

产细菌素屎肠球菌 F11.1G 的生物学特性分析

万颖¹, 王明根¹, 朱振宇¹, 白天天², 杨成¹, 郭雪峰^{*1,3}

1 塔里木大学 动物科学与技术学院, 新疆 阿拉尔 843300

2 塔里木大学 生命科学与技术学院, 新疆 阿拉尔 843300

3 塔里木大学 新疆生产建设兵团塔里木畜牧科技兵团重点实验室, 新疆 阿拉尔 843300

万颖, 王明根, 朱振宇, 白天天, 杨成, 郭雪峰. 产细菌素屎肠球菌 F11.1G 的生物学特性分析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(8): 3119-3132.

WAN Ying, WANG Minggen, ZHU Zhenyu, BAI Tiantian, YANG Cheng, GUO Xuefeng. Biological characteristics of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* F11.1G[J]. Microbiology China, 2024, 51(8): 3119-3132.

摘要: 【背景】随着滥用抗生素导致耐药问题日益严重, 逐渐破坏动物健康与生态环境。为应对这一全球性公共威胁, 多国禁止把抗生素作为食品和饲料添加剂, 益生菌的替代使用应运而生。

【目的】对产细菌素屎肠球菌(*Enterococcus faecium*) F11.1G 的生物学特性作全面分析, 以保证该菌株在生产中的合理及安全应用。【方法】通过热稳定性试验、耐酸试验和耐胆盐试验测定其耐热、耐酸和耐胆盐性能; 通过药敏试验探究其耐受药物能力; 通过表面疏水性试验、自凝聚性试验间接探究其对细胞的黏附能力; 通过蛋白酶耐受试验研究其在蛋白酶作用下活性作用的强弱。

【结果】屎肠球菌 F11.1G 发酵上清液具有较强的热稳定性, 在 110 °C 条件下仍然能够发挥抑菌作用, 而最佳生长温度为 37 °C。当 pH 5.9 时, 菌株生长情况较好且存活率最高, 随着 pH 的降低, 其生长受到抑制, 当 pH 值降低为 1.8 时, 菌株仍可生长, 但存活率仅有 9%。胆盐浓度在 0.10% 时存活率达 140.0%, 胆盐浓度在 0.15% 时, 存活率达 126.6%, 而胆盐浓度在 0.20% 时, 存活率为 96.6%; 菌株对头孢吡肟、丁胺卡那、庆大霉素、诺氟沙星、红霉素、罗红霉素、多黏菌素 B、林可霉素、链霉素、新霉素、甲硝唑、克林霉素、制霉菌素、甲氧苄啶、阿奇霉素和卡那霉素耐受; 对头孢他啶、左氧氟沙星、环丙沙星中度敏感; 对青霉素、头孢唑啉、头孢呋辛、氟霉素、四环素、多西环素、替考拉宁、克拉霉素和呋喃妥因高度敏感。菌株 F11.1G 对正己烷、二甲苯、乙酸乙酯和二氯甲烷的疏水率分别为 84.29%、25.75%、31.26% 和 15.08%。菌株 F11.1G 在 3、6、9、12、15 和 18 h 的自凝聚率分别为 51%、54%、76%、80%、83% 和 84%。在蛋白酶 K 作用下, 对大肠杆菌(*Escherichia coli*)和沙门氏菌(*Salmonella*)的抑菌效果明显减弱, 抑菌圈直径分别为 13.05 mm 和 11.28 mm, 抑菌率下降幅度分别为 52% 和 58%, 而在胰蛋白酶、胃蛋白酶的作用下未产生抑菌圈,

资助项目: 兵团中青年科技创新领军人才队伍建设项目(2016BC001); 塔里木大学研究生科研创新项目(TDBSCX202309)
This work was supported by the Construction of Young and Middle-aged Science and Technology Innovation Leading Talents of the Corps (2016BC001) and the Graduate Research Innovation Program of Tarim University (TDBSCX202309).

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

Received: 2023-11-04; Accepted: 2023-12-20; Published online: 2024-03-15

抑菌效果几乎完全丧失。【结论】屎肠球菌 F11.1G 具有良好的耐高温、耐酸、耐胆盐能力，对丁胺卡那、庆大霉素、诺氟沙星、红霉素和罗红霉素等 16 种药物耐受，对正己烷有较高的疏水率且自凝聚性良好，经胰蛋白酶、胃蛋白酶处理后抑菌活性丧失，证明该抑菌物质为蛋白类或肽类，为微生态制剂的安全应用提供基础数据。

关键词：细菌素；屎肠球菌 F11.1G；生物学特性；替抗

Biological characteristics of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* F11.1G

WAN Ying¹, WANG Minggen¹, ZHU Zhenyu¹, BAI Tiantian², YANG Cheng¹, GUO Xuefeng^{*1,3}

1 College of Animal Science and Technology, Tarim University, Alar 843300, Xinjiang, China

2 College of Life Science and Technology, Tarim University, Alar 843300, Xinjiang, China

3 Key Laboratory of Tarim Animal Husbandry Science and Technology Corps of Xinjiang Production and Construction Corps, Tarim University, Alar 843300, Xinjiang, China

Abstract: [Background] The abuse of antibiotics leads to increasingly severe drug resistance, which poses a growing threat to animal health and the environment. In response to this global public health threat, many countries have banned the use of antibiotics as food and feed additives. In this context, probiotics emerge as alternatives. **[Objective]** To comprehensively characterize bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* F11.1G. **[Methods]** Tests were carried out to examine the thermal stability, acid tolerance, bile salt tolerance, antibiotic sensitivity, surface hydrophobicity, self-aggregation, and protease resistance of this strain. **[Results]** The fermentation supernatant of *E. faecium* F11.1G had strong thermal stability and maintained antibacterial activity at 110 °C, with an optimal growth temperature of 37 °C. The strain grew well and had the highest survival rate at pH 5.9. As the pH decreased, the growth was inhibited. However, at pH 1.8, the strain can still grow with a survival rate of 9%. The strain showed the survival rates of 140.0%, 126.6%, and 96.6% at the bile salt concentrations of 0.10%, 0.15%, and 0.20%, respectively. The strain was tolerant to 16 antibiotics: cefepime, amikacin, gentamicin, norfloxacin, erythromycin, roxithromycin, polymyxin B, lincomycin, streptomycin, neomycin, metronidazole, clindamycin, nystatin, trimethoprim, azithromycin, and kanamycin. It was moderately sensitive to ceftazidime, levofloxacin, and ciprofloxacin and highly sensitive to penicillin, cefazolin, cefuroxime, chloramphenicol, tetracycline, doxycycline, teicoplanin, clarithromycin and nitrofurantoin. The hydrophobicity of *E. faecalis* F11.1G to hexane, xylene, ethyl acetate, and dichloromethane was 84.29%, 25.75%, 31.26%, and 15.08%, respectively. The self-aggregation rates of *E. faecalis* F11.1G at the time points of 3, 6, 9, 12, 15, and 18 h were 51%, 54%, 76%, 80%, 83%, and 84%, respectively. In the presence of protease K, the inhibitory effects of the strain against *Escherichia coli* and *Salmonella* were significantly weakened, with the inhibition zone diameters of 13.05 mm and 11.28 mm and the inhibition rate decreases of 52% and 58%, respectively. In the presence of trypsin and pepsin, no inhibition zone was formed, which indicated that the strain almost completely lost the

antibacterial effects. **[Conclusion]** *E. faecium* F11.1G demonstrates strong tolerance to high temperatures, acids, and bile salt, resistance to 16 antibiotics, high hydrophobicity to hexane, and high self-aggregation. However, it loses its antibacterial activity after treatment with trypsin and pepsin, which indicates that the antibacterial substance is a protein or peptide. The results provide basic data for the safe application of probiotics.

