

研究报告

具有优良抑菌特性乳酸菌的筛选鉴定及活性物质检测

杜东晓¹, 赵龙妹^{*1}, 李旺¹, 李元晓¹, 丁轲¹, 何万领¹, 曹平华¹

河南科技大学动物科技学院, 河南 洛阳 471023

杜东晓, 赵龙妹, 李旺, 李元晓, 丁轲, 何万领, 曹平华. 具有优良抑菌特性乳酸菌的筛选鉴定及活性物质检测[J]. 微生物学通报, 2022, 49(8): 3165-3178

Du Dongxiao, Zhao Longmei, Li Wang, Li Yuanxiao, Ding Ke, He Wanling, Cao Pinghua. Screening and identification of lactic acid bacteria with excellent antibacterial properties and detection of active substances[J]. Microbiology China, 2022, 49(8): 3165-3178

摘要:【背景】有益性乳酸菌在人体和动物体内分布极为广泛, 是维持胃肠道菌群平衡、提高机体免疫力的主力军。近年来, 为了解决禁用抗生素而导致动物发病率不断增高的问题, 分析和研究乳酸菌及其所产活性物质的益生特性并开发新型饲料添加剂成为一个重要手段。【目的】本实验旨在从土壤中分离筛选出具有优良抑菌特性的乳酸菌, 并对其所产活性物质的特性进行分析评价。【方法】采用溴甲酚紫平板法筛选并结合抑菌能力检测, 得到 2 株具有优良抑菌特性的产酸菌株, 分别命名为 H-3 和 H-4。经形态学鉴定及 16S rRNA 基因序列测定后, 对 2 株菌分别进行生长曲线和产酸量检测; 通过排除酸处理、蛋白酶处理和热处理的方法分析 2 株菌所产抑菌物质的有效成分。【结果】H-3 和 H-4 菌株经初步鉴定为乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*), 2 株菌均具有良好的生长性能及产酸性能。菌株发酵上清液对大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、猪霍乱沙门氏菌(*Salmonella choleraesuis*)、福氏志贺氏菌(*Shigella flexneri*)均表现出明显的抑制作用。pH 值调至 6.0 时, 菌株发酵上清液仍保持较好的抑菌活性; pH 值调至 7.4 时, H-4 菌株上清液抑菌活性消失。经蛋白酶处理后上清液的抑菌活性减弱甚至消失, 但高温处理对其抑菌活性几乎无影响, 说明抑菌物质中存在一种蛋白质且具有良好的热稳定性。【结论】本实验从土壤中分离得到的 2 株乳酸片球菌具有广谱抑菌特性, 而且所产抑菌物质中除有机酸外还存在一种蛋白质。该 2 株菌的发现及对它们所产抑菌物质的研究为新型绿色饲料添加剂及替抗产品的研发提供了材料并奠定了理论基础。

关键词: 乳酸片球菌; 片球菌素; 广谱抑菌; 筛选鉴定

基金项目: 河南科技大学博士科研启动基金(13480076); 河南省重点研发与推广专项(科技攻关) (212102110174, 212102110157); 河南科技大学大学生研究训练计划项目(2021375)

Supported by: Doctoral Scientific and Research Start-Up Fund of Henan University of Science and Technology (13480076); Key Research and Development and Promotion Projects of Henan Province (Research and Development of Key Science and Technologies) (212102110174, 212102110157); Student Research Training Program of Henan University of Science and Technology (2021375)

*Corresponding author: E-mail: zhaolongmei@126.com

Received: 2021-11-23; Accepted: 2022-03-22; Published online: 2022-04-13

Screening and identification of lactic acid bacteria with excellent antibacterial properties and detection of active substances

DU Dongxiao¹, ZHAO Longmei^{*1}, LI Wang¹, LI Yuanxiao¹, DING Ke¹, HE Wanling¹, CAO Pinghua¹

College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, Henan, China

Abstract: [Background] Lactic acid bacteria are widely distributed in human and animals. They are the main force to maintain the balance of gastrointestinal flora and improve immunity. In recent years, as antibiotics are banned to be used as feed supplements for animals, the incidence of animal diseases has been on the rise. An essential solution is to develop new feed supplements based on the characteristics of lactic acid bacteria and their active metabolites. [Objective] To isolate and screen lactic acid bacteria with excellent antibacterial properties from soil and to analyze and evaluate the characteristics of their active metabolites. [Methods] Two acid-producing strains with excellent antibacterial activity were screened with bromocresol purple plate method and Oxford cup method, which were named H-3 and H-4, respectively. After morphological identification and 16S rRNA gene sequencing, the growth curves and acid production of the two strains were detected, respectively. The effective components of antibacterial substances produced by the two strains were analyzed based on acid exclusion, protease treatment, and heat treatment. [Results] H-3 and H-4 were preliminarily identified as *Pediococcus acidilactici*, which demonstrated good growth performance and acid production capacity. The supernatant of the fermentation broth of the two strains showed obvious inhibitory effect on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis* and *Shigella flexneri*. At pH 6.0, the supernatant maintained strong antibacterial activity, while at pH 7.4, the antibacterial activity of the supernatant of H-4 disappeared. The antibacterial activity of the supernatant treated with protease decreased or even disappeared, but the high-temperature treatment had little influence on the activity, suggesting the existence of a protein in the antibacterial substances with thermal stability. [Conclusion] H-3 and H-4 have broad-spectrum antibacterial activity, and in addition to organic acids, there is also a protein in the produced antibacterial substances. The result in this study lays a theoretical foundation for the research and development of new green feed supplements and antibiotic alternatives.

Keywords: *Pediococcus acidilactici*; pediocin; broad-spectrum bacteriostasis; screening and identification

我国作为畜牧业养殖大国,长期以来都存在养殖门槛低、饲养体量大、散户多、饲养员养殖技术参差不齐及安全意识不高而导致动物发病率高的问题,带来了极大的经济损失。

随着养殖模式的扩大,人们发现将抗生素添加进饲料中能够预防疾病、提高动物生产性能、降低饲养成本。饲料中添加抗生素是饲料产业的一项重大进步,但由于抗生素过量或不合理

使用导致大量致病菌出现了耐药性,进而转变成“超级细菌”,同时也会在动物体内造成大量药物残留,破坏肠道菌群结构,严重影响了饲料业的发展和人类的健康。继瑞典、丹麦、英国等国家实施禁抗措施以来,我国农业农村部第 194 号公告明确规定自 2020 年 7 月 1 日起,饲料生产企业停止生产含有促生长类药物饲料添加剂(中药类除外)的商品饲料^[1]。然而禁用抗生素后动物生产性能受到了严重影响,如断奶仔猪腹泻、采食量减少、肠道屏障功能受损等^[2]。因此就当前而言,寻找或研发出抗生素的替代品成为了社会关注的热点问题。

常见的抗生素替代产品有益生菌、抗菌肽、酶制剂、酸化剂等。其中益生菌因其能够通过调节胃肠道微生物生态菌群平衡而达到促生长、增进动物健康、提高动物免疫水平等作用,是最理想的一类抗生素替代品。乳酸菌是研究最多、最具代表性的益生菌,其代谢产物如细菌素、有机酸等,均具有良好的益生作用。细菌素属于抗菌肽的一种,稳定性强且耐高温、耐酸碱、对真核细胞无毒,但能对多种病原体 and 癌细胞起到杀伤和抑制作用^[3],具有选择性免疫激活和调节功能,在机体内不易产生耐药性、易降解^[4],是目前研究的一大热点,在饲料中添加抗菌肽制剂,能显著降低母猪死产率、提高仔猪成活率。有机酸属于酸化剂的一种,研究表明有机酸能提高消化酶活性并为胃肠上皮细胞提供能量、改善小肠吸收能力、促进血液流动、提高免疫能力^[5]。因此研究乳酸菌及其所产细菌素和有机酸,对饲料生产具有很大的价值。

