

网络出版时间:2025-02-06 15:58:23 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20250206.1136.002

# 格氏乳球菌 SHAMU-LG6 对葡萄球菌的拮抗活性研究

翁胜男<sup>1</sup>,冷贵云<sup>1</sup>,刘颖<sup>2</sup>,王亚武<sup>1</sup>,李昕<sup>1</sup>,姚杰<sup>1</sup>,周强<sup>1</sup>,唐伟<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>安徽医科大学第二附属医院检验科,合肥 230601;

<sup>2</sup>中国科学院合肥物质科学研究院强磁场科学中心,合肥 230031)

**摘要** 目的 探索格氏乳球菌 SHAMU-LG6 对葡萄球菌的拮抗活性。方法 利用 VITEK 2 GP 鉴定卡、Microflex LT MALDI-TOF 质谱分析仪和 16S rDNA 扩增测序 3 种方法共同鉴定菌株种属。牛津杯法抑菌试验检测格氏乳球菌 SHAMU-LG6 对不同葡萄球菌的拮抗活性;XAD16 非离子型大孔树脂吸附、梯度乙醇洗脱和旋转蒸发干燥初步分离纯化抗菌活性成分。结果 格氏乳球菌 SHAMU-LG6 对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、腐生葡萄球菌、路邓葡萄球菌、人葡萄球菌、头状葡萄球菌、沃氏葡萄球菌等均具有拮抗效应,抑菌指数分别为 3.3、3.0、4.3、2.0、4.0、3.5、3.8 和 3.5。格氏乳球菌 SHAMU-LG6 分泌的抗菌活性成分主要存在于 70% 和 80% 乙醇洗脱物中。结论 格氏乳球菌 SHAMU-LG6 对葡萄球菌具有强拮抗效应,其分泌的抗菌活性成分有望成为新型抗菌药物开发的先导化合物。

**关键词** 格氏乳球菌;葡萄球菌;拮抗活性;抗菌活性成分;分离纯化;16S rDNA;牛津杯法

**中图分类号** Q 939.92;R 378.1+1

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2025)02-0195-06

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.02.002

葡萄球菌是临床样本中分离率最高的革兰阳性病原菌<sup>[1]</sup>。难以杜绝的抗生素不合理使用、甚至是滥用,会诱发耐药菌的产生和播散。其中,耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)已被世界卫生组织列为威胁人类健康的主要病原体之一<sup>[2-3]</sup>,临床治疗棘手。迄今,微生物依然是新型抗菌药物的重要来源<sup>[4]</sup>。乳酸菌隶属于厚壁菌门、芽孢杆菌纲、乳杆菌目,分布广泛,通常被认为是益生菌,包括乳杆菌属、乳球菌属、明串珠菌属、片球菌属、链球菌属、气球菌属、差异球菌属、肉杆菌属、狡诈球菌属、肠球菌属、酒球菌属、四联球菌属、漫游球菌属和魏斯氏菌属<sup>[5-6]</sup>。该课题组专利保藏了一株格氏乳球菌 SHAMU-LG6,保藏编号为 CCTCC M 2023482,该研究拟探索格氏乳球

菌 SHAMU-LG6 对葡萄球菌的拮抗活性,为新型抗菌药物和益生菌制剂的研发提供物质基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株** 葡萄球菌菌株分离自安徽医科大学第二附属医院临床病患的呼吸道、肠道、尿道、血液、皮肤和感染组织等,经过革兰阳性细菌(VITEK 2 gram-positive, VITEK 2 GP)鉴定卡法和基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)法共同鉴定确认,包括金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、腐生葡萄球菌、路邓葡萄球菌、人葡萄球菌、头状葡萄球菌、沃氏葡萄球菌等。根据微量肉汤稀释法进行药敏试验结果和美国临床实验室标准化协会 M100-S29 标准,将金黄色葡萄球菌菌株进一步分为 MRSA 和甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(meticillin-sensitive *S. aureus*, MSSA)。格氏乳球菌 SHAMU-LG6 分离自 1 例泌尿科普通患者(非泌尿系感染)的尿液标本,经过 VITEK 2 GP 鉴定卡法、MALDI-TOF MS 法和 16S rDNA 测序法共同鉴定确认。上述菌株均分离自常规临床送检样本,属于免伦理审查范围。