Keywords: bacteriocin; *Enterococcus faecium* F11.1G; biological characteristics; antibiotic alternatives

大量研究表明,低剂量抗生素能够改善牲畜生产性能,减少动物死亡率和发病率,部分抗生素还能促进动物生长,但长期滥用会使抗生素累积在动物体内,使其残留量超标,并杀死动物胃肠道中的有益微生物^[1]。2006年欧盟禁止在饲料中添加促进生长和预防疾病类抗生素^[2]。自2016年12月31日起,我国停止经营、使用用于食品动物的氧氟沙星、诺氟沙星等4种抗生素类兽药。自2020年7月1日起,停止生产含有促生长类药物饲料添加剂,以减少滥用抗生素造成的危害,维护动物源食品安全和公共卫生安全。因而,寻求安全、高效的抗生素替代品成为热点。益生菌又称益生素^[3],早在20世纪中后期,Diniel等^[4]发现益生菌是一些有益的活性微生物,英国Fuller等^[5]研究得出益生菌能调节肠内菌群生态平衡,并强调活菌才有益于健康。随着研究的深入推进,科研工作者们发现了益生菌的更多有益功能,如治疗肠道疾病^[6-8]、增强宿主免疫力^[9-10]、增强酶活性、抗氧化能力^[11]、调节机体代谢^[12]和产生细菌素等^[13]。2001年,益生菌被联合国粮食及农业组织/世界卫生组织(Food and Agricultural Organization of the United Nations/World Health Organization, FAO/WHO)定义为:活的微生物,当足量且合理摄入时,对宿主健康有显著益处^[14-15]。益生菌的种类繁多,饲料中常添加的主要为乳酸菌、芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和酵母等。乳酸菌的安全性已在国际上被认可^[16]。屎肠球菌

(*Enterococcus faecium*)是肠道中常见的一种乳酸菌,为肠球菌属,菌落形态呈卵圆形,兼性厌氧型革兰氏阳性菌,已广泛应用于畜牧业^[17-18]。1975年,Krämer等^[19]首次报道了屎肠球菌E1可产生细菌素 enterocin E1,迄今为止已经报道了很多产细菌素的屎肠球菌^[20-21]。屎肠球菌素应用最广泛的主要有 enterocin A 和 enterocin B^[22],属于II类细菌素,这类细菌素为小分子多肽或蛋白质,具有良好的热稳定性和广谱抑菌性,对单核细胞性李斯特菌具有很强的抑制作用。屎肠球菌素常被用于肉制品和乳制品防腐。Chakchouk-Mtibaa等^[23]的研究表明,在4℃保存的火鸡肉样品中添加屎肠球菌素 bacfl 31,可以延长火鸡肉保质期并增强感官属性。Vandera等^[24]研究表明,将屎肠球菌 KE82 添加到牛奶中可以产生 enterocin A 和 enterocin B,抑制李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)的生长,延长牛奶的保质期。本课题组尹雪等^[25]从新疆传统发面肥中筛选出3株乳酸菌,当pH值为4.0-7.0时3株菌均能存活,在3%和6.5% NaCl条件下生长状况良好,而且能适应10-45℃温度范围,其中一株产酸能力较强且能充分利用多种碳源,经测序鉴定为屎肠球菌 F11.1G。然而,屎肠球菌 F11.1G 的生物学特性尚不清楚,本研究通过热稳定性试验、耐酸试验、耐胆盐试验、药敏试验和蛋白酶耐受试验对其生物学特性作全面分析,为屎肠球菌 F11.1G 在饲料添加剂的应用上提供理论支持。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样 品

菌株 F11.1G 由郭雪峰团队分离筛选所得；大肠杆菌(*Escherichia coli*)和沙门氏菌(*Salmonella*)由新疆生产建设兵团塔里木动物疫病诊断与防控工程实验室李莲瑞团队提供。

1.1.2 培 养 基

MRS 培养基和麦康凯培养基，北京奥博星生物技术有限责任公司；LB 培养基，杭州百思生物技术有限公司。

1.1.3 主要试剂和仪器

DNA 细菌基因组提取试剂盒，上海索莱宝科技有限公司；通用型 DNA 纯化回收试剂盒，上海索莱宝科技有限公司；T4 连接盒，TaKaRa 公司；*Taq* 酶和 DNA Marker，北京全式金生物技术有限公司；质粒小提试剂，天根生化科技(北京)有限公司；琼脂糖，白鲨生物科技有限公司；牛胆盐(胆酸含量 $\geq 75\%$)，上海麦克林生化科技有限公司；胃蛋白酶(3 000 U/g)，索莱宝生物技术有限公司；胰蛋白酶(250 U/g)，白鲨生物科技有限公司；蛋白酶 K (30 mAnsonU/mg)，默克医药生物科技公司。PCR 仪，杭州博日科技有限公司；电泳仪，北京君意东方电泳设备有限公司；电子天平和 pH 测试仪，梅特勒托利多仪器上海有限公司；气浴恒温振荡器和数显恒温水浴锅，江苏金怡仪器科技有限公司；紫外分光光度计，上海元析仪器有限公司；台式高速大容量冷冻离心机，长沙湘仪离心机仪器有限公司。

1.2 菌株 F11.1G 的鉴定

用 DNA 细菌基因组提取试剂盒提取细菌 DNA 后作为模板，采用 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3')进行 PCR 扩增。PCR 反应体系：10 \times Buffer 2.5 μ L，

dNTP Mixture (25 μ mol/L) 2 μ L，*Taq* 酶(5 U/ μ L) 0.8 μ L，DNA 模板(10 ng/ μ L) 2 μ L，上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L，无菌超纯水补足 25 μ L。PCR 反应条件：95 $^{\circ}$ C 4 min；94 $^{\circ}$ C 1 min，50 $^{\circ}$ C 1 min 20 s，72 $^{\circ}$ C 90 s，35 个循环；72 $^{\circ}$ C 8 min；4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序，从 GenBank 数据库中下载已知菌株的 16S rRNA 基因序列，通过 BLAST 比对分析，并用 MEGA 5.0 构建系统发育树。

