

一株盐湖芽孢杆菌 LG 的鉴定及其抗金黄色葡萄球菌活性研究

李新* 于慧瑛 杜磊 曹建斌

(运城学院 生命科学系 山西 运城 044000)

摘要:【目的】从运城盐湖中分离获得一株耐盐细菌 LG, 对其进行分类鉴定及抗菌特性研究。【方法】利用 16S rRNA 基因序列分析对菌株进行分类鉴定。以金黄色葡萄球菌为指示菌, 采用杯碟法对菌株 LG 发酵上清液进行抗菌活性检测, 利用扫描电镜和透射电镜观察其抗菌效果。研究不同因素对上清液抗菌活性的影响, 并采用 PCR 技术对菌株基因组进行功能基因筛查。【结果】系统发育分析表明该菌为 *Bacillus* 属成员, 在 0–25% 的 NaCl 浓度范围内生长良好, 为耐盐细菌。电镜观察发现, 菌株 LG 发酵上清液处理金黄色葡萄球菌可导致细胞结构明显出现异常, 细胞质泄漏。抗菌稳定性研究表明, 菌株 LG 发酵上清液活性稳定, 表现出了良好的对紫外光、温度、pH 和 NaCl 的耐受性。采用特异性引物, 通过 PCR 筛查发现菌株 LG 基因组中含有聚酮合酶(PKS I)基因和非核糖体肽合成酶(NRPS)基因, 表明该菌具有产多种代谢产物的潜力。【结论】极端环境中的微生物资源可作为抗菌活性物质的潜在新来源。

关键词: 芽孢杆菌, 耐盐菌, 金黄色葡萄球菌, 抗菌活性, 功能基因

Characterization of *Bacillus* sp. LG from Yuncheng Salt Lake and its antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*

LI Xin* YU Hui-Ying DU Lei CAO Jian-Bin

(College of Life Sciences, Yuncheng University, Yuncheng, Shanxi 044000, China)

Abstract: [Objective] A halotolerant bacterium LG was isolated from Yuncheng Salt Lake, and its identification and antimicrobial properties were studied. [Methods] The strain LG was identified by 16S rRNA gene sequence analysis. Using *Staphylococcus aureus* as the indicator, antimicrobial activity of the fermentation broth of strain LG was detected by cylinder plate method. Morphological and ultrastructure changes of treated cells were observed by scanning electron microscopy and transmission electron microscopy. Different physicochemical factors on its activity and PCR screening of functional genes were also studied. [Results] The strain is a halotolerant bacterium which can grow well over a range of NaCl concentration of 0–25%, and it is characterized as the genus of *Bacillus* and named as *Bacillus* sp. LG. Electron spectroscopy showed that significant morphological and ultrastructure changes of *Staphylococcus aureus* were observed after treatment by fermentation broth of *Bacillus* sp.

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(No. 31300002); 山西省青年科技研究基金项目(No. 2015021141)

*通讯作者: Tel: 86-359-8594324; 信箱: lixin-eva@163.com

收稿日期: 2014-09-10; 接受日期: 2014-11-04; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-11-15

LG. Antimicrobial properties of the strain LG indicated that it showed excellent stability towards temperature, ultraviolet, pH and NaCl. Using specific primers, polyketide synthase (PKS I) and nonribosomal peptide synthetase (NRPS) genes were detected by PCR technique, which indicated that the strain LG possess potential of producing active metabolites. **[Conclusion]** Results from the present study showed that microorganisms from extremophilic environment may be developed as a potential new source of antimicrobial substances.

Keywords: *Bacillus*, Halotolerant bacteria, *Staphylococcus aureus*, Antimicrobial activity, Functional gene

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是一种重要的革兰氏阳性条件致病菌, 属人畜共患病原菌, 可引起多种严重感染^[1-2]。近年来, 由于金黄色葡萄球菌感染几率的增加以及抗生素滥用所导致的耐药性菌株的出现, 使该菌引起感染的治疗变得越来越困难^[3]。尤其是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)的出现, 使几乎所有抗生素的治疗均不起作用。因此寻找和开发新型的抗金黄色葡萄球菌的物质, 已成为医学和微生物学研究领域的重要课题。