本实验拟从土壤中筛选具有优良抑菌特性的乳酸菌,并对乳酸菌及其所产活性物质的特性进行研究,为开发新型绿色饲料添加剂奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

指示菌:大肠杆菌(*Escherichia coli*) ATCC 25922、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 6538、猪霍乱沙门氏菌(*Salmonella choleraesuis*) ATCC 13312 和福氏志贺氏菌(*Shigella flexneri*) CMCC 51572 均为本实验室保存。

1.1.2 培养基

LB 培养基^[6],用于指示菌株的培养和保存;MRS 培养基^[7],用于乳酸菌的培养和保存;筛选培养基的配制见参考文献^[8],主要用于产酸菌株的筛选。

1.1.3 主要试剂和仪器

细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒、蛋白酶 K、DNA Marker、通用引物 27F 和 1492R,生工生物工程(上海)股份有限公司。PCR 扩增仪,ABI 公司;电热恒温培养箱,上海新苗医疗器械制造有限公司;电热恒温水浴锅,上海申安医疗器械厂。

1.2 乳酸菌的筛选与分离纯化

称取 1 g 土壤样品溶于 9 mL 无菌水中,于 37 °C、200 r/min 振荡 20 min 后取出,对样品溶液进行梯度稀释(10^{-1} 和 10^{-2}),取 100 μ L 稀释后的样品均匀涂布于筛选固体培养基上,37 °C 恒温培养 48 h。挑取平板上黄色产酸区域中生长较为良好的单菌落再次接种于筛选培养基上,37 °C 恒温培养 24 h,观察菌株是否产酸。将筛选到的产酸菌株划线接种至 MRS 固体培养基上,重复 2-3 次,使平板上长出的菌落形态一致且无杂菌生长,将筛选到的菌株保存备用。

1.3 产抑菌活性物质菌株的筛选

1.3.1 指示菌悬液的制备

将活化后的大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、猪霍乱沙门氏菌、福氏志贺氏菌菌液接种至 LB

液体培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养 20 h。采用稀释涂布平板法计算菌悬液的菌含量, 取 10^6 CFU/mL 作为指示菌菌悬液浓度。

1.3.2 菌株代谢产物的制备

将筛选到的菌株接种至 MRS 液体培养基中, 37 °C 静置培养 24 h 后, 取适量菌液在 12 000 r/min 的条件下离心 5 min, 收集上清液, 所得上清液即为菌株的代谢产物。

1.3.3 菌株代谢产物抑菌试验

参考牛津杯琼脂扩散法进行抑菌活性测定^[9], 以金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、猪霍乱沙门氏菌和福氏志贺氏菌(10^6 CFU/mL)为指示菌, 向 LB 固体培养基上加 100 μ L 指示菌菌悬液并涂布均匀, 将牛津杯放置在涂布好的 LB 平板上, 并向其中加入 100 μ L 菌株发酵上清液, 37 °C 恒温静置培养 12 h, 观察有无透明抑菌圈。

1.4 菌株的鉴定

1.4.1 乳酸菌的形态学鉴定

将纯化后的乳酸菌划线接种于 MRS 平板上, 37 °C 恒温培养 24 h, 观察并记录菌落形态特征, 采用革兰氏染色法对其进行染色, 在光学显微镜下进行镜检, 观察菌体形态特征。

1.4.2 分子生物学鉴定

根据细菌基因组提取试剂盒的说明提取菌株基因组 DNA。以菌株的基因组 DNA 为模板, 采用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')对 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(50 μ L): 基因组 DNA 1 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 2 μ L, 2×Mix 25 μ L, ddH₂O 20 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 4 min; 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共 34 个循环; 72 °C 10 min。

利用琼脂糖凝胶电泳对 PCR 扩增产物进行检测, 观察有无清晰的目的条带。将 PCR 扩增

产物送去生工生物工程(上海)股份有限公司进行序列测定。测序结果在 NCBI 网站上进行 BLAST 分析, 并将其序列信息与 GenBank 中已知序列进行比对, 然后使用 MEGAX 软件通过邻接法(neighbor-joining method)构建系统发育树。

1.5 菌株所产抑菌物质的特性分析

1.5.1 生长曲线的测定

按 2%的接种量将活化后的乳酸菌菌液接种至 MRS 液体培养基中, 37 °C 静置培养 48 h。每隔 2 h 取一次发酵菌液, 以未接种乳酸菌的 MRS 液体培养基作为对照, 在 600 nm 波长处测定其吸光值(OD_{600}), 平行测定 3 次, 以时间为横坐标、吸光值为纵坐标, 绘制菌株培养 48 h 的生长曲线。

1.5.2 不同时间段乳酸菌发酵液的抑菌能力

按 2%的接种量将活化后的乳酸菌菌液接种至 MRS 液体培养基中, 37 °C 静置培养 48 h。每隔 2 h 取一次发酵菌液, 12 000 r/min 离心 5 min, 收集上清液进行抑菌试验, 以未接种乳酸菌的 MRS 液体培养基作为对照, 检测菌液上清抑菌能力随发酵时间的变化规律。

1.5.3 菌液发酵 48 h 的 pH 值变化

按 2%的接种量将活化后的乳酸菌菌液接种至 MRS 液体培养基中, 37 °C 静置培养 48 h。每隔 4 h 取一次发酵菌液, 以未接种乳酸菌的 MRS 液体培养基作为对照, 平行测定 3 次, 检测发酵过程中发酵液 pH 值的变化规律。

1.5.4 抑菌物质酸作用的排除

用 5 mol/L 的 NaOH 溶液将 37 °C 恒温静置培养 12 h 的菌株发酵上清液 pH 值分别调至 6.0 和 7.4, 排除有机酸的干扰, 以未处理过的发酵上清液和 pH 值为 6.0 的乳酸、乙酸溶液作为对照进行抑菌试验, 37 °C 恒温静置培养 12 h, 观察并记录结果。测定 pH 值为 3.0–8.0 范围内菌株发酵上清液抑菌活性的变化。

1.5.5 抑菌物质对蛋白酶的敏感性

用 5 mol/L 的 NaOH 溶液将 37 °C 恒温静置培养 24 h 的乳酸菌发酵上清液 pH 值调至蛋白酶 K 的最适 pH 值 7.4, 加入酶液使终浓度为 1 mg/mL, 37 °C 水浴 2 h, 以未经酶处理、pH 值为 7.4 的乳酸菌发酵上清液作为对照进行抑菌试验, 观察并记录结果。

1.5.6 抑菌物质的热稳定性

将乳酸菌发酵上清液在沸水中分别处理 10、20、30 和 40 min, 以未处理过的乳酸菌发酵上清液作为对照进行抑菌试验, 观察并记录结果。

1.5.7 数据处理

试验测得的数据均包含 3 次重复值, 数据以平均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm SD$)表示。使用 IBM SPSS Statistics 26 软件, 采用 t 检验(student's t test)对数据进行差异性分析, 以 $P<0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌筛选结果

H-3 和 H-4 菌株在 MRS 平板上的菌落如图 1A 所示, 菌落直径为 2 mm 左右, 均呈圆形、凸起、微白色、表面光滑不透明, 边缘整齐, 与乳酸菌菌落形态极为相似。经培养过夜后, 筛选平板(图 1B)上的菌落周围培养基由紫色变为黄色, 说明筛选到的 2 株菌均具有产酸能力。