1.3 菌株 F11.1G 发酵上清液的制备

将 1 g 菌株 F11.1G 接种于 100 mL 已灭菌的 MRS 液体培养基中，37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 24 h 制备发酵液。将发酵液接种于 MRS 固体培养基上 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h，将得到的单菌落接种于 30 mL MRS 液体培养基中，37 $^{\circ}$ C 静置培养 14–16 h 至指数生长期，得到浓度为 10⁸ CFU/mL 的种子液^[26]。检测种子液的 pH 值，用移液枪吸取 10 mL 种子液接种于 1 000 mL MRS 液体培养基中，37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 36 h 得到发酵液，于 4 $^{\circ}$ C 冰箱冷藏过夜后再以 8 000 r/min 离心 15–20 min，去除菌体及培养基等残留杂质，得到发酵上清液。

1.4 指示菌平板的制备

将沙门氏菌和大肠杆菌单菌落接种到 LB 液体培养基，37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 10–12 h，用梯度稀释法将菌悬液浓度调节为 1 \times 10⁶ CFU/mL，将梯度稀释后的大肠杆菌和沙门氏菌菌悬液分别接种于 LB 固体培养基和麦康凯固体培养基，37 $^{\circ}$ C 恒温箱培养 16 h。

1.5 热稳定性试验

将菌株 F11.1G 的发酵上清液于不同温度 (37、60、80、100 和 110 $^{\circ}$ C)水浴锅中加热 30 min，4 $^{\circ}$ C 冷藏过夜。用梯度稀释法将指示菌液调节至合适的浓度，将稀释后的菌液涂布于 LB 培

培养基,等距离打孔,孔径为 8 mm,于每个孔中注入不同温度的菌株 F11.1G 发酵上清液,随后将培养皿放入 37 °C 恒温培养箱培养 12–16 h,测量各孔抑菌圈直径。以 37 °C 菌株 F11.1G 的发酵上清液的抑菌圈直径为对照组,其抑菌率记为 100%,其他温度为试验组,计算抑菌率。抑菌率(%)=(试验组抑菌圈直径/对照组抑菌圈直径)×100 (1)

1.6 耐酸试验

将活化后的屎肠球菌 F11.1G 菌液分别注入 4 个等量的锥形瓶中,在每个锥形瓶中加入不同浓度 HCl 溶液,每组搅拌均匀后测定其 pH,分别将 pH 值调至 1.8、2.5、3.0 和 3.5 这 4 个梯度,另取一锥形瓶装入原菌液,并测定原菌液的 pH 值,将 5 组不同 pH 值的菌液置于 37 °C 恒温培养箱摇床培养 36 h 后,每组各吸取 100 μL 接种于 5 组 MRS 固体培养基,于 37 °C 恒温培养箱倒置厌氧培养 36 h,取出进行各组的平板活菌计数,并按照 Liu 等^[27]的方法计算存活率。

1.7 耐胆盐试验

将 400 mL 菌株 F11.1G 菌液于 37 °C、200 r/min 培养 10–12 h 后平均装入 4 个已灭菌的锥形瓶。其中 3 个依次加入 0.10、0.15 和 0.20 g 的牛胆盐,配制成胆盐浓度分别为 0.10%、0.15% 和 0.20% 的 MRS 液体培养基,剩余一个不加牛胆盐作为对照组,每组吸取 100 μL 菌液均匀涂布 MRS 培养基,每组设 3 个平行,37 °C 倒置厌氧培养 32–36 h,并按照 Alameri 等^[28]的方法计算其存活率。

1.8 药敏试验

参照 K-B 纸片扩散法^[29]对青霉素、头孢唑啉和头孢他啶等常见 28 种抗菌药物进行敏感试验。

1.9 表面疏水性试验

参考 Mallappa 等^[30]的方法,将菌株 F11.1G

活化培养后,8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,用 PBS (pH 7.1)洗涤 2 次,调 OD_{600} 为 0.8–0.9。取 3 mL 菌液分别加 1 mL 二甲苯、乙酸乙酯、正己烷和二氯甲烷,涡旋混匀,37 °C 静置孵育 2 h 进行有机相和水相分离,孵育完成后,取下层水相,测定其在波长 600 nm 处的吸光度。

表面疏水性计算公式:

$$\text{疏水率}(\%) = [(A_0 - A) / A_0] \times 100 \quad (2)$$

式中: A_0 和 A 分别为菌液与有机溶剂混匀前、后测得的吸光度。

1.10 自凝聚性试验

按照 Polak-Berecka 等^[31]方法,将菌株 F11.1G 活化培养后,8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,用 PBS (pH 7.0)洗涤。将菌体用 PBS 重悬至浓度约为 10^8 CFU/mL,调整菌悬液的 OD_{600} 值为 0.50 ± 0.05 ,于 37 °C 静置孵育,分别于 3、6、9、12、15、18 h 取 4 mL 上清,测定波长 600 nm 处的吸光值。

菌体表面自凝集能力计算公式:

$$\text{自聚集率}(\%) = (1 - A_t / A_0) \times 100 \quad (3)$$

式中: A_0 为菌悬液的初始 OD_{600} 值; A_t 为菌悬液静置不同时间的上清液 OD_{600} 值。

1.11 蛋白酶耐受试验

取 3 组 10 mL 菌株 F11.1G 菌株发酵上清液分别加入等量的蛋白酶 K、胰蛋白酶和胃蛋白酶,用 HCL 或氢氧化钠将发酵上清液调制成适宜蛋白酶 K、胰蛋白酶和胃蛋白酶的 pH (7.6、7.6 和 2.0),在各蛋白酶适宜的温度(55、37 和 37 °C)水浴 2 h,未经蛋白酶处理的 pH 5.9 的发酵上清液为对照组,进行抑菌试验,每组设 3 个平行。

2 结果与分析

2.1 菌株 F11.1G 的鉴定结果

菌株 F1.11G 的 16S rRNA 基因序列通过

GenBank 中核酸序列数据库进行 BLAST 比对, 与屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*) 相似度达 100%, 表明该菌属于屎肠球菌属, 命名为屎肠