盐湖是一类特殊的生态系统, 由于含盐度较高, 生活在这类环境中的动植物较为有限, 但其中蕴藏着丰富的嗜/耐盐微生物资源。由于特殊的生存环境, 盐湖微生物形成了独特的种群特点和代谢机制, 并产生了许多具有特殊功能的代谢产物, 在食品、医药、造纸和环保等领域具有十分重要的潜在开发利用价值^[4-5]。近年来, 人们虽对盐湖微生物开展了广泛的研究, 但将其用于抗菌活性筛选的报道却较为有限^[6-8]。迄今为止, 仅有少数的嗜盐细菌次生代谢产物获得分离纯化, 如 *Halobacillus litoralis* YS3106 产生的 3 种具有抗真菌作用的环肽^[9]和 *Pelagibacter variabilis* 产生的具有抗肿瘤活性的一组吩嗪类化合物 Pelagiomicins A-C^[10], 这与已广泛报道的其它类群微生物的天然产物相比, 无论在种类或数量上都相差甚远。盐湖微生物中所蕴含的丰富次级代谢产物资源还远未被人们所发掘。本研究从山西运城盐湖中分离获得了一株对金黄色葡萄球菌具有明显抗菌活性的耐盐细菌 LG, 采用 16S rRNA 基因序列分析对其进行了分类鉴定, 并对其发酵液抗菌活性进行了初步研究。在活性筛

选的基础上, 对菌株 LG 基因组进行了聚酮合酶(PKS I)基因和非核糖体肽合成酶(NRPS)基因的筛查研究。

1 材料与方法

1.1 菌株及培养条件

菌株 LG 分离自运城盐湖黑泥样品。金黄色葡萄球菌(CICC 10786)购于中国工业微生物菌种保藏管理中心, 为致病菌, 生物危害程度: 三类。所有菌株均采用 LB 培养基(蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, NaCl 10 g, 蒸馏水 1 L, pH 7.0)于 37 °C 下进行活化培养。采用陈雷等^[7]方法确定菌株的最适培养条件, 主要包括 pH、温度和盐度。

1.2 主要试剂和仪器

蛋白胨、酵母粉、琼脂糖(分子级)和 EDTA 等常用试剂购自北京奥博星生物技术有限责任公司; 氨苄青霉素钠(Amp)、X-gal、IPTG 和 DNA 提取纯化试剂等购自上海生工生物工程有限公司; DNA Marker、DNA 聚合酶、合成引物和 pMD18-T Vector 等均购自大连 TaKaRa 公司。

主要仪器包括凝胶成像系统(Tanon-1600), 购自上海天能公司; PCR 扩增仪, 购自美国 Bio-Rad 公司; 高速台式冷冻离心机(TGL-16M), 购自湖南湘仪; 立式压力蒸气灭菌器(LDZX-50K), 购自上海申安医疗器械厂; 电泳仪(DYY-6C), 购自北京市六一仪器厂。

1.3 菌株 LG 的 16S rRNA 基因序列分析及系统进化树构建

提取菌株基因组总 DNA, 以此为模板, 采用细菌通用引物进行 16S rRNA 基因的 PCR 扩增。正向

引物(27F): 5'-GAGTTTGATCCTGGTCAG-3'; 反向引物(1492R): 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3', 由大连宝生物公司合成。扩增体系为: DNA 模板(约 50 mg/L) 1 μ L, 扩增 Buffer 2 μ L, dNTPs (20 mmol/L) 1.6 μ L, 正反向引物(5 μ mol/L)各 1 μ L, 补水至 20 μ L。扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 6 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物纯化及测序由北京三博远志生物科技公司完成。测序结果在 NCBI 数据库中进行 BLAST 搜索, 选取与其同源性较高的相关序列, 利用 ClustalW 软件进行多重序列比对后, 采用 MEGA 5.0 软件分析, 通过邻接法构建菌株 LG 的系统进化树。菌株 LG 的 16S rRNA 基因序列已提交到 GenBank 数据库中, 序列号为 KM502588。

1.4 菌株活化及抗菌上清液制备

从斜面上挑取适量的菌苔接入已灭菌 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 2 d。发酵液经 12 000 r/min 离心 12 min, 上清液用于抗菌活性检测。

