

路则宝,王靓贤,姬志林,等. 具抑菌活性乳酸菌筛选及抑菌活性物质分析[J]. 江苏农业科学,2019,47(6):170-173.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.06.039

具抑菌活性乳酸菌筛选及抑菌活性物质分析

路则宝¹,王靓贤^{2,3},姬志林¹,刀 娅³,潘梦丽¹,罗义勇^{2,3}

(1. 楚雄医药高等专科学校,云南楚雄 675005; 2. 云南大学农学院,云南昆明 6505002;

3. 昆明理工大学生命科学与技术学院,云南昆明 650500)

摘要:以大肠杆菌 O157:H7 为指示菌,采用 spot-on-lawn 法从食源性乳酸菌菌种库中筛选获得 2 株高抑菌活性乳酸菌,基于 16S rRNA 基因序列分析,分别鉴定为戊糖片球菌和发酵乳杆菌。利用改良牛津杯法测定 2 株乳酸菌发酵浓缩液对常见食源性病原菌的抑菌谱,并分析蛋白酶 K、pH 值、温度对抑菌物质活性的影响,结果发现 2 菌株均能显著抑制大肠杆菌和李斯特菌,其中戊糖片球菌发酵液具有更明显广谱抑菌效果;发酵液抑菌活性均受 pH 值影响,戊糖片球菌发酵液对蛋白酶、热敏感,发酵乳杆菌发酵液对蛋白酶、热不敏感。研究结果表明,戊糖片球菌发酵液抑菌活性物质有多肽(蛋白)和有机酸,发酵乳杆菌来源的抑菌物质化学成分是一些具有热稳定性的有机酸。该研究获得乳酸菌可以用于食品发酵和防腐领域,且为抑菌物质分离、鉴定和抑菌机制研究奠定基础。

关键词:乳酸菌;乳酸菌素;抑菌活性;抑菌谱

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)06-0170-04

乳酸菌(lactic acid bacteria,简称 LAB)是一类能发酵碳水化合物(主要指葡萄糖)产生大量乳酸的革兰氏阳性菌,是传统发酵食品中的主要菌群,长期定居于人类肠道并有益于人体健康,是公认的食品级安全微生物。LAB 具有多种生理功能,比如促进营养物质吸收、维持肠道菌群平衡、提高人体免疫力等^[1]。另外,经过 LAB 发酵不仅可以增加食品的可消化性,赋予发酵食品特有风味、质地和结构,还能产生细菌素、过氧化氢、二氧化碳和有机酸等多种抑菌物质^[2]。基于 LAB 安全性及其功能多样性,LAB 被广泛用于食品发酵和生物保藏领域。随着人民生活水平提高和食品安全意识增强,人们对食品的安全卫生和自身健康状况日益关注,天然食品和绿色食品更容易被消费者认可和接受,因此研究开发广谱、高效、稳定、安全的天然抗菌物质已成为当今国际食品防腐剂发展的主要方向。LAB 来源的天然防腐剂,由于生产成本低廉、安全性高、抑菌效果好等原因,目前已成为研究热点。

LAB 主要通过产生酸性物质和乳酸菌素发挥抑菌作用。酸性物质是乳酸菌代谢的中间产物或终产物,主要包括乙酸、乳酸等,酸性物质抑菌作用强弱取决于介质的 pH 值、酸的离解程度和酸的种类^[2]。酸性物质是乳酸菌的主要抑菌物质,LAB 主要通过产生酸性物质抑制食物中的部分致病菌和腐败菌,马妙莲等研究发现,乳酸菌发酵上清液中抑菌有机酸包括乳酸、乙酸及少量的琥珀酸、柠檬酸、棕榈酸、油酸、硬脂酸和亚油酸等^[3]。乳酸菌素是乳酸菌合成分泌的对革兰氏阳性菌发挥抑菌作用、部分对热稳定的蛋白或多肽,相关学者对