球菌 F11.1G。再选取相似度高的多个近源乳杆菌的 16S rRNA 基因序列, 用软件 MAGE 5.0 构建系统发育树, 结果见图 1。

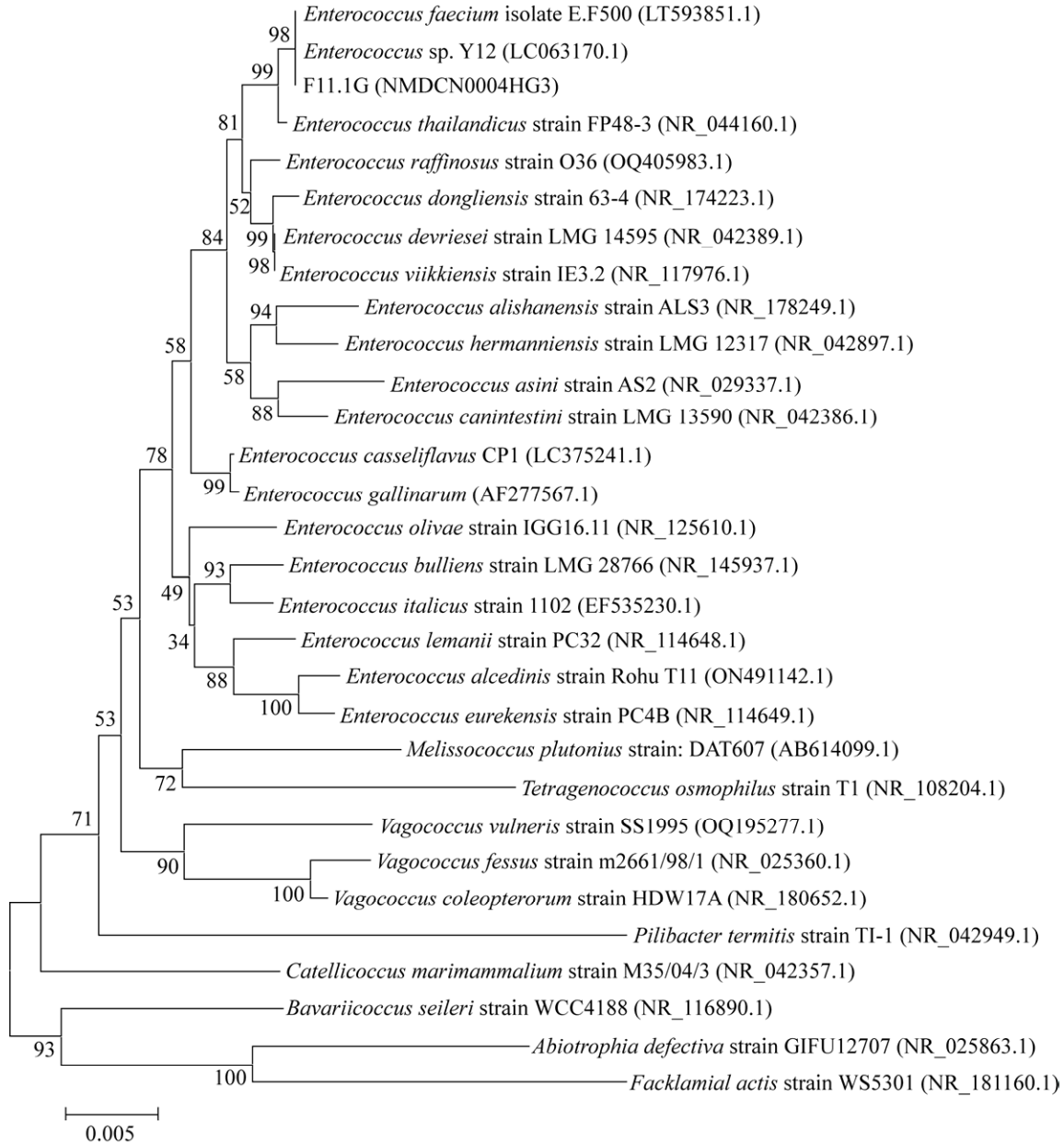


图 1 基于菌株 F11.1G 的 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 括号中序号为菌株 GenBank 登录号; 分支点上的数字为 Bootstrap 支持率; 标尺为序列差异的分支长度

Figure 1 Phylogenetic tree constructed based on 16S rRNA gene sequence of strain F11.1G. The serial number in parentheses is the GenBank login number of the strain; The number on the branch point represents Bootstrap support rate; The ruler is the branch length of the sequence difference.

2.2 热稳定性试验结果

由图 2 可知，在 37 °C 时菌株 F1.11G 发酵上清液对沙门氏菌和大肠杆菌的抑菌效果非常明显，抑菌圈直径分别达 24.0 mm 和 24.3 mm，而在 110 °C 时其抑菌圈直径分别为 11.0 mm 和 10.2 mm。由图 3 可知，37 °C 为菌株 F1.11G 最佳生长温度，随着温度升高，菌株 F1.11G 发酵上清液对沙门氏菌和大肠杆菌的抑菌率逐渐降低，在 110 °C 时抑菌率仍在 40% 以上。

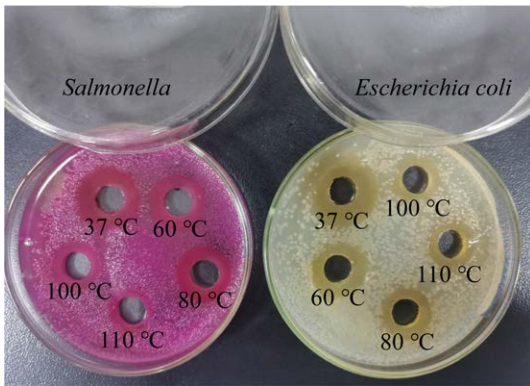


图 2 不同温度处理后菌株 F11.1G 的抑菌圈
Figure 2 Antibacterial zone of strain F11.1G after different temperature treatments.

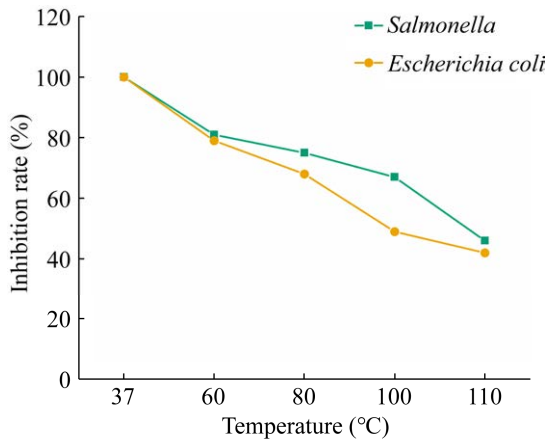


图 3 菌株 F11.1G 在不同温度条件下对发沙门氏菌和大肠杆菌的抑菌率
Figure 3 Antibacterial activity of strain F11.1G against *Salmonella* and *Escherichia coli* under different temperature conditions.

2.3 耐酸试验结果

不同 pH 条件下菌株 F1.11G 的生长情况和存活率结果见图 4 和表 1。当 pH 5.9 时，菌株生长情况较好且存活率最高，随着 pH 的降低，其生长受到抑制，当 pH 值降低为 1.8 时，菌株仍可以生长，存活率为 9%。

2.4 耐胆盐试验结果

菌株 F1.11G 在胆盐浓度 0.10% 时存活率高达 140.0%，在胆盐浓度 0.15% 时，存活率达到 126.6%，在胆盐浓度 0.20% 时，存活率为 96.6% (图 5, 表 2)。

2.5 药敏试验结果

用菌株 F11.1G 对 28 种常见抗菌药物进行药敏试验，如图 6 所示，不同药物产生不同大小的抑菌圈或者无抑菌圈产生。由表 3 可知，菌株 F1.11G 对头孢吡肟、丁胺卡那、庆大霉素、诺氟沙星、红霉素、罗红霉素、多黏菌素 B、

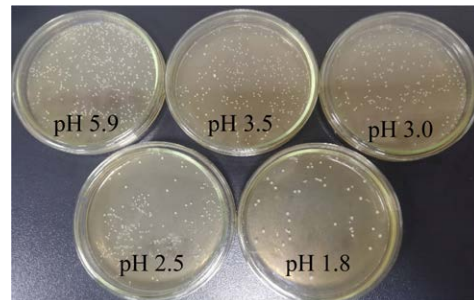


图 4 菌株 F11.1G 在不同 pH 条件下的生长情况
Figure 4 Growth of strain F11.1G under different pH conditions.