1.5 抗菌活性检测

1.5.1 紫外光照稳定性: 取 5 mL 菌株 LG 发酵上清液置于紫外灯下, 分别于 2、4、8、12、16、20 和 24 h 取样, 以金黄色葡萄球菌为指示菌, 未处理的发酵上清作为对照, 采用杯碟法测定抑菌圈直径, 根据其直径变化来判断其光照稳定性。

1.5.2 热稳定性: 将 1 mL 上清液分别置于 0、20、40、60、80 和 100 $^{\circ}$ C 下处理 2 h, 以金黄色葡萄球菌为指示菌, 未处理的发酵上清作为对照, 采用杯碟法测定抑菌圈直径, 考察其热稳定性。

1.5.3 pH 稳定性: 取 1 mL 上清液, 将其 pH 分别调为 3.0、5.0、7.0、9.0 和 11.0, 定容至 2 mL, 静置 2 h。以金黄色葡萄球菌为指示菌, 未处理的发酵上清(pH 7.0)为对照, 采用杯碟法检测其酸碱稳定性。

1.5.4 NaCl 稳定性: 取 1 mL 上清液, 加入 NaCl 溶液, 分别调节盐浓度为 5%、10%、15%和 20%, 静置 2 h。以金黄色葡萄球菌为指示菌, 未加盐的发酵上清作为对照, 采用杯碟法考察其对 NaCl 的

稳定性。

1.6 电镜观察

取 0.1 mL 活化的金黄色葡萄球菌菌悬液 (10^8 CFU/mL), 加入 2 mL 发酵上清液, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 24 h, 离心收集细胞, 用磷酸缓冲液(pH 7.4)冲洗, 加入 2.5% (体积比)的戊二醛溶液进行固定。固定后的细胞经缓冲液再次洗涤, 乙醇梯度脱水并进行临界点干燥, 喷金后在扫描电镜(JSH-35CF, 日本)下观察。固定后的细胞经洗涤后, 用 1%四氧化锇溶液固定 20 h 后, 乙醇梯度脱水, 包埋于树脂中进行超薄切片, 醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色后用透射电镜(DXB2-12, 上海)观察。

1.7 PKS I 和 NRPS 基因的 PCR 筛查及序列分析

菌株 LG 的 PKS I 和 NRPS 基因扩增参照 Zhu 等^[11]的方法进行。PKS I 基因检测引物为 KSF (5'-GCGATGGATCCNCAGCAGCG-3') 和 KSR (5'-GTGCCGGTNCCGTGNGYYTC-3'), NRPS 基因检测引物为 NPF (5'-GCNGGYGGYGCNTAYGTNC-3')和 NPR (5'-CCNCGDATYTTNACYTG-3'), 均由大连宝生物公司合成。PCR 产物通过 1%的琼脂糖凝胶电泳检测后, 进行回收纯化、酶连及转化。挑取有代表性的阳性克隆送往北京三博远志生物科技公司进行测序。将获得的基因序列提交到 GenBank 中获得基因登录号。采用 DNAMAN 软件将测得的 PKS I 和 NRPS 基因序列转换为氨基酸序列, 在 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对, 选取同源性较高的相似序列, 采用 DNAMAN 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 菌株 LG 分类学鉴定

2.1.1 部分生理生化特征: 菌株 LG 在 0–25%的盐浓度范围内均能生长, 最适生长浓度为 5%, 确定其为耐盐细菌; 最适生长 pH 和温度分别为 7.0 和 35–37 $^{\circ}$ C。

