



研究报告

一株肠膜明串珠菌的分离鉴定及其抑菌特性

李祎* 吴晓敏 杜航 景如贤 杨刚刚*

河南师范大学生命科学学院 功能微生物绿色转化技术河南省工程实验室 河南 新乡 453007

摘要:【背景】水产病原细菌严重威胁水产动物健康且制约水产养殖业发展,细菌性鱼病的有效防治成为水产养殖领域亟待解决的问题。【目的】筛选对水产病原细菌有抑制效果的菌株,并研究其抑菌特性及其在水产细菌病害防治中的实际效果。【方法】通过 16S rRNA 基因测序、构建系统发育树和生理生化鉴定确定筛选菌株的进化地位,通过乙酸乙酯萃取获得抑菌物质粗提物,通过偶氮酪蛋白法检测菌株胞外蛋白酶活力,采用结晶紫染色法对菌株的生物膜形成能力进行测定,通过浸浴攻毒模型确定所筛菌株对维氏气单胞菌的防治作用。【结果】从泡菜发酵物中筛选出一株乳酸菌 DH,经 16S rRNA 基因测序、发育树分析和生理生化鉴定确定其为肠膜明串珠菌,该菌分泌的胞外抑菌物质对鼠伤寒沙门氏菌、大肠埃希氏菌、铜绿假单胞菌、杀鲑气单胞菌、希瓦氏菌和维氏气单胞菌表现出抑菌效果,其抑菌物质能被乙酸乙酯萃取并且具有热稳定性。菌株 DH 能够显著抑制待测菌株的蛋白酶产量和生物膜形成能力,并且对维氏气单胞菌浸浴攻毒有防治作用。【结论】肠膜明串珠菌 DH 通过分泌抑菌物质抑制水产病原细菌的生长,能够为细菌性鱼病的防治提供一定的理论和应用潜力。

关键词: 水产病原细菌, 肠膜明串珠菌, 抑菌物质, 蛋白酶产量, 生物膜形成能力

Isolation, identification, and antibacterial characterization of *Leuconostoc mesenteroides*

LI Yi* WU Xiaomin DU Hang JING Ruxian YANG Ganggang*

Henan Province Engineering Laboratory for Bioconversion Technology of Functional Microbes, College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang, Henan 453007, China

Abstract: [Background] Aquatic pathogenic bacteria threaten the health of aquatic organisms and restrict the development of aquaculture. The effective prevention and control of bacterial diseases in fish has become an urgent problem in aquaculture. [Objective] To screen out a bacterial strain with inhibitory effect on aquatic pathogenic bacteria, and to study its antibacterial properties and performance in controlling aquatic

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (32000073); Natural Science Foundation of Henan Province (202300410240); Key Scientific Research Programs of Henan Education Department (21A180011); Key Research and Development and Promotion Projects of Henan Province (212102310242); Young Talent Promotion Project of Henan Province (2021HYTP042)

*Corresponding authors: Tel: 86-373-3326559

E-mail: LI Yi: liyi@htu.edu.cn; YANG Ganggang: 2015072@htu.edu.cn

Received: 19-04-2021; **Accepted:** 25-05-2021; **Published online:** 15-06-2021

基金项目: 国家自然科学基金(32000073); 河南省自然科学基金(202300410240); 河南省高等学校重点科研项目(21A180011); 河南省重点研发与推广专项(科技攻关)(212102310242); 河南省青年人才托举工程项目(2021HYTP042)

*通信作者: Tel: 0373-3326559

E-mail: 李祎: liyi@htu.edu.cn; 杨刚刚: 2015072@htu.edu.cn

收稿日期: 2021-04-19; **接受日期:** 2021-05-25; **网络首发日期:** 2021-06-15

bacterial diseases. **[Methods]** The strain was identified after full consideration of the phylogenetic tree constructed based on the 16S rRNA gene and the physiological and biochemical characteristics. The antibacterial substances were extracted with ethyl acetate. The effects of the strain on the extracellular protease production and biofilm-forming ability of pathogenic bacteria were determined by azo casein method and crystal violet staining, respectively. Furthermore, the inhibitory effect of the strain on *Aeromonas veronii* Z12 was evaluated by animal experiment. **[Results]** The lactic acid bacterial strain DH was screened out from the fermented product of pickle and identified as *Leuconostoc mesenteroides*. The strain secreted extracellular antimicrobial substances, and showed antibacterial effect on *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas salmonicida*, *Shewanella putrefaciens*, and *A. veronii*. The antibacterial substances could be extracted with ethyl acetate and had thermal stability. Strain DH inhibited the extracellular protease production and biofilm-forming ability of the tested pathogenic bacteria, and exhibited protection against the challenge of *Aeromonas veronii* Z12. **[Conclusion]** *L. mesenteroides* DH can inhibit the growth of aquatic pathogenic bacteria by secreting antibacterial substances, which has the potential for the prevention and control of bacterial diseases in fish.

Keywords: aquatic pathogenic bacteria, *Leuconostoc mesenteroides*, antibacterial substances, protease production, biofilm-forming ability

淡水养殖是我国内陆水产业主要的经济产业, 为人类提供大量优质的动物蛋白, 对改善饮食结构和增强体质有重要意义^[1]。淡水养殖产品因其营养丰富、肉质鲜美、富含维生素等特点深受消费者的喜爱, 其产量和规模都在不断增大, 我国淡水养殖面积和产量已居世界首位。在养殖水体中存在大量细菌, 而致病细菌的过度生长会造成细菌性鱼病, 严重影响水产养殖鱼类的健康, 对水产养殖业的发展造成严重威胁^[2]。特别是气单胞菌可大规模引起淡水鱼类腐皮病、疥疮病、细菌性败血症、细菌性肠炎等, 造成鱼体表面出血、溃烂、组织发炎, 最终死亡。在治疗细菌性鱼病的过程中, 所施用的抗生素易引发细菌的耐药性, 导致耐药菌株和耐药基因的传播^[3], 加剧了细菌性鱼病的危害。如何有效地防治细菌性鱼病成为水产养殖领域亟待解决的问题。

乳酸菌是一种益生菌, 是构成特定区域正常微生物菌群的重要成员, 能够调节肠道菌群、改善肠道环境, 对机体健康有重要的促进作用^[4]。同时, 乳酸菌分泌蛋白质或肽类(抗菌肽)对病原菌有一定的抑制作用。但是, 目前发现的乳酸菌抗菌物质数量不多且应用于水产细菌病害防治中的报道相当有限。因此, 筛选对水产病原

细菌生长有抑制作用的乳酸菌对于水产细菌病害的防治具有重要意义和应用价值。肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)是乳酸菌中明串珠菌属的重要菌种, 具有很高的生物安全性, 其能够分泌细菌素从而抑制病原细菌的生长^[4]。然而, 关于肠膜明串珠菌在水产病原细菌防控中的实际应用的报道很少, 因此将其应用于细菌性鱼病的防治中有一定的研究价值。

本论文从泡菜发酵物中筛选到一株乳酸菌, 经过 16S rRNA 基因测序、发育树分析及生理生化鉴定确定其为肠膜明串珠菌, 对其抑菌效果和抑制物质进行分析, 探究其对气单胞菌的蛋白酶产量和生物膜形成能力的影响, 并进一步通过动物实验研究其对维氏气单胞菌浸浴攻毒的防治作用, 以期为水产细菌病害的防治提供理论基础和应用价值。

1 材料与方法

1.1 菌株

肠膜明串珠菌 DH 由本实验室分离鉴定并保存, 于 MRS 培养基中培养。鼠伤寒沙门氏菌(CGMCC 1.1190)、大肠埃希氏菌(CGMCC 1.12883)和铜绿假单胞菌(CGMCC 1.15148)购于中国普通微生物保藏管理中心。杀鲑气单胞菌 Z2、希瓦氏