表 1 pH 对菌株 F11.1G 存活率的影响

Table 1 The effect of pH value on the survival rate of strain F11.1G

pH	Number of colonies	Survival rate (%)
5.9	609	100.0
3.5	321	52.7
3.0	305	50.0
2.5	268	44.0
1.8	54	9.0

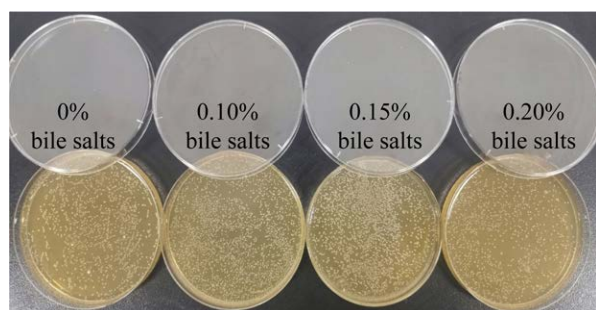


图5 菌株 F11.1G 在不同浓度胆盐的生长情况
Figure 5 Growth of strain F11.1G at different concentrations of bile salts.

林可霉素、链霉素、新霉素、甲硝唑、克林霉素、制霉菌素、甲氧苄啶、阿奇霉素和卡那霉素耐受，对头孢他啶、左氧氟沙星、环丙沙星中度敏感，对青霉素、头孢唑啉、头孢呋辛、

表2 不同浓度胆盐对菌株 F11.1G 存活率的影响
Table 2 The effect of different concentrations of bile salts on the survival rate of strain F11.1G

Concentration of bile salts (%)	Number of colonies	Survival rate (%)
0.00	1 015	100.0
0.10	1 428	140.0
0.15	1 285	126.6
0.20	984	96.9

氯霉素、四环素、多西环素、替考拉宁、克拉霉素和呋喃妥因高度敏感。

2.6 疏水性试验结果

乳酸菌的疏水性是指乳酸菌脱离水相黏附于其他有机相的能力，疏水性越强的乳酸菌越容易黏附于宿主胃肠道的上皮细胞，进而与之相互作用生成生物膜保护层。如图 7 所示，参

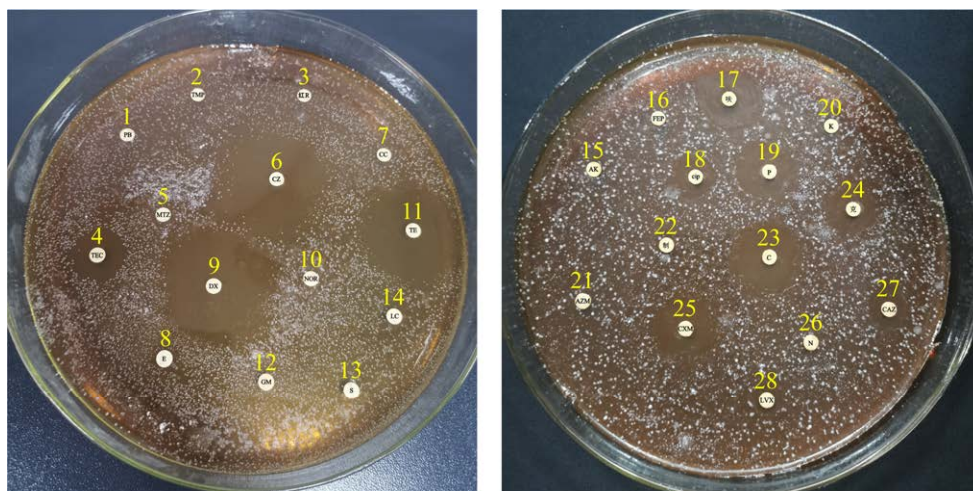


图6 菌株 F11.1G 在不同抗菌药物下的生长情况 1: 多黏菌素 B; 2: 甲氧苄啶; 3: 罗红霉素; 4: 替考拉宁; 5: 甲硝唑; 6: 头孢唑林; 7: 克林霉素; 8: 红霉素; 9: 多西环素; 10: 诺氟沙星; 11: 四环素; 12: 庆大霉素; 13: 链霉素; 14: 林可霉素; 15: 丁胺卡那; 16: 头孢吡肟; 17: 呋喃妥因; 18: 环丙沙星; 19: 青霉素; 20: 卡那霉素; 21: 阿奇霉素; 22: 制霉菌素; 23: 氯霉素; 24: 克拉霉素; 25: 头孢呋辛; 26: 新霉素; 27: 头孢他啶; 28: 左氧氟沙星

Figure 6 Growth of strain F11.1G under different antibiotics. 1: Polymyxin B; 2: Trimethoprim; 3: Roxithromycin; 4: Teicoplanin; 5: Metronidazole; 6: Cefazolin; 7: Clindamycin; 8: Erythromycin; 9: Doxycycline; 10: Norfloxacin; 11: Tetracycline; 12: Gentamicin; 13: Streptomycin; 14: Lincomycin; 15: Amikacin; 16: Cefepime; 17: Furadantin; 18: Ciprofloxacin; 19: Penicillin; 20: Kanamycin; 21: Azithromycin; 22: Nystatin; 23: Chloramphenicol; 24: Clarithromycin; 25: Cefuroxime; 26: Neomycin; 27: Ceftazidime; 28: Levofloxacin.

表 3 菌株 F11.1G 对不同抗菌药物的敏感性试验结果

Table 3 Sensitivity test results of strain F11.1G to different antibiotics

Drug name	Concentration (µg/disc)	Bacterial inhibition diameter (mm)	Result	Drug name	Concentration (µg/disc)	Bacterial inhibition diameter (mm)	Result
Penicillin	10	25	S	Tetracycline	30	38	S
Cefazolin	30	34	S	Doxycycline	30	38	S
Ceftazidime	30	9	I	Streptomycin	10	0	R
Cefuroxime	30	17	S	Neomycin	30	0	R
Cefepime	30	0	R	Ciprofloxacin	5	6	I
Chloramphenicol	30	28	S	Metronidazole	5	0	R
Levofloxacin	5	7	I	Clindamycin	2	0	R
Amikacin	30	0	R	Nystatin	100	0	R
Gentamicin	10	0	R	Teicoplanin	30	21	S
Norfloxacin	10	0	R	Trimethoprim	5	0	R
Erythromycin	15	0	R	Clarithromycin	15	16	S
Roxithromycin	15	0	R	Furadantin	300	28	S
Polymyxin B	30	0	R	Azithromycin	15	0	R
Lincomycin	2	0	R	Kanamycin	30	0	R

R: Resistant; I: Intermediate, S: Sensitive.