乳酸菌素展开了较为深入的研究,华鹤良等研究发现,乳酸菌素作用发挥受 pH 值、温度条件影响,对水解蛋白酶敏感性^[4],已被应用作为食品添加剂的乳酸链球菌素(Nisin),国内外有许多结构与抗菌机制的报道^[5]。

我国是一个乳酸菌资源种类丰富的国家,但对乳酸菌研究起步比较晚,虽然对乳酸菌的研究投入大量人力物力,也已经有了很多新型乳酸菌生物制品在食品工业中的应用和大规模生产,但存在抑菌物质产量较少、抑菌活性不稳定、抑菌谱较窄等问题,因此正确地选择乳酸菌菌株是非常重要的。本研究目的为筛选优良抑菌性状的食源性乳酸菌,为乳酸菌优良菌株及其抑菌代谢产物的开发和应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验菌株和培养基

昆明理工大学生命科学与技术学院应用微生物室食品微生物菌种库含有各种分离于传统发酵食品(豆豉、泡菜、酸萝卜等)的微生物,从中随机取 24 株乳酸菌作为本试验出发菌株。

食源性病原大肠杆菌(*Escherichia coli*) O157:H7,金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)保存于昆明理工大学生命科学与技术学院应用微生物室,作为本试验的指示菌株。

MRS 液体培养基:1% 蛋白胨,0.8% 牛肉粉,0.4% 酵母粉,2% 葡萄糖,0.1% 吐温 80,0.2% K_2HPO_4 ,0.5% NaAc,0.02% $MgSO_4$,0.005% $MnSO_4$,0.2% 柠檬酸三铵,pH 值 6.2,115 ℃ 高压蒸汽灭菌 20 min。

LB 液体培养基:1% 蛋白胨,0.5% 酵母提取物,0.5% NaCl,pH 值 7.0,121 ℃ 高压蒸汽灭菌 15 min。

BHI 液体培养基:1% 胰蛋白胨,0.5% NaCl,0.25% Na_2HPO_4 ,0.2% 葡萄糖,1.75% 脑心浸出粉,pH 值 7.4,121 ℃ 高压蒸汽灭菌 15 min。

收稿日期:2019-01-20

基金项目:云南省教育厅科学研究基金(编号:2017ZDX003);国家自然科学基金(编号:31660451)。

作者简介:路则宝(1980—),男,山东汶上人,硕士,副教授,从事微生物与免疫学研究。E-mail:18987832338@163.com。

通信作者:罗义勇,博士,副教授,从事功能性食品微生物发掘与应用研究。E-mail:yyongluo168@kmust.edu.cn。

MRS、LB、BHI 固体培养基:相应液体培养基中添加 1.5%~1.8% 琼脂。

水琼脂:在去离子水中加 2% 琼脂粉,121 °C 高压蒸汽灭菌 15 min。

1.2 具有抑菌活性乳酸菌筛选

利用 agar-spot-on law 方法筛选具有抑菌活性的乳酸菌^[6]。从-80 °C 冰箱中随机选取 24 株乳酸菌,以 1% (体积分数) 比例分别接种于 5 mL MRS 液体培养基中,温度为 37 °C 条件下中静置培养过夜。将过夜培养物振荡混匀,取 10 μ L 滴加于 MRS 固体平板上,置于温度为 37 °C 条件下培养 24 h。将含有浓度为 1×10^6 CFU/mL 大肠杆菌 O157:H7 的 LB 固体培养基铺在长有乳酸菌单菌落的 MRS 固体培养基上,37 °C 过夜培养 12 h,观察抑菌效果。

1.3 具有抑菌活性乳酸菌鉴定

选取上述抑菌效果最好的 2 株乳酸菌,利用细菌基因组提取试剂盒(中国百泰克公司)提取基因组 DNA。以细菌 16S rRNA 基因为分子 Marker,利用细菌通用引物 F27(5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3')和 R1492(5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3')进行 PCR 扩增。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后,送公司进行测序。通过在 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中进行同源性在线比对,鉴定菌种种属^[7-9]。