菌 Z3、维氏气单胞菌 Z12 由作者从鱼体内分离并保藏于河南师范大学应用与环境微生物实验室, 于 LB 培养基中培养。

1.2 主要试剂、仪器及培养基

葡萄糖、牛肉膏、胰蛋白胨和酵母提取物, Oxoid 公司; 脱脂奶粉和偶氮酪蛋白, 上海碧云天生物技术有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, TaKaRa 公司。

超净工作台, 苏州智净净化设备有限公司; 酶标仪, 郑州金友宁仪器有限公司; 紫外分光光度计, 上海仪电分析仪器有限公司; 离心机, Beckman Coulter 公司; 光学显微镜 BX63, Olympus Corporation 公司; pH 计, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; PCR 仪和凝胶成像系统, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 全自动生长曲线分析仪, OY Growth Curves 公司。

MRS 培养基(g/L): 葡萄糖 20.0, 牛肉膏 10.0, 酵母提取物 5.0, 柠檬酸氢二铵 2.0, 三水合乙酸钠 5.0, 四水磷酸氢二钾 2.0, 硫酸锰 0.05, 七水硫酸镁 2.0, 吐温-80 1 mL/L, 调节 pH 至 6.5 左右, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

1.3 方法

1.3.1 菌株的筛选

将泡菜发酵物用无菌生理盐水进行 10^{-1} – 10^{-5} 梯度稀释, 将不同梯度的稀释液涂布到加有碳酸钙的 MRS 平板, 于 37 °C 下培养 48 h, 挑取有溶钙圈的单菌落于 MRS 平板上划线纯化, 反复操作 2–3 次, 获得纯种菌株。将所筛菌株于 -80 °C 甘油保存, 并进行后续实验。

1.3.2 筛选菌株的鉴定

提取筛选菌株 DH 的基因组 DNA, 利用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')^[5] 对其 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增并测序。将测序结果与 NCBI 数据库比对, 选取与所测序列相似性较高的序列。应用 MEGA 5.0 生物软件^[6], 采用邻接 (Neighbor-Joining) 法构建系统发育树。将所筛选

菌株接种到 MRS 平板上, 于 37 °C 恒温培养 24–48 h 至单菌落形成, 观察菌落形态。将细菌细胞在载玻片上固定后, 用石炭酸复红进行简单染色, 在油镜下观察其细胞形态。通过 Analytic Products INC (API) 50CH 和 20E 试剂条, 按照操作手册对菌株 DH 利用唯一碳源的产酸能力和生理生化特征进行测定。

1.3.3 菌株 DH 耐酸能力和产酸能力的测定

将菌株 DH 和大肠埃希氏菌 DH5 α (作为阴性对照) 活化后分别接入到 pH 2.0、4.0、6.0、8.0 的 MRS 液体培养基和 LB 液体培养基中, 在 37 °C、120 r/min 条件下恒温振荡培养 48 h, 通过全自动生长曲线分析仪测定其在 600 nm 处的吸光度值。每个处理设置 3 个生物学重复。

将菌株 DH 和大肠埃希氏菌 DH5 α (作为阴性对照) 经活化后分别接入 MRS 液体培养基和 LB 液体培养基中, 在 37 °C、120 r/min 条件下恒温振荡培养, 并在培养 0、2、4、6、8、10、24、36、48 h 后取样, 用 pH 计测定发酵液的 pH, 以表征菌株 DH 在生长过程中的产酸能力。每个样品设置 3 个平行。

1.3.4 菌株 DH 的抑菌效果

将检测菌株(大肠埃希氏菌、铜绿假单胞菌、鼠伤寒沙门氏菌、杀鲑气单胞菌 Z2、希瓦氏菌 Z3、维氏气单胞菌 Z12)在 LB 液体培养基中进行活化, 菌株 DH 在 MRS 液体培养基中活化, 37 °C、120 r/min 培养过夜, 取菌株 DH 的发酵液在 12 000 r/min 下离心 3 min, 取上清。吸取待测菌株的发酵液 100 μ L 涂布于不同的 LB 平板。每个平板上放置无菌滤纸片, 每个滤纸片上滴加 10 μ L 菌株 DH 的无菌上清液为处理组, 滴加 10 μ L 无菌 MRS 液体培养基作为对照组, 每个待测菌株平板上的处理组和对照组均设置 3 个平行。将上述平板置于 37 °C 恒温培养过夜, 观察抑菌圈大小。

将检测菌株(杀鲑气单胞菌 Z2、希瓦氏菌 Z3、维氏气单胞菌 Z12)以 1% 的接种量接种到 LB 液体培养基中, 处理组在此基础上加 1% 菌株 DH 的无

菌上清液,并设置加 1%无菌 MRS 培养基为对照组,在 37 °C、120 r/min 条件下振荡培养,并在培养 0、3、6、9、12 和 24 h 后取样,用酶标仪测定其在 600 nm 波长下吸光值,每组设置 3 个平行。

1.3.5 菌株 DH 抑菌物质的提取及其热稳定性

菌株 DH 在 MRS 液体培养基中活化,在 37 °C、120 r/min 条件下振荡培养 24 h 后,取发酵液于 12 000 r/min 离心 10 min,取上清。加入等体积的乙酸乙酯,振荡混匀 3 次,每次 2 h。将每次收集的乙酸乙酯萃取物混合后于旋转蒸发仪减压蒸干,取部分粗提物用甲醇溶解,并将抑菌物质在薄层层析(Thin Layer Chromatography, TLC)板点板,用二氯甲烷:甲醇=20:1 的展层剂进行层析,层析后分别用碘蒸汽显色和紫外线显影。剩余的粗提物加入少量二甲基亚砜(DMSO)溶解,获得抑菌物质粗提物。按照上述方法进行抑菌实验,测试乙酸乙酯萃取物对维氏气单胞菌 Z12 的抑制效果,分别取一定量的乙酸乙酯萃取物于 60、80、121 °C 加热处理,冷却后按照上述方法进行抑菌实验,验证温度对抑菌物质的影响。

1.3.6 菌株 DH 对检测菌株胞外蛋白酶活性的影响

采用偶氮酪蛋白法对检测菌株的蛋白酶产量进行测定^[7]。将检测菌株 Z2、Z3 和 Z12 接种于含有 1%脱脂牛奶的 LB 培养基中,分别添加 1% DH 无菌上清和无菌 MRS 培养基作为处理组和对照组,于 37 °C、120 r/min 振荡培养 24 h 后分别取培养液于 12 000 r/min 离心 10 min,去除菌体后收集上清。取 100 μ L 无菌上清加入 100 μ L 的偶氮酪蛋白溶液(由 50 mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液配制,终浓度为 0.5%),并置于 37 °C 反应 2 h。加入 500 μ L 10% (质量体积分数)三氯乙酸溶液终止反应,室温放置 30 min。反应液于 8 000 r/min 离心 5 min 后,取上清 500 μ L 并向其中加入 500 μ L 1 mol/L NaOH 溶液混匀,以只含有 500 μ L Tris-HCl 缓冲液和 500 μ L 菌株无菌上清液的反应液作为空白对照,测定 OD_{440} 。每小时 OD_{440} 变化

