

研究报告

牦牛源产细菌素屎肠球菌的分离鉴定和益生特性

王朝, 冉旋, 雷江英, 陈德纯*

西南民族大学畜牧兽医学院, 四川 成都 610041

王朝, 冉旋, 雷江英, 陈德纯. 牦牛源产细菌素屎肠球菌的分离鉴定和益生特性[J]. 微生物学通报, 2023, 50(8): 3454-3466.

WANG Zhao, RAN Xuan, LEI Jiangying, CHEN Dechun. Isolation, identification, and probiotic properties of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* from yak[J]. Microbiology China, 2023, 50(8): 3454-3466.

摘要:【背景】抗生素的滥用导致牦牛肠道常见病原菌耐药性增加, 益生菌作为对抗耐药性细菌的新型武器, 应用前景广阔。【目的】获取益生特性优良的牦牛源益生菌。【方法】将 20 份牦牛粪便样本在含 0.5% CaCO₃ 的 MRS 培养基上分离纯化, 以大肠杆菌和金黄色葡萄球菌为指示菌, 用牛津杯法筛选有抑菌活性的菌株; 排除酸和过氧化氢后, 经耐酸耐热试验和蛋白酶敏感试验筛选产细菌素菌株, 用形态学和 16S rRNA 基因序列分析鉴定; 通过对大肠杆菌、沙门氏菌等腹泻病原菌体外抑菌试验、耐模拟胃肠液、测定自聚集能力和疏水性及抗生素敏感试验分析益生特性。【结果】从 20 份牦牛粪便样本中共分离出 11 株产生溶钙圈的菌株, 其中 6 株对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌抑菌效果显著, 经复筛得到 2 株产细菌素的乳酸菌 SC6 和 SC9, 经鉴定均为屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*)。其中 SC9 对腹泻病原菌抑菌效果明显, 有良好的耐受性和肠道黏附能力, 对 5 种常用抗生素均敏感。【结论】屎肠球菌 SC9 有一定的抗逆性和潜在的益生能力, 具备作为益生菌的潜力。

关键词: 牦牛; 细菌素; 屎肠球菌; 分离鉴定; 益生特性

Isolation, identification, and probiotic properties of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* from yak

WANG Zhao, RAN Xuan, LEI Jiangying, CHEN Dechun*

College of Animal and Veterinary Sciences, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, Sichuan, China

Abstract: [Background] The abuse of antibiotics leads to the increase in drug resistance of common pathogenic bacteria in the intestinal tract of yaks. While probiotics have a promising

资助项目: 西南民族大学引进人才科研启动金资助项目(RQD2021074)

This work was supported by the Southwest Minzu University Research Startup Funds (RQD2021074).

*Corresponding author. E-mail: chendechn@swun.edu.cn

Received: 2022-10-21; Accepted: 2023-01-07; Published online: 2023-02-24

application against drug-resistant bacteria. **[Objective]** To obtain yak probiotics with excellent probiotic properties is the purpose. **[Methods]** Twenty yak fecal samples were isolated and purified on MRS medium containing 0.5% CaCO₃, and strains with bacterial inhibitory activity were screened out by the Oxford cup method using *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* as indicator bacteria. After acid and hydrogen peroxide were discharged, the bacteriocin-producing strains were screened out by acid and heat resistance test and protease sensitivity test, and identified by morphology and 16S rRNA sequence analysis. The probiotic properties were analyzed by *in vitro* bacteriostatic test against diarrhea pathogenic such as *E. coli* and *Salmonella* spp., measuring self-aggregation ability and hydrophobicity, tolerance to simulated gastrointestinal juice test, and antibiotic sensitivity test. **[Results]** Eleven strains of calcium soluble circles were isolated from 20 yak fecal samples, six of which had significant inhibitory effects on *E. coli* and *S. aureus*. Two strains of bacteriocin-producing lactic acid bacteria (SC6 and SC9) were obtained by re-screening, both of which were identified as *Enterococcus faecium*. The strain SC9 had obvious bacteriostatic effect on the bacteria of yak diarrhea, with good tolerance and intestinal adhesion ability in the simulated gastric and intestinal fluid, and it was sensitive to five commonly used antibiotics. **[Conclusion]** *E. faecium* SC9 has certain stress resistance and the potential as a probiotic.

Keywords: yak; bacteriocin; *Enterococcus faecium*; isolation and identification; probiotic properties

牦牛是以中国青藏高原为起源地的珍贵牛种, 其对高寒、低氧的高原环境有极强的适应能力, 在丰草期短、枯草期长的自然条件下也能生存, 并为青藏高原地区的人民提供多种生产和生活必需品, 具有较高的经济价值^[1]。在养殖过程中, 人们常使用抗生素来预防和治疗牦牛细菌性疾病, 但不合理的使用甚至滥用会导致牦牛体内病原菌耐药率增加、抗生素残留超标, 破坏微生物群平衡, 导致并发症等^[2-3]。为预防感染和限制抗生素副作用, 使用益生菌替代疗法正是当下研究热点。

益生菌是一类通过帮助宿主重建微生物群平衡从而改善抗生素有害影响的活性微生物, 它能促进肠道对营养物质的吸收并改善肠道健康状况^[4], 对宿主的健康起着十分重要的作用。益生菌在生长过程中会产生一种重要的活性代谢产物——细菌素, 它是某些细菌核糖体合成