1.4 乳酸菌来源抑菌物质对常见食源性病原细菌抑制水平测定

将上述 2 株乳酸菌先在 MRS 液体培养基中过夜活化,然后按 1% (体积分数) 比例将活化菌液转接至新鲜 MRS 液体培养基中,37 °C 静置培养 24 h。离心(12 000 r/min,2 min)收集上清液,以 9 mL/管分装于 50 mL 离心管中,利用 parafilm 膜封住管口,然后先置于-80 °C 冰箱中过夜冷冻,再利用真空冷冻干燥机(100020,德国)冷冻干燥,最后用生理盐水溶解固体粉末,得到浓度为 0.5 g/mL 的乳酸菌发酵上清浓缩液。利用改良牛津杯双层平板法测定乳酸菌抑菌谱^[3,10-11]。配制水琼脂平板,并在琼脂表面放置 3 个灭菌牛津杯。将 3 种常见食源性病原细菌(大肠杆菌 O157:H7、单核细胞增生李斯特菌和金黄色葡萄球菌)分别在 LB、LB 和 BHI 液体培养基中活化,然后将这 3 种病原菌分别加入冷却至 55 °C 的 LB 或 BHI 固体培养基中,使之浓度达到 1×10^6 CFU/mL,摇匀后缓慢倒入已放置牛津杯的水琼脂上,冷却后取出牛津杯,孔中分别加入 200 μ L 发酵上清浓缩液或未浓缩发酵上清液,温度为 37 °C 过夜培养 24 h,观察并测量抑菌圈大小。未接菌的 MRS 液体培养和发酵样品平行试验,得到的 MRS 液体培养基浓缩液作为对照。所有试验均重复 3 次。

1.5 乳酸菌来源抑菌物质化学本质及作用特性

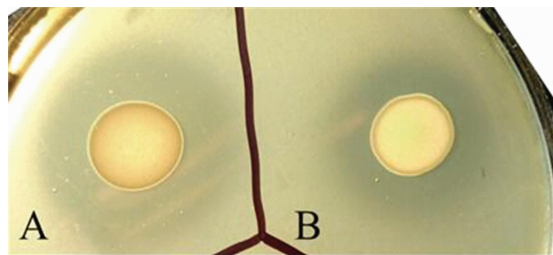
在乳酸菌发酵上清浓缩液中,加入工作浓度为 1 mg/mL 的蛋白酶 K,45 °C 水浴酶解 3 h,再 65 °C 水浴 20 min,使酶失活;向发酵上清浓缩液中加入适量 1 mol/L NaOH,使其 pH 值为 6.5;将发酵上清浓缩液分别置于 65、80、100 °C 水浴锅中处理 1 h^[12]。取 200 μ L 经蛋白酶 K、NaOH 和温度处理的发酵上清浓缩液,用改良牛津杯法测定对大肠杆菌 O157:H7、单核细胞增生李斯特菌和金黄色葡萄球菌的抑制水平。MRS 液体培养基浓缩液与发酵上清浓缩液进行平行试验,得到的

液体作为对照。所有试验均重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 具抑菌活性乳酸菌筛选与鉴定

大肠杆菌分别与 24 株乳酸菌共培养 12 h 后,观察到 16 株乳酸菌有明显抑菌效果。从中挑出 9 株抑菌效果相对较好的菌株再次进行筛选,筛选获得 2 株抑菌效果最好的菌株,分别命名为 KM9、KM19 (图 1)。16S rRNA 基因同源性分析发现,KM9、KM19 分别与 NCBI 数据库中戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*)和发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)具有>99% 同源性,说明 KM9、KM19 分别为戊糖片球菌、发酵乳杆菌。