0.001 定义为一个酶活力单位(1 U)。每株菌株的处理组和对照组均设置 3 个平行。

1.3.7 菌株 DH 对检测菌株生物膜形成能力的影响

采用结晶紫染色法对检测菌株的生物膜形成能力进行测定^[8]。将检测菌株 Z2、Z3 和 Z12 活化后按 1%的接种量接种于 LB 液体培养基中,37 °C 静置培养过夜。将发酵液按 2%接种量分别接入每孔盛有 1 mL LB 的 24 孔板中,处理组在此基础上加 50 μ L 菌株 DH 的无菌上清液,并设置加 50 μ L 无菌 MRS 培养基为对照组,每组均设 3 个平行,37 °C 恒温静置培养 72 h。弃去各孔培养基,蒸馏水洗涤 3 次,室温干燥 30 min 以上,并于 65 °C 固定 15 min。加入 1 mL 结晶紫染色液染色 30 min,吸弃结晶紫染液,用去离子水将结晶紫冲洗干净至无色,室温干燥。加入 1 mL 95%乙醇溶液脱色 30 min 后,用酶标仪测定其 OD_{595} 值,并用光学显微镜(400 \times)观察各组生物膜形成情况。

1.3.8 菌株 DH 对气单胞菌浸浴攻毒的作用

实验斑马鱼购于新乡水产市场,体长为(2.38 \pm 0.25) cm,体重为(0.21 \pm 0.04) g。正常饲喂 5 d 后,挑选外观正常、体质健康、反应灵敏的成熟个体并随机将其分为 4 组,每组均含有 10 条斑马鱼。其中 2 组仍然正常饲喂饲料,另外 2 组分别饲喂添加了不同浓度菌株 DH (1.5 \times 10⁷ CFU/mL 和 4.5 \times 10⁷ CFU/mL)的等质量的饲料,持续观察 10 d。将维氏气单胞菌 Z12 活化后,接种于 LB 液体培养基 37 °C、120 r/min 振荡培养 24 h 后,取发酵液于 12 000 r/min 离心 10 min,去上清,收集菌体。菌体用无菌 PBS 重悬并洗涤 3 次后,调整菌体浓度以 5 \times 10⁸ CFU/mL 终浓度加入上述添加菌株 DH 的 2 个处理组和另外 1 组斑马鱼中,剩余 1 组添加等体积的无菌 PBS 作为对照组。每天观察并记录各组斑马鱼存活情况。

1.3.9 数据分析

利用软件 GraphPad Prism 8.0.2 中 Student's

t-test 方法进行显著性分析, *P* 值小于 0.05 代表数据之间存在显著性差异。

2 结果与分析

2.1 菌株的鉴定

测序后将全长为 1 412 bp 的 16S rRNA 基因序列提交至 NCBI 的 GenBank 及 EzTaxon 数据库进行比对, 发现菌株 DH 的 16S rRNA 基因序列与 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *jonggajibkimchii* DRC1506 有最高相似性, 达到 100%。通过 MEGA 5.0 生物软件, 采用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树(图 1A), 结果发现菌株 DH 与 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *jonggajibkimchii* DRC1506 在同一分支, 说明菌株 DH 属于肠膜明

串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*) *jonggajibkimchii* 亚种, 命名为 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *jonggajibkimchii* DH (MW821358)。

菌株 DH 在 MRS 平板上生长 24 h 后, 可以观察到菌落为乳白色, 呈圆形, 较小, 边缘整齐, 不透明(图 1B)。将细菌细胞进行简单染色后在光学显微镜下观察到细菌细胞呈球形、短棒状, 细菌细胞长约 1–2 μm , 宽约 0.8–1.5 μm (图 1C)。通过 API 50CH 试剂条对菌株 DH 的产酸能力进行研究, 菌株 DH 以唯一碳源生长过程中产酸, 其 pH 改变而使培养基中指示剂颜色变化, 从而确定菌株 DH 利用不同碳源生长的能力, 结果如表 1 所示。菌株 DH 的其他生理生化特征见表 1。

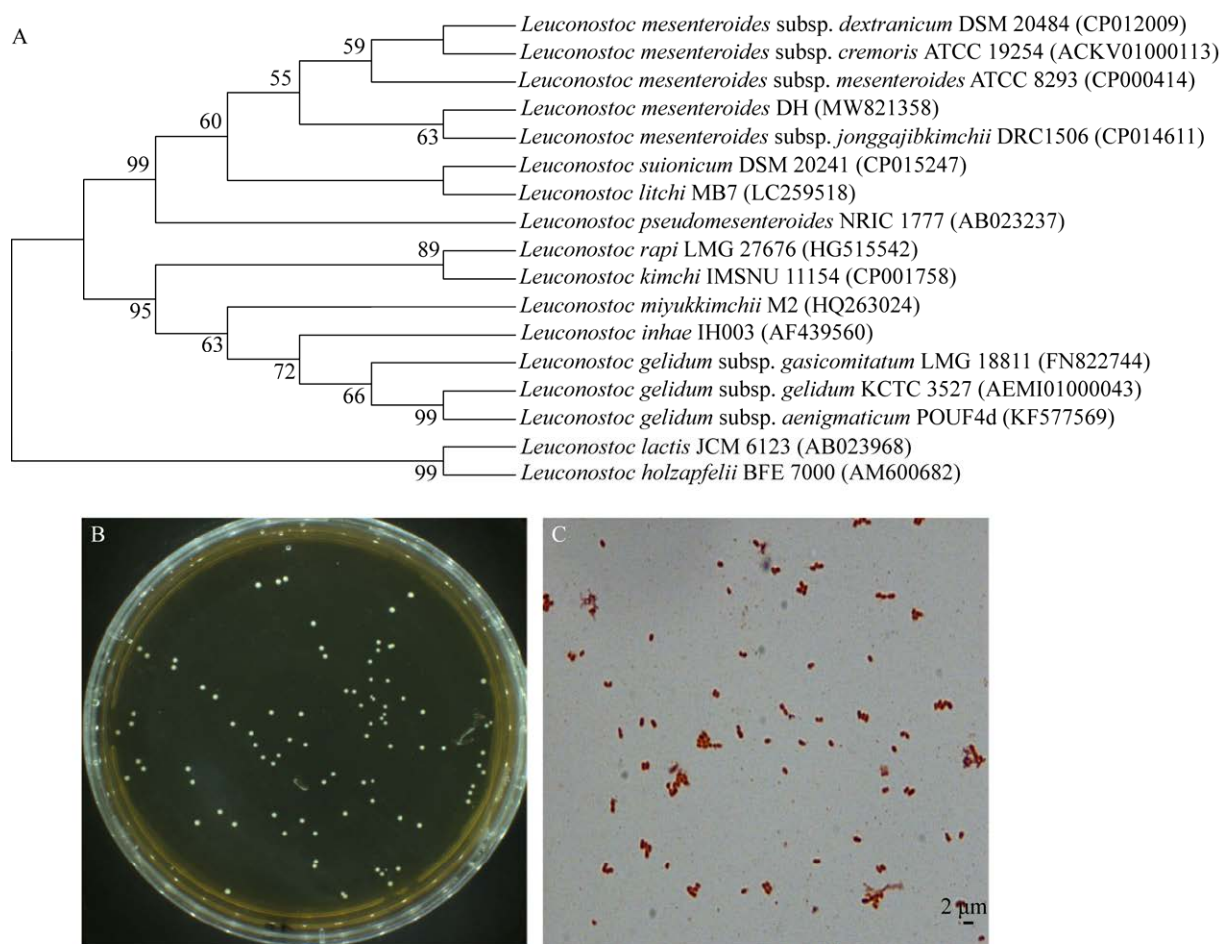


图 1 菌株 DH 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树(A)、菌落(B)和细胞形态(C)

Figure 1 Neighbour-Joining tree showing the phylogenetic positions of strain DH based on 16S rRNA gene (A), colony morphology (B) and cell morphology (C)

表 1 菌株 DH 的生理生化特性
Table 1 The physiology and biochemistry characteristics of strain DH

