

研究报告

猪源产细菌素芽孢杆菌的筛选及抑菌特性

罗宝龙 魏军林 黄丽丽 张艳 倪永清*

(石河子大学食品学院 新疆 石河子 832000)

摘要:【背景】抗生素作为生长促进剂在畜牧业中的滥用,出现了严重的耐药基因富集和扩散问题,发掘新兴的生长促进剂作为饲料添加剂市场潜力巨大,目前益生菌制剂的开发最具潜力。【目的】通过对散养健康育肥猪粪便中芽孢杆菌的分离筛选,获得对典型肠道病原菌具有显著抑菌活性的芽孢杆菌,确定其产生的细菌素特性,以此对芽孢杆菌作为猪养殖业生长促进剂的潜力进行评价。【方法】采用梯度稀释涂平板法分离可培养细菌,利用牛津杯法检测菌株的抑菌活性。通过微生物形态及 16S rRNA 基因序列分析,确认 6 株产细菌素菌株的分类地位,并对其抗生素耐药性、细菌素稳定性及生理生化特征进行比较分析。【结果】从 116 株纯培养物中筛选得到 6 株对指示病原菌具有显著抑菌效应的产细菌素芽孢杆菌,其中 2 株为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*), 3 株为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*), 1 株为地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)。菌株 *B. licheniformis* DY7 和 *B. subtilis* FX4 对致泻、产肠毒素、出血性 *Escherichia coli* 均有显著的抑制效果,对头孢噻肟和红霉素高度敏感,其细菌素在 pH 3.0–9.0、50–100 °C 水浴处理后仍具有明显的抑菌活性。【结论】猪源产细菌素芽孢杆菌 DY7 和 FX4 具有高效的病原细菌抑菌能力,所产细菌素稳定性较好,具有作为动物生长促进剂的应用潜力。

关键词: 猪源, 细菌素, 芽孢杆菌, 抑菌活性, 抗生素

Selection and antibacterial activity of bacteriocin-producing Bacilli from swine

LUO Bao-Long WEI Jun-Lin HUANG Li-Li ZHANG Yan NI Yong-Qing*

(College of Food, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000, China)

Abstract: [Background] Using traditional antibiotics as growth promoters in the pig industry leads to the richness and transmission of bacterial resistant genes. Thus, the identification and development of the emerging growth promoters as alternatives to antibiotics represents tremendous economic potential in feed additive industry. Probiotic cultures are interesting candidates as feed additives for food-producing animals. [Objective] This work had as main objectives to isolate Bacilli from the

Foundation item: Special Foundation for the Research and Commercialization of Modern Agricultural Technologies of Xinjiang Production and Construction Corps (2015AC003)

*Corresponding author: E-mail: niyqlzu@sina.com

Received: September 12, 2017; **Accepted:** November 02, 2017; **Published online** (www.cnki.net): November 17, 2017
基金项目: 新疆兵团现代农业科技攻关与成果转化项目(2015AC003)

*通信作者: E-mail: niyqlzu@sina.com

收稿日期: 2017-09-12; **接受日期:** 2017-11-02; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2017-11-17

feces of free-range swine and then to characterize bacteriocins produced by Bacilli showing inhibition of typical gastrointestinal bacterial pathogens, in order to evaluate their potential as new growth promoters. **[Methods]** Using the dilution plate separation method and coated plate method, we screened culturable Bacilli. Strains presenting inhibitory properties for gastrointestinal bacterial pathogens were determined by Oxford cup method. The bacteriocin-producing *Bacillus* isolates were identified by 16S rRNA gene sequencing. **[Results]** Screening of 116 candidate strains isolated from feces samples resulted in the selection of six isolates presenting markedly inhibitory properties for bacterial pathogens, of which two strains were identified as *Bacillus velezensis*, three as *Bacillus subtilis* and one as *Bacillus licheniformis*. Among of them, *B. licheniformis* strain DY7 and *B. subtilis* strain FX4 exhibited the most effective inhibitory activity against the indicator pathogens, except for *Salmonella enterica* CICC10420, and were susceptible to Cefotaxime and Erythromycin. Additionally, both bacteriocins were stable over a wide range of pH 3.0–9.0 and temperatures 50–100 °C. **[Conclusion]** The effective inhibitory activity against the indicator pathogens and the stability may lead to the assumption that the strains DY7 and FX4 may be applied as pig growth promoters to control pathogens.

