	AM–20	–

注:“–”表示无抑菌圈,“+”表示有明显的抑菌圈,“++”表示有很强的抑菌圈。

其中,AM–8 和 AM–10 有明显的抑菌圈,抑菌效果见图 2。



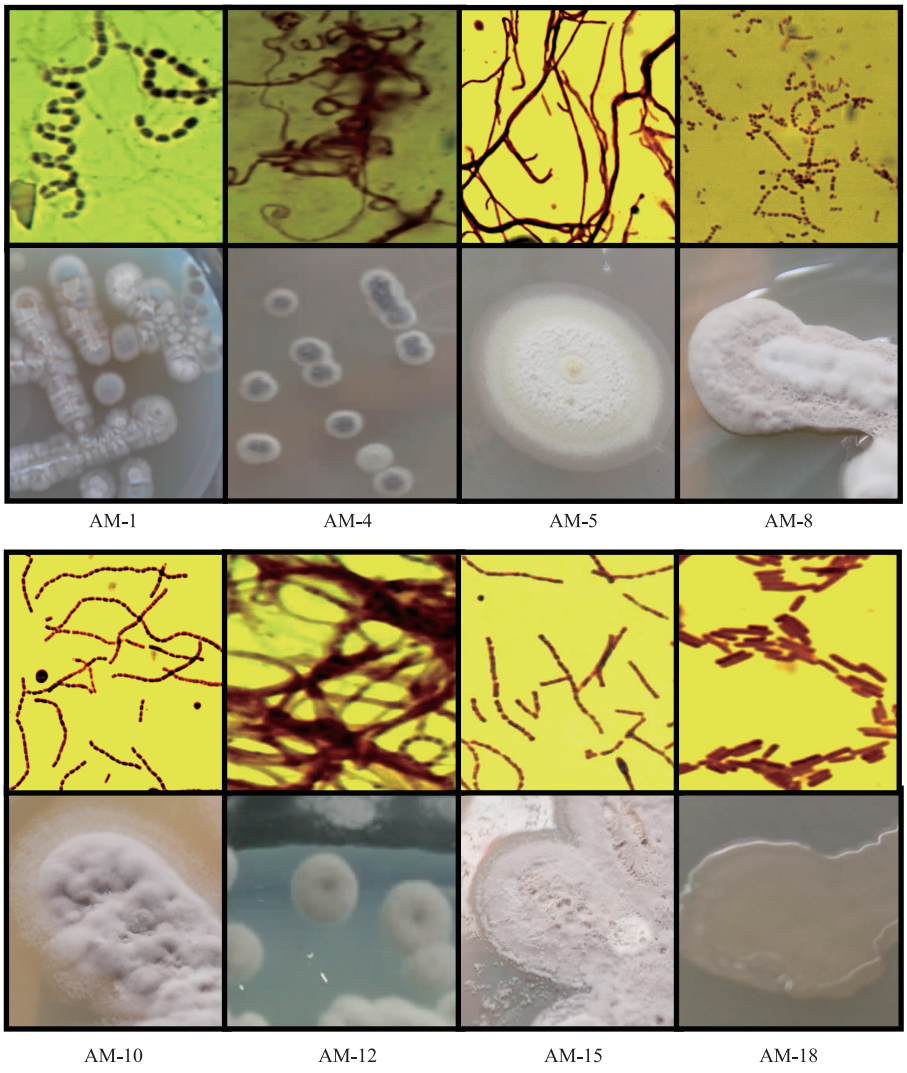
(a) (b)

图 2 拮抗放线菌的抑菌圈

Fig. 2 Inhibition zones of actinomycete strains

2.3 拮抗放线菌的鉴定结果

2.3.1 *形态鉴定结果* 在 10×100 光学显微镜下观察各菌种的个体形态并拍摄照片,观察平板上不同菌种的菌落特征并拍摄照片,结果见图 3。



注:每个菌株序号的上图是该菌株的个体形态,下图是群体形态

图 3 不同拮抗菌株的菌丝及菌落形态

Fig. 3 Morphology of mycelium and colony of different antagonistic strains

结果显示,除 AM-18 菌株外,以上各菌株都有分化清晰的基内菌丝、气生菌丝和孢子丝,并且孢子丝的特点与《伯杰氏细菌鉴定手册》(第九版)中描述的链霉菌属特征高度相似。菌落特征也与链霉菌属的菌落特征高度相近,因此将前 7 个菌种初步鉴定为链霉菌属放线菌。AM-18 根据个体形态和菌落特征,鉴定为细菌。

