

研究报告

一株家蚕肠道分离乳酸菌的鉴定及生物学特性

李斯森¹, 陈芳敏^{*1,2}, 方丽¹, 季新奇¹, 夏琬婷^{1,2}, 史孟雄¹, 李佳璇¹, 王馨蒂¹

1 沈阳大学 生命科学与工程学院 辽宁省城市有害生物治理与生态安全重点实验室, 辽宁 沈阳 110044

2 沈阳大学 区域污染环境生态修复教育部重点实验室, 辽宁 沈阳 110044

李斯森, 陈芳敏, 方丽, 季新奇, 夏琬婷, 史孟雄, 李佳璇, 王馨蒂. 一株家蚕肠道分离乳酸菌的鉴定及生物学特性[J]. 微生物学通报, 2025, 52(2): 771-784.

LI Simiao, CHEN Fangmin, FANG Li, JI Xinqi, XIA Wanting, SHI Mengxiong, LI Jiaxuan, WANG Xindi. Identification and biological characterization of a lactic acid bacterial strain isolated from the gut of *Bombyx mori*[J]. Microbiology China, 2025, 52(2): 771-784.

摘要:【背景】乳酸菌(lactic acid bacteria)作为益生菌可用作动物微生态制剂, 家蚕(*Bombyx mori*)作为鳞翅目的模式昆虫, 其肠道内的乳酸菌还有待研究。【目的】从家蚕肠道菌中筛选出性能良好的乳酸菌作为微生态制剂潜力菌株。【方法】通过形态学特征和生化试验筛选出家蚕肠道分离菌中的乳酸菌, 结合 16S rRNA 基因序列分析鉴定到种; 通过溶血试验评估其安全性; 通过生长曲线及产酸曲线测定其生长特征和产酸情况; 通过温度及 pH 敏感性试验测定其抗逆性; 通过测定自聚合能力、疏水能力、病原菌共凝聚能力评估其黏附性; 通过药敏试验测定其耐药性, 并检测其耐药基因。【结果】从家蚕肠道分离出的 56 个菌株中筛选出一株乳酸菌 A2, 经鉴定为粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)。该菌株不溶血, 接种后 3-9 h 生长迅速且产酸最快; 在 80 °C 高温条件下仍能存活; pH<4.0 时存活率显著下降, 但当 pH 10.0 时存活率>78%, 具有极强的耐碱性; 黏附性较强, 自聚合能力为 18%, 疏水能力为 70%, 与大肠杆菌(*Escherichia coli*)的共凝聚性为 32%、与沙门氏菌(*Salmonella*)的共凝聚性为 34%、与金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的共凝聚性为 40%, 对氨苄西林、红霉素和万古霉素有耐药性, 对庆大霉素中度敏感, 对磺胺异恶唑、氯霉素、四环素和氧氟沙星敏感。此外, 从该菌株中检测到 4 类抗生素的 5 个耐药基因, 它们分别是: β -内酰胺类 *bla*_{SHV}、*bla*_{TEM}、氯霉素类 *cat*、氨基糖苷类 *aph*(3')-IIa 和四环素类 *tetE*。【结论】该乳酸菌安全、耐高温、耐碱、黏附性较强, 可作为后续开发微生物发酵饲料及家蚕微生态制剂的菌种, 为肠道益生菌的开发利用提供科学依据和优质资源。

关键词: 家蚕; 乳酸菌; 生物学特性; 耐药基因

资助项目: 国家自然科学基金面上项目(42177406); 辽宁省自然科学基金面上项目(2023-MS-319)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (42177406) and the Natural Science Foundation of Liaoning Province (2023-MS-319).

*Corresponding author. E-mail: fangminchen@syu.edu.cn

Received: 2024-06-25; Accepted: 2024-09-10; Published online: 2024-10-09

Identification and biological characterization of a lactic acid bacterial strain isolated from the gut of *Bombyx mori*

LI Simiao¹, CHEN Fangmin^{*1,2}, FANG Li¹, JI Xinqi¹, XIA Wanting^{1,2}, SHI Mengxiong¹, LI Jiakuan¹, WANG Xindi¹

¹ Liaoning Key Laboratory of Urban Integrated Pest Management and Ecological Security, College of Life Science and Bioengineering, Shenyang University, Shenyang 110044, Liaoning, China

² Key Laboratory of Eco-restoration of Regional Contaminated Environment of Ministry of Education, Shenyang University, Shenyang 110044, Liaoning, China

Abstract: **[Background]** Lactic acid bacteria as probiotics can be developed as microecological preparations for animals. The lactic acid bacteria in the gut of *Bombyx mori*, a model insect of *Lepidoptera*, remain to be studied. **[Objective]** To isolate the lactic acid bacteria with good biological properties from the gut of *B. mori* for developing microecological preparations. **[Methods]** The lactic acid bacteria isolated from the gut of *B. mori* were screened based on morphological, physiological, and biochemical characteristics and identified by 16S rRNA gene sequencing. The safety of the strain screened out was evaluated by the hemolysis test, and the growth characteristics and acid production of the strain were determined by growth curve and acid production curve. The stress tolerance of the strain was determined by temperature and pH sensitivity tests. The adhesion of the strain was evaluated based on self-aggregation, hydrophobicity, and coagglutination with pathogens. Furthermore, the drug resistance of the strain was examined by the drug sensitivity test, and the drug resistance genes carried by the strain were detected. **[Results]** Among the 56 strains isolated, one strain A2 was screened out and identified as *Enterococcus farcalis*. The strain did not present hemolysis, experienced rapid growth and acid production 3–9 h after inoculation. It could survive at a high temperature of 80 °C. The survival rate of the strain decreased in the case of below pH 4.0 and was over 78% at pH 10.0, which indicated that the strain had strong alkaline tolerance. The strain demonstrated strong adhesion, with the self-aggregation of 18%, the hydrophobicity of 70%, and the coagglutination of 32%, 34%, and 40% with *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Staphylococcus aureus*, respectively. It was resistant to ampicillin, erythromycin, and vancomycin, moderately sensitive to gentamicin, and sensitive to sulfafurazole, chloramphenicol, tetracycline, and ofloxacin. The strain carried five drug resistance genes conferring resistance to four categories of antibiotics: β -lactam (*bla_{SHV}* and *bla_{TEM}*), chloramphenicol (*cat*), aminoglycosides (*aph(3')-IIa*), and tetracycline (*tetE*). **[Conclusion]** The lactic acid bacterial strain isolated from the gut of *B. mori* was safe, thermostable, and alkali-tolerant and it had strong adhesion. Therefore, it served as a candidate strain for the subsequent development of microbial fermented feed and microecological preparations for silkworm. This study provided a scientific basis and high-quality resources for the development and utilization of gut probiotics.

Keywords: *Bombyx mori*; lactic acid bacteria; biological characteristics; drug resistance gene

家蚕(*Bombyx mori*)是鳞翅目蚕蛾科家蚕蛾属昆虫,其肠道菌资源十分丰富^[1-2],家蚕肠道微生物不仅能降解纤维素、木聚糖、果胶和淀粉,促进家蚕的消化生长^[3],而且能激活家蚕的先天性免疫,抵御病原菌的入侵^[4]。但在家蚕的养殖过程中由于大量使用抗生素造成药物残留、耐药细菌增多等一系列问题,严重危害家蚕养殖业发展和人类健康^[5]。乳酸菌(lactic acid bacteria)因其具有参与吸收营养物质、改善胃肠道环境、促进动物生长、抑制肠道病原菌的侵入与定殖、调节肠道菌群平衡、参与免疫应答等多种益生功能^[6-8],能发挥出抗生素的使用效果但不会对人体产生危害,已作为微生态制剂广泛应用于畜禽养殖业中。Hayakawa 等^[9]将乳酸菌饲喂给猪,发现其进食量和生长性能都有所提高,Zhang 等^[10]的研究发现饲喂乳酸菌可以提高肉鸡的生长性能和免疫功能。罗智明等^[11]已证实给家蚕添食枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)能够促进家蚕的生长。然而,家蚕肠道中的乳酸菌特性及开发潜力还有待挖掘。本研究旨在从家蚕肠道菌中筛选出生长状况良好、抗逆性和黏附性强的乳酸菌,为开发微生物发酵饲料及动物微生态制剂提供优质菌种资源。