的小肽, 具有无毒无害、高效抑菌、不易残留、不产生抗性等点^[5], 而且有利于益生菌发挥益生功能。早期的研究认为细菌素仅对有近缘关系的菌株有杀伤作用(窄谱), 但近年来很多研究证明一种细菌素也可能对其他细菌有抑制杀伤作用(广谱)^[6]。

屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)是一种常见于动物肠道的兼性厌氧型乳酸菌, 肠道黏附能力和抗逆性较强^[7], 能提高畜禽生长性能并改善健康^[8], 降低粪便中病原微生物数量^[9], 近年来常被作为益生菌用于饲料工业^[10]。目前, 有关牦牛源产细菌素屎肠球菌的益生特性鲜有报道。因此, 本研究从采集的牦牛粪便样品中分离筛选产细菌素屎肠球菌, 并通过研究牦牛源腹泻病原菌的体外抑菌试验、耐模拟胃肠液、自聚集和疏水性测定以及抗生素敏感试验等, 以期对牦牛源屎肠球菌的开发利用提供一些数据和理论参考。

1 材料与方 法

1.1 菌株及样品来源

20 份牦牛粪便样本采集自青海海南藏族自治州；牦牛源大肠杆菌、牦牛源金黄色葡萄球菌、牦牛源沙门氏菌、大肠杆菌(ATCC 25922)和金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)由西南民族大学动物医学实验室提供。

12 只 SPF 级昆明小鼠购自成都达硕生物公司，饲养于西南民族大学动物房中。本实验严格按照西南民族大学动物护理和使用委员会使用标准进行(SWUN-MR0056)。

1.2 培养基和主要试剂、仪器

MRS 琼脂培养基、MRS 肉汤培养基、LB 培养基，青岛海博生物科技有限公司；蛋白酶 K、胰蛋白酶、胃蛋白酶，生工生物工程(上海)股份有限公司；氨苄西林、奥格门汀(阿莫西林克拉维酸钾)、环丙沙星、米诺环素、四环素、庆大霉素、氟苯尼考药敏纸片，杭州微生物试剂有限公司；盐酸、氢氧化钠、过氧化氢酶、DNA 提取液、10%十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、氯化钠，索莱宝生物科技有限公司。

离心机，湖南湘雅实验室仪器开发有限公司；振荡培养箱，上海知楚仪器有限公司；PCR 仪，赛默飞世尔科技有限公司；电泳仪，北京六一仪器厂；紫外分光光度计，上海仪电分析仪器有限公司；生物电泳图像分析系统，上海复日科技有限公司。

1.3 菌株的分离纯化

在 9 mL 无菌生理盐水中加入 1 g 牦牛粪便样品，混匀后以 10 倍梯度稀释，吸取 200 μ L 稀释度为 10^6 – 10^8 CFU/mL 的稀释液，在含 0.5% CaCO_3 MRS 平板上均匀涂布，37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 24 h。挑取产生溶钙圈的菌落，在 MRS 培养基上划线分离直至获得纯菌株。经革兰氏染色后

显微镜观察，筛选革兰氏阳性菌株，用甘油于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.4 产细菌素乳酸菌的初筛与复筛

1.4.1 产细菌素乳酸菌的初筛

参考周晏阳^[11]的方法并略作改动，将筛选得到的革兰氏阳性纯菌株接种于 MRS 肉汤培养基中，取 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 的菌液，4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 10 min，取上清液，用 0.22 μm 一次性滤菌器过滤。用 10^6 CFU/mL 的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌作指示菌，将无菌牛津杯置于涂布有指示菌的 LB 培养基上，杯中加 100 μL 上清液，每组 3 个重复，以空白 MRS 肉汤培养基为对照组。4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 8 h，待上清液扩散完全，转移至 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 9–12 h 后测量抑菌圈的直径。

1.4.2 排除酸和过氧化氢试验

参考王娜等^[12]的方法，将菌株培养上清液用盐酸调 pH 值至 6.0，加入过氧化氢酶至无气泡产生，水浴 2 h。以相同 pH 的 MRS 肉汤培养基为对照，以大肠杆菌和金黄色葡萄球菌为指示菌，通过牛津杯法进行抑菌试验。

1.4.3 耐热、耐酸和耐蛋白酶试验

调菌株培养上清液的 pH 值至 5.0，分别在 60 $^{\circ}\text{C}$ 、80 $^{\circ}\text{C}$ 条件下处理 15 min，90 $^{\circ}\text{C}$ 条件下处理 10 min，测定上清液的抑菌能力；用氢氧化钠和盐酸调上清液的 pH 值至 2.0、3.0、4.0、6.0 和 7.0，以无菌 MRS 肉汤培养基为对照组，采用牛津杯法进行抑菌试验。

排除酸和过氧化氢后，选择在高温和酸性条件下仍具有明显抑菌效果的菌株，调其上清 pH 值至胃蛋白酶、胰蛋白酶和蛋白酶 K 的最适 pH 值(分别为 2.0、7.0 和 7.0)，37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下水浴 1 h，再将 pH 值调回到初始 pH 值，对照组为未处理的上清液，检测抑菌活性。

1.4.4 对腹泻病原菌的体外抑菌试验

参照周晏阳等^[13]的方法测定产细菌素菌株

对常见腹泻病原菌的抑菌活性, 指示菌为大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌等 10 株牦牛源致病菌。