A—戊糖片球菌 KM9; B—发酵乳杆菌 KM19

图1 2 株乳酸菌对大肠杆菌 O157:H7 抑菌效果

2.2 乳酸菌来源抑菌物质抑菌谱分析

利用改良牛津杯法测定 2 株乳酸菌发酵上清浓缩液和未浓缩发酵上清液对 3 种常见食源性病原细菌的抑制作用,测定结果表明,未浓缩发酵上清液对所有病原菌均没有抑制活性(数据未显示),可能是未浓缩发酵上清液中抑菌物质含量过低。戊糖片球菌 KM9、发酵乳杆菌 KM19 发酵上清浓缩液对大肠杆菌 O157:H7 和单核细胞增生李斯特菌均具有明显抑制作用,相比较 KM9 对大肠杆菌 O157:H7、单核细胞增生李斯特菌抑制效果较好,KM9 对金黄色葡萄球菌有抑制效果而 KM19 则无(表 1、表 2、表 3)。戊糖片球菌 KM9 发酵上清浓缩液不仅仅对食源性致病菌革兰氏阳性单核细胞增生李斯特菌、金黄色葡萄球菌产生抑菌作用,也对革兰氏阴性大肠杆菌 O157:H7 有较强的抑制作用,说明其产生的抑菌物质具有广谱的抗菌活性。

由于乳酸菌菌株特异性,分泌的抑菌物质不同,使乳酸菌具有不同的病原菌抑菌谱;同一乳酸菌对不同病原菌具有不同的抑菌效果,可能跟病原菌的细胞结构组成相关。据相关报道^[3,7,9-10,13],分离的乳酸菌菌株产生的抗菌物质对大肠杆菌、单核细胞增生李斯特菌、金黄色葡萄球菌等可以产生抑制作用,但抑菌谱有差异。马妙莲等从食用性小米分离得到的戊糖乳杆菌对大肠杆菌、单核增生李斯特菌、金黄色葡萄球菌及多种植物病原真菌产生抑菌作用^[3],熊骏等从云南传统发酵豆豉中分离的植物乳杆菌对鼠伤寒沙门菌、大肠杆菌、猪链球菌、单核细胞增生李斯特菌、金黄色葡萄球菌等产生抑菌作用^[7],刘君等从鱼、虾肠道分离得到的戊糖片球菌对美人鱼发光杆菌、大肠杆菌、溶藻弧菌、铜绿假单胞菌、创伤弧菌、副溶血弧菌等都有不同程度的抑制作用^[9],胡彦新等从传统发酵食品中分离出产细菌素的香肠乳杆菌、乳酪短杆菌、植物乳杆菌对沙门氏菌、志贺氏菌、金黄色葡萄球菌具有抑菌作用^[10],任大勇等从发酵食品中分离出植物乳杆菌对沙门氏菌、大肠杆菌、

表 1 乳酸菌发酵上清浓缩液对大肠杆菌 O157：H7 抑菌效果

浓缩液来源	抑菌圈直径 (mm)					
	浓缩液未处理	蛋白酶 K 处理	调节 pH 值 6.5	65℃	80℃	100℃
对照	—	—	—	—	—	—
戊糖片球菌 KM9	19.5 ± 0.17	14.8 ± 0.42 *	— *	16.3 ± 0.69 *	12.8 ± 0.84 *	14.5 ± 0.17 *
发酵乳杆菌 KM19	7.7 ± 0.25	7.3 ± 0.1	— *	8.0 ± 0.58	5.8 ± 0.69	7.3 ± 0.38

注：—表示无抑菌圈；“*”表示相对于浓缩液未处理时，抑菌圈具有显著性差异 ($P < 0.05$)。表 2、表 3 同。

表 2 乳酸菌发酵上清浓缩液对单核细胞增生李斯特菌抑菌效果

浓缩液来源	抑菌圈直径 (mm)					
	浓缩液未处理	蛋白酶 K 处理	调节 pH 值 6.5	65℃	80℃	100℃
对照	—	—	—	—	—	—
戊糖片球菌 KM9	14.0 ± 0.17	14.5 ± 0.29	— *	10.3 ± 0.51 *	9.7 ± 0.19 *	10.3 ± 0.38 *
发酵乳杆菌 KM19	6.2 ± 0.1	6.3 ± 0.1	— *	5.7 ± 0.19	5.2 ± 0.42	4.7 ± 0.38