1 材料与方法

1.1 样品

供试菌株为实验室从家蚕肠道分离出的 56 个菌株,病原菌为大肠杆菌(*Escherichia coli*) CMCC(B)44102、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) CMCC(B)26003、沙门氏菌(*Salmonella*) CMCC(B)50115 和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) CMCC(B)10104,均购于上海鲁微科技有限公司。

1.2 培养基和主要试剂、仪器

乳酸细菌培养基(MRS),海博生物技术有限公司;哥伦比亚血琼脂培养基,江门市凯林

贸易有限公司。革兰氏染色试剂盒,北京索莱宝科技有限公司;细菌 DNA 提取试剂盒,北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;抗生素药敏片,杭州微生物试剂有限公司。电泳仪,北京六一仪器厂;凝胶成像仪,Bio-Rad 公司;紫外分光光度计,上海佑科仪器仪表有限公司。

1.3 乳酸菌的鉴定

形态观察及革兰氏染色镜检:观察菌落形态特征,通过镜检观察革兰氏染色结果和细胞形态特征。生化鉴定:对菌株进行过氧化氢试验、明胶液化试验、糖酵解试验。分子生物学鉴定:用细菌 DNA 提取试剂盒提取菌株 DNA,使用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3')进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(30 μ L): 2 \times Taq Plus Master Mix 15 μ L, 27F (10 μ mol/L) 1 μ L, 1492R (10 μ mol/L) 1 μ L, DNA 模板 1 μ L, ddH₂O 补足 30 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测,条带单一且长度为 1 500 bp 左右的样品送往生工生物工程(上海)股份有限公司测序。获得序列与 NCBI 数据库中已有基因序列进行同源性比对分析,相似度>95%则鉴定为同一个属,相似度>99%,则鉴定为同一个种^[12],用 MEGA 11 的 ClustalW 对齐序列,用最大似然法构建系统发育树,重复取样 1 000 次计算自展值(Bootstrap)。

1.4 溶血试验

将供试菌株培养为 $OD_{600}=0.5$ 的菌悬液,将菌液点接在哥伦比亚血琼脂培养基上,37 $^{\circ}$ C 培养 24 h,观察溶血圈的形成情况,若产生和铜绿假单胞菌一样的草绿色溶血圈则为 α 溶血;若产生和金黄色葡萄球菌一样的透明溶血圈则为 β 溶血;若无溶血圈产生则为不溶血^[13]。

1.5 菌株生长曲线的测定

将供试菌株按 1% 的接种量接种于无菌 MRS 液体培养基中,于 37 °C、180 r/min 条件下培养,分别于 0、0.5、1、1.5、2、2.5、3、4、5、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24 h 取样,测定波长 600 nm 处的吸光度值(OD_{600} 值),每组设置 3 个重复,以培养时间为横坐标,以 OD_{600} 值为纵坐标,绘制生长曲线。

1.6 菌株产酸能力的测定

将 100 μ L 供试菌株接种于 200 mL 无菌 MRS 液体培养基中,于 37 °C、180 r/min 条件下培养,分别于 0、1、2、3、4、5、6、7、8、10、12、14、16、18、20、24 h 取样,测定其 pH 值,每组设置 3 个重复,以培养时间为横坐标,以 pH 值为纵坐标,绘制产酸曲线。

1.7 温度敏感性试验

按照参考文献[14]的方法,将供试菌株接种于无菌的 MRS 液体培养基中,分别于 20、30、40、50、60、70、80 °C 条件下水浴 15 min,37 °C 培养 24 h 后测定 OD_{600} 值,每组设置 3 个重复,并计算其存活率。

存活率(%)=试验组 OD_{600} 值/对照组 OD_{600} 值 \times 100。

1.8 pH 敏感性试验

将 MRS 液体培养基用 0.1 mol/L 盐酸溶液及 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液调整 pH 值分别为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0,将菌种以 1% 的接种量分别接种到灭菌后的培养基中,37 °C、180 r/min 培养 24 h。测 OD_{600} 值,每组设置 3 个重复,并计算其存活率。

存活率(%)=试验组 OD_{600} 值/对照组 OD_{600} 值 \times 100。

1.9 自聚合能力测定试验

按照参考文献[15]的方法,将菌液 5 000 \times g 离心 10 min 得到菌体,使用 PBS 重悬菌体并调

整 OD_{600} 为 0.5,吸取 2 mL 细菌重悬液,37 °C 培养 2 h,吸取 1 mL 上层液体测定 OD_{600} 值(A_1)。运用公式(1)计算自聚合能力。

$$\text{自聚合能力}(\%)=(1-A_1/0.5)\times 100 \quad (1)$$

细菌对于自聚合能力的划分标准为:自聚合能力在 16%–35% 为低自聚合能力,在 36%–50% 为中等自聚合能力,在 50% 以上为高自聚合能力。

1.10 疏水能力测定试验

按照参考文献[15]的方法,将菌液 5 000 \times g 离心 10 min 弃去上清,加入 PBS 清洗 3 次菌体,使用 0.1 mol/L 硝酸钾重悬,调整 OD_{600} 为 0.5,取 3 mL 菌悬液加入 1 mL 二甲苯静置 10 min,振荡 1 min,静置 30 min,取水相测定 OD_{600} 值(A_2),运用公式(2)计算疏水能力。

$$\text{疏水能力}(\%)=(1-A_2/0.5)\times 100 \quad (2)$$

细菌对于疏水能力的划分标准为:疏水能力在 20% 以下为非疏水,在 20%–50% 为中度疏水,在 50% 以上为高度疏水。

1.11 病原菌共凝聚能力测定试验

按照参考文献[15]的方法,将菌液调整 OD_{600} 为 0.5,取等量菌悬液与大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌分别混合,室温静置,于 0 和 18 h 取上清液测定 OD_{600} 值(A_3),运用公式(3)计算共凝聚性。

$$\text{共凝聚性}(\%)=(0.5-A_3)/0.5\times 100 \quad (3)$$

1.12 药敏试验

在 MRS 固体培养基上均匀涂布活化后的菌悬液,将氨苄西林、红霉素、磺胺异恶唑、氯霉素、庆大霉素、四环素、万古霉素和氧氟沙星这 8 种抗生素的药敏片放置于平板上,每组设置 3 个重复,37 °C 培养 24 h,观察并记录抑菌圈大小,根据抑菌圈大小判定耐药性。