**1.1.2 主要试剂与仪器** LB 肉汤、LB 琼脂平板(上海生工生物工程股份有限公司);无水乙醇(无

2024-10-20 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82102460);安徽医科大学研究生科研与实践创新项目(编号:YJS20230190);安徽医科大学第二附属医院临床研究培育计划项目(编号:2021LCZD13);安徽医科大学校科研基金项目(编号:2022xkj197)

作者简介:翁胜男,女,硕士研究生;

周强,男,副教授,主任技师,硕士生导师,通信作者, E-mail: zhouqiang1973@163.com;

唐伟,男,主治医师,硕士生导师,通信作者, E-mail: tangwei317822887@sina.com

锡展望化工试剂有限公司);非离子型大孔树脂(上海源叶生物科技有限公司);膜过滤器(0.45  $\mu\text{m}$  和 0.22  $\mu\text{m}$ ,美国 Millipore 公司);微孔滤膜(0.45  $\mu\text{m}$  和 0.22  $\mu\text{m}$ ,上海新亚净化器件厂);哥伦比亚绵羊血琼脂平板(合肥天达诊断试剂有限公司);麦氏比浊仪、全自动微生物鉴定及药敏分析仪、VITEK 2 GP 鉴定卡(法国生物梅里埃公司);MALDI-TOF MS 分析仪(德国布鲁克公司);立式全温振荡培养箱(上海知楚仪器有限公司);高速冷冻离心机(北京白洋医疗器械有限公司);层析柱(盐城协弘科学仪器有限公司);旋转蒸发仪、浴槽(郑州长城科工贸有限公司);循环水式多用真空泵(上海析牛莱伯仪器有限公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 格氏乳球菌 SHAMU-LG6 的鉴定

**1.2.1.1 菌落特征与菌体形态** 四区划线法接种血琼脂平板,5%  $\text{CO}_2$ 、35  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养 24 h,观察菌落特征。挑取典型菌落进行革兰染色,光学显微镜下观察染色后的菌体形态。

**1.2.1.2 菌种鉴定** VITEK 2 GP 鉴定卡法:按照说明书要求,配制 0.5 麦氏浊度(McFarland, MCF)菌液,使用 Compact 全自动微生物鉴定药敏仪和 VITEK 2 GP 鉴定卡,初步鉴定菌株种属。

**MALDI-TOF MS 法:**使用一次性接种环挑取新鲜单个菌落,均匀涂布于不锈钢靶板待测区。依次滴加 1  $\mu\text{l}$  70% 甲酸和  $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸基质液并干燥。按 Microflex LT MALDI-TOF MS 分析仪的操作说明,上机检测。使用 MALDI FlexAnalysis 和 Biotyper 软件,采集并分析菌株的质谱图,进而鉴定菌株种属。质谱鉴定分值  $\geq 1.7$ ,表示鉴定结果可信。

**16S rDNA 测序法:**提取菌株的基因组 DNA,以细菌通用引物 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R(5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3')进行 PCR 扩增。产物测序由上海派森诺生物科技股份有限公司完成。将测序数据提交至 GenBank,并在进行 NCBI 数据库中进行 BLAST 序列分析比对,最终确定菌株种属。

**1.2.2 牛津杯法抑菌实验** 使用无菌棉签,蘸取适量 0.5 MCF 葡萄球菌悬液,密集涂布于 LB 琼脂平板表面。放置牛津杯(内径 6 mm),杯中加入 3.0 MCF 格氏乳球菌 SHAMU-LG6 悬液,室温下静置。待杯内液体被平板完全吸收,移除牛津杯,29  $^{\circ}\text{C}$  过夜孵育。观察杯痕周围有无抑菌圈形成,并测量抑

菌圈直径。参考左双海等<sup>[7]</sup>的方法,计算抑菌指数(antibacterial index, AI)评估格氏乳球菌 SHAMU-LG6 对葡萄球菌的拮抗效应。

AI = 格氏乳球菌 SHAMU-LG6 对葡萄球菌的抑菌圈直径/格氏乳球菌 SHAMU-LG6 的菌落直径。AI = 1,无拮抗活性;1 < AI < 2,弱拮抗活性;2  $\leq$  AI < 3,中等拮抗活性;AI  $\geq$  3,强拮抗活性。抑菌率 = 有拮抗活性的菌株数/菌株总数  $\times 100\%$