1.5 16S rRNA 基因序列分析

用酚氯仿法抽提细菌基因组 DNA, 采用 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGA TCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCT TGTTACGACTT-3')进行序列扩增。PCR 反应体系按照 2×T5 Super PCR Mix 试剂盒说明书操作。PCR 反应条件: 98 °C 5 min; 98 °C 10 s, 54 °C 15 s, 72 °C 2 min, 36 个循环; 4 °C 保存。PCR 扩增产物在 1% 的琼脂糖凝胶中电泳 25 min, 菌种测序由北京擎科生物科技公司完成。

1.6 生长曲线的测定

将菌株接种到 5 mL MRS 肉汤培养基中, 37 °C、220 r/min 恒温培养 24 h 后作为种子液。按 3% 的量接种于 100 mL MRS 肉汤培养基中, 37 °C、220 r/min 培养, 每隔 2 h 取 1 mL 菌液测 OD_{600} , 以 MRS 肉汤培养基为空白对照。共测定至 24 h, 根据所得数据绘制菌株的生长曲线^[11]。

1.7 耐模拟胃液和肠液试验

配制模拟胃液: 100 mL 0.2% 的无菌生理盐水将 0.35 g 胃蛋白酶稀释混匀, 用盐酸调 pH 值为 2.5^[14]。配制模拟肠液: 100 mL 蒸馏水中加入 1.1 g 碳酸氢钠和 0.2 g 氯化钠, 搅拌均匀后再加入 1.8 g 牛胆盐和 0.1 g 胰蛋白酶, 混匀后用氢氧化钠溶液调 pH 值至 8.0。用 0.22 μm 一次性滤菌器将模拟胃液和模拟肠液过滤备用^[15]。参照张蓓^[16]的方法, 将菌株接种于 MRS 液体培养基, 37 °C、220 r/min 摇床培养 24 h。4 °C、8 000 r/min 条件下离心 5 min 收集菌体, 用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液冲洗 3 次。在模拟胃液中, 以 10% 的接种量接入菌落数为 10^8 – 10^9 CFU/mL 的菌液, 采用平板计数法测定 0 h 和 3 h 的活菌数。同样地, 在模拟肠液中以 10% 的接种量接入

10^8 – 10^9 CFU/mL 的菌液, 测定 0 h 和 4 h 的活菌数, 按公式(1)计算菌株的存活率。

$$\text{存活率}(\%) = \frac{C_1}{C_2} \times 100 \quad (1)$$

式中: C_1 为处理后的 MRS 液体培养基所测得的乳酸菌活菌数(CFU/mL); C_2 为对照 MRS 液体培养基所测得的乳酸菌活菌数(CFU/mL)。

1.8 自聚集能力和疏水性测定

参考李清等^[17]和熊世进等^[18]的方法并略作改动。将种子液以 2% 的接种量接入无菌 MRS 液体培养基中, 37 °C、220 r/min 摇床培养 24 h。4 °C、8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 用 pH 7.2 的无菌磷酸盐缓冲液清洗 2 次, 再重新悬浮于磷酸盐缓冲液中, 将菌数调整至 10^7 – 10^8 CFU/mL。在比色皿中加 3 mL 菌液, 用紫外分光光度计测定 OD_{600} , 记做(A_0)。将细菌悬液 37 °C 静置 5 h 后, 取 3 mL 上清液加入另一比色皿中, 测定 OD_{600} , 记做(A_t)。按公式(2)计算自聚能力。重复进行 3 次独立实验, 取平均值。

$$\text{自聚集能力}(\%) = 1 - \frac{A_t}{A_0} \times 100 \quad (2)$$

按上述方法制备细菌悬液, 加入等体积的二甲苯涡旋振荡混匀, 37 °C 静置 1 h 后取水相, 测水相的 OD_{600} , 记做(A)。用公式(3)计算菌株的表面疏水性。独立实验重复 3 次, 取平均值。

$$\text{表面疏水性}(\%) = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100 \quad (3)$$

式中: A_0 表示菌体初始吸光值; A 表示二甲苯处理后下层水相吸光值。

1.9 抗生素敏感性试验

用 10^6 CFU/mL 大肠杆菌 ATCC 25922 和金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 作为质控菌株。在 6 mL MRS 肉汤培养基中, 以 1% 的接种量接入种子液, 37 °C、220 r/min 摇床培养 24 h。调整菌落数至 1.5×10^8 CFU/mL, 用无菌棉签蘸取并

在 MH 琼脂平皿上均匀涂布，倒置，室温干燥 15 min。用无菌镊子夹取药敏纸片，将其贴在 MH 琼脂表面，轻压以使纸片与琼脂贴合牢固。每个琼脂表面贴 4 张抗菌药纸片，设 3 个平行，24 h 后测量抑菌圈直径。

1.10 动物安全性试验

经 7 d 适应性饲喂后，12 只 SPF 级昆明小鼠随机分为两组，每组 6 只。对照组小鼠不做处理，正常饲喂；实验组小鼠每只每日灌胃屎肠球菌菌液 0.2 mL (10^8 CFU/mL)。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌的分离纯化和形态学观察结果

20 份牦牛粪便样品中共分离出 11 株产生溶钙圈的菌株(图 1)，可初步判断为乳酸菌，依次编号为 SC1-SC11。革兰氏染色为阳性，显微镜观察可见菌体为圆形球菌，呈单个、成对或短链状排列(图 2)。

2.2 产细菌素乳酸菌的初筛结果

如图 3 和表 1 所示，菌株 SC1、SC6、SC7、SC9、SC10 和 SC11 的抑菌圈直径均大于 10 mm，对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌能力较强。



图 1 产生溶钙圈的菌株

Figure 1 Strains that produce calcium-soluble circles.