2.3.2 *拮抗链霉菌的生理生化鉴定结果* 7 个拮抗链霉菌菌株的部分生理生化特性鉴定结果见表 4。与《伯杰氏细菌鉴定手册》(第九版)中链霉菌的生理生化试验结果对比,这些鉴定项目均与链霉菌属模式菌种高度相似,最终鉴定这 7 个菌株均属于放线菌目链霉菌科链霉菌属菌种。

2.4 链霉菌 Am-8 发酵培养基碳源、氮源筛选

2.4.1 *碳源筛选试验结果与分析* Am-8 在不同的碳源下,发酵培养 6 d 后,测无菌发酵液中抑菌物质的抑菌圈大小, 筛选出抑菌圈直径最大的碳源,结果见图 4。

表 4　拮抗链霉菌的生理生化鉴定结果

Table 4　Physiological and biochemical identification of *Streptomyces sp*

生理生化实验		AM–1	AM–4	AM–5	AM–8	AM–10	AM–12	AM–15
牛奶凝固实验	观察 3 d	+	––	––	+	––	+	+
	观察 7 d	+	+	+	+	+	+	+
淀粉水解试验		+	+	+	+	+	+	+
纤维素水解试验		––	––	––	+	+	––	–
酪蛋白水解试验		+	+	+	+	+	+	+
产硫化氢试验		––	––	––	––	––	––	––
不同碳源利用	L–阿拉伯糖	+	+	+	+	+	+	+
	D–木糖	+	+	+	+	+	+	+
	D–果糖	+	+	+	+	+	+	+
	葡萄糖	+	+	+	+	+	+	+
	肌醇	+	+	+	+	+	+	+
	蔗糖	+	+	+	+	+	+	+
	甘露醇	+	+	+	+	+	+	+

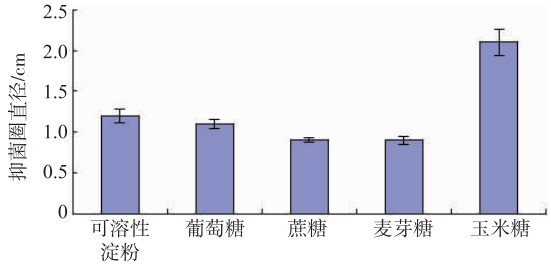


图 4　不同碳源对链霉菌 Am–8 产抗菌物质的影响

Fig. 4　Effect of different carbon source on the yield of antibacterial substances of *Streptomyces* Am–8

由图 4 可知，玉米粉为碳源时，链霉菌 Am–8 代谢物对大肠杆菌的抑菌活性显著高于其他碳源，抑菌圈直径最大。

2.4.2　*氮源筛选试验结果与分析*　Am–8 在不同氮源中发酵培养 6 d 后测无菌发酵液中抑菌物质的活性，结果见图 5。

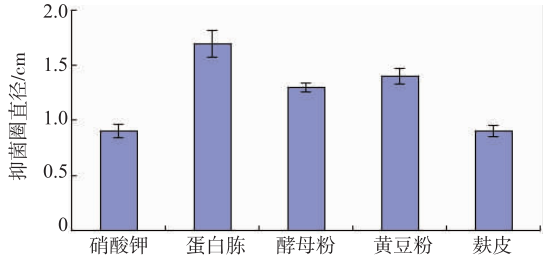


图 5　不同氮源对链霉菌 Am–8 产抗菌物质的影响

Fig. 5　Effect of different nitrogen source on the yield of antibacterial substances of *Streptomyces* Am–8