**1.2.3 抗菌活性粗提物的制备** 复苏后的格氏乳球菌 SHAMU-LG6 在 LB 肉汤中,35  $^{\circ}\text{C}$  振荡培养,直至菌密度在 600 nm 波长处的吸光度值为 0.25。将培养物按 1% (v/v) 比例接种新鲜 LB 肉汤,200 r/min、29  $^{\circ}\text{C}$  发酵 24 h。经离心和滤过除菌,获取无菌发酵上清液。随后,加入 XAD-16 非离子型大孔树脂,磁力搅拌下,吸附过夜。湿法灌装分离柱,并使用超纯水和梯度乙醇(30%、50%、60%、70%、80%、90%)依次洗脱,收集梯度乙醇洗脱液。梯度乙醇洗脱液经旋转蒸发干燥后,复溶于适量超纯水并滤过除菌。以金黄色葡萄球菌为指示菌,牛津杯法验证各梯度乙醇洗脱物的杀菌活性,筛选出抗菌活性粗提物。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 版软件进行统计学分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组样本间比较采用独立样本  $t$  检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。绘图使用 Origin 2021、Photoshop 2020 和 Illustrator 2020 软件。

## 2 结果

### 2.1 格氏乳球菌 SHAMU-LG6 的鉴定

**2.1.1 菌落特征和菌体形态** 格氏乳球菌 SHAMU-LG6 的菌落呈圆形凸起、灰白色、不透明、边缘整齐、表面光滑、湿润、直径 0.5 ~ 3.0 mm,周围有  $\alpha$  溶血环(图 1A)。革兰染色后在光学显微镜下观察,格氏乳球菌 SHAMU-LG6 菌体成圆形或卵圆形,成对或短链状排列,无荚膜、无芽胞、无鞭毛,为革兰阳性菌(图 1B)。

**2.1.2 菌种鉴定** VITEK 2 GP 鉴定卡法,初步鉴定该菌株为格氏乳球菌。MALDI-TOF MS 法,采集并分析该菌株的质谱图(图 2),进一步鉴定为格氏乳球菌,评分为 2.370,表明鉴定结果可信。该菌株 PCR 扩增获得一段长度为 1 110 bp 的 DNA 序列,GenBank 登录号为 OQ918061。经过 BLAST 比对,该菌株与格氏乳球菌相似度达到 99.66%。综

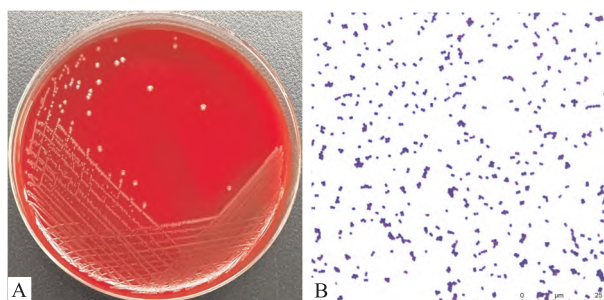


图1 格氏乳球菌 SHAMU-LG6 的菌落形态及革兰染色

Fig.1 Growth morphology and gram staining of *Lactococcus garvieae* SHAMU-LG6

A: Growth morphology; B: Gram staining morphology  $\times 1\ 000$ .

合前述的菌落特征和菌体形态,确定该菌株为格氏乳球菌,2023年4月6日将其保藏在中国典型培养物保藏中心,保藏名称为 *L. garvieae* SHAMU-LG6,保藏编号为 CCTCC M 2023482。

## 2.2 格氏乳球菌 SHAMU-LG6 对葡萄球菌的作用

根据药敏试验结果,将金黄色葡萄球菌进一步分为 MRSA 和 MSSA。牛津杯法抑菌实验表明(图3),格氏乳球菌 SHAMU-LG6 对 MRSA、MSSA、表皮葡萄球菌、路邓葡萄球菌、人葡萄球菌、头状葡萄球菌和沃氏葡萄球菌具有强拮抗活性,AI 分别为 3.3、3.0、