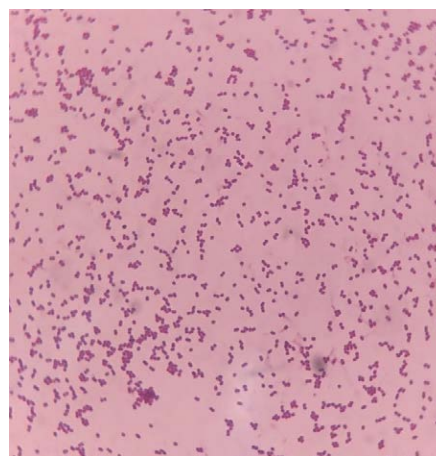


图 2 革兰氏染色结果(10×100)

Figure 2 Gram staining results (10×100).

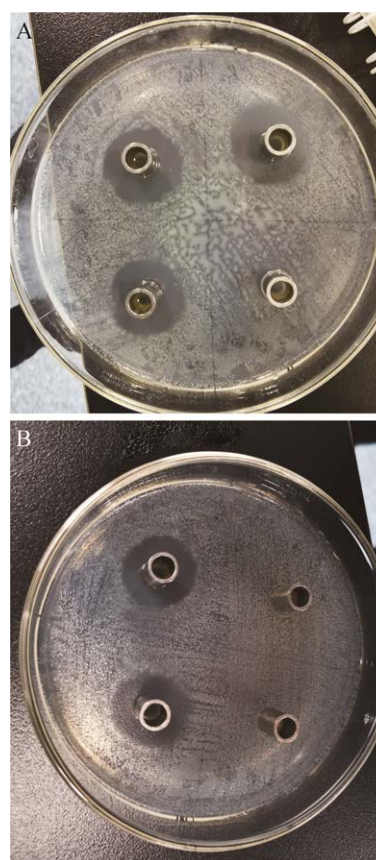


图 3 产细菌素乳酸菌对大肠杆菌(A)和金黄色葡萄球菌(B)抑菌活性的测定

Figure 3 Determination of antibacterial activity of bacteriocin-producing lactic acid against *Escherichia coli* (A) and *Staphylococcus aureus* (B).

表 1 产细菌素乳酸菌的初筛结果

Table 1 Preliminary screening results of bacteriocin producing lactic acid bacteria

Strain No.	Bacillus/ Coccus	Diameter of inhibition circle (mm)	
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SC1	Coccus	11.0	19.8
SC2	Coccus	18.2	-
SC3	Coccus	13.5	-
SC4	Coccus	13.5	-
SC5	Coccus	17.6	-
SC6	Coccus	10.9	15.2
SC7	Coccus	13.0	20.0
SC8	Coccus	-	14.4
SC9	Coccus	18.6	22.0
SC10	Coccus	16.0	20.6
SC11	Coccus	12.3	21.3

牛津杯内径 6.0 mm、外径 8.0 mm, -: 抑菌圈直径<8 mm, 表明菌株无抑菌活性^[12]. 下同

Oxford cup inner diameter 6.0 mm, outer diameter 8.0 mm, -: The diameter of the inhibition circle <8 mm, indicating that the strain does not inhibit bacterial activity^[12]. The same below.

表 2 排除有机酸和过氧化氢试验

Table 2 A testing of excluding the effects of organic acids and hydrogen peroxide

Indicator bacteria	Screening conditions	Diameter of inhibition circle (mm)					
		SC1	SC6	SC7	SC9	SC10	SC11
<i>Escherichia coli</i>	Organic acid	11.0	12.6	10.3	11.1	12.4	12.4
	Hydrogen peroxide						
<i>Staphylococcus aureus</i>	Organic acid	10.7	13.2	12.0	11.0	14.3	13.1
	Hydrogen peroxide						

表 3 菌株发酵上清液对热稳定性试验

Table 3 Thermal stability test of strain fermentation supernatant

Indicator bacteria	Temperature (°C)	Diameter of inhibition circle (mm)					
		SC1	SC6	SC7	SC9	SC10	SC11
<i>Escherichia coli</i>	60	14.0	16.1	13.0	17.3	13.1	14.0
	80	12.2	13.0	10.5	14.7	10.0	13.2
	90	10.9	12.0	-	12.5	-	12.0
<i>Staphylococcus aureus</i>	60	15.2	16.1	13.3	15.0	13.8	15.4
	80	13.1	15.6	10.0	14.1	10.2	14.0
	90	10.8	12.2	-	12.0	-	11.0

2.3 产细菌素乳酸菌的复筛结果

2.3.1 排除酸和过氧化氢试验结果

在排除酸和过氧化氢干扰后, 有 6 株乳酸菌仍表现出较强的抑菌活性(表 2), 说明这些菌株存在其他抑菌物质。

2.3.2 耐热、耐酸和耐蛋白酶试验结果

在耐热试验中, 随着温度升高, 分离菌株抑菌活性均有所下降。90 °C 处理 10 min 后, 菌株 SC7 和 SC10 失去抑菌活性, 但菌株 SC1、SC6、SC9 和 SC11 对指示菌仍有大于 70% 的抑菌效果(表 3), 说明这 4 株菌热稳定性较强。