由图 5 可知，蛋白胨作为氮源时链霉菌 Am–8 代谢物对大肠杆菌 O157:H7 的抑菌活性最强，明显高于硝酸钾和麸皮，但仅略高于酵母粉和黄豆粉。

2.5　发酵培养基的单因素预试验结果与分析

2.5.1　*玉米粉质量浓度对链霉菌 Am–8 产抗菌物质的影响结果*　将发酵基础培养液 2 中的碳源玉米粉设置 6 个质量浓度梯度，发酵培养 6 d 后测无菌发酵液中的抑菌活性，结果见图 6。

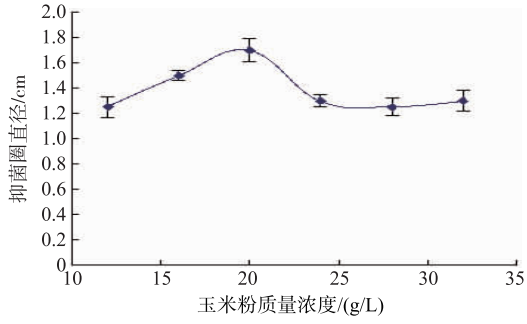


图 6　玉米粉质量浓度对链霉菌 Am–8 产抗菌物质的影响

Fig. 6　Effect of the concentration of the flour on the yield of the antibacterial substances of *Streptomyces* Am–8

由图 6 可知，玉米粉质量浓度为 20 g/L 左右，链霉菌 Am–8 无菌发酵液对大肠杆菌 O157:H7 的抑菌圈直径最大，所产抗菌物质的质量浓度最高。

2.5.2　*蛋白胨质量浓度对链霉菌 Am–8 产抗菌物质的影响结果*　以发酵基础培养液 2 中的氮源蛋白胨设置 6 个质量浓度梯度，发酵培养 6 d 后测无菌发酵液中抑菌物质的活性，结果见图 7。

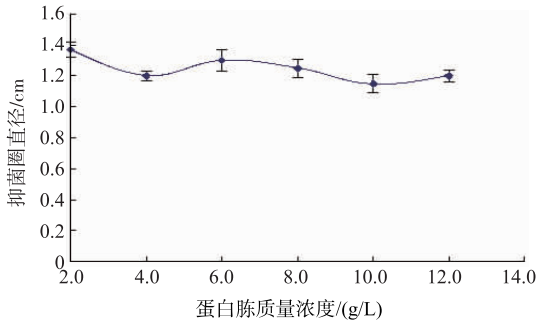


图 7　蛋白胨质量浓度对链霉菌 Am-8 产抗菌物质的影响

Fig. 7　Effect of the concentration of peptone on the yield of the antibacterial substances of *Streptomyces* Am-8

由图 7 可知,蛋白胨质量浓度为 2 g/L 时,链霉菌 Am-8 无菌发酵液对大肠杆菌 O157:H7 的抑菌圈直径最大。但实际上在本试验的质量浓度区间,蛋白胨质量浓度的改变对 AM-8 抑菌物质的产量影响较小。

2.5.3　氯化钠质量浓度对链霉菌 Am-8 产抗菌物质的影响结果　以发酵基础培养液 2 为基础,设置氯化钠 6 个质量浓度梯度,发酵培养 6 d 后测无菌发酵液中抑菌物质的活性。结果见图 8。

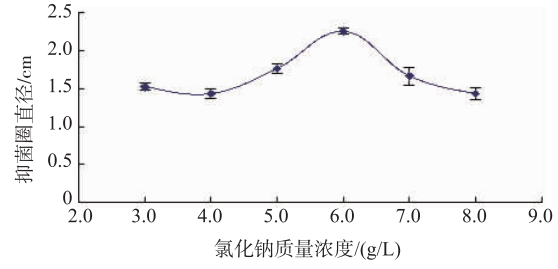


图 8　氯化钠质量浓度对链霉菌 Am-8 产抗菌物质的影响

Fig. 8　Effect of the sodium chloride concentration on the yield of the antibacterial substances of *Streptomyces* Am-8