2.2 具有优良抑菌活性乳酸菌的筛选结果

以金黄色葡萄球菌为例, H-3 和 H-4 菌株的抑菌效果如图 2 所示。从表 1 可以看出菌株 H-3 和 H-4 对指示菌均表现出良好的抑菌活性。通过独立样本 t 检验(independent t test)可知, H-3 菌株的发酵上清液对 4 种指示菌的抑菌圈直径无显著差异($P>0.05$), 但 H-4 菌株的发酵上清液对猪霍乱沙门氏菌的抑菌圈直径为(2.40 ± 0.29) cm, 显著高于其他 3 株指示菌($P<0.05$)。

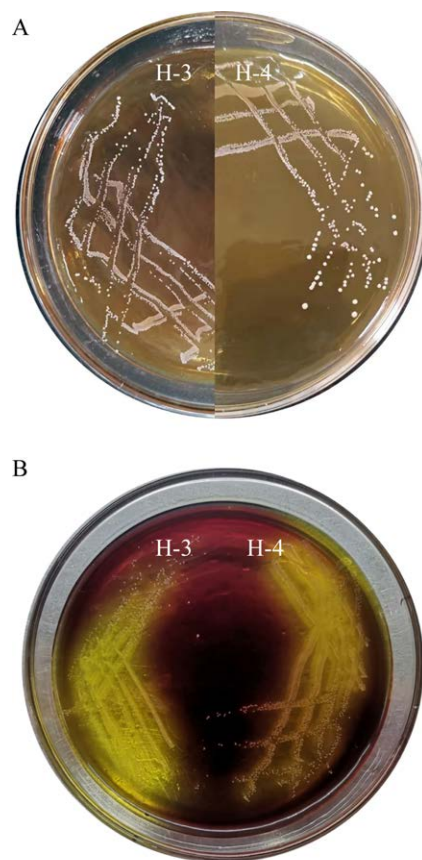


图 1 筛选菌株的菌落形态图 A: 菌落形态图; B: 菌株产酸图

Figure 1 Colony morphology of screened strains. A: Colony morphology; B: Acid production map of strain.

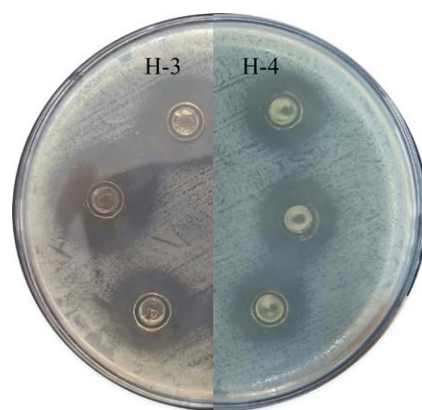


图 2 菌株抑菌效果图

Figure 2 Bacteriostatic effect of strain.

表 1 菌株代谢产物的抑菌圈直径(cm)

Table 1 Diameter of inhibition zone (cm) of metabolites of strain

Group	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. choleraesuis</i>	<i>S. flexneri</i>
H-3	2.10±0.33	2.10±0.23	2.30±0.24	2.10±0.17
H-4	1.60±0.17	1.70±0.12	2.40±0.29 ^a	1.30±0.22

注: a: 猪霍乱沙门氏菌与其他 3 组间有显著性差异 ($P<0.05$)

Note: a: There was significant difference between *S. choleraesuis* and the other three groups ($P<0.05$).

2.3 乳酸菌鉴定结果

2.3.1 形态学鉴定结果

对 H-3 菌株和 H-4 菌株分别进行革兰氏染色, 在光学显微镜(1 000×)下观察(图 3), 菌体均呈球状, 直径大小为 0.6 μm–1.0 μm, 以双球

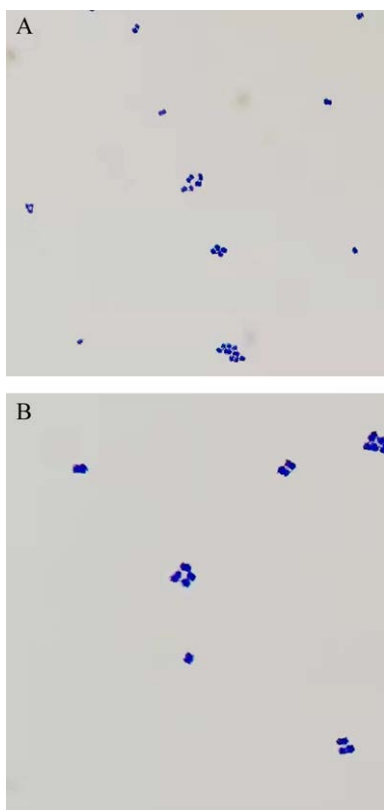


图 3 菌株的革兰氏染色镜检图 A: H-3 菌株; B: H-4 菌株

Figure 3 Gram stain microscopic examination of strain. A: H-3 strain; B: H-4 strain.

菌或四叠球菌形式出现, 很少以单个细胞出现, 不呈链状排列, 蓝紫色, 为革兰氏阳性菌。

2.3.2 分子生物学鉴定结果

由图 4 可知, 琼脂糖凝胶电泳图上观察到 2 条大小约为 1 500 bp 的特异性条带, 将菌株 16S rRNA 基因序列测序结果在 NCBI 上对比后发现, 2 株菌与 *Pediococcus acidilactici* 的一致性达到了 100%, 通过邻接法构建的菌株系统发育树见图 5, 将其鉴定为乳酸片球菌。

2.4 乳酸菌发酵液的抑菌特性分析

2.4.1 乳酸菌的生长曲线

由图 6 可知菌株的生长曲线呈经典的 S 型^[10], 可以观察到明显的延滞期、对数生长期和稳定期。0–2 h 时 H-3 菌株处于延滞期, 0–4 h 时 H-4 菌株处于延滞期, 此时期细菌数量增长缓慢; 2–12 h 时 H-3 菌株处于对数增长期, 4–12 h 时 H-4 菌株也处于对数增长期, 此时期细菌生长迅速, 分裂旺盛, H-3 和 H-4 菌株均于 18 h 后进入稳定期。

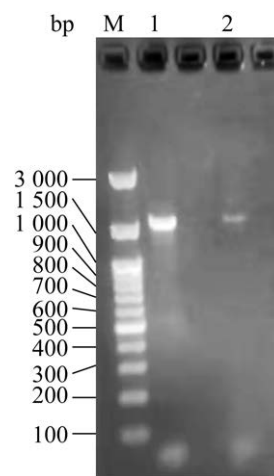


图 4 H-3 和 H-4 菌株 PCR 扩增 16S rRNA 基因的电泳图 M: DNA Marker L; 1 和 2 依次为 H-3 和 H-4 的 16S rRNA 基因扩增产物

Figure 4 Electrophoretogram of 16S rRNA gene amplified by PCR of H-3 and H-4 strains. M: DNA Marker L; 1 and 2 are 16S rRNA gene amplification products of H-3 and H-4, respectively.