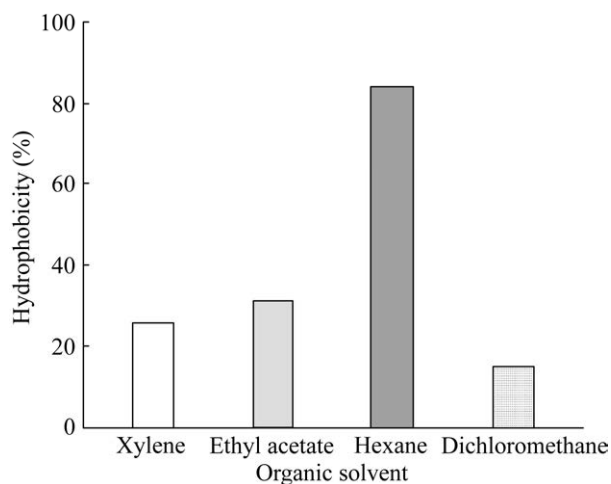


图 7 菌株 F11.1G 对不同有机试剂的疏水率

Figure 7 Hydrophobicity of strain F11.1G towards different organic reagents.

照 Hernández-Alcántara 等^[32]的划分标准, 屎肠球菌 F11.1G 对正己烷的疏水率为 84.29%, 属高度疏水, 并优于对其他溶剂的疏水性; 对二甲苯(25.75%)、乙酸乙酯(31.26%), 属中度疏水;

对二氯甲烷(15.08%), 疏水性较差。

2.7 自凝聚性试验结果

自凝聚性是益生菌之间聚集在一起, 有利于在恶劣环境中形成竞争优势、以抵抗有害菌的一种性质。乳酸菌的自凝集能力与肠上壁细胞的黏附能力呈正相关, 通常具有较高自凝集的菌株有利于其在肠道中定殖^[33]。由图 8 可知, 菌株 F11.1G 在 3、6、9、12、15 和 18 h 的自凝聚率分别为 51%、54%、76%、80%、83% 和 84%, 说明该菌株自凝聚能力表现良好。

2.8 蛋白酶耐受试验结果

由图 9 可知, 相较于对照组, 菌株 F11.1G 的发酵上清液在蛋白酶 K 作用下, 对大肠杆菌和沙门氏菌的抑菌效果明显减弱, 抑菌圈直径为 13.05 mm 和 11.28 mm (表 4), 抑菌率下降幅度为 52%和 58%。在胰蛋白酶、胃蛋白酶的作用下未产生抑菌圈, 抑菌效果几乎完全丧失。

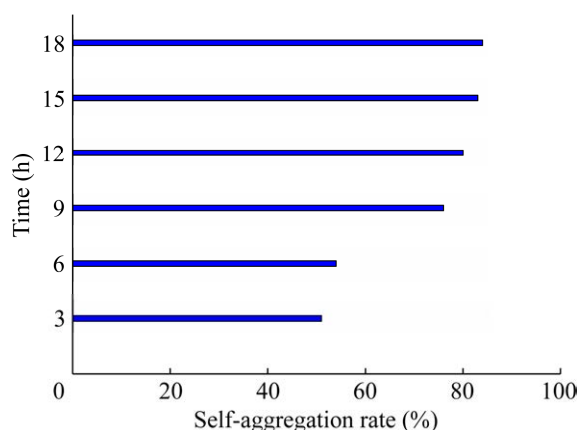


图8 菌株 F11.1G 在不同时间的自凝聚率
Figure 8 Self-agglutination rate of *Enterococcus faecium* F11.1G at different time.

3 讨论与结论

益生菌已被证明在许多生理和病理状况中促进各种生物学效应, 包括过敏、肠道和肝脏

疾病、代谢疾病等^[34]。本研究发现, 屎肠球菌 F11.1G 作为肠道菌群的优势属, 对大肠杆菌、沙门氏菌等常见致病菌有抑制作用, 热稳定性试验显示, 屎肠球菌 F11.1G 的发酵上清液在 110 °C 仍有 40% 左右的抑菌活性, 表明该抑菌物质具有较强的耐高温能力。是否适应低 pH 环境是益生菌能否在消化道中定殖的必要条件^[35-36], 有研究发现, 良性益生菌可耐受 pH 2.0, 也可耐受人胃中存在的高酸水平^[37]。本研究发现屎肠球菌 F11.1G 在低 pH 条件下仍有一定的存活率, 说明其对动物胃液的低 pH 环境有一定的适应能力, 但随着 pH 的不断降低, 屎肠球菌 F11.1G 生长受到不同程度的抑制, 这可能是由于培养基 pH 的不同引起屎肠球菌细胞膜电荷变化, 改变其通透性, 从而影响屎肠球菌对营养物质的吸收和胞内酶的活性, 使其生长受抑



图9 菌株 F11.1G 在蛋白酶作用下对大肠杆菌和沙门氏菌的抑菌效果 1: 发酵上清液; 2: 胃蛋白酶; 3: 蛋白酶 K; 4: 胰蛋白酶

Figure 9 The antibacterial effect of strain F11.1G on *Escherichia coli* and *Salmonella* under protease action. 1: Fermentation supernatant; 2: Pepsin; 3: Proteinase K; 4: Trypsin.

表 4 菌株 F11.1G 经蛋白酶处理后的抑菌圈直径
Table 4 The diameter of the inhibition zone of strain F11.1G after protease treatment (mm)

Protease	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i>
Proteinase K	13.05±0.78	11.28±0.52
Pepsin	0.00	0.00
Trypsin	0.00	0.00

制。Yang 等^[38]研究表明, 适宜乳酸菌生长的最佳 pH 值在 6.0–6.5, 而本试验中, 屎肠球菌 F11.1G 能在 pH 1.8 的极低环境下生长, 这可能与屎肠球菌来源、种类、地域等不同有关。小肠中的胆盐浓度通常在 0.03%–0.30% 波动, 所以益生菌要在肠道中生存与定殖, 不仅需要耐受胃液的低 pH 值, 还需耐受高渗透压的胆盐环境^[39-40]。本研究中, 在培养基胆盐浓度为 0.1% 时, 屎肠球菌 F11.1G 可达 140% 的存活率, 比 Sharma 等^[41]研究中的乳酸菌对胆盐的耐受力高出很多。以往对乳酸菌的研究也表明, 植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 和副干酪乳杆菌 (*Lactobacillus paracasei*) 对胆盐具有较高的耐受性^[42]。Lee 等^[43]从狗的肠道中分离的肠球菌株中也报告了类似结果。由此推断, 屎肠球菌 F11.1G 的高耐胆盐能力使其具备定殖肠道的基本条件并发挥益生作用。在临床或疫病防治中常需抗菌药物和益生菌联合使用, 所以研究菌株对抗菌药的敏感性是指导合理用药的重要依据^[44]。Zavaryani 等^[45]分离筛选出几十种屎肠球菌的菌株药敏试验显示, 大部分菌株对链霉素、丁胺卡那、庆大霉素和卡那霉素等氨基糖甙类抗生素表现出高耐药性, 与本试验的部分研究结果相同。然而屎肠球菌 F11.1G 对青霉素、头孢唑啉、头孢呋辛等 9 种抗生素高度敏感, 表明菌株不能和上述 9 种抗生素共用, 否则会降低屎肠球菌 F11.1G 的益生作用。菌株的黏附能力是益生菌筛选的重要指标, Schillinger 等^[46]认为, 细菌表面蛋白表达水平的差异可能导致