1.13 耐药基因检测

参考文献[16–30],共选择了 8 类抗生素的 22 种耐药基因,具体引物序列信息如表 1。以乳

表 1 22 种耐药基因 PCR 引物序列信息

Table 1 Sequence information of PCR primers for 22 drug resistance genes

抗生素种类 Antibiotic type	耐药基因 Drug resistance gene	引物序列 Primer sequence (5'→3')	产物长度 Product length (bp)	退火温度 Annealing temperature (°C)	参考文献 Reference
β-内酰胺类 β-lactam	<i>bla_{CTX-M}</i>	F: TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA R: CGATATCGTTGGTGGTGCCATA	500	54.0	[16]
	<i>bla_{SHV}</i>	F: TGGTTATGCGTTATATTCGCC R: GCTTAGCGTTGCCAGTGCT	800	54.0	[17]
	<i>bla_{TEM}</i>	F: CAGAAACGCTGGTAAAAGTA R: ACTCCCCGTCGTGTAGATAA	719	54.5	[18]
磺胺类 Sulfonamides	<i>sul1</i>	F: CATTGCCTGGTTGCTTCAT R: ATCCGACTCGCAGCATT	238	52.0	[19]
	<i>sul2</i>	F: CATCATTTTCGGCATCGTC R: TCTTGC GGTTTCTTTCAGC	793	55.0	[19]
	<i>sul3</i>	F: AGATGTGATTGATTTGGGAGC R: TAGTTGTTTCTGGATTAGAGCCT	443	55.0	[19]
氯霉素类 Chloramphenicol	<i>catA</i>	F: GGATATGAAAATTTATCCCTC R: CAATCATCTACCCTATGAAT	486	50.0	[20]
	<i>cat</i>	F: TTAGGTTATTGGGATAAGTTA R: GCATGRTAACCATCACAWAC	300	48.0	[21]
氨基糖苷类 Aminoglycosides	<i>aph(3')-IIa</i>	F: TGACTGGGCACAACAGACAA R: CGGCGATACCGTAAAGCAC	667	52.0	[19]
	<i>ant(3'')-Ia</i>	F: ATCTGGCTATCTTGCTGACA R: TATGACGGGCTGATACTGG	284	50.0	[22]
	<i>ant(6)</i>	F: ACTGGCTTAATCAATTTGGG R: GCCTTCCGCCACCTCACCG	597	58.0	[22]
四环素类 Tetracyclines	<i>tetB</i>	F: CTCAGTATTCCAAGCCTTTC R: CTAAGCACTGTCTCCTGTT	416	52.0	[23]
	<i>tetE</i>	F: GTCATGATGGCACTGGTCAT R: CTCTGCTGTACATCGCTCTT	1 180	52.5	[24]
	<i>tetM</i>	F: GTTAAATAGTGTTCTTGGAG R: CTAAGATATGGCTCTAACAA	657	57.0	[24]
糖肽类 Glycopeptides	<i>vanA</i>	F: CATGAATAGAATAAAAAGTTGCAATA R: CCCCTTTAACGCTAATACGATCAA	1 030	55.0	[25]
	<i>vanB</i>	F: ATGGGAAGCCGACAGTC R: GATTTCGTTCCCTCGACC	635	53.0	[25]
喹诺酮类 Quinolones	<i>qnrA</i>	F: ATTTCTCACGCCAGGATTG R: GATCGCAAAGGTTAGGTCA	516	53.0	[26]
	<i>qnrB</i>	F: ACGATGCCTGGTAGTTGTCC R: GATCGTGAAAGCCAGAAAGG	469	54.0	[26]
	<i>qyrA</i>	F: TGTCCGAGATGGCCTGAAGC R: CGTTAATCACTTCCGTCAG	525	58.0	[27]
大环内酯类 Macrolides	<i>ermB</i>	F: GAAAAGGTA CTCAACCAAATA R: AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC	639	60.0	[28]
	<i>MefE</i>	F: GGGAGATGAAAAGAAGGAGT R: TAAAATGGCACCGAAAG	363	60.0	[29]
	<i>MefA</i>	F: TGGTTCGGTGCTGCTTACTATTGT R: CCCCTATCAACATTCCAGA	553	60.0	[30]

酸菌的 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(25 μ L): $2\times$ Taq Plus Master Mix 12.5 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, DNA 模板 1 μ L, ddH₂O 补足 25 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 退火温度根据表 1 以及温度梯度实验设定, 40 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。其中 *cat*、*aph(3')-IIa* 和 *tetE* 基因经温度梯度实验后确定的退火温度分别为 52、53 和 53 $^{\circ}$ C。

1.14 统计分析

实验数据分析采用 GraphPad Prism 8 软件。抑菌圈大小数据用平均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 存活率、自聚合能力、疏水能力、病原菌共凝集能力以百分率(%)表示, 2 个以上样本比较采用单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 形态特征和生化鉴定结果

家蚕肠道分离出的 56 个菌株经形态学观察及革兰氏染色镜检结果显示, 有 31 株为潜在的乳酸菌, 通过进一步生化鉴定, 最终确定菌株 A2 为乳酸菌。其菌落形态特征及染色结果如图 1 所示。结果表明, 菌株 A2 的菌落特征为白色、圆形、湿润、边缘整齐, 革兰氏染色阳性。

生化鉴定结果显示菌株 A2 的过氧化氢试验、明胶液化试验结果为阴性, 能分解蔗糖、葡萄糖、麦芽糖, 不能分解阿拉伯糖(表 2)。

综合形态特征和生化鉴定结果, 参考相关文献[31-32], 初步判断菌株 A2 为肠球菌属(*Enterococcus*)且为乳酸菌(lactic acid bacteria)。

2.2 分子生物学鉴定结果

菌株 A2 的 16S rRNA 基因序列已递交到 NCBI 基因数据库, GenBank 登录号为 PP471139, 序列分析结果显示菌株 A2 与粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)相似性达到 99.79%。基于

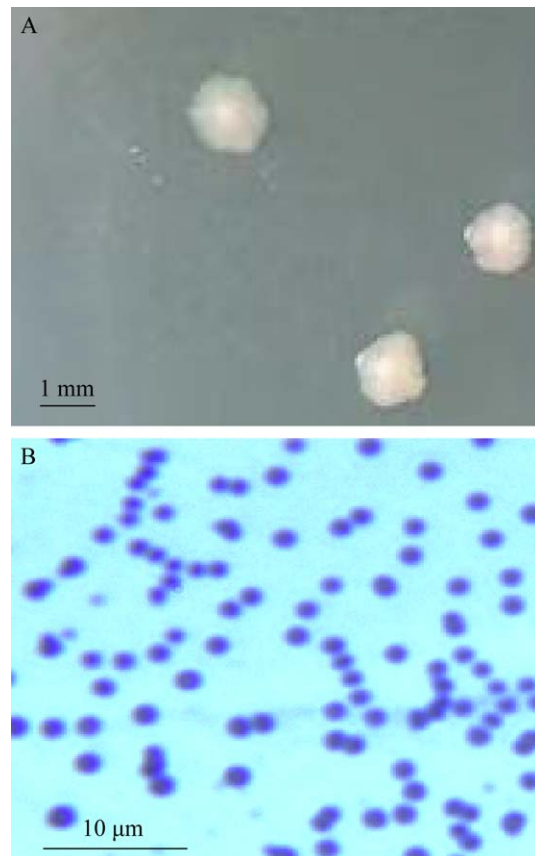


图 1 菌株 A2 的菌落特征(A)及革兰氏染色结果(B)
Figure 1 Colony morphology (A) and Gram staining (B) of strain A2.

表 2 菌株 A2 的生化鉴定结果

Table 2 Biochemical identification results of strain A2

试验 Test	结果 Result
过氧化氢试验 Hydrogen peroxide test	-
明胶液化试验 Gelatin liquefaction test	-
蔗糖 Sucrose	+
葡萄糖 Glucose	+
麦芽糖 Maltose	+
阿拉伯糖 Arabinose	-

+: 阳性; -: 阴性。

+: Positive; -: Negative.