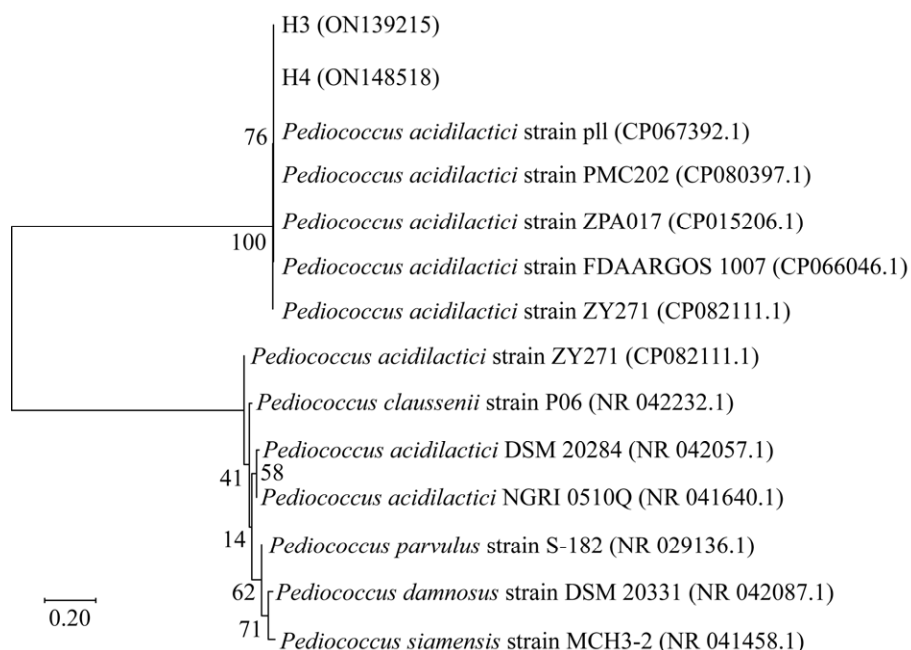


图5 菌株 H-3 和 H-4 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 括号中内容表示菌株 NCBI 序列登录号; 分支点数字表示置信度; 标尺表示遗传距离

Figure 5 Phylogenetic tree of H-3 and H-4 based on 16S rRNA gene sequence. The contents in parentheses are NCBI accession numbers of the strain; Branch point number indicates confidence; Scale indicates evolution distance.

2.4.2 不同时间段菌株发酵上清液的抑菌活性测定结果

如图 7、图 8 所示, H-3 和 H-4 菌株不同时间段的抑菌变化规律大致相同, 基本有上升期、下降期和稳定期, 以大肠杆菌为指示菌, H-3 菌株在生长初期并无明显的抑菌能力, 此后于 40 h 达到峰值; H-4 菌株在生长初期即表现出

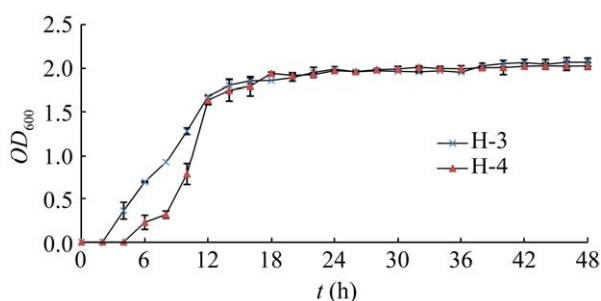


图6 菌株生长曲线

Figure 6 Strain growth curve.

了良好的抑菌效果, 于 24 h 达到峰值, 可见 H-3 菌株对大肠杆菌表现抑菌能力需要有一定的抑菌物质积累。以猪霍乱沙门氏菌为指示菌, H-3 菌株在 24 h 出现峰值后极速下降, 而后趋于稳定, H-4 菌株在 32 h 达到峰值后稍有下降, 后趋于稳定。对金黄色葡萄球菌, H-3 菌株在 28–40 h 抑菌活性最强, 然后稳定, H-4 菌株在 36 h 达到峰值后, 44 h 后趋于稳定。对福氏志贺氏菌, 2 株菌前期均增长稳定, 分别于 20 h 和 32 h 达到高峰, 此后曲线有下降的趋势。乳酸菌能通过产生乳酸、细菌素、过氧化氢、小分子肽类等代谢产物来抑制致病菌的繁殖, 曲线的下降可能是由于乳酸的积累抑制了菌体的生长和乳酸的产生^[11], 或与蛋白类抑菌物质的降解、细菌素聚合或吸附到细胞上^[12]等原因有关。

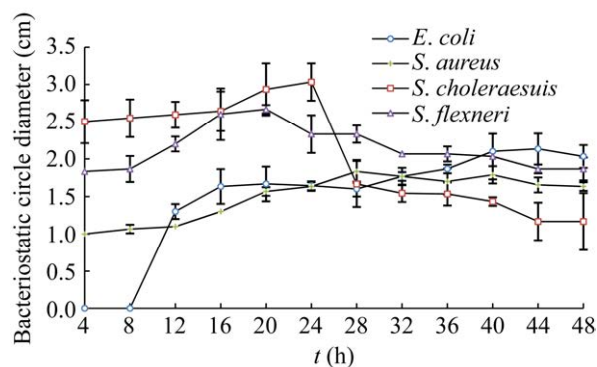


图 7 H-3 菌株发酵上清液的抑菌活性

Figure 7 Antibacterial activity of fermentation supernatant of strain H-3.

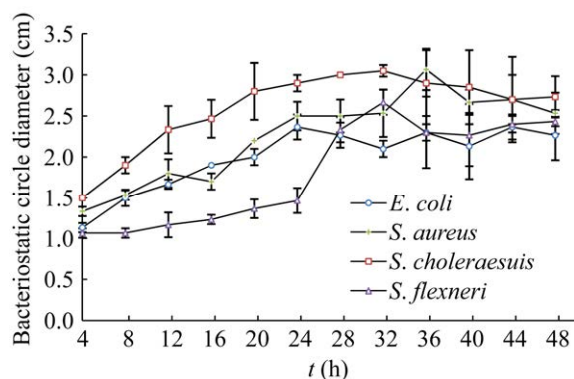


图 8 H-4 菌株发酵上清液的抑菌活性

Figure 8 Antibacterial activity of fermentation supernatant of strain H-4.

2.4.3 乳酸菌的产酸特性

由图 9 的产酸曲线可见, H-3 和 H-4 菌株发酵液培养 4 h 时初始 pH 值约为 5.5, 呈酸性, 此后数值持续下降, 最后都稳定在 pH 值为 3.0 左右。说明 H-3 和 H-4 菌株均具有良好的产酸能力。

2.4.4 排除酸试验结果

从表 2 可以看出, pH 值为 6.0 时, 乳酸与乙酸溶液均无抑菌能力, 而菌株发酵上清液仍保持一定的抑菌效果, 可见 2 株菌产生的抑菌物质中除有机酸外, 还存在一些其他抑菌活性物质, 与崔美岩等^[13]的研究结果一致。pH 值调

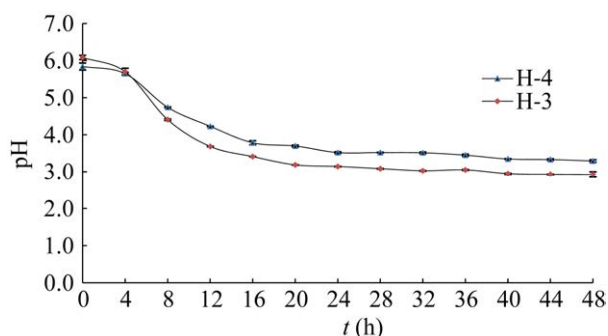


图 9 菌株 pH 值变化曲线

Figure 9 Acid production map of strain.