乳酸菌之间细胞表面疏水性的巨大差异, 各种报道还显示了疏水性和黏附能力之间的相关性^[47], 虽然本研究并未直接探究乳酸菌对上皮细胞的黏附能力, 但通过疏水性能和自凝聚性能来间接评估其黏附能力。屎肠球菌 F11.1G 有较强的自凝聚性能力, 并且对正己烷有较高的疏水能力, 表明其有利于胃肠道细胞的黏附。在蛋白酶耐受试验中, 当上清液添加适量蛋白酶 K、胃蛋白酶和胰蛋白酶后, 屎肠球菌 F11.1G 的抑菌活性减弱或消失。由于脂肽基本不受蛋白酶影响, 说明本研究中的抑菌物质不是脂质或糖类, 而是蛋白质或肽类, 推测该抑菌物质是细菌素。Lasik-Kurdyś 等^[48]对从葡萄酒中分离的类细菌素进行蛋白酶试验, 结果与本研究近似。本研究中的屎肠球菌 F11.1G 所产的细菌素, 因其可被消化系统产生的胃蛋白酶和胰蛋白酶分解, 不会对动物自身的肠道菌群造成负担, 从而不会危害动物健康。

益生菌由于优良的特性和临床价值, 目前被用作膳食补充剂和饲料添加剂等领域, 有必要进行多中心和重复研究, 以评估益生菌在改善许多生理甚至病理方面的实际作用。然而, 关于益生菌在细胞和动物模型中作用机制的研究数量甚少。例如, 关于其如何调节体内免疫反应的效应分子基础与生理机制仍然未知。本研究中, 屎肠球菌 F11.1G 的数据仅基于体外试验获得, 关于体内试验部分是未来研究的重点, 也有待于进一步深入和完善。

REFERENCES

- [1] BISHT R, SAXENA P. Antibiotic abuse: post-antibiotic apocalypse, superbugs and superfoods[J]. Current Science, 2019, 116(7): 1055-1056.
- [2] CASTANON JIR. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds[J]. Poultry Science, 2007, 86(11): 2466-2471.
- [3] HILL C, GUARNER F, REID G, GIBSON GR,

- MERENSTEIN DJ, POT B, MORELLI L, CANANI RB, FLINT HJ, SALMINEN S, CALDER PC, SANDERS ME. The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic[J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2014, 11: 506-514.
- [4] DANIEL M, LILLY, STILLWELL RH. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms[J]. *Science*, 1965, 147(3659): 747-748.
- [5] FULLER AFRC. Probiotics in man and animals[J]. *Journal of Applied Bacteriology*, 1989, 66(5): 365-378.
- [6] DELUNGAHAWATTA T, AMIN JY, STANISZ AM, BIENENSTOCK J, FORSYTHE P, KUNZE WA. Antibiotic driven changes in gut motility suggest direct modulation of enteric nervous system[J]. *Frontiers in Neuroscience*, 2017, 11: 588.
- [7] JOHNSON EL, HEAVER SL, WALTERS WA, LEY RE. Microbiome and metabolic disease: revisiting the bacterial phylum *Bacteroidetes*[J]. *Journal of Molecular Medicine*, 2017, 95(1): 1-8.
- [8] DAHIYA DK, RENUKA, PUNIYA M, SHANDILYA UK, DHEWA T, KUMAR N, KUMAR S, PUNIYA AK, SHUKLA P. Gut microbiota modulation and its relationship with obesity using prebiotic fibers and probiotics: a review[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 563.
- [9] SWANSON KS, GIBSON GR, HUTKINS R, REIMER RA, REID G, VERBEKE K, SCOTT KP, HOLSCHER HD, AZAD MB, DELZENNE NM, SANDERS ME. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics[J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2020, 17: 687-701.
- [10] KAYAMA H, OKUMURA R, TAKEDA K. Interaction between the microbiota, epithelia, and immune cells in the intestine[J]. *Annual Review of Immunology*, 2020, 38: 23-48.
- [11] AMOAH K, HUANG QC, TAN BP, ZHANG S, CHI SY, YANG QH, LIU HY, DONG XH. Dietary supplementation of probiotic *Bacillus coagulans* ATCC 7050, improves the growth performance, intestinal morphology, microflora, immune response, and disease confrontation of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 87: 796-808.
- [12] WESTFALL S, LOMIS N, KAHOULI I, DIA SY, SINGH SP, PRAKASH S. Microbiome, probiotics and neurodegenerative diseases: deciphering the gut brain axis[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2017, 74(20): 3769-3787.
- [13] WU T, ZHANG Y, LV Y, LI P, YI D, WANG L, ZHAO D, CHEN HB, GONG J, HOU YQ. Beneficial impact and molecular mechanism of *Bacillus coagulans* on piglets' intestine[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(7): 2084.
- [14] MAZIDI M, REZAIIE P, KENGNE AP, MOBARHAN MG, FERNS GA. Gut microbiome and metabolic syndrome[J]. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 2016, 10(2): S150-S157.
- [15] JENSEN H, GRIMMER S, NATERSTAD K, AXELSSON L. *In vitro* testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2012, 153(1/2): 216-222.
- [16] WIDYASTUTI Y, ROHMATUSSOLIHAT, FEBRISANTOSA A. The role of lactic acid bacteria in milk fermentation[J]. *Food and Nutrition Sciences*, 2014, 5(4): 435-442.
- [17] EMMANUEL DGV, JAFARI A, BEAUCHEMIN KA, LEEDLE JAZ, AMETAJ BN. Feeding a combination of lactate-utilizing and lactate producing bacteria modulates acute phase response in feedlot steers[J]. *Canadian Journal of Animal Science*, 2007, 87(2): 251-257.
- [18] LUO JJ, ZHENG AJ, MENG K, CHANG WH, BAI YG, LI K, CAI HY, LIU GH, YAO B. Proteome changes in the intestinal mucosa of broiler (*Gallus gallus*) activated by probiotic *Enterococcus faecium*[J]. *Journal of Proteomics*, 2013, 91: 226-241.
- [19] KRÄMER J, BRANDIS H. Mode of action of two streptococcus faecium bacteriocins[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1975, 7(2): 117-120.
- [20] CASAUS P, NILSEN T, CINTAS LM, NES IF, HERNÁNDEZ PE, HOLO H. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A[J]. *Microbiology*, 1997, 143(Pt7): 2287-2294.
- [21] LAUKOVÁ A, SZABÓOVÁ R, PLEVA P, BUŇKOVÁ L, CHRASTINOVÁ L. Decarboxylase-positive *Enterococcus faecium* strains isolated from rabbit meat and their sensitivity to enterocins[J]. *Food Science & Nutrition*, 2016, 5(1): 31-37.
- [22] HUANG Y, YE KP, YU KQ, WANG K, ZHOU GH. The potential influence of two *Enterococcus faecium* on the growth of *Listeria monocytogenes*[J]. *Food Control*, 2016, 67: 18-24.