由图 8 可知,链霉菌 Am-8 无菌发酵液对大肠杆菌 O157:H7 的抑菌圈直径随着培养基中氯化钠质量浓度的增大而增大,当氯化钠质量浓度达到约 6.0 g/L 时抑菌活性达到最大。

2.5.4　碳酸钙的浓度对链霉菌 Am-8 产抗菌物质的影响结果　以发酵基础培养液 2 为基础,添加碳酸钙并设置 6 个质量浓度梯度,发酵培养 6 d 后测无菌发酵液中抑菌物质的活性。结果见图 9。

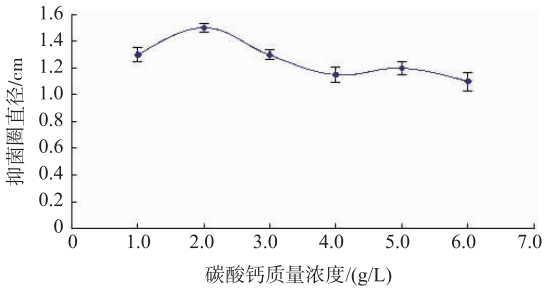


图 9　碳酸钙质量浓度对链霉菌 Am-8 产抗菌物质的影响

Fig. 9　Effect of the calcium carbonate concentration on the yield of the antibacterial substances of *Streptomyces* Am-8

由图 9 可知,在试验条件下,碳酸钙的添加质量浓度为 2.0 g/L 时,链霉菌 Am-8 无菌发酵液对大肠杆菌 O157:H7 的抑菌圈直径达到最大,低于 2.0 g/L 时抑菌物质的活性随着碳酸钙质量浓度增大而增大,继续提高碳酸钙质量浓度对抗菌物质的活性有抑制作用。

2.6　响应面法优化培养基的结果与分析

2.6.1　回归方程及因素显著性分析　按 Box-Behnken 试验设计配置 15 组发酵培养基,发酵培养 6 d 后,测定无菌发酵液的抑菌活性,结果见表 5。

表 5　Box-Behnken 试验设计及结果

Table 5　Experimental design and results of Box-Behnken

标准序	X_1	X_2	X_3	抑菌圈直径/cm
1	−1	−1	0	1.42±0.03
2	1	−1	0	1.44±0.05
3	−1	1	0	1.32±0.03
4	1	1	0	1.24±0.02
5	−1	0	−1	1.19±0.08
6	1	0	−1	1.54±0.03
7	−1	0	1	1.31±0.04
8	1	0	1	1.02±0.03
9	0	−1	−1	1.23±0.05
10	0	1	−1	1.22±0.06
11	0	−1	1	1.16±0.03
12	0	1	1	1.17±0.06
13	0	0	0	1.70±0.05
14	0	0	0	1.92±0.08
15	0	0	0	1.72±0.04

表 5 中 1~12 为析因试验,13~15 为中心点试验。15 个试验分为析因点和零点,析因点为自变量 X_1、X_2、X_3 取值所构成的三维顶点,零点为区域的中

心点，零点试验重复 3 次，用以估计试验误差。运用 Minitab17 软件程序对 15 个试验点的响应值进行响应曲面设计分析，得到回归模型方差分析表 6 及回归方程。

表 6　回归模型方差分析

Table 6　Analysis of regression model variance

项目	自由度	Adj SS	Adj MS	*F* 值	*P* 值
模型	9	0.822	0.091 3	8.70	0.014 0*
线性	3	0.045 1	0.015 0	1.43	0.338
X_1	1	0.000	0.000	0.000	1.00
X_2	1	0.011 3	0.011 3	1.07	0.348
X_3	1	0.033 8	0.033 8	3.22	0.133
平方	3	0.672	0.224	21.3	0.003 00**
X_1^2	1	0.116	0.116	11.1	0.021 0**
X_3^2	1	0.226	0.226	21.6	0.006 00**
X_3^2	1	0.421	0.421	40.1	0.001 00**
双因子交互作用	3	0.105	0.035 0	3.34	0.114
X_1X_2	1	0.002 50	0.002 50	0.240	0.646
X_1X_3	1	0.102	0.102	9.76	0.026 0*
X_2X_3	1	0.000 100	0.000 100	0.010 0	0.926
误差	5	0.052 5	0.010 5		
失拟	3	0.022 9	0.007 62	0.510	0.712
纯误差	2	0.029 6	0.014 8		
合计	14	0.874			
R^2	94.0%				
调整后 R^2	83.2%				