2.1.2 系统进化树构建: 采用 PCR 扩增菌株 LG 的 16S rRNA 基因获得大小为 1 454 bp 的片段。采用

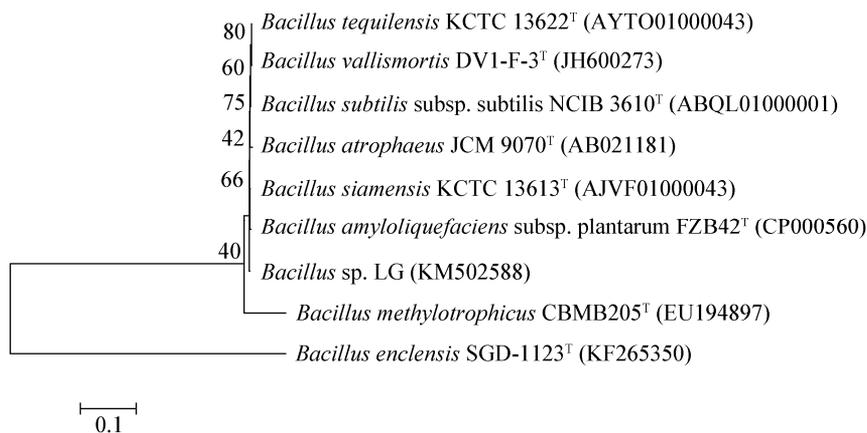


图 1 基于 16S rRNA 基因序列采用邻接法构建的菌株 LG 的系统进化树

Figure 1 Phylogenetic tree of strain LG constructed by Neighbor-Joining method based on 16S rRNA gene sequence

注: 括号中的序号代表菌株的 GenBank 登录号; 分支点上的数字代表计算 1 000 次聚类到一起的几率; 标尺刻度代表 10% 的序列差异。

Note: The sequence number in the bracket means the GenBank accession number of the strain. The number at the node means the percentage of occurrence in 1 000 boot-straped trees. The scale bar means 10% sequence difference.

邻接法构建菌株的系统进化树如图 1 所示。菌株 LG 与 *Bacillus* 属内各种的一致性均在 99.0% 以上, 系统发育分析归于同一分支, 确定其为 *Bacillus* 属成员, 命名为 *Bacillus* sp. LG。

2.2 菌株 LG 发酵液抗金黄色葡萄球菌活性研究

2.2.1 抗菌活性检测: 采用杯碟法检测菌株 LG 发酵上清液的抗菌活性, 结果发现在牛津杯的周围出现一个明显的透明圈(图 2), 表明该菌可产生胞外抗菌物质, 对金黄色葡萄球菌具有明显的抑制作用。

2.2.2 抗菌稳定性研究: 菌株发酵上清液具有良好的对紫外光的稳定性, 以原液为对比, 在紫外光照

射下, 发现其抑菌活性无明显变化。热稳定性研究发现, 当温度低于 80 °C 处理上清液, 抗菌活性几乎不变。然而, 在 100 °C 下处理 2 h 后, 菌株 LG 发酵上清液完全丧失抗菌活性(图 3A)。在 pH 9.0 时, 上清液对金黄色葡萄球菌的抗菌活性最强; 在酸性条件(pH<7.0)下, 抗菌活性有所下降。在 pH 值高于 11.0 时, 活性损失较明显(图 3B)。盐稳定性研究表明, 菌株 LG 发酵上清液对 NaCl (0–20%) 具有良好的耐受性, 在 NaCl 浓度为 15% 时, 抗菌活性最高(图 3C)。

2.3 电镜观察

采用扫描电镜观察菌株 LG 上清液对金黄色葡萄球菌的抗菌作用, 如图 4 所示。正常金黄色葡萄球菌细胞形状规则, 呈圆形, 表面较为光滑, 直径约为 0.8–0.9 μm (图 4A)。经抗菌上清液处理后的细胞形态发生明显变化, 细胞表面粗糙并出现裂纹, 部分已破裂, 并有疑似细胞质泄漏(图 4B)。

透射电镜观察表明, 正常细胞内细胞质分布均匀, 细胞壁厚度约为 80–100 nm, 含有隔膜。细胞质中含有丰富的电子致密物质(图 5A)。经处理后的细胞形状明显变形, 胞内部结构发生紊乱, 外表面