4.3、4.0、3.5、3.8 和 3.5;对腐生葡萄球菌具有中等拮抗活性,AI 为 2.0。随机选取 MRSA 和 MSSA 各 15 株,实验显示格氏乳球菌 SHAMU-LG6 对 15 株 MRSA 和 13 株 MSSA 有强拮抗活性,对 2 株 MSSA 有中等拮抗活性(表1)。格氏乳球菌 SHAMU-LG6 对 MRSA 和 MSSA 产生的抑菌圈直径分别为  $(22.24 \pm 1.83)$  mm 和  $(19.63 \pm 2.14)$  mm,格氏乳球菌 SHAMU-LG6 对 MRSA 和 MSSA ( $t = 3.587, P = 0.01$ ) 的拮抗活性存在差异(图4)。

**2.3 抗菌活性粗提物的制备** 牛津杯法验证梯度乙醇洗脱物的抑菌效应(图5),100  $\mu$ l 50%、60%、70%、80%、90% 乙醇洗脱物的抑菌圈直径分别为 12.0、11.2、13.8、13.5、5.9 mm。其中,70% 和 80% 乙醇洗脱物的抑菌效应最强,即为抗菌活性粗提物。

## 3 讨论

葡萄球菌因抗生素滥用而演变出了多种耐药机制,如产生  $\beta$ -内酰胺酶、主动外排抗菌药物以及改变细胞膜的通透性等<sup>[8]</sup>,这给临床抗感染治疗带来了极大的挑战。研究<sup>[9]</sup>表明,乳酸菌产生的细菌素能够抑制其它细菌、真菌、病毒和寄生虫的生长,有潜力开发为新型抗菌药物。本课题组在前期实验中,成功筛选出一株能够明显拮抗金黄色葡萄球菌

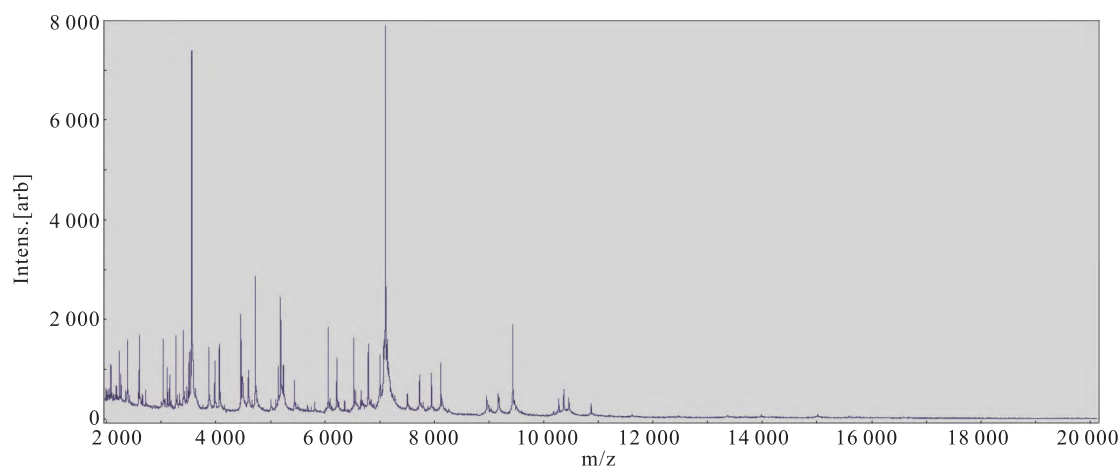


图2 格氏乳球菌 SHAMU-LG6 的 MALDI-TOF MS 鉴定图谱

Fig.2 MALDI-TOF MS characterization map of *Lactococcus garvieae* SHAMU-LG6

表1 格氏乳球菌 SHAMU-LG6 对 MRSA 和 MSSA 的拮抗活性

Tab.1 Antagonistic activity of *Lactococcus garvieae* SHAMU-LG6 against MRSA and MSSA

Bacteria	Number of strains	No antagonistic activity	Weak antagonistic activity	Moderate antagonistic activity	Potent antagonistic activity	Inhibition rate (%)
MRSA	15	0	0	0	15	100
MSSA	15	0	0	2	13	100