菌株 A2 和肠球菌属序列相似度高(>95%)的 7 个模式菌株的 16S rRNA 基因序列构建系统发育树(图 2), 结果显示, 菌株 A2 与粪肠球菌亲缘

关系最近，可鉴定为粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*)。

综上可知，从家蚕肠道菌中筛选出的菌株 A2 为乳酸菌，鉴定为肠球菌属的粪肠球菌。

2.3 安全性评估结果

菌株 A2 的溶血性检测结果(图 3)显示，以金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)为质控菌

株，A2 不溶血，为安全菌株。

2.4 菌株生长活性及产酸情况测定结果

菌株 A2 的生长曲线及产酸曲线如图 4 所示，结果表明菌株 A2 前 3 h 生长缓慢，处于迟缓期，产酸较慢；3–9 h 生长迅速，处于对数期，产酸较快；10–20 h 生长趋于平稳，处于稳定期且产酸也趋于平稳；20 h 后呈下降趋势，处于衰亡期。

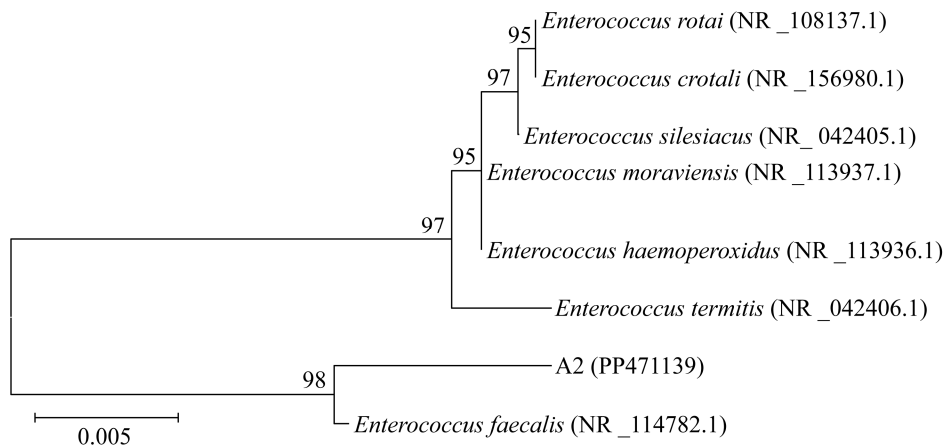


图 2 基于家蚕肠道乳酸菌 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 括号内的编号为 GenBank 登录号；分支点上的数字是自展值，代表进化树分支可信度的百分比；标尺 0.005 表示 0.5% 的序列分歧。

Figure 2 Phylogenetic tree constructed based on 16S rRNA gene sequence of gut lactic acid bacteria of *Bombyx mori*. The serial number in parentheses is the login number in GenBank; The numbers at the branch points are the self-spread values representing the percentage of the evolutionary tree branch confidence; The scale 0.005 represents a sequence divergence of 0.5%.

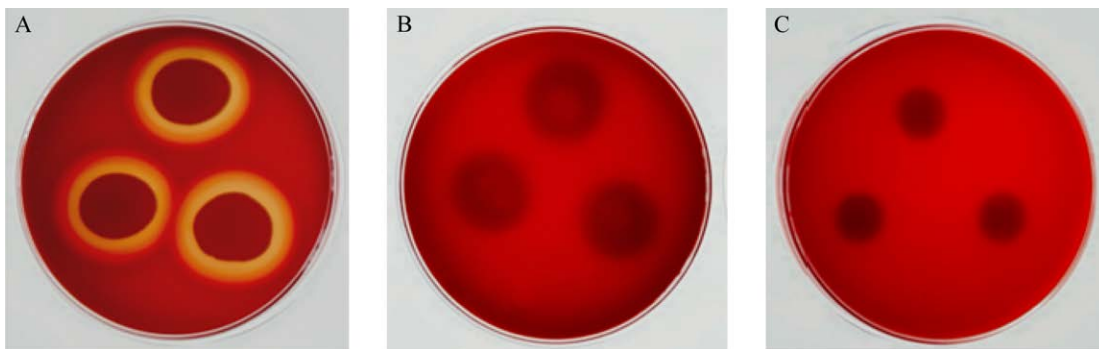


图 3 菌株 A2 的溶血性检测 A: 金黄色葡萄球菌; B: 铜绿假单胞菌; C: 粪肠球菌 A2。

Figure 3 The hemolytic test of strain A2. A: *Staphylococcus aureus*; B: *Pseudomonas aeruginosa*; C: *Enterococcus faecalis* A2.

2.5 抗逆性试验结果

菌株 A2 的抗逆性试验结果见图 5。由图 5A 可知, 以 20 °C 为对照组, 30、40、50、60、70 和 80 °C 条件下的存活率分别为 93.52%、92.45%、83.46%、79.75%、52.33% 和 47.55%, 菌株 A2 在 80 °C 高温条件下仍能存活, 具有一定的耐高温特性。温度敏感性试验的单因素分析结果显示, 50 °C 时菌株的存活率显著下降,

20–40 °C 时菌株的存活率无明显变化, 说明 20–40 °C 为菌株最适生长温度。由图 5B 可知, 以 pH 6.0 为对照, pH 值为 2.0、3.0、4.0、5.0、7.0、8.0、9.0 和 10.0 时, 菌株存活率分别为 2.62%、3.11%、9.95%、97.70%、97.27%、90.16%、90.05% 和 78.69%, 菌株 A2 在 pH 10.0 时存活率仍高达 78.69%, 具有较强的耐碱性。pH 敏感性试验单因素分析结果显示在 pH 4.0 和 8.0 时

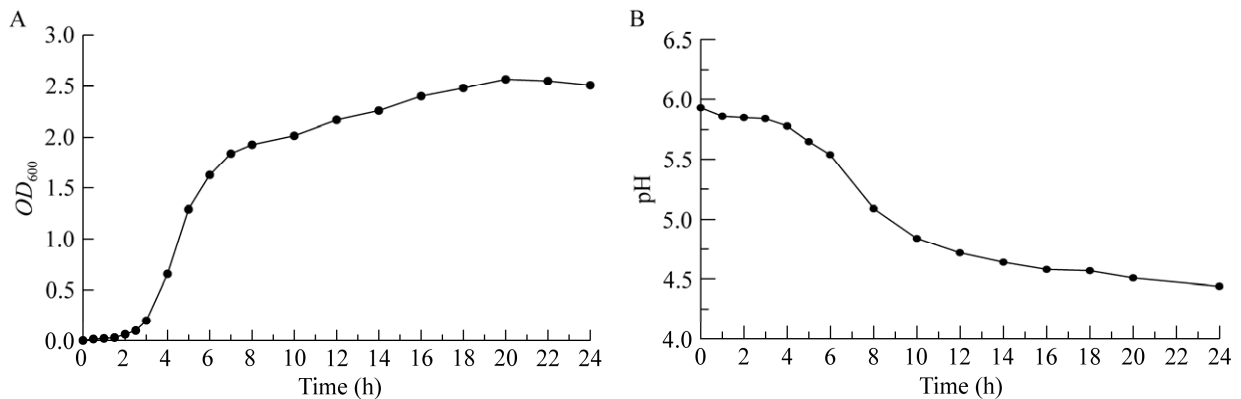


图 4 菌株 A2 生长曲线及产酸曲线 A: 生长曲线; B: 产酸曲线。

Figure 4 Growth curve and acid production curve of strain A2. A: The growth curve; B: The acid production curve.

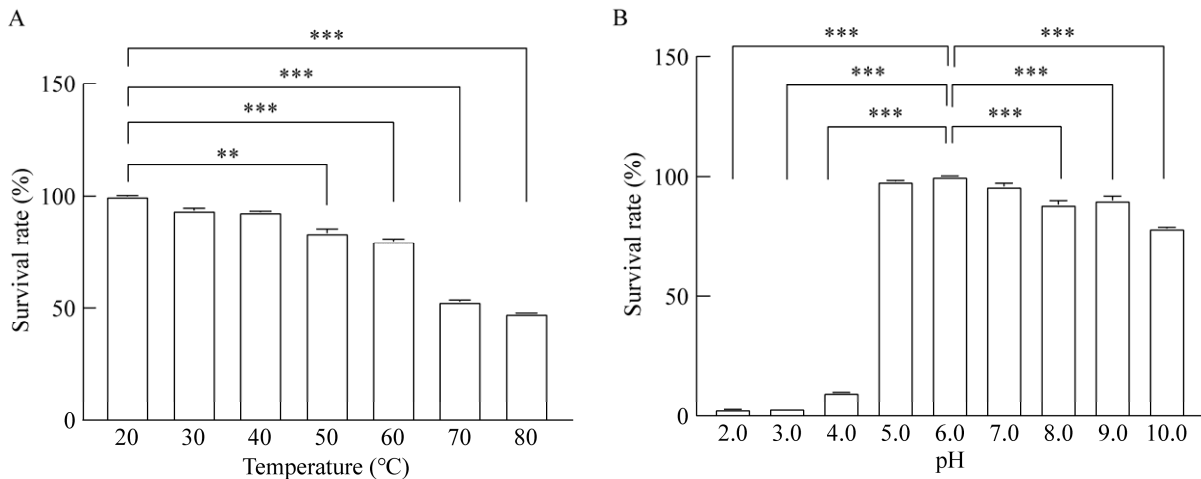


图 5 菌株 A2 抗逆性试验结果 A: 温度敏感性试验结果; B: pH 敏感性试验结果。

Figure 5 Resilience test results of strain A2. A: The result of temperature sensitivity experiment; B: The result of pH sensitivity test. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