耐酸试验结果显示, 各菌株在 pH 2.0-6.0 范围内具有较强的抑菌活性, 随 pH 值增大抑菌活性下降。pH 7.0 时, 菌株 SC1 和 SC11 抑菌圈直径<8 mm 时抑菌活性丧失; 而菌株 SC6 和 SC9 抑菌圈直径≥10 mm, 仍具有一定抑菌能力(表 4), 这表明这 2 株菌的抑菌物质在酸性条件下较稳定。

表 4 菌株发酵上清液对酸稳定性试验

Table 4 Acid stability test of strain fermentation supernatant

Indicator bacteria	pH	Diameter of inhibition circle (mm)			
		SC1	SC6	SC9	SC11
<i>Escherichia coli</i>	2.0	27.0	29.2	28.1	31.0
	3.0	18.2	24.3	23.4	27.2
	4.0	17.1	20.0	16.0	17.4
	5.0	14.6	15.5	14.1	13.5
	6.0	9.5	12.5	11.5	12.4
	7.0	—	11.8	11.1	11.0
<i>Staphylococcus aureus</i>	2.0	33.2	39.1	37.2	30.6
	3.0	21.8	30.0	31.2	26.8
	4.0	18.3	26.3	30.1	22.0
	5.0	15.5	23.6	20.6	15.3
	6.0	10.3	13.0	12.0	9.4
	7.0	—	10.0	11.2	—

分别用胰蛋白酶、胃蛋白酶和蛋白酶 K 处理菌株 SC6 和 SC9 的上清液后, 它们的抑菌能力均有所下降, 甚至丧失(表 5)。由于排除了酸和过氧化氢等的干扰, 可以证明, 菌株 SC6 和 SC9 培养上清液的抑菌物质是蛋白类物质^[19]。

2.3.3 对腹泻病原菌的体外抑菌试验结果

通过对腹泻病原菌体外抑菌试验可以看出, 菌株 SC6 和 SC9 的抑菌圈直径均 ≥ 14 mm (表 6), 表明这 2 株菌对 10 株常见犍牛源腹泻病原菌具有较强的抑菌能力。

表 5 菌株培养上清液对酶稳定性试验

Table 5 Protease stability test of strain fermentation supernatant

Indicator bacteria	Conditions	Diameter of inhibition circle (mm)	
		SC6	SC9
<i>Escherichia coli</i>	Trypsin	11.0	13.4
	Pepsin	—	—
	Proteinase K	—	—
<i>Staphylococcus aureus</i>	Trypsin	11.2	12.6
	Pepsin	—	—
	Proteinase K	—	—

表 6 细菌素对指示菌的抑菌能力

Table 6 Bacteriostatic ability of bacteriocin against indicator bacteria

Indicator bacteria	Diameter of inhibition circle (mm)	
	SC6	SC9
<i>E. coli</i> SWUN1435	18	23
Enterotoxigenic <i>E. coli</i> SWUN6794	21	20
Hemolytic <i>E. coli</i> SWUN4580	20	16
Hemolytic <i>E. coli</i> SWUN4566	19	17
Hemolytic <i>E. coli</i> SWUN4569	21	19
<i>Salmonella blegdam</i> SWUN3825	14	16
<i>Salmonella</i> SWUN3733	19	23
<i>Salmonella</i> SWUN3710	31	31
<i>Salmonella</i> SWUN3712	24	22
<i>Staphylococcus aureus</i> SWUN4509	20	21

2.4 16S rRNA 基因序列分析结果

菌株 SC6 和 SC9 的 PCR 扩增产物经过凝胶电泳检测, 结果见图 4, 扩增的条带在 1 000–2 000 bp 之间, 约为 1 500 bp。将 PCR 产物测序并将序列通过 BLAST 比对, 构建系统发育树(图 5)。结果发现菌株 SC6 和 SC9 与屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)亲缘关系最近。结合形态学鉴定, 可确定菌株 SC6 和 SC9 为屎肠球菌。

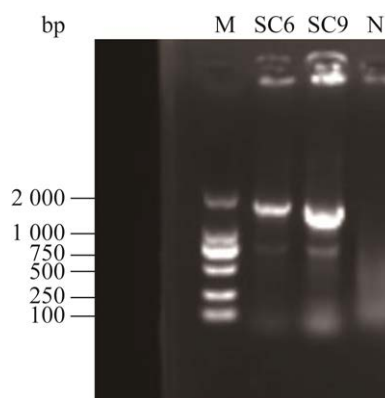


图 4 16S rRNA 基因扩增结果 M: DL2000 DNA Marker; SC6、SC9: 目标菌株; N: 阴性对照

Figure 4 Results of 16S rRNA gene amplification. M: DL2000 DNA Marker; SC6, SC9: Target strains; N: Negative control.