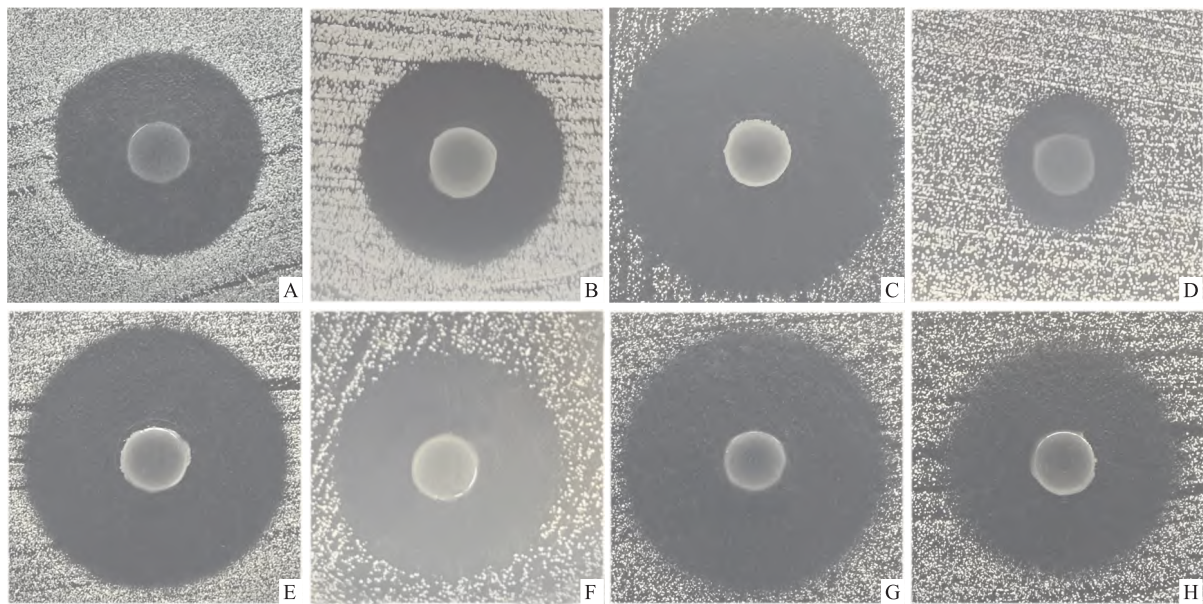


图3 格氏乳球菌 SHAMU-LG6 对葡萄球菌的拮抗活性

Fig.3 Antagonistic activity of *Lactococcus garvieae* SHAMU-LG6 against *Staphylococcus*

A: MRSA; B: MSSA; C: *Staphylococcus epidermidis*; D: *Staphylococcus saprophyticus*; E: *Staphylococcus lugdunensis*; F: *Staphylococcus hominis*; G: *Staphylococcus capitis*; H: *Staphylococcus warneri*.

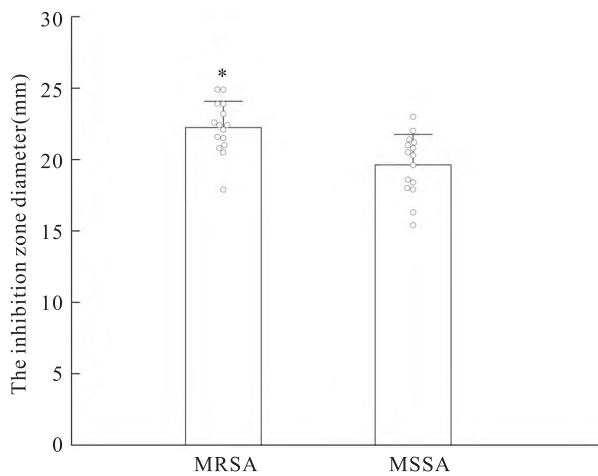


图4 格氏乳球菌 SHAMU-LG6 对 MRSA 和 MSSA 的拮抗活性评估  
Fig.4 Evaluation of antagonistic activity of *Lactococcus garvieae* SHAMU-LG6 against MRSA and MSSA

\*  $P < 0.05$  vs MSSA group.