表 3 乳酸菌发酵上清浓缩液对金黄色葡萄球菌抑菌效果

浓缩液来源	抑菌圈直径 (mm)					
	浓缩液未处理	蛋白酶 K 处理	调节 pH 值 6.5	65℃	80℃	100℃
对照	—	—	—	—	—	—
戊糖片球菌 KM9	5.2 ± 0.35	4.2 ± 0.25	— *	7.0 ± 0.17	6.8 ± 0.1	4.8 ± 0.67
发酵乳杆菌 KM19	—	—	—	—	—	—

金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌产生抑菌作用^[13]。

2.3 乳酸菌来源抑菌物质化学本质及作用特性

乳酸菌发酵上清浓缩液经蛋白酶 K 处理后检测结果表明, KM9 来源抑菌物质对大肠杆菌 O157：H7 抑菌效果有所减弱, 但对金黄色葡萄球菌和单核细胞增生李斯特菌的抑制活性几乎未发生改变; KM19 来源的抑菌物质对大肠杆菌 O157：H7 和单核细胞增生李斯特菌的抑制活性均未受影响 (表 1、表 2、表 3、图 2)。说明 KM9 来源抑菌物质中对大肠杆菌 O157：H7 作用成分中含有对蛋白酶敏感的蛋白质, 而对金黄色葡萄球菌和单核细胞增生李斯特菌的作用成分对蛋白酶不敏感。

发酵上清浓缩液 pH 值变成近中性 (pH 值 6.5) 时, KM9、KM19 来源的抑菌物质对大肠杆菌 O157：H7、金黄色葡萄球菌和单核细胞增生李斯特菌的抑制活性完全丧失 (表 1、表 2、表 3、图 2), 说明 KM9、KM19 来源的抑菌物质化学成分应该是各种有机酸或酸性条件下发挥抑菌活性的多肽 (蛋白)。

温度敏感性试验结果, 高温能降低戊糖片球菌 KM9 来源抑菌物质对大肠杆菌 O157：H7 和单核细胞增生李斯特菌的抑制能力 (表 1、表 2、图 3), 但对金黄色葡萄球菌抑制活性几乎未受影响; KM19 来源的抑菌物质对大肠杆菌 O157：H7 和单核细胞增生李斯特菌的抑制活性几乎不受影响 (表 1、表 2、表 3、图 3)。结果表明 KM9 来源抑菌物质中对大肠杆菌 O157：H7、单核细胞增生李斯特菌的作用成分对热敏感, 而对金黄色葡萄球菌作用成分对热稳定; KM19 来源的抑菌物质对热稳定。