Keywords: Swine, Bacteriocin, Bacilli, Antibacterial activity, Antibiotic

在自然状态的家畜养殖业环境中, 新生仔猪一般不会因为微生物菌群单一而发病, 但是集约化养殖的猪群生活在亚健康状态, 尤其消毒环境下出生的仔猪, 加上为提高母猪繁殖率而推行的仔猪早期断奶技术, 使初生仔猪和断奶幼崽对病原菌的抵抗力较弱, 外界环境的变化很容易引起猪群肠道内的微生物体系发生变化, 一旦有益菌不能形成优势则可能出现病原微生物的入侵而导致腹泻^[1-2]。自从 Stokstad 等报道了低剂量抗生素具有促进动物生长的作用, 20 世纪 40 年代以来抗生素不仅广泛用于动物疾病的预防, 而且作为生长促进剂用来提高动物的生产效率^[3]。然而, 抗生素的滥用导致了微生物抗性基因的富集和扩散^[4]。目前, 新型饲料添加剂的开发倍受重视, 例如产细菌素的益生菌制剂、有机酸、精油等, 其中细菌素是由细菌核糖体合成产生的一类对亲缘关系较近物种具有抑制活性的多肽或多肽前体, 具有无毒害、耐高温和无细菌耐受性等优点, 逐渐被应用到食品、饲料等行业^[5]。例如, He 等^[6]发现仔猪颗粒饲料中单独添加产细菌素的枯草芽孢杆菌具有降低腹泻率、维持肠道代谢稳定等作用。Agazzi 等^[7]将乳酸菌 *Lactobacillus animalis* SB310、*Lactobacillus paracasei* subsp.

paracasei SB137 和芽孢杆菌 *Bacillus coagulans* SB117 菌株添加到 2–28 日龄的荷斯坦牛犊饲料中, 改善了牛犊的肠道菌群, 提高了生长性能和生物特征参数。因此, 动物肠道微生物大多由具有一定稳定性的宿主特异性菌群构成^[8]。研究也发现, 芽孢杆菌在不良环境中可形成抗极端环境的孢子, 相比目前使用较多的乳杆菌、乳球菌和双歧杆菌具有更大的生存优势和开发潜力, 特别是抑菌谱相对较宽的益生芽孢杆菌菌种资源的研发尤为重要^[9-10]。

健康成年动物粪便中蕴藏着丰富的可维持菌群平衡的益生菌资源。本研究针对户外自然状态下散养的健康育肥猪粪便, 从中筛选多种芽孢杆菌及广谱抗菌的产细菌素芽孢杆菌优良菌株, 并对益生性能明显菌株的抗生素耐药性及其细菌素的稳定性进行检测, 以期对猪养殖业微生物饲料添加剂的研发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、主要试剂和仪器

病原指示菌 *Staphylococcus aureus* CICC21600、*Escherichia coli* EPEC O127:K63 CICC10411、*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar

Typhimurium CICC10420、*Escherichia coli* ETEC O78:K80 CICC10421、*Escherichia coli* EHEC O157:H7 CICC21530 购自中国工业微生物菌种保藏管理中心。生物试剂和抗生素均购自北京博奥拓达科技有限公司；用于 PCR 扩增的全套试剂及扩增引物购自 TaKaRa 公司；生理生化试验所用试剂购自北京索莱宝科技有限公司。PCR 仪购自德国 BIOMETRA 公司；凝胶成像系统购自法国 Vilber 公司。

1.1.2 样品和培养基

10 份散养健康育肥猪粪便样品来源于石河子 152 团 5 连。用无菌药匙采集新鲜粪便装于灭菌保鲜盒，置于 4 °C 车载冰箱，2 h 内运回实验室进行处理。

LB 培养基(g/L)：胰蛋白胨 10.0，酵母浸粉 5.0，NaCl 5.0。pH 6.5， 1×10^5 Pa 灭菌 20 min (固体加琼脂 18.0 g/L)。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离纯化