存活率开始显著下降, pH 5.0–7.0 时存活率无明显变化, 说明 pH 5.0–7.0 为菌株最适 pH。综合温度和 pH 敏感性结果可知, 菌株 A2 具有耐高温、耐碱性环境的特性。

2.6 黏附性测定结果

菌株 A2 的黏附性测定结果如图 6 所示。由图 6A 可知, 菌株 A2 的自聚合能力为 18%, 为低自聚合能力; 疏水能力为 70%, 为高度疏水; 由图 6B 可知, 菌株 A2 与大肠杆菌的共凝

聚性为 32%、与沙门氏菌的共凝聚性为 34%、与金黄色葡萄球菌的共凝聚性为 40%, 单因素分析显示菌株 A2 对大肠杆菌与金黄色葡萄球菌的共凝聚性之间差异显著。总的来说, 该菌株高度疏水并且能够与肠道中的病原菌共凝聚, 有在肠道中定殖的潜力。

2.7 药敏试验结果

利用 8 类抗生素药敏片分别测定菌株 A2 对 8 类抗生素的敏感性, 结果如图 7 所示。

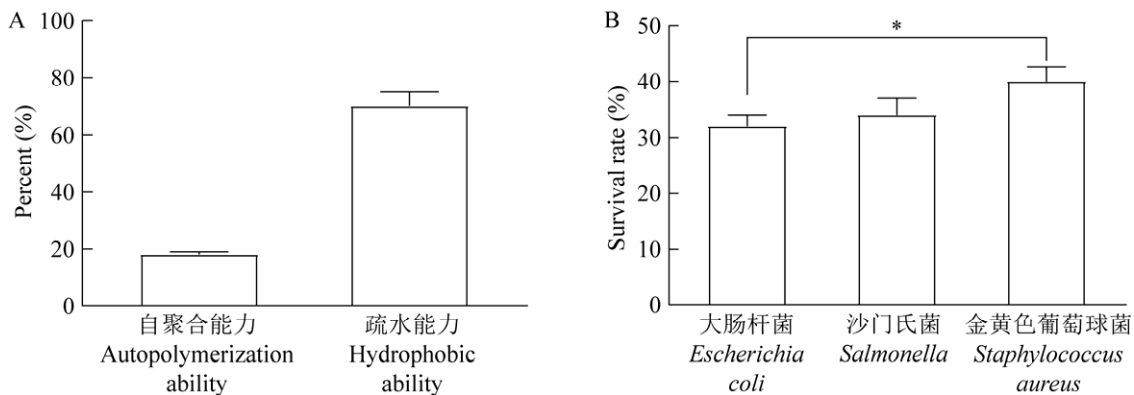


图 6 菌株 A2 黏附性测定结果 A: 自聚合能力及疏水能力结果; B: 病原菌共凝聚结果。

Figure 6 Adherence test results of A2 strain. A: The result of self-polymerization ability and hydrophobic ability; B: The result of coaggregation of pathogenic bacteria. *: $P < 0.05$.

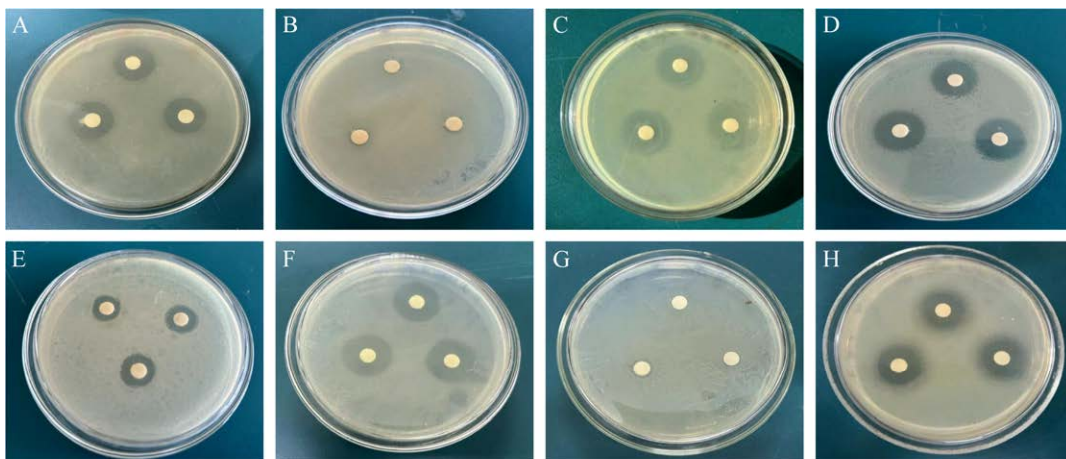


图 7 菌株 A2 对 8 类抗生素的药敏试验结果 A–H: 氨苄西林、红霉素、磺胺异恶唑、氯霉素、庆大霉素、四环素、万古霉素、氧氟沙星。

Figure 7 Drug susceptibility test results of strain A2 to eight kinds of antibiotics. A–H: Ampicillin, erythromycin, sulfisoxazole, chloramphenicol, gentamicin, tetracycline, vancomycin and ofloxacin.

测量菌株 A2 对 8 类抗生素药敏片的抑菌圈直径并按美国临床实验室标准化研究所(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) CLSI M100-S26 版的标准^[33]得出 A2 对不同抗生素的药敏性结果(表 3)。

结果表明菌株 A2 对氨苄西林、红霉素和万古霉素耐药, 对庆大霉素中度敏感, 对磺胺

异恶唑、氯霉素、四环素和氧氟沙星敏感。

2.8 耐药基因检测结果

耐药基因检测结果表明, β -内酰胺类 *bla_{SHV}*、*bla_{TEM}*、氯霉素类 *cat*、氨基糖苷类 *aph(3')-IIa* 和四环素类 *tetE* 检测结果为阳性, 其余为阴性, PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳图见图 8。

表 3 菌株 A2 对 8 类抗生素药敏性判定结果

Table 3 Susceptibility determination results of A2 strain to eight kinds of antibiotics

抗生素 Antibiotic	判定标准 Judgement criteria (mm)			抑菌圈直径 Inhibition zone diameter (mm)	结果 Result
	S	I	R		
氨苄西林 Ampicillin	≥ 29	28–29	≤ 28	17.71 \pm 0.62	R
红霉素 Erythromycin	≥ 23	14–22	≤ 13	6.99 \pm 0.64	R
磺胺异恶唑 Sulfisoxazole	≥ 17	13–16	≤ 12	19.43 \pm 1.19	S
氯霉素 Chloramphenicol	≥ 18	13–17	≤ 12	19.82 \pm 0.51	S
庆大霉素 Gentamicin	≥ 15	13–14	≤ 12	13.85 \pm 0.73	I
四环素 Tetracycline	≥ 19	15–18	≤ 14	20.03 \pm 0.37	S
万古霉素 Vancomycin	≥ 17	15–16	≤ 14	12.96 \pm 0.60	R
氧氟沙星 Ofloxacin	≥ 16	13–15	≤ 12	18.69 \pm 0.80	S

R: 耐药; I: 中度敏感; S: 敏感。

R: Resistant; I: Intermediary; S: Susceptible.