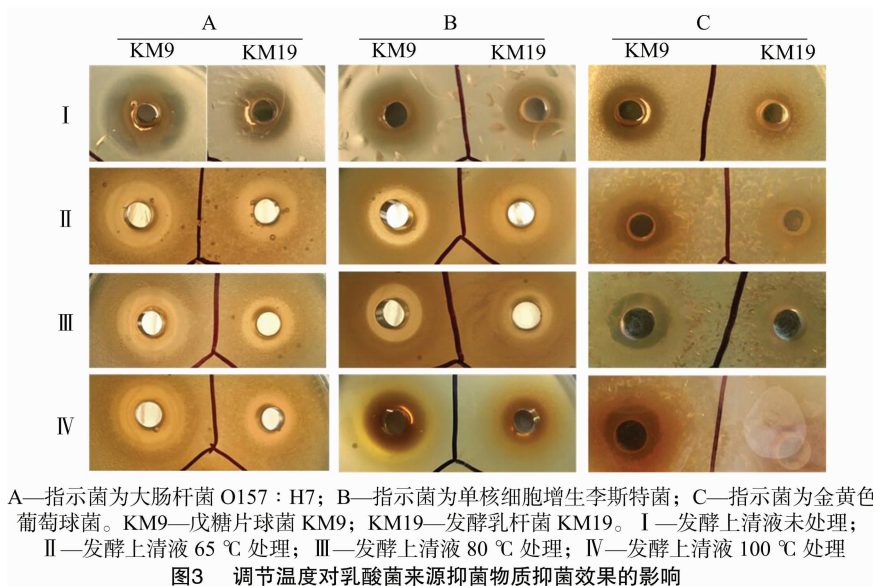
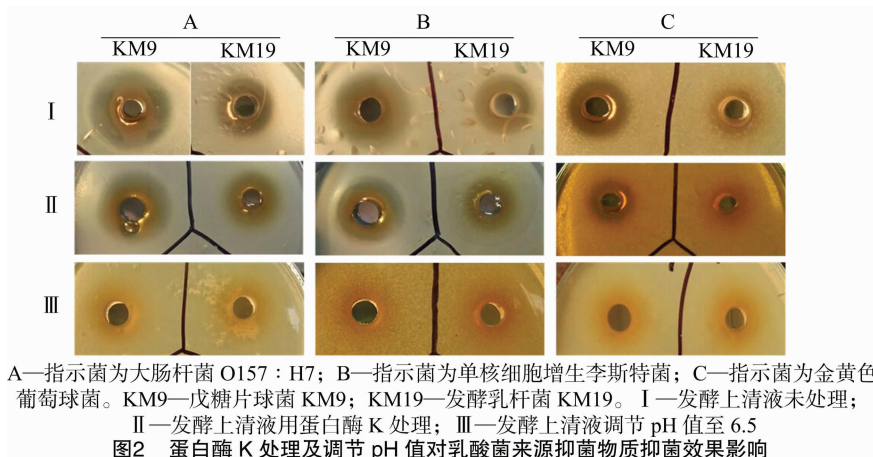
乳酸菌产生的抑菌物质种类繁多, 不同乳酸菌产生不同的抑菌物质。张辉华等发现, 乳酸菌不但对革兰氏阳性菌有效, 对革兰氏阴性菌也有很强抑菌效果; 并且抑菌物质对蛋白酶不敏感, 推测其不是细菌素类物质, 很可能是类抗生素物质^[14]。李院等对来源于酱菜制品乳酸菌的抑菌物质进行分析, 发现抑菌物质对热稳定, 对 pH 值变化敏感, 对蛋白酶处理亦表现不同敏感性, 推测抑菌作用有效成分可能为小肽类/

或有机酸^[15]。何艳霞等从米粉发酵液、酒醅和老面酵头中分离得到 1 株具有良好抑菌效果的乳酸菌, 其抑菌物质活性具有热稳定性; 高效液相色谱测定显示, 苯乳酸、苹果酸、乳酸、乙酸、柠檬酸是其主要抑菌物质, 且苯乳酸对该菌抑菌活性贡献较大^[16]。田丰松等分离的菌株对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌产生抑菌作用, 坚强乳杆菌、粪肠球菌、屎肠球菌和巴黎链球菌主要抗菌物质为有机酸, 黏膜乳杆菌的抗菌物质为过氧化氢、蛋白和有机酸^[17]。杜琨从西藏牧民酸奶中筛选出乳酸菌对金黄色葡萄球菌、小肠结肠炎耶尔森菌、藤黄微球菌、蜡状芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、荧光假单胞菌等的抑制作用较好, 认为抑菌机制主要是破坏菌体的细胞壁或膜的结构^[18]。

综合以上结果分析, KM9 来源的抑菌物质化学成分主要是各种有机酸和小部分蛋白质, 参与对大肠杆菌 O157：H7 和单核细胞增生李斯特菌作用的抑菌成分对温度敏感, 对金黄色葡萄球菌作用的成分主要是热稳定性的各种有机酸; KM19 来源的抑菌物质化学成分应该是一些具有热稳定性的有机酸。