参考 Lee 等^[11]的方法，25 g 样品溶于 225 mL 生理盐水，振荡混匀，85 °C 水浴 30 min。采用梯度稀释液涂平板法在 LB 培养基上涂布，37 °C 培养 24 h。根据菌落颜色、大小、形态等表型差异进行初步筛选，连续转接划线培养 3 次后，挑单菌落接种至 LB 液体培养基中，37 °C、150 r/min 振荡富集 18 h，5 600 r/min 离心 10 min，弃掉上清液后加入新鲜培养基重悬，补充 25% 的灭菌甘油冷冻保藏在 -80 °C。

1.2.2 革兰氏染色

纯培养物进行革兰氏染色、孔雀绿芽孢染色，镜检，初步筛选得到疑似芽孢杆菌菌株。

1.2.3 产细菌素菌株的初筛

将指示菌均匀涂布于相应的培养基上，分别移取 2 μ L 疑似菌株菌悬液点种，并做标记。静置 15 min 后置于指示菌最适温度倒置培养 18 h，点种部位出现透明圈则说明有抑菌作用^[12]。

1.2.4 产细菌素菌株的复筛

初筛菌株在 37 °C、150 r/min 振荡培养 48 h，

8 000 r/min 离心 10 min 收集上清液。复筛实验组包括：(1) 调节上清液 pH 6.5；(2) 调节上清液过氧化氢酶浓度为 5 μ g/mL，30 °C 水浴 2 h；(3) 调节上清液胰蛋白酶浓度为 5 μ g/mL，30 °C 水浴 2 h；(4) 调节上清液胃蛋白酶浓度为 5 μ g/mL，30 °C 水浴 2 h；(5) 调节上清液蛋白酶 K 浓度为 5 μ g/mL，30 °C 水浴 2 h。以 LB 液体培养菌悬液离心所得上清液做空白对照，每组移取 200 μ L 按牛津杯法进行抑菌实验，每组处理 3 个平行，记录结果^[13]。

1.2.5 分离菌株 16S rRNA 基因的系统进化分析

参考 Justé 等的方法提取产细菌素菌株 DNA，并采用细菌通用引物正向 27F 和反向 1492R 进行 PCR 扩增^[14]。PCR 产物由生工生物工程(上海)股份有限公司纯化后进行测序。将测序结果提交到 GenBank 数据库中，序列相似性分析利用 BLAST 在线进行。从数据库获得相关属种的 16S rRNA 基因序列，建立系统发育树。用 ClustalX 1.83 软件将序列进行排列^[15]，用邻接法 (Neighbor-Joining method) 计算进化距离，在 MEGA 5.0^[16] 软件中采用 P-distances 法和 Kimura-2-parameter 双参数法建立系统发育树，进化树分支的置信度采用 Bootstrap 法分析，重复次数为 1 000。

1.2.6 细菌素的热、酸碱稳定性测定

将发酵上清液分别按以下处理进行细菌素粗蛋白液的热、酸碱稳定性测定：(1) 分别在 50、70、80、90、100、121 °C 处理 30 min，冷却至室温；(2) 分别调节 pH 为 3.0、5.0、7.0、9.0、11.0，37 °C 温育 24 h，调回 pH 6.5。采用牛津杯法进行抑菌试验，指示菌为 CICC10411。

1.2.7 药敏实验

根据文献[17]，将筛选的产细菌素芽孢杆菌培养至对数期，采用相差显微镜调整菌液浓度大约在 $(2.0-2.5) \times 10^8$ CFU/mL，移取 200 μ L，用无菌棉签将菌液涂布于 LB 固体培养基。按照 NCCLS 2010 将杆菌肽(Bacitracin, BAT)、头孢噻肟(Cefotaxime, CTX)、红霉素(Erythromycin, ERM)、四环素(Tetracycline, TET)制成每片含药量分别为 0.04 IU、30 μ g、15 μ g、