Items	Results
L-arabinose	+
Amygdalin	+
D-fructose	+
D-mannose	+
D-lactose	+
Maltose	+
Cellobiose	-
Melibiose	+
Trehalose	+
Salicin	+
Pptassium	+
Sucrose	+
Potassium 2-ketogluconate	+
Raffinose	+
Potassium gluconate	+
Ribose	-
D-xylose	+
Potassium 5-ketogluconate	+
β-galactosidase	W
Arginine dihydrolase	-
Lysine decarboxylase	+
Ornithine decarboxylase	+
Citrate utilization	-
H ₂ S production	-
Urease	-
Tryptophane deaminase	W
Indole production	-
Acetoin production	-
Gelatinase	-
Glucose	+
Mannitol	+
Inositol	+
Sorbitol	+
Rhamnose	+
Saccharose	+

注：+：阳性；W：弱阳性；-：阴性
Note: +: Positive; W: Weakly positive; -: Negative

2.2 菌株 DH 耐酸能力和产酸能力

通过对菌株 DH 和大肠埃希氏菌 DH5α (阴性对照)在不同 pH 的培养基中生长水平的测定研究菌株 DH 的耐酸能力。如图 2A 所示，菌株 DH 在不同 pH 表现出不同的生长水平，菌株 DH 在 pH 2.0 的条件下几乎不能生长。在 pH 4.0 和 pH 6.0 的条件下，菌株 DH 的迟缓期很短，很快进入了对数生长期，但是其稳定期很快出现，最终限制菌株的生长水平导致菌株丰度较低。虽然在 pH 8.0 的条件下菌株 DH 经历较长时间的迟缓期，但是当其进入对数生长期后，细菌数量显著升高，最终在细菌丰度上远高于其他 pH 条件。作为对照的菌株 DH5α 几乎在 pH 2.0 和 pH 4.0 的条件下完全不能生长，在 pH 6.0 和 pH 8.0 的条件下快速进入对数生长期，而且在 pH 6.0 的条件下达到最高生长水平(图 2B)。与菌株 DH5α 相比，菌株 DH 在酸性条件下生长的能力更强，表明该菌株有一定的耐酸能力。

乳酸菌往往具有较强的产酸能力，通过对其培养液 pH 的不断测定研究其产酸能力(图 2C)。结果发现随着菌株 DH 的生长，培养液的 pH 呈现持续下降的趋势，在培养 24 h 后从初始的 pH 5.0-6.0 下降至 4.06，并趋于稳定。菌株 DH5α 培养液的 pH 随着其生长表现出先降低后升高的趋势，并最终高于其初始 pH。与菌株 DH5α 相比，菌株 DH 有一定的产酸能力，在生长过程中产生酸性代谢物使得培养液 pH 下降，并且在 24 h 时 pH 达到稳定，这可能与其细菌生长曲线有关。在培养 24 h 时，细菌达到稳定期，细菌细胞数量趋于稳定，因此其生长 pH 同样维持稳定。

2.3 菌株 DH 的抑菌效果

通过滤纸片法检测菌株 DH 的无菌上清对待测菌株的抑制效果，结果如图 3 所示，6 种待检测菌株涂布的平板上均出现了明显的抑菌圈。其中菌株 DH 对鼠伤寒沙门氏菌和大肠埃希氏菌的抑菌圈相对于其他 4 种检测菌株更大，但是只与维

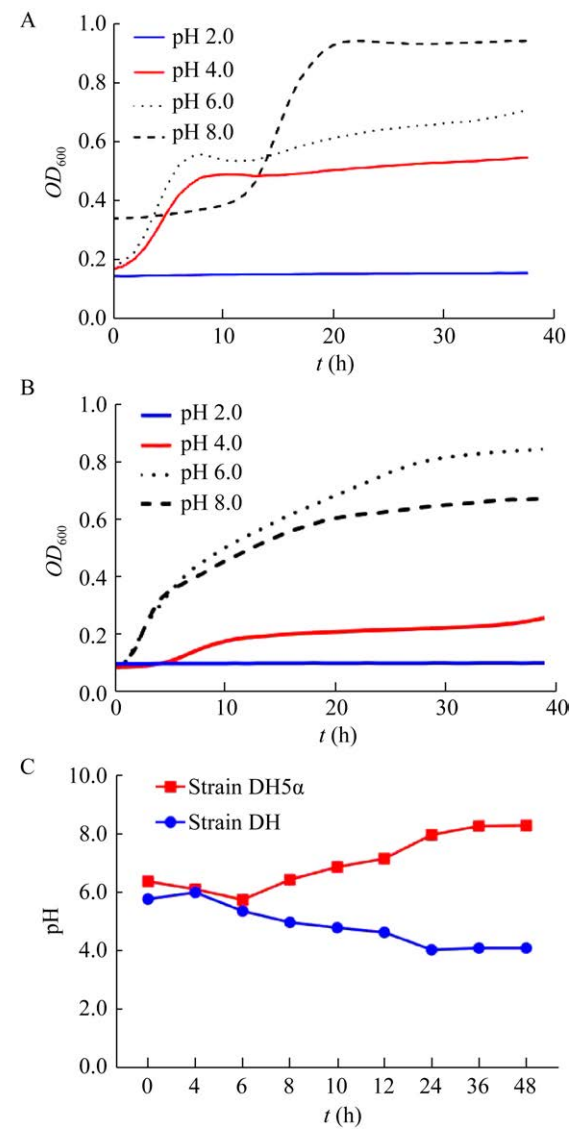


图 2 菌株 DH (A)和菌株 DH5α (B)在不同 pH 条件下的生长水平及其产酸能力(C)
Figure 2 Growth level of strain DH (A) and strain DH5α (B) under different pH conditions and the acid production capacity (C)

氏气单胞菌 Z12 的抑菌圈直径有显著性差异 (表 2)。虽然鼠伤寒沙门氏菌和大肠埃希氏菌的抑菌圈直径更大, 但是其滤纸片周围仍有少量细菌生长, 抑菌的效果不彻底。杀鲑气单胞菌 Z2、希瓦氏菌 Z3 和维氏气单胞菌 Z12 滤纸片周围没有细菌生长, 菌株 DH 对这 3 株细菌的抑制效果更加彻底。

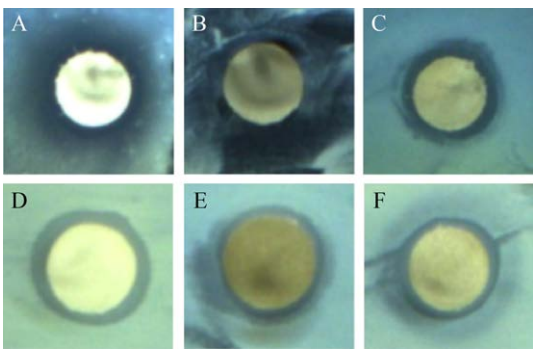


图 3 滤纸片法检测菌株 DH 对待测菌株的抑制效果
Figure 3 The inhibition effect of strain DH on the tested strains based on filter paper method

注: A: 鼠伤寒沙门氏菌; B: 大肠埃希氏菌; C: 铜绿假单胞菌; D: 杀鲑气单胞菌 Z2; E: 希瓦氏菌 Z3; F: 维氏气单胞菌 Z12
Note: A: *Salmonella typhimurium*; B: *Escherichia coli*; C: *Pseudomonas aeruginosa*; D: *Aeromonas salmonicida* Z2; E: *Shewanella putrefaciens* Z3; F: *Aeromonas veronii* Z12

表 2 菌株 DH 无菌上清对待测菌株的抑菌圈
Table 2 Inhibition zone of sterile supernatant on testing strains