- [23] CHAKCHOUK-MTIBAA A, SMAOUI S, KTARI N, SELLEM I, NAJAH S, KARRAY-REBAI I, MELLOULI L. Biopreservative efficacy of bacteriocin bacfl31 in raw ground turkey meat in terms of microbiological, physicochemical, and sensory qualities[J]. *Biocontrol Science*, 2017, 22(2): 67-77.
- [24] VANDERA E, LIANOU A, KAKOURI A, FENG JB, KOUKKOU AI, SAMELIS J. Enhanced control of *Listeria monocytogenes* by *Enterococcus faecium* KE82, a multiple enterocin-producing strain, in different milk environments[J]. *Journal of Food Protection*, 2017, 80(1): 74-85.
- [25] 尹雪, 郭雪峰, 帕提古丽·毛拉红, 刘俊峰, 张秀萍, 席琳乔, 程龙. 传统发面面肥中乳酸菌的分离与鉴定[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(14): 141-145.
- YIN X, GUO XF, Patiguli Maolahong, LIU JF, ZHANG XP, XI LQ, CHENG L. Isolation and identification of lactic acid bacteria from Chinese traditional sourdough[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(14): 141-145 (in Chinese).
- [26] KVANÇ SA, KVANÇ M, YIĞIT T. Antibiotic susceptibility, antibacterial activity and characterization of *Enterococcus faecium* strains isolated from breast milk[J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2016, 12(3): 1732-1740.
- [27] LIU ZJ, XU C, TIAN R, WANG W, MA JG, GU LY, LIU F, JIANG ZM, HOU JC. Screening beneficial bacteriostatic lactic acid bacteria in the intestine and studies of bacteriostatic substances[J]. *Journal of Zhejiang University Science B*, 2021, 22(7): 533-547.
- [28] ALAMERI F, TARIQUE M, OSAILI T, OBAID R, ABDALLA A, MASAD R, AL-SBIEI A, FERNANDEZ-CABEZUDO M, LIU SQ, AL-RAMADI B, AYYASH M. Lactic acid bacteria isolated from fresh vegetable products: potential probiotic and postbiotic characteristics including immunomodulatory effects[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(2): 389.
- [29] BSAC Working Party on Susceptibility Testing. BSAC standardized disc susceptibility testing method[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2001, 48(suppl_1): 43-57.
- [30] MALLAPPA RH, SINGH DK, ROKANA N, PRADHAN D, BATISH VK, GROVER S. Screening and selection of probiotic *Lactobacillus* strains of Indian gut origin based on assessment of desired probiotic attributes combined with principal component and heatmap analysis[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2019, 105: 272-281.
- [31] POLAK-BERECKA M, WAŚKO A, PADUCH R, SKRZYPEK T, SROKA-BARTNICKA A. The effect of cell surface components on adhesion ability of *Lactobacillus rhamnosus*[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2014, 106(4): 751-762.
- [32] HERNÁNDEZ-ALCÁNTARA AM, WACHER C, LLAMAS MG, LÓPEZ P, PÉREZ-CHABELA ML. Probiotic properties and stress response of thermotolerant lactic acid bacteria isolated from cooked meat products[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2018, 91: 249-257.
- [33] BRÜCKNER S, MÖSCH HU. Choosing the right lifestyle: adhesion and development in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2012, 36(1): 25-58.
- [34] SLATTERY C, COTTER PD, O'TOOLE PW. Analysis of health benefits conferred by *Lactobacillus* species from kefir[J]. *Nutrients*, 2019, 11(6): 1252.
- [35] GROSU-TUDOR SS, ZAMFIR M. Probiotic potential of some lactic acid bacteria isolated from Romanian fermented vegetables[J]. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 2012, 17(1): 234-239.
- [36] FUOCHI V, PETRONIO GP, LISSANDRELLO E, FURNERI PM. Evaluation of resistance to low pH and bile salts of human *Lactobacillus* spp. isolates[J]. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 2015, 28(3): 426-433.
- [37] DAS P, KHOWALA S, BISWAS S. *In vitro* probiotic characterization of *Lactobacillus casei* isolated from marine samples[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2016, 73: 383-390.
- [38] YANG E, FAN L, YAN J, JIANG Y, DOUCETTE C, FILLMORE S, WALKER B. Influence of culture media, pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria[J]. *AMB Express*, 2018, 8: 10.
- [39] HYRONIMUS B, Le MARREC C, HADJ SASSI A, DESCHAMPS A. Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, 61(2/3): 193-197.
- [40] JENA PK, TRIVEDI D, THAKORE K, CHAUDHARY H, GIRI SS, SESHADRI S. Isolation and characterization of probiotic properties of *Lactobacilli* isolated from rat fecal microbiota[J]. *Microbiology and Immunology*, 2013, 57(6): 407-416.
- [41] SHARMA A, LAVANIA M, SINGH R, LAL B. Identification and probiotic potential of lactic acid bacteria from camel milk[J]. *Saudi Journal of*

- Biological Sciences, 2021, 28(3): 1622-1632.
- [42] ZOUMPOPOULOU G, FOLIGNE B, CHRISTODOULOU K, GRANGETTE C, POT B, TSAKALIDOU E. *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 displays probiotic potential *in vitro* and protects against trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis and *Salmonella* infection in murine models[J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 121(1): 18-26.
- [43] LEE H, YOON H, JI Y, KIM H, PARK H, LEE J, SHIN H, HOLZAPFEL W. Functional properties of *Lactobacillus* strains isolated from kimchi[J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 145(1): 155-161.
- [44] MÄTTÖ J, van HOEK AHAM, DOMIG KJ, SAARELA M, FLORÉZ AB, BROCKMANN E, AMTMANN E, MAYO B, AARTS HJM, DANIELSEN M. Susceptibility of human and probiotic *Bifidobacterium* spp. to selected antibiotics as determined by the Etest method[J]. International Dairy Journal, 2007, 17(9): 1123-1131.
- [45] ZAVARYANI SM, MIRNEJAD R, PIRANFAR V, MOGHADDAM MM, SAJJADI N, SAEEDI S. Assessment of susceptibility to five common antibiotics and their resistance pattern in clinical *Enterococcus isolates*[J]. Iranian Journal of Pathology, 2020, 15(2): 96-105.
- [46] SCHILLINGER U, GUIGAS C, HEINRICH HOLZAPFEL W. *In vitro* adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products[J]. International Dairy Journal, 2005, 15(12): 1289-1297.
- [47] EHRMANN MA, KURZAK P, BAUER J, VOGEL RF. Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry[J]. Journal of Applied Microbiology, 2002, 92(5): 966-975.
- [48] LASIK-KURDYŚ M, SIP A. Evaluation of the antimicrobial activity of bacteriocin-like inhibitory substances of enological importance produced by *Oenococcus oeni* isolated from wine[J]. European Food Research and Technology, 2019, 245(2): 375-382.