30 μg 的抗生素纸片(直径 6 mm), 贴于平板上, 倒置培养 18 h, 利用游标卡尺测定抑菌圈直径。每种纸片 3 个平行, 结果求平均值。

1.2.8 产细菌素菌株的生理生化鉴定

按照东秀珠等^[18]描述的方法进行。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离

依据菌落特征、细胞形态等从 10 份样品中初步分离得到 116 株纯培养物, 经革兰氏染色、芽孢染色得到 82 株疑似芽孢杆菌。大部分菌株菌落颜色为白色、灰白色, 少部分菌株呈现淡黄色、暗红色; 液体培养时培养基表面形成菌膜, 振荡后呈絮状悬浮。此外, 鉴定后属于同一种的不同菌株, 进化关系相近但其菌落形态有差异。图 1 为筛选的 6 株产细菌素芽孢杆菌菌株的菌落特征。

2.2 产细菌素菌株的筛选

初筛实验得到的 15 株菌至少对 1 种指示菌有明显的抑菌作用。考虑到细菌代谢过程中产生的过氧化氢、细菌素、有机酸或酸性末端物质均会不同程度地抑制其它微生物的生长, 因此通过调整 pH 和过氧化氢酶浓度来排除对菌株产细菌素实验结果的干扰判定, 通过 3 种蛋白酶对代谢液的处理, 初步证实抑菌物质的类蛋白质性质。复筛得到 6 株

具有不同抑菌谱的产细菌素菌株(表 1), 其中 DY7 可以抑制 5 种指示菌, FX4 和 EY3 对 CICC10420 没有抑制作用。菌株 EY3、FX4 对 CICC21600 的抑菌圈分别为 13.26、18.42 mm。

2.3 复筛得到的产细菌素菌株的系统发育分析

将 6 株产细菌素菌株所获得的 16S rRNA 基因序列提交到 NCBI, 通过 BLAST 工具在 GenBank 数据库中与已发表的 16S rRNA 基因序列进行相似性比较, 选取相似性在 98% 以上的序列构建系统发育树, 由系统发育树可知 6 株产细菌素菌株均为芽孢杆菌属。菌株 C7、C4 与 *B. velezensis* 的 16S rRNA 基因序列相似性达到 99%; EY3、BY2、FX4 与已知种 *B. subtilis* 的相似性均达到 99% 以上; DY7 与 *B. licheniformis* 的相似性达到 100%, 结合形态特征和生理生化特征初步确定 6 株菌的分类学地位(图 1)。

2.4 细菌素稳定性

不同温度、pH 分别对 DY7、FX4 所产细菌素稳定性的影响分析见图 2、3。DY7 和 FX4 的发酵上清液经过 70 $^{\circ}\text{C}$ 处理 30 min 后, 抑菌活性分别下降了 11.0% 和 18.1%; 经过 100 $^{\circ}\text{C}$ 处理 30 min 后, 抑菌活性仍有 39.8% 和 32.5%; 经过 121 $^{\circ}\text{C}$ 处理后, 抑菌活性完全丧失。细菌素在 pH 6.5 时抑菌效果最好; 在 pH 3.0–11.0 范围内均有抑菌活性, 当 pH 为 3.0

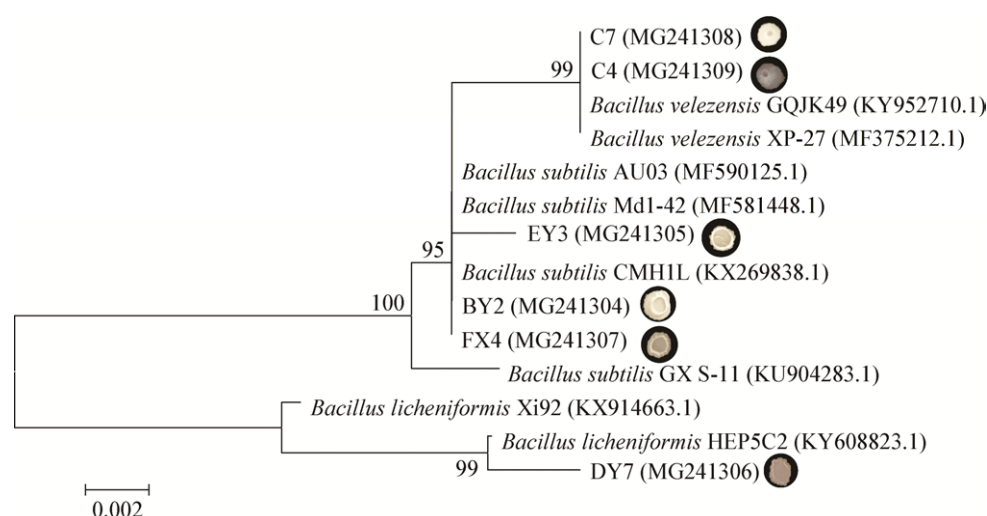


图1 基于16S rRNA基因序列的产细菌素芽孢杆菌系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree of bacteriocin-producing *Bacillus* based on 16S rRNA gene sequences