注：* 表示显著水平，** 表示极显著水平

得到的回归方程将系数保留 3 位有效数字后调整为：$Y=1.78-0.00X_1-0.037\ 5X_2-0.065\ 0X_3-0.178X_1^2-0.248X_2^2-0.338X_3^2-0.025\ 0X_1X_2-0.160X_1X_3+0.005\ 00X_2X_3$

表 6 回归模型方差分析表明，模型的线性项不显著（p=0.338），平方项极显著（p=0.003 00），双因子交互项不显著（p=0.114），模型显著（p=0.014 0），该回归模型的多元相关系数 R^2=94.0%，模型的失拟误差与纯误差差别不显著，说明模型对实际情况拟合较好，可靠性较好。根据一次项的系数，3 个因素对抑菌物质产量的影响大小关系 $X_3>X_2>X_1$。

2.6.2　响应面及等高线图分析　根据图 10—12，响应面分析图均为山丘曲面，说明该拟合模型存在极大值。令 Y 分别对 X_1，X_2，X_3 偏导为零，即对拟合出的二次方程求导，得出方程组。方程组得出 3 个解：X_1=0.055 2，X_2=−0.079 5，X_3=−0.110。即玉米粉的质量浓度为 20.1 g/L、氯化钠的质量浓度为 5.92 g/L、碳酸钙的质量浓度为 1.89 g/L，抑菌圈直径最大值为 1.79 cm。$Y=(X_1,X_2)$ 和 $Y=(X_2,X_3)$ 等高线图呈现圆形，说明两因素之间交互作用不显著，$Y=(X_1,X_3)$ 等高线图呈椭圆形，说明这两个因素之间交互作用显著。

3　结　语

作者筛选到 2 株放线菌 AM−8 和 AM−10，对大肠杆菌 O157:H7 具有较强的抑制作用，通过形态学、生理生化特征的鉴定，初步鉴定为放线菌目链霉菌科链霉菌属菌种。以筛选到的 AM−8 为发酵菌株，高氏 1 号液体培养基为发酵基础培养基，先测试碳源和氮源种类，发现在相同添加量下，玉米粉为碳源、蛋白胨为氮源时，AM−8 发酵产生抗菌物质的抑菌圈直径优于其他碳源和氮源。多因子的两水平预备试验筛选到玉米粉、蛋白胨、NaCl、$CaCO_3$ 的质量浓度对链霉菌 AM−8 抑菌物质产量的影响相对显著。采用单因素预试验，测试玉米粉、蛋白胨、NaCl、$CaCO_3$ 的质量浓度对抑菌物质产量的影响，找