的细菌,进一步研究其抗菌活性具有十分重要的科研价值。

本研究采用基于 PCR 的分子技术<sup>[10]</sup>,结合菌落特征和菌体形态,鉴定该菌株为格氏乳球菌,属于乳酸菌家族,命名为格氏乳球菌 SHAMU-LG6。迄今,已报道了 6 种来自不同格氏乳球菌的细菌素,其抗菌活性各不相同。如, Garviecin L1-5<sup>[11]</sup> 只对单核增生李斯特菌、梭状芽孢杆菌和亲缘关系较近的

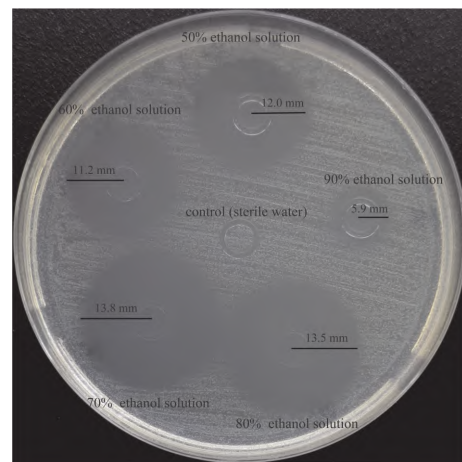


图5 梯度乙醇洗脱物的活性验证

Fig.5 Confirmation of the activity of gradient ethanol eluates

菌株有作用。Garvicin ML<sup>[12]</sup>可以抑制屎肠球菌、肺炎链球菌以及部分乳杆菌、乳球菌、片球菌、丙酸杆菌、梭状芽孢杆菌和李斯特菌属细菌。Garvieacin Q<sup>[13]</sup>和 Garvicin A<sup>[14]</sup>均能抑制除其生产者之外的其它格氏乳球菌,但前者还可抑制单核增生李斯特菌 ATCC 19115。此外, Garviecin LG34<sup>[15]</sup>和 Garvicin KS<sup>[16]</sup>对金黄色葡萄球菌有抑制作用。因此,本研究中格氏乳球菌 SHAMU-LG6 拮抗多种葡萄球菌的现象,可能归因于其产生了类似的抗菌活性物质。许

多抑制革兰阳性菌的细菌素通过靶向细胞膜发挥杀菌作用。如 Nisin 与靶菌细胞膜上的脂质 II 结合,通过膜成孔及抑制细胞壁的合成杀死靶菌<sup>[17]</sup>; Garvicin Q<sup>[18]</sup> 和 Lactococcin A<sup>[19]</sup> 通过特异性结合靶细胞上的甘露糖磷酸转移酶系统,诱导细胞膜渗漏和细胞死亡。据此推测,格氏乳球菌 SHAMU-LG6 可能通过靶向葡萄球菌细胞膜,破坏菌体结构,从而发挥杀菌作用。由于金黄色葡萄球菌是临床样本中分离率最高的革兰阳性菌,尤其是 MRSA,具有高致病率和广谱耐药性,对  $\beta$ -内酰胺类、大环内酯类和氨基糖苷类抗生素均产生不同程度的耐药。因此,本研究以 MRSA 和 MSSA 为例进行了统计学分析,发现格氏乳球菌 SHAMU-LG6 对 MRSA 的拮抗效应强于 MSSA。此现象可能与其抗菌活性物质在靶菌上的受体数量及分布有关。

为进一步研究抗菌活性物质的成分和结构,本研究采用大孔树脂吸附粗提法,从细菌发酵液中分离纯化此种物质。经过 XAD16 非离子型大孔树脂吸附、梯度乙醇洗脱、旋转蒸发干燥、超纯水复溶和旋干物复溶液活性验证,发现格氏乳球菌 SHAMU-LG6 分泌的抗菌活性物质主要存在于 70% 和 80% 乙醇洗脱物中。与传统萃取法相比,此方法具有吸附容量大、操作费用低和树脂易再生等优点。此前, Wu et al<sup>[20]</sup> 使用 XAD16 大孔树脂粗提鼠李糖乳杆菌 ZFM216 的抗菌肽,又经过凝胶色谱和反相高效液相色谱法实现了抗菌肽的精细纯化。这说明了此种纯化方法的可行性,因此,本课题组后续拟使用凝胶色谱和反相高效液相色谱,精细纯化抗菌活性粗提物;通过扫描电镜、透射电镜和荧光染色研究其杀菌机制。