表 1 产细菌素菌株的抑菌谱和生理生化特征
Table 1 Bacteriostatic spectrum, physiological and biochemical characteristics of bacteriocin-producing strains

Items	BY2	C4	C7	DY7	EY3	FX4
CICC10411	+++	—	+++	+++	++	++
CICC10420	++	—	—	+	—	—
CICC10421	—	—	++	++	++	++
CICC21530	—	—	+++	+++	++	++
CICC21600	—	+	+	++	++	+++
胰蛋白酶 Trypsin	—	—	+	—	—	—
胃蛋白酶 Pepsin	+	—	+	—	—	—
蛋白酶 K Proteinase K	—	—	—	—	—	—
接触酶	+	+	+	+	+	+
Catalase						
淀粉水解 Hydrolysis of starch	+	+	+	+	+	+
明胶液化 Gelatin liquefaction	+	+	+	+	+	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+
V-P test	+	+	+	+	+	+
葡萄糖发酵(产酸) Glucose fermentation (produce acid)	—	+	+	—	+	—
葡萄糖发酵(产气) Glucose fermentation (produce gas)	+	+	+	+	+	+
柠檬酸盐利用 Citrate utilization	—	—	—	+	—	—
菌落特征 Colony characteristics	白色, 边凸内凹, 不规则	灰色, 内凸中凹, 不规则	白色, 内凸中凹, 不规则	暗红色, 边缘褶皱, 不规则	白色, 边凸内凹, 圆形	暗红色, 边凸内凹, 不规则
细胞特征 Cell characteristics	杆状产芽孢, G ⁺	杆状产芽孢, G ⁺	杆状产芽孢, G ⁺	杆状产芽孢, G ⁺	杆状产芽孢, G ⁺	杆状产芽孢, G ⁺

注: —: 阴性(8 mm); +: 阳性(8–11 mm); ++: 11–14 mm; +++: >14 mm.

Note: —: Negative (8 mm); +: Positive (8–11 mm); ++: 11–14 mm; +++: >14 mm.

时, 菌株 DY7 (图 4)和 FX4 所产细菌素的抑菌活性分别为 77.6%和 84.6%; 在 pH 为 9.0 时, 抑菌活性分别降低了 29.0%和 34.2%, 显示碱性环境对细菌素抑菌活性的影响比酸性大。

2.5 产细菌素菌株的抗生素敏感性

图 5 统计显示, 所有 6 株产细菌素菌株均对 CTX、ERM 敏感; 除菌株 EY3 外均对 BAT 有耐药性; 菌株 C4、C7、EY3 对 CTX、ERM、TET 较敏

感; 菌株 BY2、DY7、FX4 对 TET 具有耐受性。

2.6 产细菌素菌株的生理生化特征

产细菌素菌株生理生化结果见表 1, 结果表明 6 株芽孢杆菌属产细菌素菌株接触酶、淀粉水解、明胶液化、硝酸盐还原、V-P 试验、葡萄糖产气实验均呈阳性; 柠檬酸盐利用实验只有菌株 DY7 呈阳性; BY2、DY7、FX4 的葡萄糖产酸实验呈阴性。