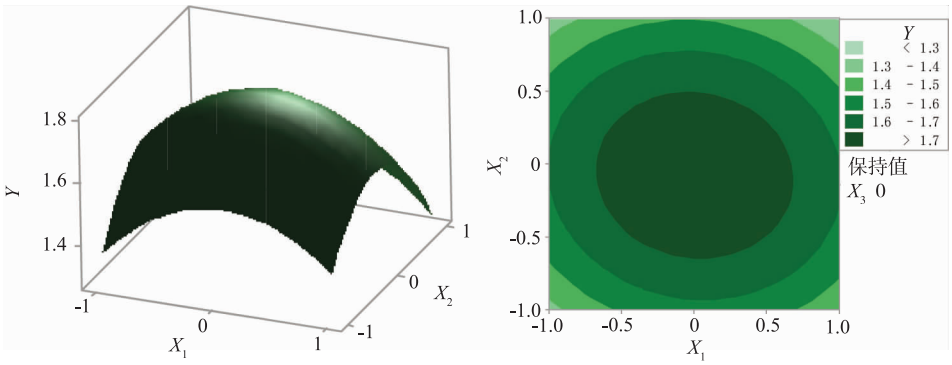


图 10　$Y=f(X_1,X_2)$响应面图及等高线

Fig. 10　$Y=f(X_1,X_2)$ response surface and contour

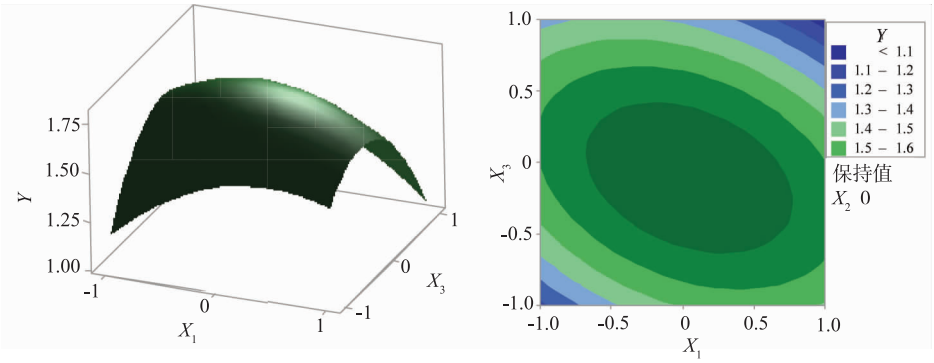


图 11　$Y=f(X_1,X_3)$响应面图及等高线

Fig. 11　$Y=f(X_1,X_3)$ response surface and contour

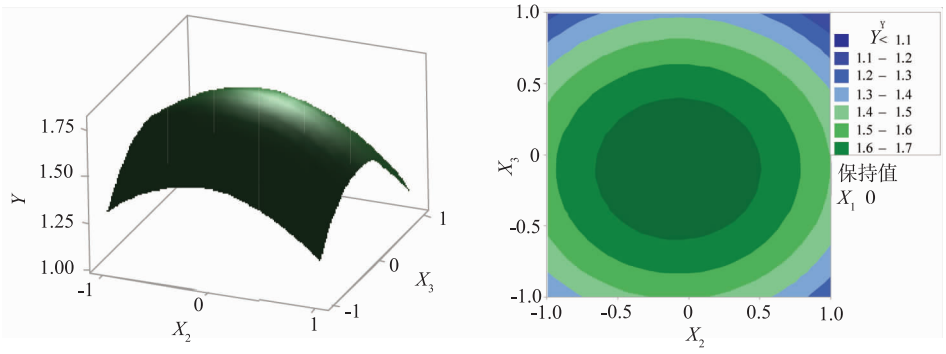


图 12　$Y=f(X_2,X_3)$响应面图及等高线

Fig. 12　$Y=f(X_2,X_3)$ response surface and contour

到响应面设计时零点的浓度玉米粉为 20.0 g/L，NaCl 为 6.0 g/L，$CaCO_3$ 为 2.0 g/L。响应面法优化该培养基，最终确定最佳培养基配方为玉米粉 20.1 g/L，蛋白胨 2.0 g/L，K_2HPO_4 0.5 g/L，$MgSO_4·7H_2O$ 0.50 g/L，NaCl 5.92 g/L，$FeSO_4·7H_2O$ 0.01 g/L，$CaCO_3$ 1.89 g/L。

实际上，本研究使用的 O157:H7 菌株为无毒菌株，不含志贺氏毒素基因。根据庄凌[14]的研究，可以抑制无毒 O157:H7 菌株的抗菌药物，一般也能抑制编码毒素基因的 O157:H7 菌株。因此筛选到的菌株所产的抗菌物质也具有相当的研究价值。

致病性的 O157:H7 菌株往往含有志贺氏毒素基因中的一种或两种，感染后更具毒性。大多数情况下，O157:H7 引起的腹泻是自限性的，可以用口服补液疗法有效治疗。持续性感染可以使用抗菌药物[15]。但抗菌药物的治疗可能会产生耐药问题，越来越多的研究表明，致病性大肠杆菌的耐药能力不断