检测菌株 Testing strains	抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone (mm)
鼠伤寒沙门氏菌 <i>Salmonella typhimurium</i>	11.0±1.0a
大肠埃希氏菌 <i>Escherichia coli</i>	10.8±1.0a
铜绿假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9.5±0.5a
杀鲑气单胞菌 Z2 <i>Aeromonas salmonicida</i> Z2	9.3±0.6ab
希瓦氏菌 Z3 <i>Shewanella putrefaciens</i> Z3	8.3±0.3a
维氏气单胞菌 Z12 <i>Aeromonas veronii</i> Z12	8.2±0.3b

注: 不同小写字母表示差异显著, $P<0.05$
Note: Different lowercase letters indicate significant differences, $P<0.05$

由于杀鲑气单胞菌 Z2、希瓦氏菌 Z3 和维氏气单胞菌 Z12 是水产养殖环境中常见的病原细菌且菌株 DH 对这 3 株待测菌株的抑菌效果更加彻底, 于是进一步通过生长曲线法检测菌株 DH 对这 3 株细菌的抑制效果。如图 4 所示, 在待测菌株刚开始生长的时候, 3 株细菌的生长水平在菌株

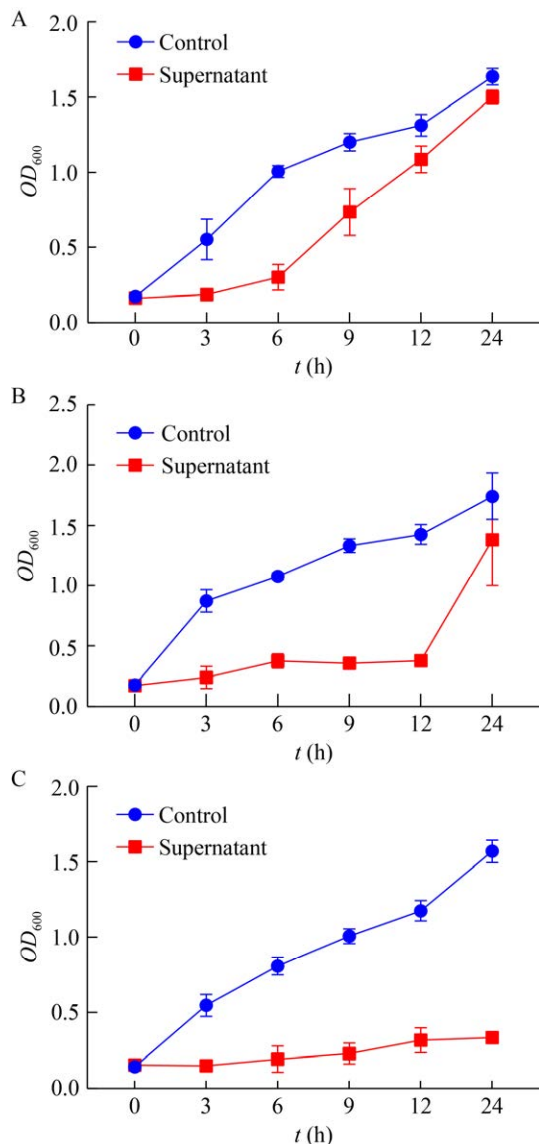


图4 菌株DH无菌上清对杀鲑气单胞菌Z2(A)、希瓦氏菌Z3(B)和维氏气单胞菌Z12(C)生长的影响

Figure 4 Effect of sterile supernatant of strain DH on the growth of *Aeromonas salmonicida* Z2 (A), *Shewanella putrefaciens* Z3 (B) and *Aeromonas veronii* Z12 (C)

DH作用下均受到明显抑制,但是杀鲑气单胞菌Z2在菌株DH作用下6 h后开始明显生长,逐渐达到对照组的生长水平。希瓦氏菌Z3的生长在前12 h一直被菌株DH抑制,但是到第24 h时其生长水平已经与对照没有明显差异。菌株DH对维氏气单胞菌Z12有较好的抑制效果,在整个检测过程中处理组的维氏气单胞菌Z12在菌株DH的

抑制作用下一直没有生长。

2.4 菌株DH的抑菌物质及其热稳定性研究

将乙酸乙酯萃取的抑菌物质在TLC板上层析,并用碘蒸汽显色和紫外显影,结果发现碘蒸汽显色法不能让抑菌物质在TLC板上显色,而在紫外线照射下明显可以观察到有条带出现在TLC板上(图5A),说明乙酸乙酯萃取物中具有苯环等芳香基团或有共轭双键的物质具有紫外吸收特性,从而在紫外照射下有条带出现。将抑菌物质分别在不同温度下处理后进行抑菌实验,发现经过高温处理后的抑菌物质与未经加热处理的抑菌物质一样均能抑制维氏气单胞菌Z12的生长,在滤纸片周围出现明显的抑菌圈,而且抑菌圈直径均在8 mm以上(图5B),表明经过高温处理后的抑菌物质仍具有较高的抑菌活性,菌株DH分泌的抑菌物质具有较高的热稳定性。

2.5 菌株DH对待测菌株蛋白酶产量的影响

采用偶氮酪蛋白法对菌株DH作用下的检测菌株蛋白酶产量进行研究,结果如图6所示。在培养24 h后,对照组中菌株Z2的胞外蛋白酶活力最高,显著高于其他2株待测细菌,在添加了菌株DH无菌上清液的处理组中,菌株Z2的蛋白酶产量显著($P < 0.0001$)低于对照组,表明菌株DH

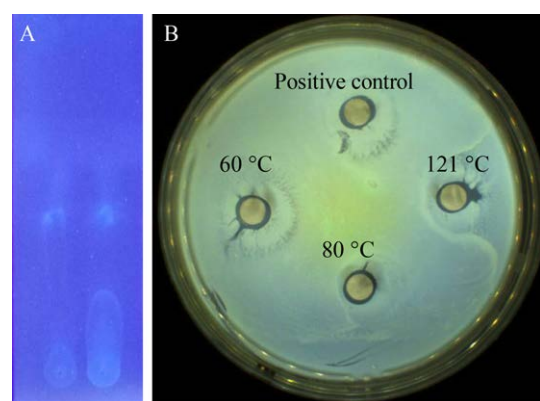


图5 菌株DH的抑菌物质在紫外下的显色(A)及不同温度下的抑菌效果(B)

Figure 5 Color development of antibacterial substance of strain DH under UV (A) and antibacterial activity at different temperatures (B)

能够抑制菌株 Z2 的蛋白酶活力。菌株 Z3 虽然其蛋白酶活力不高,但是添加了菌株 DH 无菌上清液后其蛋白酶活力受到抑制,其蛋白酶产量与对照相比显著($P=0.0136$)降低。通过对菌株 Z12 的蛋白酶活力测定发现,虽然菌株 DH 对菌株 Z12 生长的抑制效果最为明显(图 6),但是菌株 DH 对菌株 Z12 的蛋白酶活力没有抑制效果,添加了菌株 DH 的处理组与对照组相比其蛋白酶产量变化不显著($P>0.9999$)。

2.6 菌株 DH 对待测菌株生物膜形成能力的影响

利用结晶紫染色法对菌株 DH 作用下检测菌株生物膜形成能力进行定量测定(图 7),其中空白对照组平均 OD_{595} 值加上其 3 倍标准差(Standard Deviation, SD)作为细菌生物膜形成的临界值(OD_c),若待测菌株的 $OD_{595} \leq OD_c$ 则其为无生物膜形成能力, $OD_c < OD_{595} \leq 2OD_c$ 则为生物膜形成能力较弱, $2OD_c < OD_{595} \leq 4OD_c$ 则为生物膜形成能力中等, $OD_{595} > 4OD_c$ 则为生物膜形成能力强。菌株 Z2、Z3 和 Z12 的平均 OD_{595} 值分别为 0.67 ± 0.09 、 1.38 ± 0.38 和 0.65 ± 0.05 ,均显著大于 $4OD_c$ (0.15 ± 0.02),表明这 3 株细菌的生物膜形成能力均很强。在添加了菌株 DH 的无菌上清液的处理中,3 株细菌 Z2、Z3 和 Z12 的平均 OD_{595} 值分别