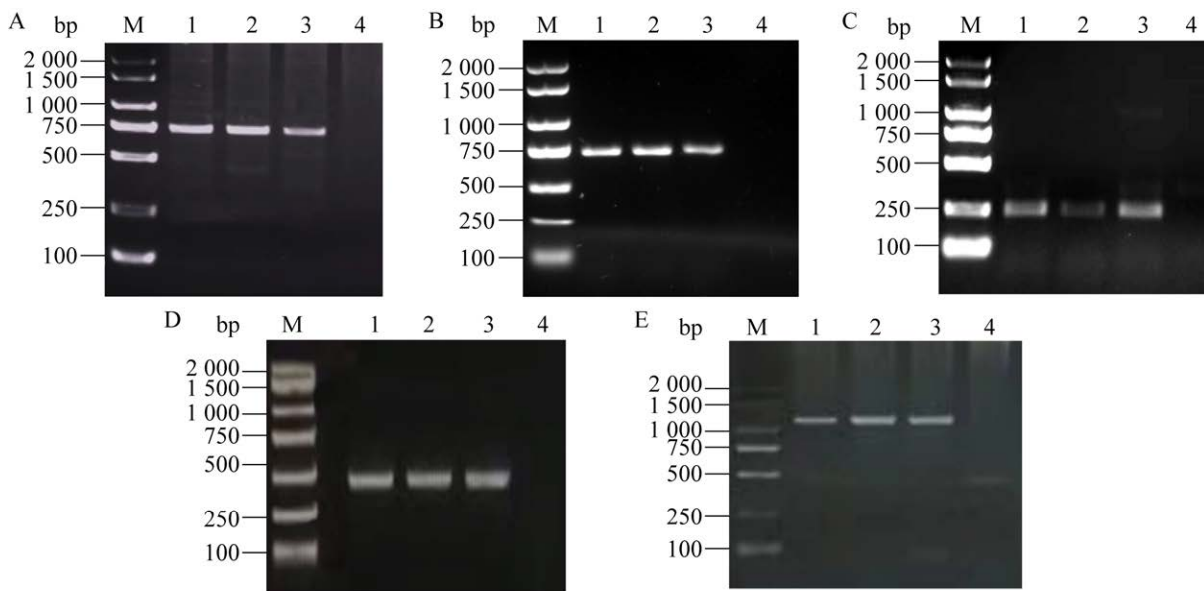


图 8 菌株 A2 耐药基因的 PCR 扩增结果 A–E: *bla_{TEM}*、*bla_{SHV}*、*cat*、*aph(3')-IIa*、*tetE* 的 PCR 扩增结果。M: DL2000 DNA Marker; 1–3: 3 个重复; 4: 阴性对照。

Figure 8 PCR amplification results of drug resistance genes in strain A2. A–E: PCR amplification results of *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *cat*, *aph(3')-IIa*, and *tetE*. M: DL2000 DNA Marker; 1–3: Three replicates; 4: Negative control.

3 讨论

乳酸菌是多数动物肠道的优势菌株之一,动物源的乳酸菌资源近年来备受关注。Tajabadi 等^[34]发现蜜蜂胃中植物乳植杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)、戊糖乳植杆菌(*Lactiplantibacillus pentosus*)和发酵黏液乳杆菌(*Limosilactobacillus fermentum*)是优势乳酸菌。本研究从家蚕肠道分离出 1 株乳酸菌,经鉴定为粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*),属于肠球菌属(*Enterococcus*)。已有研究表明,肠球菌在家蚕消化道内是高频微生物,具有多样的生物学特性,并且对家蚕微孢子虫孢子的发芽具有显著抑制作用^[35]。因此,这株菌具有较高的研究价值。

本研究中的菌株 A2 无溶血性,为安全菌株,不会对家蚕健康产生影响。其产酸性能良好,能够降低环境的 pH 值,抑制其他有害微生物的生长。菌株 A2 的抗逆性也很强,在 80 °C 的高温条件下仍能存活,有耐高温特性。因家蚕肠道为碱性,所以测定了菌株的耐碱能力,结果表明菌株 A2 在 pH 10.0 时存活率高达 78.69%,有耐碱特性,能够在家蚕的碱性肠道中存活。

菌株定殖肠道过程中需要先黏附于组织表面,菌株的疏水能力和自聚集能力与黏附性有关,龚虹等^[36]发现戊糖片球菌的自聚集能力为 7.76%,疏水能力为 8.38%,本研究中粪肠球菌 A2 的自聚合能力为 18%,疏水能力为 70%,自聚合能力及疏水能力更具优势。与病原菌共凝聚能够防止病原菌在肠道中的定殖,使病原菌直接排出体外,减少病原菌的危害,大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌是常见的病原菌,会导致家蚕出现腹泻、脓肿等症状,菌株 A2 对它们的共凝聚力均大于 30%,说明菌株 A2 具有一定的抗病原菌潜力。

随着抗生素的大量使用,细菌的耐药性受到人们的广泛关注,对于益生菌的耐药性及耐药机制的研究也日益增多^[37-39]。有耐药性的益生菌在肠道定殖后,可以耐受动物服用的抗生素,从而稳定地发挥其益生特性,对动物有益。本研究选取了最常见的八类抗生素检测粪肠球菌 A2 的耐药性,发现其对氨苄西林(β -内酰胺类)、红霉素(大环内酯类)和万古霉素(糖肽类)具有耐药性。马炳存等^[40]从林麝肠道分离出的乳酸菌对目前常用的抗生素都敏感,罗强等^[41]对屎肠球菌(*Enterococcus faecium*) SC-Y112 的耐药性检测发现其表现出多重耐药性,分析耐药性的不同可能与动物的种类及生存的环境等因素有关。

有研究表明,乳酸菌可能由于在自然选择进化中产生天然的耐药性,或者通过携带耐药基因、主动外排泵系统及菌株之间的接合性转移从而对抗生素产生耐受性^[42-44],为确定本研究中的粪肠球菌 A2 是否由于耐药基因的存在产生耐药性,选取了八类抗生素共 22 个耐药基因对其进行检测,发现菌株 A2 的耐药表型和耐药基因有 4 种关系:第 1 种为菌株 A2 对 β -内酰胺类的耐药表型和基因型呈现了相对应的关系,推测可能是由于其具有耐药基因导致的耐药表型,但仍需后续对耐药基因进行敲除后验证耐药表型才能确定;第 2 种为菌株 A2 对大环内酯类、糖肽类有耐药表型,但未检测出相应的耐药基因,推测可能是相关的耐药基因还未发现,或是因为外排泵系统等其他方式产生的耐药性;第 3 种为菌株 A2 检测出了氯霉素类、氨基糖苷类、四环素类耐药基因,但没有耐药表型,可能是由于耐药基因未表达;第 4 种为菌株 A2 对磺胺类和喹诺酮类既没有耐药表型,又没有检测出耐药基因,临床用药方面可以参考。此外,菌株携带的耐药基因是否会转移至

动物体内仍需后续进一步实验研究。

4 结论

本研究从家蚕肠道分离菌中筛选出的乳酸菌安全无毒性,能在高温环境下生存,具有耐碱性能在家蚕肠道中生存,有较强黏附性能够在肠道中定殖,可以与病原菌共凝聚,防止病原菌的入侵与繁殖,可作为一种潜力菌株用于改良家蚕的饲料,或用于微生物制剂调节肠道菌的平衡,为肠道益生菌的开发利用提供科学依据和优质资源。