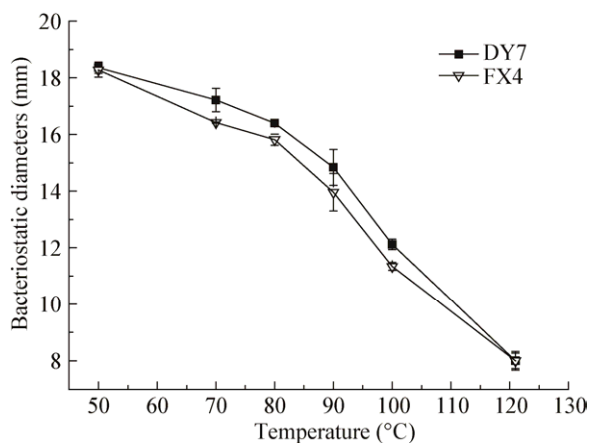


图2 细菌素的热稳定性

Figure 2 The thermal stability of bacteriocin

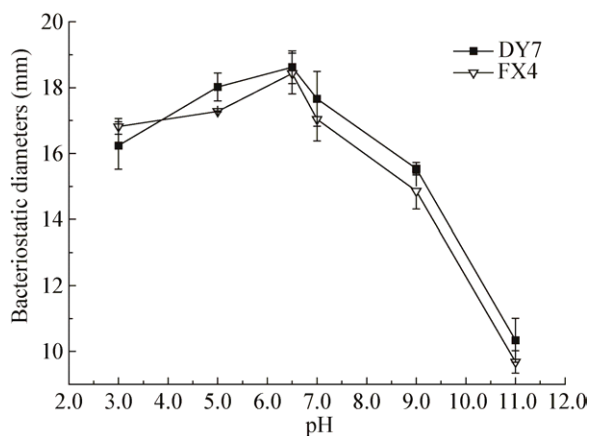


图3 细菌素的酸碱稳定性

Figure 3 The pH stability of bacteriocin

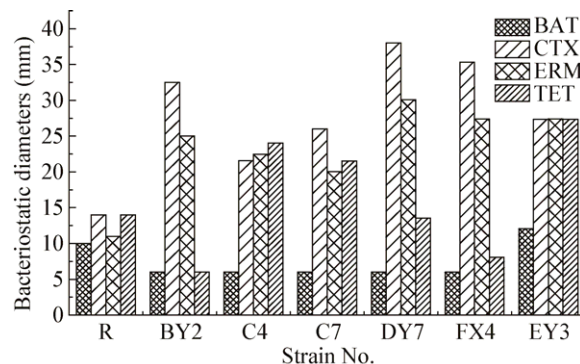


图5 产细菌素菌株的耐药谱

Figure 5 Resistance spectrum of bacteriocin-producing strains

Note: R: Resistance standard.

3 讨论与结论

目前, 由于抗生素在家禽、家畜养殖业的滥用和超级病原细菌的出现, 严重威胁人类健康。因此, 2006 年欧盟禁止了抗生素作为生长促进剂在动物生产中的应用^[19], 使得益生菌及其抗菌肽产品作为生物饲料添加剂成为科学研究开发的热门领域。益生菌及其代谢物细菌素应用于养殖业是基于其对病原微生物的营养竞争作用, 先入为主的排阻作用, 以及更显著的杀菌、拮抗作用^[20]。同时, 开发益生菌作为饲料添加剂菌株本身的安全性至关重要, 包括抗生素耐药性、产毒素作用。与抗生素相