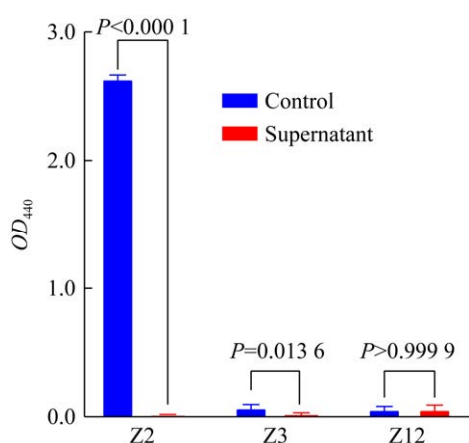


图 6 菌株 DH 对检测菌株蛋白酶产量的影响

Figure 6 Effect of strain DH on protease production of testing strains

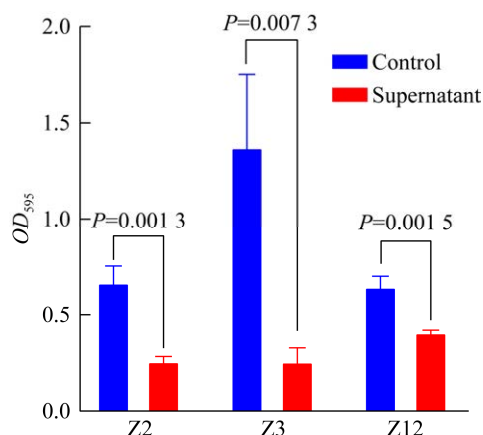


图 7 菌株 DH 对检测菌株生物膜形成能力的影响

Figure 7 Effect of strain DH on biofilm forming ability of testing strains

为 0.26 ± 0.02 、 0.26 ± 0.07 和 0.41 ± 0.02 ,均显著($P < 0.01$)低于其对照组。处理组中菌株 Z2 和 Z3 的平均 OD_{595} 值均小于 $2OD_c$,菌株 Z12 的平均 OD_{595} 值小于 $4OD_c$,说明在菌株 DH 作用下检测菌株的生物膜形成能力明显变弱,菌株 DH 对检测菌株的生物膜形成能力有一定的抑制作用。通过光学显微镜观察菌株 Z2、Z3 和 Z12 正常生长及在菌株 DH 作用下的生物膜形成水平,结果如图 8 所示。正常生长的菌株 Z2、Z3 和 Z12 细胞聚集成团,形成均匀、紧密成熟网状的生物膜,而在菌株 DH 作用下菌株 Z2、Z3 和 Z12 均不能形成致密的生物膜,细胞无法连接成膜,中间有大的间隙,结构疏松,不紧密。

2.7 菌株 DH 对维氏气单胞菌浸浴攻毒的作用

将不同浓度的菌株 DH 的活菌菌剂与斑马鱼饲料拌饲,投喂给斑马鱼作为处理组,对照组饲喂等质量的正常饲料,连续对斑马鱼的存活情况进行观察记录,用于验证菌株 DH 的生物安全性。连续 10 d 对处理组和对照组斑马鱼存活情况进行观察记录,处理组和对照组的斑马鱼存活率均为 100%,表明菌株 DH 的添加对斑马鱼的存活没有影响,菌株 DH 具有生物安全性。以饲喂菌株 DH 的斑马鱼作为乳酸菌预防组,分别将相

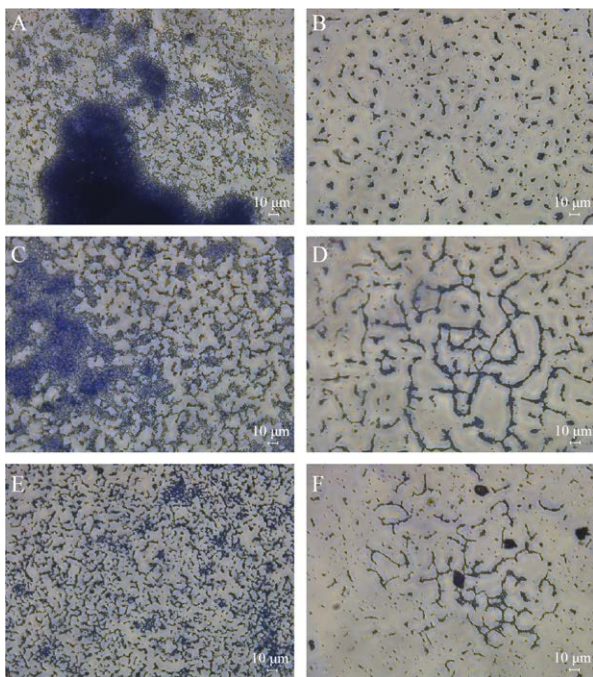


图 8 菌株 DH 对菌株 Z2、Z3 和 Z12 生物膜形成水平的影响

Figure 8 The effect of strain DH on the biofilm formation of strain Z2, Z3 and Z12

注: A: 正常生长的菌株 Z2; B: 菌株 DH 作用下的菌株 Z2; C: 正常生长的菌株 Z3; D: 菌株 DH 作用下的菌株 Z3; E: 正常生长的菌株 Z12; F: 菌株 DH 作用下的菌株 Z12

Note: A: Normal growing strain Z2; B: Strain Z2 under the effect of strain DH; C: Normal growing strain Z3; D: Strain Z3 under the effect of strain DH; E: Normal growing strain Z12; F: Strain Z12 under the effect of strain DH

同浓度的维氏气单胞菌 Z12 加入预防组和其中一个对照组进行维氏气单胞菌浸浴攻毒, 剩余一组不添加任何细菌的斑马鱼作为对照组, 连续 10 d 对各组斑马鱼的存活情况进行观察记录。如图 9 所示, 未添加细菌的对照组和添加高浓度菌株 DH 的预防组的斑马鱼在 10 d 的观察过程中存活率达到 100%, 未出现鱼体死亡的现象。然而, 低浓度预防组和气单胞菌浸浴攻毒组在第 2 天均出现鱼死亡的现象, 鱼存活率降低至 90%, 低浓度预防组的存活率在剩下的观察时间内均保持在 90%, 没有再出现鱼体死亡的现象。然而维氏气单胞菌浸浴攻毒组在第 3 天出现大量死亡的现象, 存活率降低至 40%, 直至最终存活率仅为 20%。气

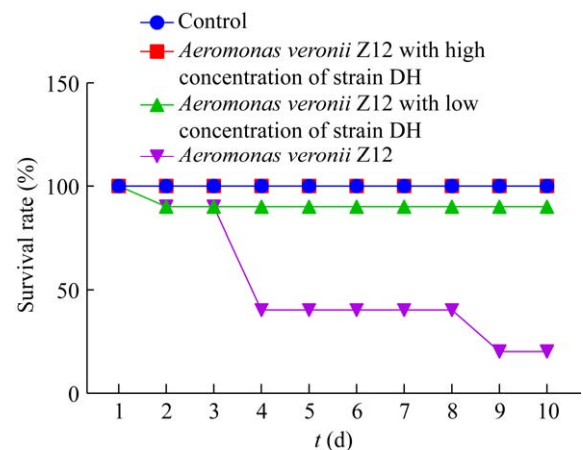


图 9 斑马鱼在气单胞菌浸浴攻毒过程中的存活率

Figure 9 Survival rate of zebrafish during challenge of *Aeromonas veronii* Z12

单胞菌浸浴攻毒实验表明菌株 DH 的饲喂能够增强斑马鱼对维氏气单胞菌的抵抗, 大大提高鱼体的存活率, 菌株 DH 在水产细菌病害的防治中有一定的应用价值。

3 讨论

水产养殖环境中的饵料残渣和排泄物易造成水体中细菌的快速滋生^[9], 特别是产毒力因子细菌(如气单胞菌、铜绿假单胞菌、哈氏弧菌等)的增殖严重威胁水产动物的健康^[10]。随着水产养殖环境中耐药细菌和耐药问题的频发, 以抗生素为主的细菌性鱼病治疗方法已经不适用于细菌疾病的防治^[11], 抗生素替代品在水产动物细菌性疾病治疗中的作用逐渐得到重视。吕可等提出借助噬菌体开展水产动物细菌性病害防控^[12]; 匡珍等研究认为乳酸菌细菌素能够应用于水产养殖中的病原菌抑制^[13]。