REFERENCES

- [1] CHEN BS, YU T, XIE S, DU KQ, LIANG XL, LAN YH, SUN C, LU XM, SHAO YQ. Comparative shotgun metagenomic data of the silkworm *Bombyx mori* gut microbiome[J]. Scientific Data, 2018, 5: 180285.
- [2] CHEN BS, DU KQ, SUN C, VIMALANATHAN A, LIANG XL, LI Y, WANG BH, LU XM, LI LJ, SHAO YQ. Gut bacterial and fungal communities of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*) and wild mulberry-feeding relatives[J]. The ISME Journal, 2018, 12: 2252-2262.
- [3] ANAND AP, VENNISON SJ, SANKAR SG, PRABHU DG, VASAN PT, RAGHURAMAN T, GEOFFREY CJ, VENDAN SE. Isolation and characterization of bacteria from the gut of *Bombyx mori* that degrade cellulose, xylan, pectin and starch and their impact on digestion[J]. Journal of Insect Science, 2010, 10: 107.
- [4] NISHIDA S, ONO Y, SEKIMIZU K. Lactic acid bacteria activating innate immunity improve survival in bacterial infection model of silkworm[J]. Drug Discoveries & Therapeutics, 2016, 10(1): 49-56.
- [5] LI CX, XU S, XIANG CJ, XU SX, ZHOU QH, ZHANG JF. The gut microbiota of silkworm are altered by antibiotic exposure[J]. FEBS Open Bio, 2022, 12(12): 2203-2212.
- [6] 尹树磊, 杜香, 张小希, 刘璐, 易俊洁, 王艳菲. 乳酸菌抗氧化机制研究进展及在食品领域的应用[J]. 食品科学, 2024, 45(13): 345-355.
- [7] YIN SL, DU X, ZHANG XX, LIU L, YI JJ, WANG YF. Research progress of antioxidant mechanism of lactic acid bacteria and its application in food field[J]. Food Science, 2024, 45(13): 345-355 (in Chinese).
- [8] 叶朋飞, 刘静, 李秋达, 黄杰秋, 马冉, 范紫腾, 龚五一, 周杰. 德氏乳杆菌的益生功能及其在发酵食品中的应用[J]. 现代食品, 2023, 29(11): 80-84.
- [9] YE PF, LIU J, LI QD, HUANG JQ, MA R, FAN ZT, GONG WY, ZHOU J. Probiotic function of *Lactobacillus delbrueckii* and its application in fermented foods[J]. Modern Food, 2023, 29(11): 80-84 (in Chinese).
- [10] 肖仔君, 钟瑞敏, 陆伟东, 康宇婷, 林丽芳. 酵素源乳酸菌的益生功能及抑菌特性评价[J]. 现代食品科技, 2023, 39(8): 62-68.
- [11] XIAO ZJ, ZHONG RM, LU WD, KANG YT, LIN LF. Evaluation of probiotic and antibacterial properties of lactic acid bacteria derived from fermented fruit broth[J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(8): 62-68 (in Chinese).
- [12] HAYAKAWA T, MASUDA T, KUROSAWA D, TSUKAHARA T. Dietary administration of probiotics to sows and/or their neonates improves the reproductive performance, incidence of post-weaning diarrhea and histopathological parameters in the intestine of weaned piglets[J]. Animal Science Journal, 2016, 87(12): 1501-1510.
- [13] ZHANG L, LI J, YUN TT, QI WT, LIANG XX, WANG YW, LI AK. Effects of pre-encapsulated and pro-encapsulated *Enterococcus faecalis* on growth performance, blood characteristics, and cecal microflora in broiler chickens[J]. Poultry Science, 2015, 94(11): 2821-2830.
- [14] 罗智明, 张一川. 添食枯草芽孢杆菌对家蚕生长与生产性能的影响[J]. 广西蚕业, 2013, 50(1): 12-22.
- [15] LUO ZM, ZHANG YC. Effect of feeding *Bacillus subtilis* on growth and production performance of silkworm[J]. Guangxi Sericulture, 2013, 50(1): 12-22 (in Chinese).
- [16] 单体江, 段志豪, 吴春银, 李志强, 王松, 毛子翎. 杜比亚蟑螂共生真菌次生代谢产物及其生物活性[J]. 环境昆虫学报, 2020, 42(1): 170-179.
- [17] SHAN TJ, DUAN ZH, WU CY, LI ZQ, WANG S, MAO ZL. Secondary metabolites of symbiotic fungi isolated from *Blattella germanica* and their biological activities[J]. Journal of Environmental Entomology, 2020, 42(1): 170-179 (in Chinese).
- [18] 李侗, 胡昕, 张潇月, 杨晨曦, 李静, 曹雪笛, 石雪雪, 邹立扣, 赵珂. 圈养大熊猫肠道乳酸菌分离及益生特性[J]. 微生物学通报, 2023, 50(9): 4063-4077.
- [19] LI T, HU X, ZHANG XY, YANG CX, LI J, CAO XD, SHI XX, ZOU LK, ZHAO K. Isolation and probiotic characteristics of lactic acid bacteria from intestinal tract of giant Panda in captivity[J]. Microbiology China, 2023, 50(9): 4063-4077 (in Chinese).
- [20] 韦珏, 刘金凤, 覃绍敏, 秦树英, 许力士, 林俊, 陈凤莲, 韦珊珊, 马玲, 陈童锦悦, 吴健敏. 发酵酸鱼中乳酸菌的鉴定及特性分析[J]. 中国酿造, 2023, 42(3): 95-100.
- [21] WEI J, LIU JF, QIN SM, QIN SY, XU LS, LIN J, CHEN FL, WEI SS, MA L, CHEN T, WU JM. Identification and characterization of lactic acid bacteria in fermented sour fish[J]. China Brewing, 2023, 42(3): 95-100 (in Chinese).
- [22] 吴雨晗, 吴婷, 涂健, 李哲, 盛婷婷, 李峰, 姚皓洲. 一株安庆六白猪源乳酸菌的分离鉴定及生物特性研究[J]. 动物营养学报, 2022, 34(8): 5415-5425.
- [23] WU YH, WU T, TU J, LI Z, SHENG TT, LI F, YAO HZ. Isolation, identification and biological characteristics of a lactic acid bacteria from Anqing liubai pigs[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2022, 34(8): 5415-5425 (in Chinese).