### 参考文献

- [1] 郭靖敏,沈晖,伍勇,等. 湖南省细菌耐药监测网 2012—2021 年葡萄球菌属细菌耐药性监测报告[J]. 中国感染控制杂志, 2024, 23(4): 442–7. doi:10.12138/j.issn.1671-9638.20245411.
- [1] Wu J M, Shen H, Wu Y, et al. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus spp.*: surveillance report from Hunan Province antimicrobial resistance surveillance system, 2012–2021[J]. *Chin J Infect Contr*, 2024, 23(4): 442–7. doi:10.12138/j.issn.1671-9638.20245411.
- [2] Craft K M, Nguyen J M, Berg L J, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): antibiotic-resistance and the biofilm phenotype[J]. *Medchemcomm*, 2019, 10(8): 1231–41. doi:10.1039/c9md00044e.
- [3] Liu S, Deng S, Liu H, et al. Four novel leaderless bacteriocins, bacin A1, A2, A3, and A4 exhibit potent antimicrobial and anti-biofilm activities against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Microbiol Spectr*, 2022, 10(5): e0094522. doi:10.1128/spectrum.00945-22.
- [4] Magana M, Pushpanathan M, Santos A L, et al. The value of antimicrobial peptides in the age of resistance [J]. *Lancet Infect Dis*, 2020, 20(9): e216–30. doi:10.1016/S1473-3099(20)30327-3.
- [5] Sharma A, Lee S, Park Y S. Molecular typing tools for identifying and characterizing lactic acid bacteria: a review [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2020, 29(10): 1301–18. doi:10.1007/s10068-020-00802-x.
- [6] 唐俊妮. 乳酸菌及其产生的细菌素[J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2022, 48(3): 250–9. doi:10.11920/xnmzdk.2022.03.003.
- [6] Tang J N. Lactic acid bacteria and their bacteriocins [J]. *J Southwest Minzu Univ Nat Sci Ed*, 2022, 48(3): 250–9. doi:10.11920/xnmzdk.2022.03.003.
- [7] 左双海,彭开松,操庆庆,等. 一株拮抗多重耐药菌的芽孢杆菌的初步研究[J]. 中国微生态学杂志, 2013, 25(6): 621–4. doi:10.13381/j.cnki.cjm.2013.06.001.
- [7] Zuo S H, Peng K S, Cao Q Q, et al. The preliminary research of one *Bacillus* strain with antagonism to multidrug resistant bacteria [J]. *Chin J Microecol*, 2013, 25(6): 621–4. doi:10.13381/j.cnki.cjm.2013.06.001.
- [8] Mlynarczyk-Bonikowska B, Kowalewski C, Krolak-Ulinska A, et al. Molecular mechanisms of drug resistance in *Staphylococcus aureus* [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(15): 8088. doi:10.3390/ijms23158088.
- [9] Hernández-González J C, Martínez-Tapia A, Lazcano-Hernández G, et al. Bacteriocins from lactic acid bacteria: a powerful alternative as antimicrobials, probiotics, and immunomodulators in veterinary medicine [J]. *Animals*, 2021, 11(4): 979. doi:10.3390/ani11040979.
- [10] Ostlie H M, Eliassen L, Florvaag A, et al. Phenotypic and PCR-based characterization of the microflora in *Norvegia cheese* during ripening [J]. *Int J Food Microbiol*, 2004, 94(3): 287–99. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.01.012.
- [11] Villani F, Aponte M, Blaiotta G, et al. Detection and characterization of a bacteriocin, garvicin L1–5, produced by *Lactococcus garvieae* isolated from raw cow's milk [J]. *J Appl Microbiol*, 2001, 90(3): 430–9. doi:10.1046/j.1365-2672.2001.01261.x.
- [12] Borrero J, Brede D A, Skaugen M, et al. Characterization of garvicin ML, a novel circular bacteriocin produced by *Lactococcus garvieae* DCC43, isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*) [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(1): 369–73. doi:10.1128/AEM.01173-10.
- [13] Tosukhowong A, Zendo T, Visessanguan W, et al. Garvieacin Q, a novel class II bacteriocin from *Lactococcus garvieae* BCC 43578 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78(5): 1619–23. doi:10.1128/AEM.06891-11.