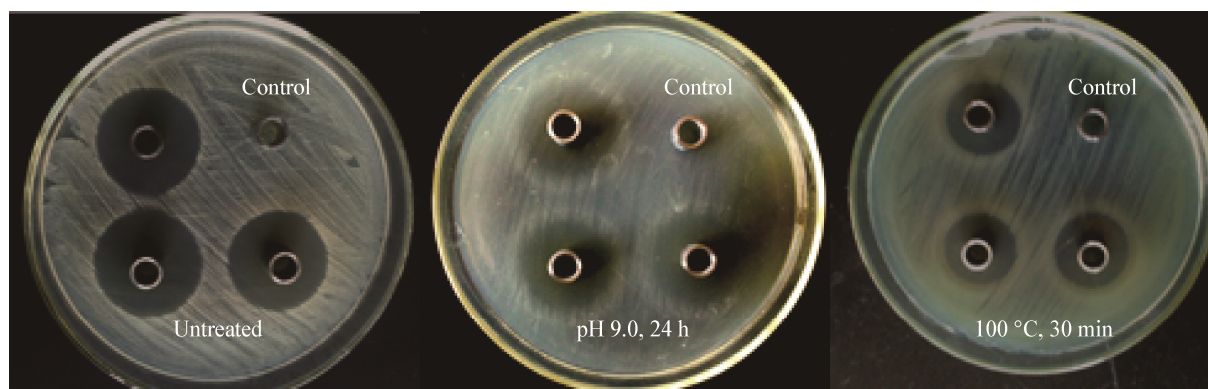


图4 菌株 DY7 所产细菌素对 CICC10411 的抑菌活性

Figure 4 Antibacterial activity to CICC10411 of strain DY7

比,虽然细菌素具有较窄的抑菌谱,但是目前的研究报道几乎没有发现靶细胞对细菌素具有耐受性。此外,Yeo等^[17]的研究发现人源益生菌 *Lactobacillus rhamnosus* GG 在猪胃肠道的存活率和肠道上皮细胞粘附能力明显低于猪源益生菌。Mulder等^[21]的研究表明初生的动物幼崽散养于自然环境更有利于肠道益生微生物的定殖,因此有必要开展更广泛的宿主特异性菌株筛选,不断拓展益生菌饲料研发和应用范围^[22]。本研究筛选得到的菌株 *B. licheniformis* DY7 与 *B. subtilis* FX4 对常见的引起动物严重腹泻、败血症及局部化脓感染的革兰氏阴性(CICC10411、CICC10420、CICC10421、CICC21530)、阳性(CICC21600)致病微生物具有抑制作用,而且 *B. licheniformis* 与 *B. subtilis* 已被列入微生物饲料添加剂范畴^[10]。

细菌素对不同酸碱环境和热基质的稳定性拓宽了生物添加剂的应用范围。Miao等的研究中,细菌素 F1 在 pH 3.0、6.0 和 9.0 条件下处理 2 h,细菌素的活性不受影响;细菌素 F1 在 60、80、100 °C 处理 60 min 和 121 °C 处理 20 min 仍有抑菌活性^[23]。本研究中 *B. licheniformis* DY7 与 *B. subtilis* FX4 菌株所产细菌素在 pH 3.0–9.0 处理 24 h 有抑菌活性,相比细菌素 F1 酸碱稳定性更强;在 121 °C 处理 30 min 时抑菌活性丧失,但 100 °C 处理 30 min 仍有抑菌活性,可以满足饲料发酵、添加剂的生产和加工工艺。

菌株对抗生素的敏感性被认为是最主要的安全特性^[24]。Manhar等^[25]报道了 *B. amyloliquefaciens* AMS1 对 Ampicillin 和 Penicillin G 具有耐受性。Hoa等^[26]的研究发现 Tetracycline 对 *B. subtilis* PY79 没有抑制作用。然而,目前研究发现由于各种因素影响,微生物不能完全替代抗生素用于疾病治疗,因此作为饲料添加剂的微生物具有一定的耐药性可增加其存活率^[6,27-28]。本研究中的 4 种抗生素根据作用机理分为两类:BAT、CTX 抑制细胞壁的合成,ERM、TET 抑制蛋白质合成^[29]。2 株高效产细菌素菌株均对 BAT 和 TET 有耐受性,这将为 2 株微