- 5415-5425 (in Chinese).
- [16] EDELSTEIN M, PIMKIN M, PALAGIN I, EDELSTEIN I, STRATCHOUNSKI L. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2003, 47(12): 3724-3732.
- [17] KIM HB, PARK CH, KIM CJ, KIM EC, JACOBY GA, HOOPER DC. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, 53(2): 639-645.
- [18] 田国宝, 王红宁, 张安云, 张毅, 杨鑫, 徐昌文. 大肠杆菌 β -内酰胺酶耐药基 *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} 三重 PCR 检测方法建立[J]. *中国兽医杂志*, 2013, 49(1): 3-5.
- TIAN GB, WANG HN, ZHANG AY, ZHANG Y, YANG X, XU CW. Establishment of *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} triple PCR assay for detection of β -lactamase resistance in *Escherichia coli*[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2013, 49(1): 3-5 (in Chinese).
- [19] ZHANG AY, WANG HN, TIAN GB, ZHANG Y, YANG X, XIA QQ, TANG JN, ZOU LK. Phenotypic and genotypic characterisation of antimicrobial resistance in faecal bacteria from 30 Giant pandas[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2009, 33(5): 456-460.
- [20] AARESTRUP FM, AGERSO Y, GERNER-SMIDT P, MADSEN M, JENSEN LB. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark[J]. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2000, 37(2): 127-137.
- [21] HUMMEL AS, HERTEL C, HOLZAPFEL WH, FRANZ CMAP. Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(3): 730-739.
- [22] CLARK NC, OLSVIK O, SWENSON JM, SPIEGEL CA, TENOVER FC. Detection of a streptomycin/spectinomycin adenyltransferase gene (*aadA*) in *Enterococcus faecalis*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1999, 43(1): 157-160.
- [23] SUNDE M, NORSTRÖM M. The prevalence of, associations between and conjugal transfer of antibiotic resistance genes in *Escherichia coli* isolated from Norwegian meat and meat products[J]. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2006, 58(4): 741-747.
- [24] MAZAHARI NEZHAD FARD R, BARTON MD, HEUZENROEDER MW. Bacteriophage-mediated transduction of antibiotic resistance in enterococci[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2011, 52(6): 559-564.
- [25] 孙艳玲, 杨威, 马宁, 孟宪华, 赵志强, 徐志媛, 赵泽广, 何欣, 张宁. 猪源鸡肠球菌的分离鉴定、耐药性和毒力基因分析[J]. *猪业科学*, 2023, 40(3): 71-74.
- SUN YL, YANG W, MA N, MENG XH, ZHAO ZQ, XU ZY, ZHAO ZG, HE X, ZHANG N. Isolation, identification, drug resistance and virulence gene analysis of *Enterococcus* of porcine origin[J]. *Journal of Swine Science*, 2023, 40(3): 71-74 (in Chinese).
- [26] 王黎明, 王宇翔, 周杰珑, 王洁, 谢军金, 张文平. 大熊猫肠道乳酸菌分离鉴定及耐药表型和基因型分析[J]. *四川动物*, 2023, 42(2): 172-182.
- WANG LM, WANG YX, ZHOU JL, WANG J, XIE JJ, ZHANG WP. Isolation of intestinal lactic acid bacteria from giant pandas and analysis of drug-resistant phenotypes and genotypes[J]. *Sichuan Journal of Zoology*, 2023, 42(2): 172-182 (in Chinese).
- [27] 张辉, 邵乐乐, 杨永春, 季艺, 马武林, 翟祎梦, 白洪青, 周莹珊, 雷蕾, 郑亚东, 宋厚辉, 邱国强. 朱鹮大肠杆菌分离鉴定及耐药性与喹诺酮类耐药基因分子特征分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2023, 50(10): 4231-4242.
- ZHANG H, SHAO LL, YANG YC, JI Y, MA WL, ZHAI YM, BAI HQ, ZHOU YS, LEI L, ZHENG YD, SONG HH, QIU GQ. Isolation, identification and molecular characterization of drug resistance and quinolone resistance genes in *E. coli* of crested ibis[J]. *Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2023, 50(10): 4231-4242 (in Chinese).
- [28] 秦宇轩, 李晶, 王秋涯, 高可心, 朱宝利, 律娜. 市售酸奶中乳酸菌的鉴定与耐药性[J]. *微生物学报*, 2013, 53(8): 889-897.
- QIN YX, LI J, WANG QY, GAO KX, ZHU BL, LÜ N. Identification of lactic acid bacteria in commercial yogurt and their antibiotic resistance[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(8): 889-897 (in Chinese).
- [29] 赖剑秀, 宋相泉, 徐菊芳, 戴玉柱, 段达荣. 学龄前儿童肺炎链球菌耐药性及大环内酯类耐药基因分析[J]. *蚌埠医学院学报*, 2023, 48(11): 1577-1580.
- LAI JX, SONG XQ, XU JF, DAI YZ, DUAN DR. Analysis of drug-resistance and macrolide-resistant genes of *Streptococcus pneumoniae* in preschool children[J]. *Journal of Bengbu Medical College*, 2023, 48(11): 1577-1580 (in Chinese).
- [30] 王昕, 韩语, 潘纪汶, 杨诺, 郑立新, 曾纪锋, 郭桂英, 郑继平. 临床分离粪肠球菌的毒力基因和耐药基因检测及其耐药性研究[J]. *热带生物学报*, 2023, 14(2): 137-144.
- WANG X, HAN Y, PAN JW, YANG N, ZHENG LX, ZENG JF, GUO GY, ZHENG JP. Virulence genes, drug resistance genes and drug resistance of clinically isolated *Enterococcus faecalis*[J]. *Journal of Tropical Biology*, 2023, 14(2): 137-144 (in Chinese).
- [31] 李文均, 陈瑛, 田新朋, 焦建宇. 《伯杰氏鉴定细菌学手册》和“伯杰氏国际系统微生物学学会”历史回顾、发展现状及未来展望[J]. *微生物学报*, 2023, 63(5): 1714-1723.
- LI WJ, CHEN Y, TIAN XP, JIAO JY. Historical review, development status and future prospect of Berger's Handbook of Bacteriological Identification and Berger's International Society for Systems Microbiology[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(5): 1714-1723 (in Chinese).
- [32] 凌代文. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法[J]. *微生物学通报*, 1999(1): 23.
- LING DW. Classification and identification of lactic

- acid bacteria and experimental methods[J]. Microbiology China, 1999(1): 23 (in Chinese).
- [33] Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 26th edition: CLSI M100-S26[S]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2016.
- [34] TAJABADI N, MARDAN M, SAARI N, MUSTAFA S, BAHREINI R, MANAP MYA. Identification of *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus fermentum* from honey stomach of honeybee[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2014, 44(3): 717-722.
- [35] 鲁兴萌, 汪方炜. 家蚕肠球菌对微孢子虫体外发芽的抑制作用[J]. 蚕业科学, 2002, 28(2): 126-128.
LU XM, WANG JW. Inhibition of *Enterococcus mori* on microsporidium sprouting *in vitro*[J]. Sericulture Science, 2002, 28(2): 126-128 (in Chinese).
- [36] 龚虹, 王海霞, 马征途, 王春颖, 冯谦, 马跃英, 李晓军, 李康宁, 刘彦民. 乳酸菌粘附力与生物膜、疏水能力和自凝集特性的研究[J]. 中国微生态学杂志, 2016, 28(9): 1026-1028, 1033.
GONG H, WANG HX, MA ZT, WANG CY, FENG Q, MA YY, LI XJ, LI KN, LIU YM. Biofilm hydrophobicity and auto-agglutination properties of five *Lactobacillus* strains[J]. Chinese Journal of Microecology, 2016, 28(9): 1026-1028, 1033 (in Chinese).
- [37] 任飞鸿, 赵婷婷, 黄小丹. 益生菌的抗生素耐药性特征研究进展[J]. 实用预防医学, 2024, 31(7): 887-892.
REN FH, ZHAO TT, HUANG XD. Research progress of antibiotic resistance characteristics of probiotics[J]. Practical Preventive Medicine, 2024, 31(7): 887-892 (in Chinese).
- [38] COLAUTTI A, ARNOLDI M, COMI G, IACUMIN L. Antibiotic resistance and virulence factors in lactobacilli: something to carefully consider[J]. Food Microbiol, 2022, 103: 103934.
- [39] DANIALI M, NIKFAR S, ABDOLLAHI M. Antibiotic resistance propagation through probiotics[J]. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology, 2020, 16(12): 1207-1215.
- [40] 马炳存, 程建国, 罗燕, 罗茜, 周鑫, 高雪华, 王鹏. 林麝肠道乳酸菌及肠杆菌多态性分析及耐药性研究[J]. 四川动物, 2015, 34(1): 29-40.
MA BC, CHENG JG, LUO Y, LUO Q, ZHOU X, GAO XH, WANG P. Polymorphism analysis and drug resistance of intestinal lactic acid bacteria and *Enterobacter* in forest musk deer[J]. Sichuan Zoology, 2015, 34(1): 29-40 (in Chinese).
- [41] 罗强, 张明, 刘巧, 罗璠. 产细菌素屎肠球菌 SC-Y112 的体外益生性及安全性评价[J]. 食品科学, 2021, 42(11): 154-160.
LUO Q, ZHANG M, LIU Q, LUO F. Evaluation of *in vitro* probiotic and safety properties of *Enterococcus faecium* SC-Y112 producing bacteriocin[J]. Food Science, 2021, 42(11): 154-160 (in Chinese).
- [42] 张燕燕. 乳酸菌对氟喹诺酮类药物耐药机制的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2008.
ZHANG YY. Study on the resistance mechanism of lactic acid bacteria to fluoroquinolones[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia Agricultural University, 2008 (in Chinese).
- [43] DARBY EM, TRAMPARI E, SIASAT P, GAYA MS, ALAV I, WEBBER MA, BLAIR JMA. Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited[J]. Nature Reviews Microbiology, 2023, 21(5): 280-295.
- [44] CLEMENTI F, AQUILANTI L. Recent investigations and updated criteria for the assessment of antibiotic resistance in food lactic acid bacteria[J]. Anaerobe, 2011, 17(6): 394-398.