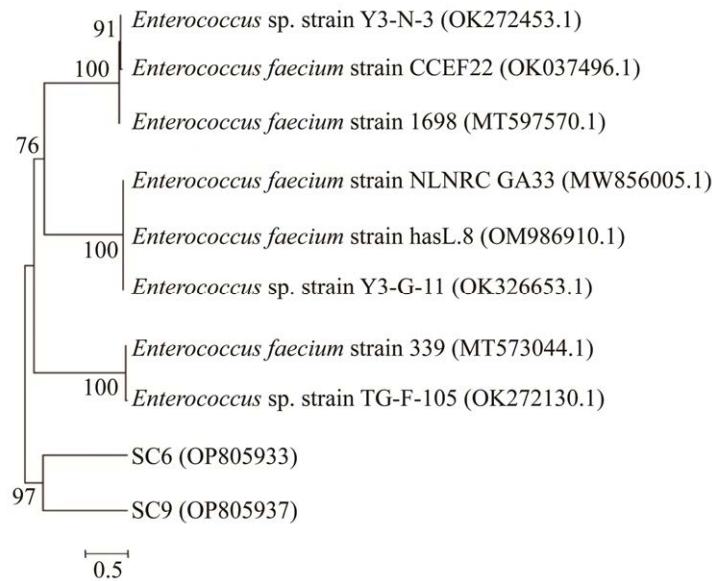


图 5 两株屎肠球菌基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 括号中的序号代表 GenBank 登录号; 分支点上的数字代表该分支的 bootstrap 值; 标尺表示进化距离

Figure 5 Phylogenetic tree of two strains of *Enterococcus faecium* based on 16S rRNA gene sequence. The serial number in brackets represents the GenBank accession number. The number on the branch point indicates the bootstrap value of the branch. The ruler represents evolutionary distances.

2.5 生长曲线的绘制

屎肠球菌 SC6 和 SC9 的生长曲线如图 6 所示, 0-2 h 为迟缓期; 2 h 后生长速度达到最大, 代谢旺盛, 为对数生长期, 最适于研究生物学性状和药物敏感性; 10 h 之后繁殖速度渐趋下降, 增殖数与死亡数大致平衡, 进入稳定期。

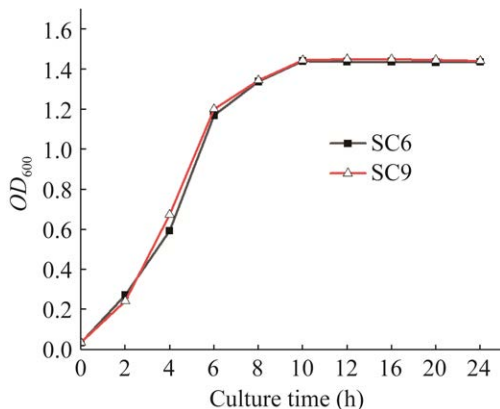


图 6 菌株 SC6 和 SC9 的生长曲线
Figure 6 The growth curves of strains SC6 and SC9.

2.6 耐模拟胃肠液试验结果

菌株 SC6 和 SC9 在模拟胃液 3 h 条件下的存活率分别为 30.20%和 31.29% (图 7), 在模拟肠液 4 h 条件下的存活率分别为 41.00%和 47.06% (图 8)。由此可见, 2 株屎肠球菌都具有良好的耐受胃肠液的能力, 可在胃肠道发挥益生作用。

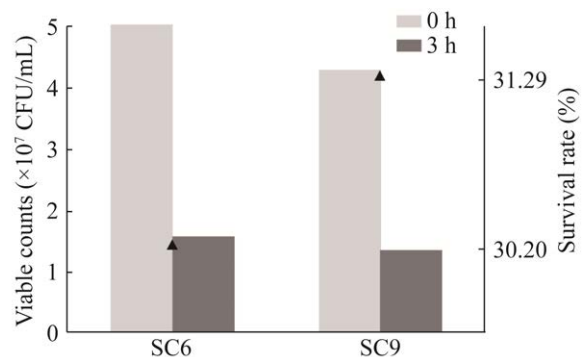


图 7 菌株在模拟胃液 3 h 条件下活菌数和存活率
Figure 7 The viable counts and survival rates of strains after 3 h in the simulated gastric fluid.

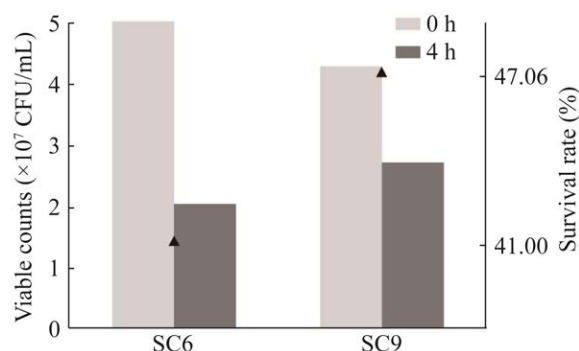


图8 菌株在模拟肠液4 h条件下活菌数和存活率
Figure 8 The viable counts and survival rates of strains after 4 h in the simulated intestinal fluid.