图 2 菌株 LG 发酵液抗菌活性检测

Figure 2 Detection of antimicrobial activity of fermentation broth of strain LG

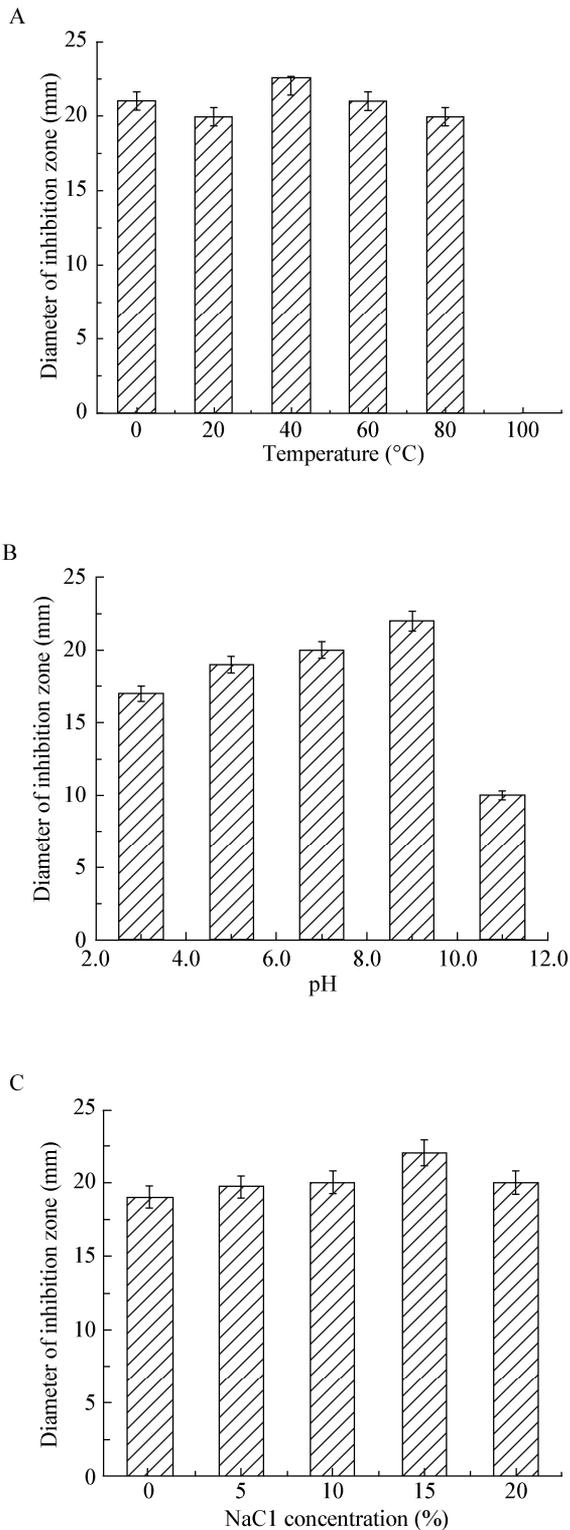


图3 菌株 LG 发酵上清液的抗菌特性
Figure 3 Antimicrobial characteristics of fermentation supernatant of strain LG

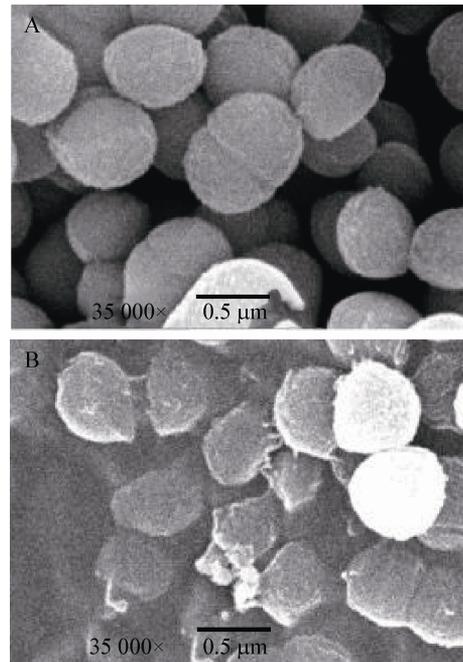


图4 扫描电镜观察

Figure 4 SEM images of *S. aureus*

注: A: 正常菌体细胞; B: 发酵液作用后的菌体细胞。

Note: A: Control cells; B: Cells treated with the fermentation broth.