至 7.4 后, H-3 菌株发酵上清液的抑菌圈直径和对照相比出现了显著性下降($P < 0.05$), H-4 菌株发酵上清液的抑菌圈直径则完全消失($P < 0.05$), 推测 H-4 菌株所产抑菌物质可能为一种酸依赖性物质, 其抑菌活性的变化可能与有机酸的叠加作用有关^[14]。从表 3 中可以看出, H-3 菌株发酵上清液在 pH 值调为 8.0 后其抑菌活性完全消失, 可能是由于较高 pH 值环境会使乳酸菌细菌素的蛋白质结构构象发生变化^[15], pH 值下调至 3.0 时, 菌株发酵上清液的抑菌圈直径均有所增大, 与 Zacharof 等^[16]的研究报道相符, 即乳酸菌细菌素能在低 pH 值环境下更好地吸附在靶细胞表面, 更有利于其发挥抑菌活性。

2.4.5 蛋白酶敏感性

从表 4 可得, 经过蛋白酶 K 处理后, H-3 菌株发酵上清液对部分指示菌的抑菌活性消失; H-4 菌株对 4 种指示菌的抑菌活性完全消失。说明 2 株菌的代谢产物中都存在对蛋白酶敏感的抑菌物质, 可能是一种肽类抑菌物质。

2.4.6 热稳定性

从表 5 可以看出, 2 株菌在高温处理 10、20、30 和 40 min 的情况下, 其抑菌物质的活性并未受到破坏, 无显著性差异($P > 0.05$)。该结果与周配东等^[17]的实验结果一致, 由此可见, 热处理不会对抑菌物质产生明显的影响, 说明 2 株菌产生的抑菌物质具有良好的热稳定性。

表 2 菌株代谢产物排除有机酸后的抑菌圈直径(cm)

Table 2 Diameter of inhibition zone (cm) after elimination of organic acids from metabolites of strain

Group	pH value	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. choleraesuis</i>	<i>S. flexneri</i>
H-3	Control	2.3±0.17	2.4±0.20a	2.9±0.09a	2.9±0.09a
	pH 6.0	2.2±0.11	1.7±0.15	2.1±0.06b	1.7±0.20
	pH 7.4	1.4±0.12a	1.5±0.14	1.5±0.08c	1.6±0.05
H-4	Control	1.8±0.15	1.8±0.12	2.6±0.21a	1.7±0.20a
	pH 6.0	1.1±0.15	1.1±0.15	1.2±0.26b	1.0±0.00b
	pH 7.4	0.0±0.00a	0.0±0.00a	0.0±0.00c	0.0±0.00c
Control	pH 6.0 of the lactic acid	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00
	pH 6.0 of the hydrochloric acid	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00

注: 同一乳酸菌株同一指示菌同列数据小写字母(a、b、c)不同表示差异显著($P<0.05$)

Note: In the same column within the group, the significant difference of $P<0.05$ level is reflected in different lowercase letters.

表 3 菌株代谢产物不同 pH 下的抑菌圈直径(cm)

Table 3 Diameter of inhibition zone (cm) of metabolites under different pH

Group	Indicator bacteria	pH 3.0	pH 4.0	pH 5.0	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0
H-3	<i>E. coli</i>	3.0±0.00a	2.9±0.08ab	2.6±0.09ac	2.0±0.05d	1.5±0.08e	0.0±0.00f
	<i>S. aureus</i>	2.9±0.13a	2.8±0.09a	2.1±0.13	1.8±0.05	1.7±0.09	0.0±0.00b
	<i>S. choleraesuis</i>	3.1±0.09	2.8±0.16	2.7±0.09	2.1±0.08a	1.8±0.05a	0.0±0.00b
	<i>S. flexneri</i>	3.1±0.14a	3.0±0.08a	2.0±0.13	1.7±0.05	1.7±0.12	0.0±0.00b
H-4	<i>E. coli</i>	3.0±0.08	2.9±0.09	2.3±0.05a	1.3±0.12b	0.0±0.00c	0.0±0.00c
	<i>S. aureus</i>	3.1±0.05a	2.8±0.05b	2.3±0.13c	1.4±0.05d	0.0±0.00	0.0±0.00
	<i>S. choleraesuis</i>	3.3±0.09	3.1±0.08	2.7±0.21	1.5±0.12b	0.0±0.00c	0.0±0.00c
	<i>S. flexneri</i>	3.4±0.05a	2.9±0.09b	2.4±0.09c	1.4±0.09d	0.0±0.00	0.0±0.00

注: 同一乳酸菌株同一指示菌同行数据小写字母(a-f)不同表示差异显著($P<0.05$)

Note: In the same line of the group, the significant difference of $P<0.05$ level is reflected in different lowercase letters.

表 4 菌株代谢产物酶处理后的抑菌圈直径(cm)

Table 4 Diameter of inhibition zone (cm) after enzyme treatment of metabolites of strain

Group	Sample	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. choleraesuis</i>	<i>S. flexneri</i>
H-3	Control	1.4±0.12a	1.5±0.14a	1.5±0.08a	1.6±0.05a
	Processing	0.0±0.00b	0.0±0.00b	1.0±0.05b	1.1±0.05b
H-4	Control	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00
	Processing	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00

注: 同一乳酸菌株同一指示菌同列数据小写字母(a、b)不同表示差异显著($P<0.05$)

Note: In the same column within the group, the significant difference of $P<0.05$ level is reflected in different lowercase letters.

表 5 菌株代谢产物热处理后的抑菌圈直径(cm)

Table 5 Diameter of inhibition zone (cm) after heat treatment of metabolites of strain

Group	Time (min)	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. choleraesuis</i>	<i>S. flexneri</i>
H-3	0	1.3±0.10	1.1±0.00	2.3±0.92	2.8±0.31
	10	1.1±0.00	1.2±0.15	2.0±0.28	2.8±0.31
	20	1.3±0.15	1.4±0.11	1.7±0.28	2.9±0.50
	30	1.3±0.07	1.5±0.05	1.6±0.28	2.7±0.15
	40	1.3±0.26	1.4±0.31	2.1±0.21	3.1±0.15
H-4	0	1.4±0.06	2.0±0.25	2.6±0.46	1.5±0.36
	10	1.4±0.20	2.0±0.10	2.5±0.45	1.4±0.35
	20	1.5±0.15	2.1±0.15	2.8±0.12	1.5±0.26
	30	1.6±0.20	2.0±0.32	2.5±0.20	1.5±0.23
	40	1.4±0.26	1.9±0.62	2.7±0.25	1.5±0.32

3 讨论与结论

大多研究表明乳酸菌在人和动物体内能够发挥良好的保健作用,如降低胆固醇、提高消化率和抗菌等。国立东等^[18]通过邻苯二甲醛法检测植物乳杆菌 HUCM115 接种前后培养基中胆固醇含量,发现该菌具有良好的降胆固醇作用。Arasu 等^[19]从传统泡菜中分离出一株具有抗氧化和其他益生功能的短乳杆菌。全面“禁抗”以来,在对可饲用功能型绿色食品添加剂的开发进程中乳酸菌是研究和应用最多的益生菌,刘韶娜等^[20]通过在饲料中添加戊糖片球菌 368 后发现其能改善猪粪便菌群的结构、提高抗菌并降低条件致病菌的相对丰度、具有促进健康和抗病的潜在功能。

本实验从土壤中筛选得到的 2 株菌,其初筛平板由紫色变为黄色,说明 2 株菌均产酸。通过抑菌能力检测,确定 2 株菌均能产生抑菌物质。将获得的菌株测序结果在 NCBI 上进行比对分析,发现 2 株菌属于乳酸片球菌。陈亚男等^[21]曾筛选出 3 株抑菌能力不等的乳酸片球菌,对其中一株进行抑菌成分分析后发现其抑菌能力可能与生长过程中产生的酸有关;董婷