上升[14,16~17],耐药性阻碍了疾病的治愈。抗菌药物作用机制不同,治疗结果也不同。有些抗菌药物作用于 DNA 合成过程,这类抗菌药物增加使用量,会触发志贺氏毒素的产生,增加感染毒性,如环丙沙星和复方新诺明。而另一些作用于细胞壁、转录和翻译的抗菌药物增加使用量,则可以抑制志贺氏毒素的产生,减少感染毒性[18]。当 O157:H7 的病程在少数易感个体(通常是 5 岁以下的儿童和老人)引起了 HUS,目前甚至没有有效的药物治疗[19]。以 Vero 细胞为基础筛选到的小分子抑制剂[20]和治疗性单克隆抗体[17]均成为 O157:H7 感染治疗的一个重要的选择。但目前,抗菌药物的治疗仍然是一种非常重要的手段,因此筛选一些大幅减少毒副作用和减少耐药性的抗菌微生物是非常有意义的。

作者筛选到两株对无毒 O157:H7 产生抑制作用的链霉菌,并初步对 AM-8 菌株的发酵培养基做了研究。但该抗菌物质是否有价值应用于生产实践和有益于疾病治疗,还需要做进一步的研究。除了要对抗菌物质进行鉴定及大幅提高菌株的抗菌物质生产能力外,还要弄清楚本研究筛选到的抗菌物质的作用机理。

参考文献:

[1] 肖大平. 肠出血性大肠杆菌 EHEC O157:H7+tccP 基因缺失菌株的构建及其生物学性状的研究[D]. 重庆:第三军医大学,2009:6-8.

[2] RANGEL J M,SPARLING P H,CROWE C,et al. Epidemiology of *Escherichia coli*. O157:H7 Outbreaks,United States,1982-2002[J]. **Emerging Infectious Diseases**,2005,11(4):603-609.

[3] WANG Yan. Infection and epidemic situation of *Escherichia coli*. O157:H7[J]. **Progressin Microbiology and Immunology**,2008,36(1):51-54.(in Chinese)

[4] 路福平. 无抗菌活性放线菌的激活和抗生素筛选新方法的研究[D]. 广州:华南理工大学,1996:5-7.

[5] QIN Sheng,ZhAOLixing,ChEN Yun,et al. Endophytic actinomycetes associated with medicinal plants:isolation,antimicribial activity and identification[J]. **Journal of Microbiology**,2009,36(11):1693-1699.(in Chinese)

[6] LIU Shu,LU Zhaoxin,LV Fengxia,et al. The identification and antimicrobial activity of a marine actinomycete[J]. **Journal of Nanjing Agricultural University**,2007,30(4):124-129.(in Chinese)

[7] 于文蕴,杜柏林. 抗生素人类现代医学的灾难及它在动物诊疗方面的现状和未来展望[A]. 2012 第四届中国兽药大会. 2012 第四届中国兽药大会论文集[C]. 北京:2012:27-31.

[8] WANG Jun,SOISSON S M,YOUNG K,et al. Platensimycin is a selective FabF inhibitor with potent antibiotic properties[J]. **Nature**,2006,441:358- 361.

[9] 管其君. 普那霉素发酵工艺研究[D]. 宁波:浙江大学宁波理工学院,2005:1-24.

[10] FANG Yaowei,WANG Shujun,LIU Shu,et al. Isolation of actinomycetes from Xisha islandsand their antimicrobial activities[J]. **Journal of Microbiology**,2014,34(4):47-52.(in Chinese)

[11] 赵斌,林会,何绍江. 微生物学实验[M]. 北京:科学出版社,2014:50-51.

[12] WANG Jing,HUANG Yun,YAO Jia,et al. Identification and control effects of two antagonistic actinomycetes against clubroot [J]. **Scientia Agricultura Sinica**,2011,44(13):2692-2700.(in Chinese)

[13] WANG Zaiqiang,HE Yueqiu,CHEN Xian,et al. Optimum cultural conditions for *Streptomyces* sp. Q0102b[J]. **Journal of South China Agricultural University**,2011,32(2):116-118.(in Chinese)

[14] ZHUANG Ling,GU Ling,GUO Xiling,et al. Antibiotic susceptibility of *E. coli* O157:H7 isolated in Jiangsu province 1999[J]. **Disease Surveillance**,2001,16(4):125-127.(in Chinese)

[15] CROXEN M A,LAW R J,SCHOLZ R,et al. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*[J]. **Clinical Microbiology Reviews**,2013,26(4):822-880.