附着一层疑似细胞质的物质,同时细胞质与细胞壁分界不明显(图 5B),这与扫描电镜观察结果基本吻合。

2.4 PKS I 和 NRPS 基因的 PCR 筛查与分析

采用特异性引物,利用 PCR 技术对菌株 LG 进行功能基因筛查,分别获得了一条 657 bp 的基因片段和一条 669 bp 的基因片段,表明菌株 LG 具有产聚酮类化合物和多肽类化合物的能力。基因序列提交到 GenBank 中获得基因登录号分别为 KM000040 和 KM054996。将基因序列翻译得到的氨基酸序列进行 BLASTp 比对,发现它们分别属于 PKS I 基因簇酮缩合酶(KS)片段的氨基酸高度保守序列和 NRPS 基因的 A 域。选取同源性较高的相关序列,采用 DNAMAN 软件进行序列比对分析,结果如图 6 所示。该菌 PKS I 基因序列与 GenBank 中已知 PKS 基因 KS 域的氨基酸序列(*Bacillus subtilis*, GenBank No. WP_029946469 和 *Sporosarcina pasteurii*,

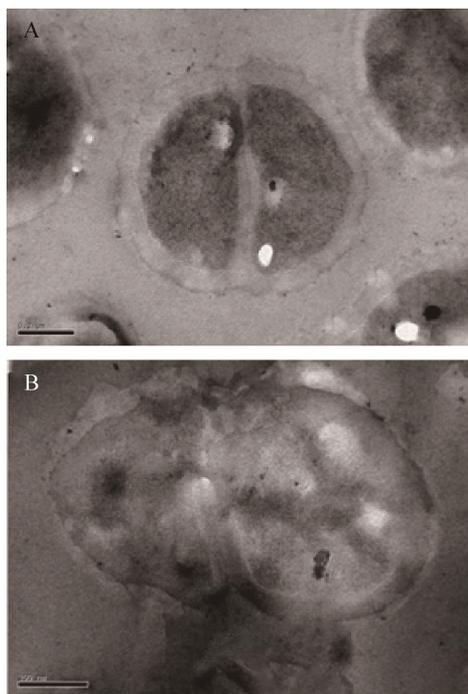


图 5 透射电镜观察

Figure 5 TEM images of *S. aureus*

注: A: 正常菌体细胞; B: 发酵液作用后的菌体细胞。

Note: A: Control cells; B: Cells treated with the fermentation broth.

WP_029726469)的相似度最高, 为 95%。NRPS 基因与已知序列(*Bacillus* sp. 916, WP_007409849 和 *Bacillus amyloliquefaciens*, WP_015239892 等)的相似度最高, 为 99%。

3 讨论

芽孢杆菌(*Bacillus*)是一类重要的药源性微生物, 在自然界中分布广泛, 可产生丰富的具有医学应用价值或动植物病害防治功能的代谢产物^[12]。然而多年来, 随着陆栖微生物在抗生素领域的广泛开发和应用, 寻找新种属或特殊性状的微生物来开发新型微生物源活性物质的难度越来越大。因此, 开拓微生物药物筛选新资源, 从极端环境中寻找和发现具有抗菌活性的特殊菌株就成为研究者关注的热点^[13]。近年来, 本课题组开展了运城盐湖微生物资源的调查研究工作, 采用杯碟法, 筛选获得了一批具有明显抗菌活性的细菌菌株。针对其中一株可抗金黄色葡萄球菌的耐盐细菌 LG 进行研究, 通过 16S rRNA 基因序列分析, 发现该菌为 *Bacillus* 属成员, 命名为 *Bacillus* sp. LG, 为耐盐细菌。