等^[22]曾从发酵酸白菜中筛选出一株具有抑菌能力的乳酸片球菌,其抑菌活性物质为片球菌素;由此可见即使 H-3、H-4 菌株为同一属,但它们各自的抑菌特性仍有很大的研究价值。

本研究分别对 2 株菌进行了生长特性和产酸能力方面的测定,结果显示 2 株菌分别于 2-4 h 进入对数生长期,18 h 进入稳定期,比杨逢清等^[23]研究的菌株更早进入对数期,与侯霞霞等^[24]筛选出的乳酸菌具有大致相同的对数生长期。此结果表明菌株能在较长时间内保持较高的活力,具有较强的繁殖力。由产酸曲线可以看出,在 4-12 h 菌液 pH 值均出现了明显的下降,展示出菌株较好的产酸性能。目前,乳酸菌产生的有机酸作为一种新型的饲料添加剂已经引起了社会的广泛关注,大量的研究表明乳酸菌产生的有机酸在食品、饲料和养殖领域表现出了良好的益生特性^[25-27],崔棹茗等^[28]曾筛选出 4 株产酸能力强、生长速率快并具其他益生特性的乳酸菌,将其用作青贮饲料乳酸菌添加剂菌种;另有研究表明 8 周龄仔猪日粮中添加 0.8% 乳酸可减少十二指肠和空肠大肠杆菌数^[29]。

本实验通过研究不同时间段菌液上清的抑

菌效果,发现在一定的培养时间内随着抑菌物质的积累,上清液的抑菌效果也出现了不断增强,由此确定了菌株的最适培养时间段:H-3 菌株的最适培养时间大致稳定在 20–40 h 之间,H-4 菌株的最适培养时间段为 24–36 h。张建飞^[30]通过对乳酸菌进行发酵特性初步研究发现,其发酵上清液在 20 h 时抑菌活性达到最大值,与本研究结果相似。通过抑菌能力检测发现 2 株乳酸菌对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均具有明显的抑制作用,该类抑菌物质具有较广的抑菌谱,具有这一特性的细菌素其应用领域将会更加广泛。据研究显示,大部分片球菌素对植物乳杆菌和单核细胞增多症李氏杆菌有明显的抑制作用,对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和沙门氏杆菌无明显的抑制作用^[31];王艳婷^[32]筛选得到的戊糖片球菌 C-2-1 所产的细菌素对多种革兰氏阳性菌有较强的抑制作用,但对供试的革兰氏阴性菌和酵母菌无明显抑制作用。

为了进一步了解乳酸菌代谢产物对有害菌的抑制能力,本研究从酶处理、排除有机酸和高温处理 3 个方面对 2 株乳酸菌发酵上清液的抑菌能力进行评估。经排酸处理后发现,在 pH 6.0 条件下,通过与乳酸和乙酸溶液对比可得,本研究中的 2 株菌均能产生除有机酸外其他具有抑菌活性的物质。pH 调至中性后,H-4 菌株发酵上清液的抑菌活性完全消失,李院^[33]曾发现其筛选到的乳酸菌发酵上清液在 pH 值为 5.0 时已丧失抑菌活性,杜贺超等^[34]筛选到的植物乳杆菌 PC4-5 其上清液抑菌活性在 pH 值为 7.0 时消失,均与本研究结果相似。可见 H-4 菌株所产活性物质只在酸性条件下具有活性,是一种酸依赖性物质。Zhang 等^[35]曾分离纯化出鼠李糖乳杆菌 LS-8 所产的一种新型抗菌物质 LS-8-25,发现其具有广泛的抑菌谱且对多种耐药病原体具有良好的抑菌活性,对酶不敏感,

具有较好的热稳定性但仅在酸性条件下具有活性,具有抵抗超级细菌的潜力,而也有部分乳酸菌所产生的细菌素仅在酸性或中性 pH 条件下才能稳定,如 nisin、lactostreptocins 等。因此,H-4 菌株所产的抑菌活性物质具有很大的研究价值。经蛋白酶处理后,H-3 菌株发酵上清液对部分指示菌的抑菌活性消失,H-4 菌株发酵上清液的抑菌活性则完全消失,均表现为对蛋白酶 K 敏感。刘树昕等^[36]曾从酸奶中筛选得到一株产细菌素的植物乳杆菌,其发酵液经排除酸和过氧化氢的影响后仍有抑菌活性且对蛋白酶敏感;章检明等^[37]筛选出一株具有广谱抑菌能力的鼠李糖乳杆菌 4121,其所产抑菌物质具有热稳定性及酸碱稳定性,对蛋白酶敏感,通过细胞吸附解析和阳离子交换层析法,认为该抑菌物质是一种多肽。本研究中的活性物质与以上 2 株乳酸菌所产抗菌肽的性能类似。因此本实验中的 2 株乳酸片球菌所产抑菌物质极可能是一种具有广谱抑菌特性的片球菌素,热处理后发现 2 株菌所产抑菌物质的活性并未受到破坏,具有较好的热稳定性,此结论与片球菌素的特性一致。片球菌素属于细菌素分类中的 IIa 类,大多数 IIa 类细菌素 N 端均存在一对二硫键,但片球菌素通常在其 C 端存在另一个二硫键,这是其区别于其他细菌素的主要特征。有研究表明,片球菌素 PA-1/acH (Ped Pa-1/PedacH) C 末端具有额外的二硫键,能够在升高温度的情况下保持自身结构的稳定性,提高其抑菌能力,扩大抑菌谱^[38]。基于这样的结构,片球菌素属于典型的小分子热稳定肽,具有较强抑菌活性、耐高温等优点^[39]。片球菌素也因此能够在食品加热处理时使用,可以缩短加热时间,将耐高温的细菌素与高压、加热等传统方法联用,有助于克服食物基质上的细菌素失活等问题^[40]。

近年来,随着饲料“禁抗”政策的颁布与实施,开发更安全、更高效的新型抗生素替代剂是目前畜牧业生产中亟待解决的问题,乳酸菌是一种安全绿色的饲料添加剂,具有很大的替抗潜力,本实验通过对菌株抑菌特性的分析,发现菌株所产抑菌物质中除有机酸起抑菌作用外,还存在着一种耐高温的蛋白质或多肽,这使其有望作为替抗型饲料添加剂应用于畜牧业中,后续还需要分离纯化菌株所产抑菌物质,研究其抑菌机制及作用机制并对其安全性进行评估。