[16] TADESSE D A,ZHAO S,TONG E,et al. Antimicrobial drug resistancein *Escherichia coli* from humansand food animals,united states,1950-2002[J]. **Emerging Infectious Diseases**,2012,18(5):741-749.

[17] SCHROEDER C M,ZHAO C,DEB Roy C,et al. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from Humans,Cattle,Swine,and Food[J]. **Applied &Enviromental Microbiology**,2002,68(2):576-581.

[18] MCGANNON C M,FULLER C A,WEISS A A. Different classes of antibiotics differentially influence shiga toxin production[J]. **Antimicrobial Agents &Chemotherapy**,2010,54(9): 3790-3798.

[19] BOYER O,NIAUDET P. Hemolytic uremic syndrome:new developments in pathogenesis and treatment [J]. **International Journal of Nephrology**,2011,2011(2090-214X):908407.

[20] WAHOMEA P G,BAI Y,NEALA L M,et al. Identification of small molecule inhibitors of ricin and shiga toxin using a cell-based high-throughput screen[J]. **Toxicon**,2010,56(3):313-323.

科　技　信　息

欧盟评估多种来源 β-淀粉酶用于食品的安全性

据欧盟食品安全局消息,欧盟委员会要求欧盟食品安全局按照 (EC) No 1332/2008 的要求,对 β-淀粉酶用于食品的安全性进行评估。2017 年 5 月 10 日欧盟食品安全局(EFSA)就小麦、大豆、大麦来源的 β-淀粉酶用于食品的安全性发布意见。

欧盟专家组经风险评估认为,大麦、小麦、大豆中提取的 β-淀粉酶无过敏风险,可以用于食品烘焙和酿造工艺、蒸馏酒精生产和用于生产葡萄糖浆的淀粉加工,按照良好操作规范,按需添加。

[信息来源] 食品伙伴网. 欧盟评估多种来源 β-淀粉酶用于食品的安全性 [EB/OL]. (2017-5-16). http://news.foodmate.net/2017/05/429077.html

欧盟再次认可脂肪酸作为食品添加剂的安全性

据欧盟食品安全局消息,2017 年 5 月 5 日欧盟食品安全局(EFSA)食品添加剂及食品营养源专家组(ANS)再次就脂肪酸(E 570)作为食品添加剂的安全性发布意见。

食品添加剂及食品营养源专家组分别评估了脂肪酸作为食品添加剂的遗传毒性、慢性毒性、生殖毒性,认为人体通过膳食途径接触的脂肪酸仅占总饱和脂肪酸暴露量的 1%,脂肪酸作为食品添加剂用于食品不存在安全风险。

[信息来源]食品伙伴网. 欧盟再次认可脂肪酸作为食品添加剂的安全性 [EB/OL]. (2017-5-16). http://news.foodmate.net/2017/05/428989.html

澳新拟批准低聚异麦芽糖作为新资源食品

据澳新食品标准局(FSANZ)消息,2017 年 5 月 16 日澳新食品标准局公布 A1123 号申请,拟批准低聚异麦芽糖作为新资源食品。

本次申请由 Essence Group Pty Ltd 公司提交。申请人拟将其作为甜味剂与增量剂用于一系列普通与特殊食品中。

澳新食品标准局于 2016 年 12 月 13 日就相关草案征求意见,共收到 6 个意见。该局于 2017 年 5 月 3 日批准了草案的修订案。2017 年 5 月 15 日澳新食品部长收到了食品标准局的决定。

[信息来源]食品伙伴网. 澳新拟批准低聚异麦芽糖作为新资源食品 [EB/OL]. (2017-5-17). http://news.foodmate.net/2017/05/429202.html