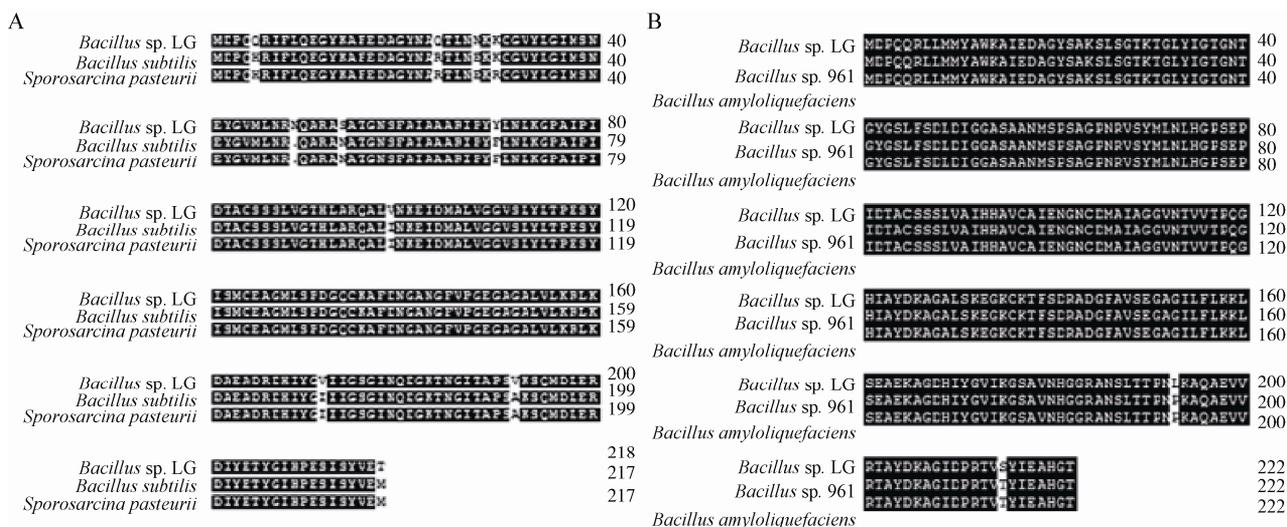


图 6 菌株 LG 的 PKS (A)和 NRPS (B)基因与已知序列的比对分析

Figure 6 Multiple alignment of PKS (A) and NRPS (B) genes of strain LG and other known sequences

近年来, 研究者们虽然对耐盐微生物开展了广泛的研究, 但对其次生代谢产物的报道却较为有限。迄今为止, 仅有少数的嗜/耐盐细菌次生代谢产物被分离纯化, 如 *Bacillus subtilis* strain SK. DU. 4 产生的两种抗菌肽^[14]和 *Lactococcus lactis* 产生的一种具有抗菌活性的乳酸链球菌素类多肽^[15]。近年来, 在耐盐细菌的许多常见种群中, 如 *Aeromonas*、*Bacillus*、*Burkholderia*、*Photobacterium*、*Pseudomonas* 等, 均发现了具有抗菌活性菌株的存在^[8,16]。本文研究发现, 菌株 LG 发酵上清液对金黄色葡萄球菌表现出了明显的抗菌活性。对其抗菌上清液进行各种处理后, 发现其抗菌活性表现了对紫外光照、热、环境酸碱度及盐度等良好的稳定性。电镜观察发现经抗菌上清液处理后的细胞出现了明显的形态变化, 细胞内部结构紊乱, 甚至导致细胞壁破裂及胞质泄漏等。有文献报道该现象主要是由于细胞渗透性的变化引起的, 而这种变化则源于药物在作用于细胞内部结构之前可能首先作用于细胞膜或细胞壁^[17], 此外, 对菌株基因组进行生物合成基因关键酶基因的 PCR 筛查发现, *Bacillus* sp. LG 确实具有产生多种次生代谢产物的潜力, 如多肽类和聚酮类化合物, 同时其抗菌活性的发挥可能也是这两类化合物起作用的结果。

与普通环境微生物相比, 生长在盐湖、海水等盐域环境中的微生物, 由于长期的选择进化, 形成了独特的环境适应机制、特殊的生理结构和独特的基因类型, 必然会产生某些具有独特化学结构或生物学活性的代谢产物, 因此作为发现新型天然化合物的潜在资源。可以预见, 随着研究工作的广泛开展, 来源于极端环境中的抗菌活性微生物将会越来越多地被发现。在本研究结果的基础上, 今后将着重针对菌株 LG 所产代谢产物进行分离纯化及结构解析等相关工作, 为其在抗生素研究领域的潜在应用奠定基础。