3 结论

本研究从 24 株来源于不同传统发酵食品的乳酸菌中筛选获得 2 株具有明显抑菌活性的菌株, 经分子学鉴定为戊糖片球菌和发酵乳杆菌, 分别命名为 KM9、KM19。KM19 能抑制大肠杆菌 O157：H7 和单核细胞增生李斯特菌, 而 KM9 除了对这 2 种食源性病原细菌有作用外, 对金黄色葡萄球菌同样具有抑菌效果。另外, 抑菌物质化学本质及作用特性初步研究发现, KM9 来源的发酵浓缩液抑菌物质化学成分与 KM19 明显不同, 推测 KM9 来源的抑菌物质化学成分主要是各种有机酸和小部分蛋白质或肽, KM19 来源的抑菌物质化学成分应该是一些具有热稳定性的有机酸。研究获得的乳酸菌可以用于食品发酵和防腐领域, 并丰富了乳酸菌应用菌种资源库, 且为后续抑菌物质的分离、鉴定和抑菌机制研究奠定了基础。



参考文献:

- [1] 赵龙飞. 乳酸菌的保健功能及其在食品中的应用研究[J]. 中国调味品, 2009, 34(6): 30-33.
- [2] 李铁军, 李爱云, 张晓峰. 乳酸菌抗菌机理研究进展[J]. 微生物学通报, 2002, 29(5): 81-85.
- [3] 马妙莲, 赵静, 陈晓琳, 等. 具有广谱抑菌活性乳酸菌的筛选及抑菌物质分析[J]. 食品科学, 2012, 33(1): 162-165.
- [4] 华鹤良, 房东升, 郭睿, 等. 乳源乳酸菌抗菌肽的活性及特性研究[J]. 食品工业, 2014, 35(7): 84-86.
- [5] 吕淑霞, 白泽朴, 代义, 等. 乳酸链球菌素(Nisin)抑菌作用及其抑菌机理的研究[J]. 中国酿造, 2008(9): 87-91.
- [6] Ben Omar N, Abriouel H, Lucas R A, et al. Isolation of bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* strains from ben saalga, a traditional fermented gruel from Burkina Faso [J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 112(1): 44-50.
- [7] 熊骏, 韩瑞娜, 张忠华, 等. 豆豉中高效抑菌活性乳酸菌的筛选及其抑菌研究[J]. 中国微生物学杂志, 2011, 23(6): 485-489.
- [8] 向新, 李晓然, 陈红, 等. 生殖道中具有抑菌活性乳酸菌的分离筛选及其抑菌物质分析[J]. 中国微生物学杂志, 2013, 25(3): 272-276.
- [9] 刘君, 林俊芳, 郭丽琼, 等. 水产源乳酸菌的多样性及抑菌活性研究[J]. 水产科学, 2015, 34(6): 351-357.
- [10] 胡彦新, 李清, 王英, 等. 传统发酵食品中产细菌素乳酸菌的筛选与鉴定[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(1): 276-278.
- [11] 申光辉, 冯孟, 张志清, 等. 一株蜂粮源拮抗细菌的分离鉴定及其抑菌物质特性[J]. 微生物学通报, 2016, 43(10): 2197-2206.
- [12] 李东霞, 庞会利, 王雁萍, 等. 蔬菜废弃物中高抗菌活性乳酸菌的筛选及鉴定[J]. 饲料研究, 2014(13): 71-74.
- [13] 任大勇, 荣凤君, 官圣洁, 等. 发酵食品乳酸菌分离鉴定及功能特性研究[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(19): 194-199.
- [14] 张辉华, 曹永长, 毕英佐, 等. 6株乳酸菌体外抑菌实验[J]. 中国兽医杂志, 2001, 37(7): 8-10.
- [15] 李院, 魏新元, 王静, 等. 抑制青霉菌乳酸菌的分离、鉴定及抑菌物质分析[J]. 食品科学, 2015, 36(21): 150-155.
- [16] 何艳霞, 王凤, 杨文丹, 等. 传统面团中抗霉菌乳酸菌的筛选及其在蒸蛋糕中的应用[J]. 食品工业科技, 2017(19): 94-101.
- [17] 田丰松, 王军, 杨连玉, 等. 不同乳酸菌分离株抗菌物质及其抗菌活性的体外检测及鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2016, 38(7): 558-561.
- [18] 杜琨. 西藏高原酸奶中乳酸菌产抑菌物质的抑菌活性及抑菌机制[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(21): 208-212.