生物寄主的抗生素给药提供依据。菌株 DY7 和 FX4 的产细菌素特性和细菌素稳定性具备生物饲料添加剂基本特性,符合饲料工业化生产工艺,可以进一步研发。

REFERENCES

- [1] Gaggia F, Mattarelli P, Biavati B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production[J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 141(S1): S15-S28
- [2] Yang FJ, Hou CL, Zeng XF, et al. The use of lactic acid bacteria as a probiotic in swine diets[J]. Pathogens, 2015, 4(1): 34-45
- [3] Stokstad ELR, Jukes TH, Pierce J, et al. The multiple nature of the animal protein factor[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1949, 180(2): 647-654
- [4] Berends BR, van den Bogaard AEJM, van Knapen F, et al. Veterinary public health: human health hazards associated with the administration of antimicrobials to slaughter animals. Part I. An assessment of the risks of residues of tetracyclines in pork[J]. Veterinary Quarterly, 2001, 23(1): 2-10
- [5] Konisky J. Colicins and other bacteriocins with established modes of action[J]. Annual Review of Microbiology, 1982, 36: 125-144
- [6] He YY, Mao CX, Wen H, et al. Influence of ad libitum feeding of piglets with *Bacillus subtilis* fermented liquid feed on gut flora, luminal contents and health[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 44553
- [7] Agazzi A, Tirloni E, Stella S, et al. Effects of species-specific probiotic addition to milk replacer on calf health and performance during the first month of life[J]. Annals of Animal Science, 2014, 14(1): 101-115
- [8] Callaway TR, Rieke SC. Direct-Fed Microbials and Prebiotics for Animals[M]. Berlin: Springer, 2011: 89-120
- [9] Barbosa TM, Serra CR, La Ragione RM, et al. Screening for *Bacillus* isolates in the broiler gastrointestinal tract[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(2): 968-978
- [10] Cutting SM. *Bacillus* probiotics[J]. Food Microbiology, 2011, 28(2): 214-220
- [11] Lee S, Lee J, Jin YI, et al. Probiotic characteristics of *Bacillus* strains isolated from Korean traditional soy sauce[J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 79: 518-524
- [12] Rojo-Bezares B, Sáenz Y, Poeta P, et al. Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolated from wine[J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 111(3): 234-240
- [13] Jia LY. Screening and identification of the bacteriocin-like-producing bacteria and studying on the bacteriocin-like[D]. Shanxi: Doctoral Dissertation of Shanxi Agricultural University, 2014 (in Chinese)
贾丽艳. 产类细菌素菌株的筛选鉴定及类细菌素的研究[D]. 山西: 山西农业大学博士学位论文, 2014
- [14] Justé A, Thomma BPHJ, Lievens B. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in

- food-associated matrices and processes[J]. Food Microbiology, 2008, 25(6): 745-761
- [15] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24): 4876-4882
- [16] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731-2739
- [17] Yeo S, Lee S, Park H, et al. Development of putative probiotics as feed additives: validation in a porcine-specific gastrointestinal tract model[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(23): 10043-10054
- [18] Dong XZ, Cai MY. Common Bacterial System Identification Manual[M]. Beijing: Science Press, 2001: 364-398 (in Chinese)
东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 364-398
- [19] Immerseel FV, Eeckhaut V, Moore RJ, et al. Beneficial microbial signals from alternative feed ingredients: a way to improve sustainability of broiler production?[J]. Microbial Biotechnology, 2017, 10(5): 1008-1011
- [20] Quigley EMM. Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota[J]. Pharmacological Research, 2010, 61(3): 213-218
- [21] Mulder IE, Schmidt B, Stokes CR, et al. Environmentally-acquired bacteria influence microbial diversity and natural innate immune responses at gut surfaces[J]. BMC Biology, 2009, 7: 79
- [22] Yang X, Fang H, Shen C, et al. Research progress of bacteriocin and its application in animal feed[J]. Feed Research, 2017(6): 5-7,16 (in Chinese)
杨旭, 方华, 沈城, 等. 细菌素研究进展及其在动物饲料中的应用[J]. 饲料研究, 2017(6): 5-7,16
- [23] Miao JY, Guo HX, Ou YW, et al. Purification and characterization of bacteriocin F1, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* FX-6 from Tibetan kefir, a traditional fermented milk from Tibet, China[J]. Food Control, 2014, 42: 48-53
- [24] Park MS, Ji GE. Development of probiotics and industrialization[J]. Food Science and Industry, 2014, 47: 19-28
- [25] Manhar AK, Saikia D, Bashir Y, et al. *In vitro* evaluation of cellulolytic *Bacillus amyloliquefaciens* AMS1 isolated from traditional fermented soybean (Churpi) as an animal probiotic[J]. Research in Veterinary Science, 2015, 99: 149-156
- [26] Hoa NT, Baccigalupi L, Huxham A, et al. Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacteriophylaxis of gastrointestinal disorders[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(12): 5241-5247
- [27] Parker EA, Roy T, D'Adamo CR, et al. Probiotics and gastrointestinal conditions: an overview of evidence from the cochrane collaboration[J]. Nutrition, 2018, 45: 125-134
- [28] Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocins — a viable alternative to antibiotics?[J]. Nature Reviews Microbiology, 2013, 11(2): 95-105
- [29] Argyri AA, Zoumpopoulou G, Karatzas KAG, et al. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests[J]. Food Microbiology, 2013, 33(2): 282-291