2.7 自聚集能力和疏水性的测定结果

疏水性和自聚集能力作为乳酸菌黏附能力的关键因素,菌株SC6和SC9的自聚集能力分别为66.17%和52.38%,疏水性分别为21.62%和30.29%(表7),表明这2株屎肠球菌均具有一定的黏附能力。

表7 菌株自聚集能力和疏水性测定结果

Table 7 Results of self-aggregation ability and hydrophobicity determination

Strain No.	Absorbance (OD_{600})			Self-aggregation ability (%)	Hydrophobicity (%)
	A_t	A_0	A		
SC6	0.712	2.105	1.650	66.17	21.62
SC9	0.720	1.512	1.650	52.38	30.29

表8 抗生素敏感试验结果

Table 8 Results of antibiotic susceptibility test

Antibiotics	Specifications ($\mu\text{g}/\text{tablet}$)	Diameter of inhibition circle (mm)						
		R	I	S	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	SC6	SC9
Augmentin	10	≤ 16		≥ 17	33(S)	30(S)	33(S)	33(S)
Minocycline	30	≤ 14	15–18	≥ 19	20(S)	41(S)	23(S)	23(S)
Tetracycline	30	≤ 14	15–18	≥ 19	13(R)	23(S)	17(I)	16(I)
Ampicillin	10	≤ 16		≥ 17	30(S)	38(S)	20(S)	25(S)
Florfenicol	30	≤ 12	13–17	≥ 18	23(S)	23(S)	29(S)	23(S)
Ciprofloxacin	5	≤ 15	16–20	≥ 21	19(I)	25(S)	11(R)	18(I)
Gentamicin	10	≤ 12	13–14	≥ 15	13(I)	23(S)	16(S)	15(S)

R: 耐药; I: 中介; S: 敏感

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

2.8 抗生素敏感性试验结果

抗生素敏感性试验结果显示,屎肠球菌SC6和SC9对奥格门汀、米诺环素、氨苄西林、氟苯尼考和庆大霉素敏感(表8),不可搭配使用。

2.9 动物安全性试验结果

对照组和实验组小鼠均未出现腹泻和死亡等症状。剖检检查内脏未见明显病变(图9)。

3 讨论与结论

结合形态学鉴定和16S rRNA基因序列分析可以判定SC6和SC9均为屎肠球菌。根据抑菌活性结果分析,菌株SC1、SC6、SC7、SC9、SC10和SC11具有的较强抑菌能力可能与菌体代谢产生的细菌素等抑菌物质有关。在排除屎肠球菌生长代谢过程中产生的酸和过氧化氢等干扰因素后,菌株上清液依旧具有较强的抑菌活性,这一点与张永红等^[20]和刘英丽等^[21]的研究结果相符。



图9 对照组(A)与实验组小鼠(B)剖检
Figure 9 Autopsy of control (A) and experimental mice (B).

为证实菌株上清液中的抑菌物质为细菌素,需验证其具有蛋白质的性质。经 90 °C 高温处理筛选得到热稳定性强的菌株 SC1、SC6、SC9 和 SC11; 在 pH 2.0–7.0 范围内,菌株上清液的抑菌能力随 pH 值增大均有所下降, pH 7.0 时,菌株 SC1 和 SC7 对金黄色葡萄球菌的抑菌效果丧失,而菌株 SC6 和 SC9 仍能保持一定的抑菌活性。对比王净净等^[22]的研究结果,本研究中 SC6 和 SC9 这 2 株菌产生的抑菌物质在酸性环境下稳定性和抑菌活性更强。用胰蛋白酶、胃蛋白酶和蛋白酶 K 分别处理后,菌株 SC6 和 SC9 发酵上清液的抑菌能力均下降甚至丧失,这一结果与胡逸敏等^[23]的实验结果一致,表明屎肠球菌的培养上清液中抑菌活性物质对蛋白酶敏感,具有蛋白质的性质,可确定为细菌素且可能属于第二类细菌素——小分子的热稳定肽(small heat-stable peptide, SHSP),具有对热稳定、疏水性的特性^[24]。此外,为进一步验证本研究中产细菌素屎肠球菌对牦牛体内腹泻病原菌的抑制效果,通过体外抑菌试验证明了产细菌素屎肠球菌 SC6 和 SC9 对牦牛源大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌的抑菌效果十分显

著,表明其可以有效抑制肠道病原菌的侵袭。

反刍动物体胃肠道内环境复杂,胃肠液和蛋白酶的作用等均可影响屎肠球菌的存活率,到达肠道定殖是其发挥益生作用的关键。王帅静等^[25]筛选的 7 株牛源益生菌,在模拟胃液中的存活率仅有 1 株菌高于本研究中 SC6 和 SC9 菌株的存活率,其余 6 株菌的存活率均低于 SC6 和 SC9; 此外,在模拟肠液中 SC6 和 SC9 2 株菌的存活率均超过 40%,耐受能力较好,能够达到肠道定殖并发挥有益作用。屎肠球菌的抑菌活性与黏附能力决定其益生作用^[26],龚虹等^[27]的研究结果发现,益生菌的黏附能力和自聚集能力、疏水性之间呈正相关。细菌的自聚集一般指的是同种菌株相互凝集形成细胞簇的现象^[28],疏水性是细菌肠道黏附能力的重要影响因素之一,二者对生物膜的形成起着重要作用,有助于益生菌在肠道的定殖并防止致病菌的黏附^[29]。屎肠球菌 SC6 和 SC9 均具有良好的自聚集能力和疏水性,具有较好的益生特性和预防肠道疾病的潜力。