乳酸菌是肠道的正常菌群, 能够分泌具有抑菌活性的蛋白质或多肽。本研究发现的肠膜明串珠菌是一类重要的乳酸菌, 具有产酸、抗氧化和抑菌等多种生物功能。Wu 等研究发现肠膜明串珠菌 SN-8 产胞外多糖能够清除活性氧自由基且具有抗肿瘤的潜力^[14]; Ngolong Ngea 等报道从苹果表面分离到的肠膜明串珠菌亚种 LB7 在体外抑制假

单胞菌,同时能够减少果汁中的棒曲霉素^[15];Pham 等研究证实肠膜明串珠菌对于高脂饮食诱导的腹部脂肪堆积有一定的缓解作用^[16]。虽然肠膜明串珠菌的生物学功能被广泛研究,但是其在水产细菌防治过程中的抑菌作用及实际应用并没有太多报道,相关研究的开展对水产细菌病害的防治有重要意义。

本研究从泡菜发酵物中筛选到一株肠膜明串珠菌 DH,经过抑菌实验发现其对多种水产病原细菌有抑制效果,特别是对气单胞菌属的杀鲑气单胞菌和维氏气单胞菌均有明显抑制效果。杀鲑气单胞菌感染可引起鱼类疫病^[17],维氏气单胞菌不仅引起鱼类疾病还影响人在内的哺乳动物的健康^[18],因此肠膜明串珠菌 DH 对气单胞菌属的抑菌能力有重要的研究价值。对肠膜明串珠菌 DH 抑菌物质进行提取和研究,发现其抑菌物质有很好的热稳定性。这与朱传胜等的研究结果类似,朱传胜等从发酵酸黄瓜中筛选到一株肠膜明串珠菌通过产生细菌素抑制单核增生李斯特氏菌,该细菌素的热稳定性很强,121 °C 处理 30 min 后相对抗菌活性仍为 93.77%^[19]。王东梅等从酸奶中筛选的肠膜明串珠菌 A3 分泌的细菌素同样具有热稳定性^[20]。肠膜明串珠菌 DH 较高的热稳定性有利于该菌在水产病原菌防治中的实际应用。水产病原菌常通过产生蛋白酶、生物膜等毒力因子造成水生动物的死亡^[21],乳酸菌在抑制病原菌生长的同时,通常对病原菌的毒力因子有一定的抑制效果。林洋等筛选出一株抑制嗜水气单胞菌的植物乳杆菌 AJS2-4;其不仅能有效降低其生物膜的生成量,还可使其结构破裂变得疏松^[22]。孙梦桐等研究表明,乳酸乳球菌 LY3-1 粗提物对哈维氏弧菌生物膜形态结构具有显著破坏作用^[23]。在本研究中肠膜明串珠菌 DH 不仅能够抑制气单胞菌的生长,并且能够显著抑制待测菌株的蛋白酶产量和生物膜形成能力,特别是对杀鲑气单胞菌 Z2 胞外蛋白酶产量的抑制效果最为明显。前期研究同

样发现杀鲑气单胞菌 Z2 的胞外蛋白酶产量非常高^[21],是其致病致腐能力的主要作用因素,在肠膜明串珠菌 DH 的作用下,其胞外蛋白酶产量显著下降,但是该菌的生长并没有受到明显抑制(图 4),这可能是因为菌株的生长与其蛋白酶产量没有直接关系,蛋白酶产量的抑制并不会造成其生长水平的影响。虽然肠膜明串珠菌 DH 对维氏气单胞菌 Z12 生长的抑制效果最为明显,由于菌株 Z12 自身胞外蛋白酶产量不高,所以肠膜明串珠菌 DH 对菌株 Z12 胞外蛋白酶的抑制作用并不显著(图 6),但是肠膜明串珠菌 DH 能够显著抑制菌株 Z12 的生物膜形成能力,细菌的生物膜的形成对于其对环境的适应及抵抗不利环境有重要帮助,是病原细菌致病能力的重要手段。肠膜明串珠菌 DH 对菌株 Z12 生物膜的抑制能够降低其对外界环境的抵抗,将其细胞暴露于抗生素及机体免疫力作用下,从而将其彻底清除。虽然肠膜明串珠菌 DH 对水产病原细菌的抑制机制并不清楚,但是根据研究结果与相关文献报道,我们认为肠膜明串珠菌 DH 能够破坏病原细菌的生物膜,去除生物膜对病原细菌的保护,通过分泌“细菌素”等抑菌物质直接作用于细菌细胞,造成细菌细胞的死亡,从而实现其抑菌作用。

为了确定肠膜明串珠菌 DH 在水产细菌病害中的实际应用效果,我们选择斑马鱼为模式动物开展攻毒实验。斑马鱼已成为研究细菌-宿主之间相互作用及细菌致病效果的一种非常重要的模式动物^[24],细菌致病效果研究方面,通常通过腹腔注射攻毒模型或者浸浴攻毒模型来研究细菌的致病性^[25]。Rendueles 等通过浸浴攻毒模型让斑马鱼自然感染爱德华氏菌(*Edwardsiella ictalurid*),并以此模型筛选能够提高斑马鱼存活率的益生菌,筛选 3 株保护菌株并通过黏附因子实现对斑马鱼的保护^[26]。本文通过浸浴攻毒模型研究肠膜明串珠菌 DH 对维氏气单胞菌胁迫下斑马鱼的存活率的作用,研究发现肠膜明串珠菌 DH 能够提高斑马鱼

对维氏气单胞菌的抵抗, 显著提高斑马鱼的存活率。肠膜明串珠菌 DH 不仅在体外能够抑制气单胞菌的生长且抑制其毒力因子的产生, 在体内同样有助于降低维氏气单胞菌对鱼的威胁, 本研究为肠膜明串珠菌 DH 在水产病原菌防治的实际应用奠定基础。

4 结论

本研究从泡菜发酵物中筛选一株乳酸菌 DH, 经过 16S rRNA 基因测序、系统发育树分析和生理生化鉴定确定该菌株属于肠膜明串珠菌。对其抑菌效果进行分析, 发现该菌分泌胞外抑菌物质对鼠伤寒沙门氏菌、大肠埃希氏菌、铜绿假单胞菌、杀鲑气单胞菌、希瓦氏菌和维氏气单胞菌均表现出抑菌效果, 其抑菌物质能被乙酸乙酯萃取并且具有热稳定性。菌株 DH 抑制待测菌株蛋白酶产量和生物膜形成能力, 并且对维氏气单胞菌浸浴攻毒有防治作用。肠膜明串珠菌的分离鉴定为水产病原菌的防治提供一种新的菌种选择, 对其抑菌特性的研究为以后将该菌应用于水产病原菌的防治奠定一定的基础和应用潜力。