REFERENCES

- [1] 王蕾蕾, 许金新. 饲料“禁抗令”施行后养殖业面临的挑战及对策[J]. 中国动物保健, 2021, 23(9): 3, 5
Wang LL, Xu JX. Challenges and countermeasures faced by the breeding industry after the implementation of the feed “prohibition order”[J]. China Animal Health, 2021, 23(9): 3, 5 (in Chinese)
- [2] 曹燕, 李闽. 饲料禁抗对生猪养殖业的启发[J]. 今日养猪业, 2020(5): 83-85
Cao Y, Li M. Inspiration of feed prohibition on pig breeding industry[J]. Pigs Today, 2020(5): 83-85 (in Chinese)
- [3] 王丽, 刘辉, 李爱科, 何贝贝, 段涛, 宋丹, 乔琳, 陈丽仙, 王薇薇. 饲料添加剂类抗生素替代品在生猪养殖中的研究进展[J]. 猪业科学, 2021, 38(2): 80-84
Wang L, Liu H, Li AK, He BB, Duan T, Song D, Qiao L, Chen LX, Wang WW. Research progress on substitutes of antibiotic with feed additives in pig breeding[J]. Swine Industry Science, 2021, 38(2): 80-84 (in Chinese)
- [4] 邓赣奇, 黄增颖, 梁耀文, 张辉华, 林树茂, 刘燊. “减抗”“替抗”背景下抗菌肽的应用和研究进展[J]. 家畜生态学报, 2020, 41(6): 1-7
Deng GQ, Huang ZY, Liang YW, Zhang HH, Lin SM, Liu S. Application and research advance of antimicrobial peptide[J]. Journal of Domestic Animal Ecology, 2020, 41(6): 1-7 (in Chinese)
- [5] 郭振, 田启文, 殷婷婷, 唐维, 孙文字, 贺帅, 刘培, 李相前. 动物饲料中替抗技术的研究进展[J]. 饲料研究, 2019, 42(12): 108-111
Guo Z, Tian QW, Yin TT, Tang W, Sun WY, He S, Liu P, Li XQ. Research progress of antibiotics replacement technology in animal feed[J]. Feed Research, 2019, 42(12): 108-111 (in Chinese)
- [6] 马妙莲. 抑霉菌的分离和鉴定及抑菌物质的分析[D]. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文, 2011
Ma ML. Isolation, identification of antifungal lactic acid bacteria and analysis of their antimicrobial substances[D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui Agricultural University, 2011 (in Chinese)
- [7] 任大勇, 荣凤君, 宫圣洁, 张振业, 朱剑威, 刘宏妍, 于寒松. 不同来源乳酸菌对2种致病菌的抑菌活性比较及抑菌性质研究[J]. 食品工程, 2015(4): 41-44
Ren DY, Rong FJ, Gong SJ, Zhang ZY, Zhu JW, Liu HY, Yu HS. Antibacterial properties of lactic acid bacteria from different sources against two pathogens[J]. Food Engineering, 2015(4): 41-44 (in Chinese)
- [8] 赵龙妹, 聂利芳. 鸡源产蛋白酶乳酸菌的筛选与鉴定[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2020(10): 89-93, 98, 151
Zhao LM, Nie LF. Screening and identification of protease producing *Lactobacillus* from chicken[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2020(10): 89-93, 98, 151 (in Chinese)
- [9] O'Connor EB, O'Riordan B, Morgan SM, Whelton H, O'Mullane DM, Ross RP, Hill C. A lacticin 3147 enriched food ingredient reduces *Streptococcus mutans* isolated from the human oral cavity in saliva[J]. Journal of Applied Microbiology, 2006, 100(6): 1251-1260
- [10] 徐云凤, 张欣, 褚泽军, 张萌, 张敏, 陈俊亮. 一株具有高效抑菌活性乳酸菌的分离鉴定及生长特性研究[J]. 食品与机械, 2021, 37(3): 12-14, 21
Xu YF, Zhang X, Chu ZJ, Zhang M, Zhang M, Chen JL. Isolation, identification and growth characteristics of a strain of lactic acid bacteria with efficient antimicrobial activity[J]. Food & Machinery, 2021, 37(3): 12-14, 21 (in Chinese)
- [11] 闫征, 王昌禄, 顾晓波. pH值对乳酸菌生长和乳酸产量的影响[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(6): 35-38
Yan Z, Wang CL, Gu XB. Influence of pH on the growth of *Lactobacillus casei* G-7 and lactic acid production[J]. Food and Fermentation Industries, 2003, 29(6): 35-38 (in Chinese)
- [12] Aasen IM, Møretro T, Katla T, Axelsson L, Storror I. Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2000, 53(2): 159-166
- [13] 崔美岩, 张蓓, 许宗为, 张淼, 张志霞, 陈骏, 谈重芳. 青海湖裸鲤肠道中益生性乳酸菌的筛选[J]. 中国食品学报, 2018, 18(2): 141-147
Cui MY, Zhang B, Xu ZW, Zhang M, Zhang ZX,

- Chen J, Tan CF. Screening of probiotic LAB from *G. przewalskii* intestinal[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(2): 141-147 (in Chinese)
- [14] 杜静芳, 缪璐欢, 马欢欢, 吕欣然, 李莹, 白凤翎, 励建荣. 淡水鱼肠道中拮抗副溶血弧菌乳酸菌的筛选及鉴定[J]. 中国食品学报, 2017, 17(5): 168-175
Du JF, Miao LH, Ma HH, Lü XR, Li Y, Bai FL, Li JR. Screening and identification of lactic acid bacteria with antagonistic *Vibrio parahaemolyticus* derived from freshwater fish intestinal[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2017, 17(5): 168-175 (in Chinese)
- [15] Jack RW, Tagg JR, Ray B. Bacteriocins of Gram-positive bacteria[J]. Microbiological Reviews, 1995, 59(2): 171-200
- [16] Zacharof MP, Lovitt RW. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria: a review article[J]. APCBEE Procedia, 2012, 2: 50-56
- [17] 周配东, 潘道东, 张玉千, 丁海兵. 产细菌素乳酸菌的筛选及其所产细菌素的特性[J]. 食品科学, 2011, 32(17): 303-307
Zhou PD, Pan DD, Zhang YQ, Ding HB. Screening of bacteriocin-producing lactic acid bacteria and its antibacterial properties[J]. Food Science, 2011, 32(17): 303-307 (in Chinese)
- [18] 国立东, 张文文, 刘艳, 黄梦玲, 门悦, 张燕丽, 王丽群. 传统发酵东北酸菜中植物乳杆菌 HUCM115 的分离及益生特性[J]. 食品科学, 2020, 41(18): 140-145
Guo LD, Zhang WW, Liu Y, Huang ML, Men Y, Zhang YL, Wang LQ. Isolation and probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* HUCM115 from traditional pickled Chinese cabbage[J]. Food Science, 2020, 41(18): 140-145 (in Chinese)
- [19] Arasu MV, Al-Dhabi NA, Rejiniemon TS, Lee KD, Huxley VAJ, Da Hye Kim, Duraipandian V, Karuppiiah P, Choi KC. Identification and characterization of *Lactobacillus brevis* P68 with antifungal, antioxidant and probiotic functional properties[J]. Indian Journal of Microbiology, 2015, 55(1): 19-28
- [20] 刘韶娜, 张斌, 相德才, 赵智勇, 赵彦光. 戊糖片球菌 368 对猪生长性能、粪菌结构和代谢产物的影响[J]. 微生物学通报, 2021, 48(6): 2035-2048
Liu SN, Zhang B, Xiang DC, Zhao ZY, Zhao YG. Effect of *Pediococcus pentosaceus* 368 on grow performance, fecal microbiota and metabolite in pigs[J]. Microbiology China, 2021, 48(6): 2035-2048 (in Chinese)
- [21] 陈亚男, 郭伟强, 陈翠英, 金山. 3 株乳酸片球菌的鉴定及其耐酸耐盐特性和抑菌作用研究[J]. 动物医学进展, 2020, 41(7): 42-47
- Chen YN, Guo WQ, Chen CY, Jin S. Identification and characterization of acid-salt tolerance and bacteriostatic action of three strains of *Pediococcus acidilactici*[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2020, 41(7): 42-47 (in Chinese)
- [22] 董婷, 周志江, 韩烨. 乳酸片球菌 PA003 抑菌作用及体外耐受性的研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(5): 140-144
Dong T, Zhou ZJ, Han Y. Study on the antimicrobe effect and tolerance *in vitro* of *Pediococcus acidilactici* PA003[J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(5): 140-144 (in Chinese)
- [23] 杨逢清, 王泽炜, 李华斌, 田崇瑜, 闫芳, 马海利, 高文伟, 田文霞. 边鸡肠道乳酸菌的分离鉴定及筛选[J]. 中国兽医学报, 2020, 40(11): 2134-2138, 2144
Yang FQ, Wang ZW, Li HB, Tian CY, Yan F, Ma HL, Gao WW, Tian WX. Isolation, identification and screening of lactic acid bacteria from intestinal tract of Bian chicken[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2020, 40(11): 2134-2138, 2144 (in Chinese)
- [24] 侯霞霞, 来航线, 韦小敏. 青贮用乳酸菌的筛选及其生物学特性研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2015, 43(1): 183-192
Hou XX, Lai HX, Wei XM. Screening of lactic acid bacteria strains and their biological characteristics[J]. Journal of Northwest A & F University: Natural Science Edition, 2015, 43(1): 183-192 (in Chinese)
- [25] 刘长建, 闫建芳, 刘秋, 姜波, 齐小辉. 猪消化道中产苯乳酸菌的益生特性研究[J]. 微生物学通报, 2012, 39(6): 804-810
Liu CJ, Yan JF, Liu Q, Jiang B, Qi XH. Probiotic characteristics of phenyllactic acid-producing LAB from swine's digestive tract[J]. Microbiology China, 2012, 39(6): 804-810 (in Chinese)
- [26] 赵丹, 杜仁鹏, 王瑶, 王琪, 那金, 郭尚旭, 葛菁萍. 副干酪乳杆菌 HD1.7 发酵酸菜与商品酸菜代谢物比较与品质评价[J]. 食品科学, 2017, 38(10): 6-11
Zhao D, Du RP, Wang Y, Wang Q, Na J, Guo SX, Ge JP. Comparative evaluation of metabolite composition and quality of *Lactobacillus paracasei* HD1.7 fermented and commercial pickled Chinese cabbage[J]. Food Science, 2017, 38(10): 6-11 (in Chinese)
- [27] 吴锦兰, 付玉麟, 周小玲, 陈正培, 熊建文, 崔娜, 巩僊. 酸笋中高产乳酸菌的筛选、鉴定及发酵条件优化[J]. 中国酿造, 2021, 40(1): 65-69
Wu JL, Fu YL, Zhou XL, Chen ZP, Xiong JW, Cui N,