- [14] Maldonado-Barragán A, Cárdenas N, Martínez B, et al. Garvicin A, a novel class IId bacteriocin from *Lactococcus garvieae* that inhibits septum formation in *L. garvieae* strains[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79(14): 4336–46. doi:10.1128/AEM.00830–13.
- [15] 刘 珊, 高玉荣. 格氏乳球菌素 LG34 生物稳定性的研究[J]. *黑龙江八一农垦大学学报*, 2013, 25(3): 67–70, 96. doi:10.3969/j.issn.1002–2090.2013.03.016.
- [15] Liu S, Gao Y R. Study of biological stability of *Lactococcus garvieae* LG34[J]. *J Heilongjiang Bayi Agricultural Univ*, 2013, 25(3): 67–70, 96. doi:10.3969/j.issn.1002–2090.2013.03.016.
- [16] Ovchinnikov K V, Chi H, Mehmeti I, et al. Novel group of leaderless multipetide bacteriocins from gram-positive bacteria[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2016, 82(17): 5216–24. doi:10.1128/AEM.01094–16.
- [17] Zendo T, Yoneyama F, Sonomoto K. Lactococcal membrane-permeabilizing antimicrobial peptides[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 88(1): 1–9. doi:10.1007/s00253–010–2764–3.
- [18] Tymoszevska A, Diep D B, Wirtek P, et al. The non-lantibiotic bacteriocin garvicin Q targets man-PTS in a broad spectrum of sensitive bacterial Genera[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 8359. doi:10.1038/s41598–017–09102–7.
- [19] Kristiansen P E, Persson C, Fuochi V, et al. Nuclear magnetic resonance structure and mutational analysis of the lactococcal A immunity protein[J]. *Biochemistry*, 2016, 55(45): 6250–7. doi:10.1021/acs.biochem.6b00848.
- [20] Wu D, Dai M, Shi Y, et al. Purification and characterization of bacteriocin produced by a strain of *Lacticaseibacillus rhamnosus* ZFM216[J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 1050807. doi:10.3389/fmicb.2022.1050807.

## Study on the antagonistic activity of *Lactococcus garvieae* SHAMU-LG6 against *Staphylococcus*

Weng Shengnan<sup>1</sup>, Leng Guiyun<sup>1</sup>, Liu Ying<sup>2</sup>, Wang Yawu<sup>1</sup>, Li Xin<sup>1</sup>, Yao Jie<sup>1</sup>, Zhou Qiang<sup>1</sup>, Tang Wei<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Dept of Clinical Laboratory, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601;

<sup>2</sup>High Magnetic Field Laboratory, Hefei Institutes of Physical Science, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031)

**Abstract Objective** To investigate the antagonistic activity of *Lactococcus garvieae* SHAMU-LG6 against *Staphylococcus*. **Methods** VITEK 2 GP identification card, Microflex LT MALDI-TOF mass spectrometer and 16S rDNA amplification sequencing were used to identify the strain species. The antagonistic activity of *L. garvieae* SHAMU-LG6 against different *Staphylococcus* was detected by Oxford cup method for bacterial inhibition; the antimicrobial active components were preliminarily isolated and purified by adsorption on XAD16 nonionic macroporous resin, gradient ethanol elution and rotary evaporation drying. **Results** *L. garvieae* SHAMU-LG6 exhibited potent antagonistic effect against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, methicillin-susceptible *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. lugdunensis*, *S. hominis*, *S. capitis* and *S. warneri*, with inhibitory indices of 3.3, 3.0, 4.3, 2.0, 4.0, 3.5, 3.8, and 3.5, respectively. The antimicrobial active components produced by *L. garvieae* SHAMU-LG6 were mainly present in 70% and 80% ethanol eluates. **Conclusion** *L. garvieae* SHAMU-LG6 exhibits a potent antagonistic effect on *Staphylococcus*, and the antimicrobial active components produced by it are expected to be a lead compound for the development of novel antimicrobial agents.

**Key words** *Lactococcus garvieae*; *Staphylococcus*; antagonistic activity; antimicrobial active components; separation and purification; 16S rDNA; oxford cup method

**Fund programs** National Natural Science Foundation of China (No. 82102460); Graduate Student Scientific Research and Practical Innovation Project of Anhui Medical University (No. YJS20230190); Clinical Research Cultivation Program of the Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University (No. 2021LCZD13); Scientific Research Project of Anhui Medical University (No. 2022xkj197)

**Corresponding authors** Zhou Qiang, E-mail: zhouqiang1973@163.com; Tang Wei, E-mail: tangwei317822887@sina.com