参 考 文 献

- [1] Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections[J]. New England Journal of Medicine, 1998, 339(8): 520-532
- [2] Baba-Moussa L, Anani L, Scheffel JM, et al. Virulence factors produced by strains of *Staphylococcus aureus* isolated from urinary tract infections[J]. Journal of Hospital Infection, 2008, 68(1): 32-38
- [3] Miller LG, Perdreau-Remington F, Rieg G, et al. Necrotizing fasciitis caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Los Angeles[J]. New England Journal of Medicine, 2005, 352(14): 1445-1453
- [4] Margesin R, Schinner F. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology[J]. Extremophiles, 2001, 5(2): 73-83
- [5] Morozkina EV, Slutskaja ES, Fedorova TV, et al. Extremophilic microorganisms: biochemical adaptation and biotechnological application[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2010, 46(1): 1-14
- [6] Chen L, Wang GY, Bu T, et al. Phylogenetic analysis and screening of antimicrobial and cytotoxic activities of moderately halophilic bacteria isolated from the Weihai Solar Saltern (China)[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009, 26(5): 879-888
- [7] Chen L, Wang GY, Bu T, et al. Identification of a moderately halophilic bacterium whb45 and screening of its antimicrobial and antitumor activity[J]. Microbiology China, 2010, 37(1): 85-90 (in Chinese)
陈雷, 王光玉, 卜同, 等. 一株中度嗜盐细菌 whb45 的鉴定及其抗菌与抗肿瘤活性筛选[J]. 微生物学通报, 2010, 37(1): 85-90
- [8] Chen QH, Zhang L, Liu ZX, et al. Screening and biological characteristics of antibiotic active halophilic and halotolerant bacteria from Xiaoxi national natural reserve[J]. Journal of Microbiology, 2010, 30(4): 7-11 (in Chinese)
陈奇辉, 张丽, 刘祝祥, 等. 小溪自然保护区嗜盐及耐盐菌抗菌活性筛选及生物学特征[J]. 微生物学杂志, 2010, 30(4): 7-11
- [9] Yang L, Tan R, Wang Q, et al. Antifungal cyclopeptides from *Halobacillus litoralis* YS3106 of marine origin[J]. Tetrahedron Letter, 2002, 43(37): 6545-6548
- [10] Imamura N, Nishijima M, Takadera T. New anticancer antibiotics pelagiomycins, produced by a new marine bacterium *Pelagibacter variabilis*[J]. Journal of Antibiotics, 1997, 50(1): 8-12
- [11] Zhu P, Zheng Y, You Y, et al. Molecular phylogeny and modular structure of hybrid NRPS/PKS gene fragment of *Pseudoalteromonas* sp. NJ6-3-2 isolated from marine sponge *Hymeniacidon perleve*[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009, 19(3): 229-237
- [12] Ye JJ, Cao NN, Zhang JF, et al. Research application progress on the *Bacillus* sp. in plant pathogenic fungi biocontrol[J]. Agricultural Science & Technology, 2013, 14(5): 695-698
- [13] Li J, Li GY. Extremophilic microorganisms: new resources of bioactive substances[J]. Chinese Journal of Nature, 2011, 33(5): 275-280 (in Chinese)
李江, 李光友. 极端微生物-生物活性物质的新源泉[J]. 自然杂志, 2011, 33(5): 275-280
- [14] Baindara P, Mandal SM, Chawla N, et al. Characterization of two antimicrobial peptides produced by a halotolerant *Bacillus subtilis* strain SK.DU.4 isolated from a rhizosphere soil sample[J]. AMB Express, 2013, 3(1): 2
- [15] Biscola V, Todorov SD, Capuano VS, et al. Isolation and characterization of a nisin-like bacteriocin produced by a *Lactococcus lactis* strain isolated from charqui, a Brazilian fermented, salted and dried meat product[J]. Meat Science, 2013, 93(3): 607-613
- [16] De la Rosa-García SC, Muñoz-García AA, Barahona-Pérez LF, et al. Antimicrobial properties of moderately halotolerant bacteria from cenotes of the Yucatan peninsula[J]. Letter in Applied Microbiology, 2007, 45(3): 289-294
- [17] Park Y, Hahn KS. Antimicrobial peptides (AMPs): peptide structure and mode of action[J]. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2005, 38(5): 507-516