- Gong X. Screening, identification and fermentation conditions optimization of lactic acid bacteria with high yield lactic acid from sour bamboo shoot[J]. China Brewing, 2021, 40(1): 65-69 (in Chinese)
- [28] 崔棹茗, 郭刚, 原现军, 李君凤, 杨晓丹, 丁良, 余成群, 邵涛. 青稞秸秆青贮饲料中优良乳酸菌的筛选及鉴定[J]. 草地学报, 2015, 23(3): 607-615
Cui ZM, Guo G, Yuan XJ, Li JF, Yang XD, Ding L, Yu CQ, Shao T. Characterization and identification of high quality lactic acid bacteria from hulless barley straw silage[J]. Acta Agrestia Sinica, 2015, 23(3): 607-615 (in Chinese)
- [29] 马玉莲, 王爽, 张鹏宇, 李阳, 刘宇. 饲用有机酸的益生特性及其在猪生产中应用研究进展[J]. 猪业科学, 2016, 33(4): 40-42
Ma YL, Wang S, Zhang PY, Li Y, Liu Y. Research progress on prebiotic properties of feed organic acids and their application in pig production[J]. Swine Industry Science, 2016, 33(4): 40-42 (in Chinese)
- [30] 张建飞. 筛选自牛、羊肠道的乳酸菌 N8603 细菌素纯化及抑菌特性分析[J]. 饲料研究, 2021, 44(11): 65-69
Zhang JF. Purification and antimicrobial activity of bacteriocin from lactic acid bacteria N8603 isolated from cattle and sheep intestines[J]. Feed Research, 2021, 44(11): 65-69 (in Chinese)
- [31] 丁成为. 乳酸片球菌素抑菌谱及应用性研究[D]. 天津: 天津大学硕士学位论文, 2007
Ding CW. Inhibition spectrum and application of pediocin[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University, 2007 (in Chinese)
- [32] 王艳婷. 戊糖片球菌 C-2-1 产细菌素的研究[D]. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文, 2016
Wang YT. Study on bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* C-2-1[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2016 (in Chinese)
- [33] 李院. 酱菜中抑菌菌的乳酸菌分离、鉴定及抑菌活性物质分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2015
Li Y. The isolation, identification and analysis of antimicrobial component of lactic acid bacteria inhibiting fungi in pickles[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A & F University, 2015 (in Chinese)
- [34] 杜贺超, 蒋加进, 王楠楠, 李静, 冯美琴, 姚宏亮. 产抑菌物质乳酸菌的筛选及其抑菌特性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(21): 8543-8550
Du HC, Jiang JJ, Wang NN, Li J, Feng MQ, Yao HL. Screening of lactic acid bacteria with producing bacteriostatic substances and study on its antibacterial characteristics[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(21): 8543-8550 (in Chinese)
- [35] Zhang LH, Wang L, Yi LH, Wang X, Zhang Y, Liu JY, Guo X, Liu L, Shao CG, Lü X. A novel antimicrobial substance produced by *Lactobacillus rhamnosus* LS8[J]. Food Control, 2017, 73: 754-760
- [36] 刘树昕, 吴爱娟, 甄妮, 孙洁, 黄苓, 曾志丹, 曾小群, 潘道东. 广谱抑菌乳酸菌的筛选及其细菌素相关基因分析[J]. 食品科学, 2020, 41(6): 101-107
Liu SX, Wu AJ, Zhen N, Sun J, Huang L, Zeng ZD, Zeng XQ, Pan DD. Screening for a strain of lactic acid bacteria with broad-spectrum antimicrobial activity and analysis of its bacteriocin-related genes[J]. Food Science, 2020, 41(6): 101-107 (in Chinese)
- [37] 章检明, 步雨珊, 杨慧, 易华西, 韩雪, 张兰威. 产抗菌肽乳酸菌筛选及抗菌肽的分离纯化与特性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(4): 781-787
Zhang JM, Bu YS, Yang H, Yi HX, Han X, Zhang LW. Screening *Lactobacillus* producing antimicrobial peptides and study on the separation, purification and characterization of antimicrobial peptides[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2018, 9(4): 781-787 (in Chinese)
- [38] Johnsen L, Fimland G, Nissen-Meyer J. The C-terminal domain of pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) is involved in specific recognition of the C-terminal part of cognate immunity proteins and in determining the antimicrobial spectrum[J]. Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(10): 9243-9250
- [39] 檀克勤, 唐嘉虹, 马现永, 邓盾. 片球菌抑菌机制及其在畜禽生产中的应用[J]. 中国畜牧兽医, 2020, 47(10): 3203-3213
Tan KQ, Tang JH, Ma XY, Deng D. Antibacterial mechanism of *Pediococcus* and its application in livestock and poultry production[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2020, 47(10): 3203-3213 (in Chinese)
- [40] 张晨曦, 贺稚非, 李洪军. 乳酸菌细菌素研究进展及其在肉制品防腐保鲜领域的应用[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(7): 271-277
Zhang CX, He ZF, Li HJ. Research of bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in preservation of meat products[J]. Food and Fermentation Industries, 2017, 43(7): 271-277 (in Chinese)