REFERENCES

- [1] Naylor RL, Goldburg RJ, Primavera JH, Kautsky N, Beveridge MCM, Clay J, Folke C, Lubchenco J, Mooney H, Troell M. Effect of aquaculture on world fish supplies[J]. *Nature*, 2000, 405(6790): 1017-1024
- [2] Wu YY, Li FX, Li LH. Research progress of pathogenic microorganisms and their technologies of detection and control in aquatic products[J]. *Microbiology*, 2009, 36(1): 113-119 (in Chinese)
吴燕燕, 李凤霞, 李来好. 水产品病原菌及其检测与控制技术研究进展[J]. *微生物学通报*, 2009, 36(1): 113-119
- [3] Ye F, Feng SH, Wu JJ, Dai ZY. Antibiotic resistant bacterial isolation and identification from shrimp ponds and their antibiotic resistance genes detection[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2019, 28(9): 1843-1849 (in Chinese)
叶繁, 冯时欢, 吴佳佳, 戴志远. 养殖虾塘常见耐药菌的分离鉴定与耐药基因检测[J]. *生态环境学报*, 2019, 28(9): 1843-1849
- [4] Daba H, Pandian S, Gosselin JF, Simard RE, Huang J, Lacroix C. Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57(12): 3450-3455
- [5] DeLong EF. Archaea in coastal marine environments[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89: 5685-5689
- [6] Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731-2739
- [7] Bendicho S, Martí G, Hernández T, Martín O. Determination of proteolytic activity in different milk systems[J]. *Food Chemistry*, 2002, 79(2): 245-249
- [8] Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Švabić-Vlahović M. A modified microtiter-plate test for quantification of *Staphylococcal* biofilm formation[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2000, 40(2): 175-179
- [9] Calanche JB, Beltrán JA, Hernández Arias AJ. Aquaculture and sensometrics: the need to evaluate sensory attributes and the consumers' preferences[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2020, 12(2): 805-821
- [10] Janda JM, Abbott SL. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2010, 23(1): 35-73
- [11] Ma CJ, Wu XM, Lin M, Huang LX, Ma Y, Yan QP. Prevalent feature of complex class 1 integrons in drug-resistant bacteria isolated from aquaculture environment[J]. *Microbiology China*, 2017, 44(9): 2089-2095 (in Chinese)
马辰婕, 吴小梅, 林茂, 黄力行, 马英, 鄢庆彬. 水产养殖环境耐药细菌中复合 1 型整合子的流行特征[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(9): 2089-2095
- [12] Lyu K, Zhao QC, Liu JY, Ma ZZ, Xu YP, Ma YS. Application of bacteriophage in aquaculture: focusing on problems and solutions[J]. *Fisheries Science*, 2020, 39(6): 964-971 (in Chinese)
吕可, 赵前程, 刘婧懿, 马子祯, 徐永平, 马永生. 噬菌体在水生动物病害防治中的应用问题和解决策略[J]. *水产科学*, 2020, 39(6): 964-971
- [13] Kuang Z, Li XY, Xu CX, Yang XS, Chi H. Research progress of bacteriocins from lactic acid bacteria and its application in aqua culture and processing[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(4): 292-298 (in Chinese)
匡珍, 李学英, 徐春霞, 杨宪时, 迟海. 乳酸菌细菌素研究进展及其在水产养殖和加工中的应用[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(4): 292-298
- [14] Wu JR, Yan DL, Liu YM, Luo X, Zhang LW. Purification, structural characteristics, and biological activities of exopolysaccharide isolated from *Leuconostoc mesenteroides*

- SN-8[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 644226
- [15] Ngolong Ngea GL, Yang QY, Tchabo W, Castoria R, Zhang XY, Zhang HY. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* LB7 isolated from apple surface inhibits *P. expansum* *in vitro* and reduces patulin in fruit juices[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2021, 339: 109025
- [16] Pham MT, Yang JJ, Balasubramaniam A, Rahim AR, Adi P, Do TTM, Herr DR, Huang CM. *Leuconostoc mesenteroides* mediates an electrogenic pathway to attenuate the accumulation of abdominal fat mass induced by high fat diet[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 21916
- [17] Ellis AE, Hastings TS, Munro ALS. The role of *Aeromonas salmonicida* extracellular products in the pathology of furunculosis[J]. *Journal of Fish Diseases*, 1981, 4(1): 41-51
- [18] Hickman-Brenner FW, MacDonald KL, Steigerwalt AG, Fanning GR, Brenner DJ, Farmer JJ. *Aeromonas veronii*, a new ornithine decarboxylase-positive species that may cause diarrhea[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1987, 25(5): 900-906
- [19] Zhu CS, Gao YR, Xu GD. Screening of lactic acid bacteria for production of anti-*Listeria* bacteriocin[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(5): 87-91,86 (in Chinese)
朱传胜, 高玉荣, 徐国栋. 对单增李斯特菌有抑制作用的乳酸菌的筛选鉴定及其细菌素的研究[J]. *现代食品科技*, 2014, 30(5): 87-91,86
- [20] Wang DM, Liu F, Ma CY, Chen HZ. Screening of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from Hetian yoghurt and characterization of the bacteriocin[J]. *Food Science and Technology*, 2012, 37(7): 26-29 (in Chinese)
王东梅, 刘飞, 马翠云, 陈红征. 和田地区酸奶中产细菌素乳酸菌的筛选及细菌素特性的研究[J]. *食品科技*, 2012, 37(7): 26-29
- [21] Jing RX, Zheng YM, Zhang N, Zhang ZY, Li Y. Detection of virulence factors and quorum sensing signal molecules of aquatic bacteria from Yellow River carp[J]. *Microbiology China*, 2021, 6(48): 2049-2060 (in Chinese)
景如贤, 郑亚萌, 张宁, 张志宇, 李祎. 黄河鲤鱼产细菌的分离及其毒力因子和群体感应信号分子的检测[J]. *微生物学通报*, 2021, 6(48): 2049-2060
- [22] Lin Y, Cui TQ, Lyu XR, Bai FL, Li JR, Shen L. Screening and identification lactic acid bacteria with inhibitory activity against quorum sensing and biofilm formation of *Aeromonas hydrophila* from traditional fermented vegetables[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2019, 19(8): 199-207 (in Chinese)
林洋, 崔天琦, 吕欣然, 白凤翎, 励建荣, 沈琳. 传统发酵蔬菜中抑制嗜水气单胞菌群体感应及生物膜形成乳酸菌的筛选与鉴定[J]. *中国食品学报*, 2019, 19(8): 199-207
- [23] Sun MT, Lyu XR, Cui TQ, Lin Y, Bai FL, Li JR. Screening and identification of lactic acid bacteria with inhibitory activity of quorum sensing and biofilm of *Vibrio harveyi* from fish intestine[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(8): 255-263 (in Chinese)
孙梦桐, 吕欣然, 崔天琦, 林洋, 白凤翎, 励建荣. 鱼类肠道中抑制哈维氏弧菌群体感应及生物膜形成的乳酸菌的筛选和鉴定[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(8): 255-263
- [24] Tobin DM, Ramakrishnan L. Comparative pathogenesis of *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Cellular Microbiology*, 2008, 10(5): 1027-1039
- [25] Van Soest JJ, Stockhammer OW, Ordas A, Bloemberg GV, Spaijk HP, Meijer AH. Comparison of static immersion and intravenous injection systems for exposure of zebrafish embryos to the natural pathogen *Edwardsiella tarda*[J]. *BMC Immunology*, 2011, 12: 58
- [26] Rendueles O, Ferrières L, Frétau M, Bégaud E, Herbomel P, Levraud JP, Ghigo JM. A new zebrafish model of oro-intestinal pathogen colonization reveals a key role for adhesion in protection by probiotic bacteria[J]. *PLoS Pathogens*, 2012, 8(7): e1002815