近年来,有关牦牛源肠球菌耐药性的报道越来越多,在周娟等^[30]的研究结果中,33 株来

自青海玉树的牦牛源屎肠球菌中有 19 株对常用的 10 种抗生素表现为耐药, 其中利福平的耐药率最高。徐凤等^[31]对采自四川红原牦牛粪便样品中的肠球菌检测了耐药性, 结果显示多重耐药情况较为严重。本研究对来自青海海南的牦牛源屎肠球菌进行耐药情况检测, 结果 2 株屎肠球菌对奥格门汀、米诺环素、氨苄西林、氟苯尼考和庆大霉素 5 种常用抗生素均敏感, 对四环素表现为中介, 屎肠球菌 SC9 对环丙沙星表现为中介, 而屎肠球菌 SC6 对环丙沙星表现为耐药。为进一步验证屎肠球菌 SC9 的安全性, 用 SC9 灌胃小鼠, 饲养一周后剖检观察, 与对照组小鼠相比未发现明显病变, 安全性好。

综上, 牦牛源产细菌素屎肠球菌 SC9 在高温及酸性环境下稳定, 能够在胃肠液中存活, 具有广谱抑菌、肠道定殖和阻止病原菌黏附的能力, 对奥格门汀、米诺环素、氨苄西林、氟苯尼考和庆大霉素敏感, 安全性高, 具备作为益生菌的潜力, 有潜在的开发利用价值。

REFERENCES

- [1] 欧江涛, 钟金城, 白文林, 赵素君. 中国牦牛的遗传多样性[J]. 黄牛杂志, 2002, 28(4): 42-46.
OU JT, ZHONG JC, BAI WL, ZHAO SJ. Genetic diversity of Chinese yak[J]. Journal of Yellow Cattle Science, 2002, 28(4): 42-46 (in Chinese).
- [2] 陈杖榴, 曾振灵. 兽医药理学[M]. 4 版. 北京: 中国农业出版社, 2017: 296.
CHEN ZL, ZENG ZL. Veterinary Pharmacology[M]. 4th ed. Beijing: China Agriculture Press, 2017: 296 (in Chinese).
- [3] 贡嘎, 王刚, 拉珍, 邢东义, 索朗斯珠. 西藏牦牛大肠杆菌对常用抗菌药物的耐药性分析[J]. 中国兽医杂志, 2014, 50(8): 80-82.
GONG G, WANG G, LA Z, XING DY, SUOLANGSIZHU. Study on antibiotic resistance of Yak *E. coli*[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2014, 50(8): 80-82 (in Chinese).
- [4] 胡玢. 紫薯益生菌酸奶的研制[D]. 邯郸: 河北工程大学硕士学位论文, 2017.
- HU F. The development of the purple potato probiotic yogurt[D]. Handan: Master's Thesis of Hebei University of Engineering, 2017 (in Chinese).
- [5] 滕坤玲, 钟瑾. 益生菌产生的细菌素及其功能机制[J]. 微生物学报, 2022, 62(3): 858-868.
TENG KL, ZHONG J. Functions and mechanisms of bacteriocins produced by probiotics[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(3): 858-868 (in Chinese).
- [6] COTTER PD, HILL C, ROSS RP. Bacteriocins: developing innate immunity for food[J]. Nature Reviews Microbiology, 2005, 3(10): 777-788.
- [7] 葛龙, 李波. 屎肠球菌在饲用微生态制剂中的研究与应用[J]. 饲料与畜牧, 2013(6): 57-59.
GE L, LI B. Research and application of *Enterococcus faecalis* in feeding microecological preparations[J]. Feed and animal husbandry, 2013(6): 57-59 (in Chinese).
- [8] 曹广添, 代兵, 张玲玲, 曾新福, 杨彩梅. 屎肠球菌对大肠杆菌感染肉鸡生长性能、血清生化指标和盲肠菌群结构的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2018, 49(5): 962-970.
CAO GT, DAI B, ZHANG LL, ZENG XF, YANG CM. Effects of *Enterococcus faecium* on the growth performance, serum biochemical parameters and the structure of cecal microflora in the *E. coli*-challenged broilers[J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2018, 49(5): 962-970 (in Chinese).
- [9] 丁爽, 郭春华, 张正帆, 柏雪, 魏婕, 张明, 罗璠. 产乳酸菌素屎肠球菌 B₁₃ 对断奶仔猪生长性能、养分消化率、血清免疫指标及粪便微生物菌群的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2017, 48(10): 1902-1911.
DING S, GUO CH, ZHANG ZF, BAI X, WEI J, ZHANG M, LUO F. Effects of *Enterococcus faecium* B₁₃ yielding bacteriocin on growth performance, nutrient digestibility, serum immune indexes and fecal microbiota of weaned piglets[J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2017, 48(10): 1902-1911 (in Chinese).
- [10] 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).
- [11] 周晏阳. 一株牦牛源产细菌素植物乳杆菌的分离鉴定及其基因组和胞外蛋白组研究[D]. 成都: 西南民

- 族大学硕士学位论文, 2017.
- ZHOU YY. Isolation and identification of a bacteriocin producing *Lactobacillus* from yak and study on its genome and extracellular proteome[D]. Chengdu: Master's Thesis of Southwest Minzu University, 2017 (in Chinese).
- [12] 王娜, 李慧, 戴伶俐, 孙学颖, 靳焯, 赵丽华. 产细菌素乳酸菌的筛选与鉴定[J]. 中国食品学报, 2020, 20(12): 248-255.
- WANG N, LI H, DAI LL, SUN XY, JIN Y, ZHAO LH. Screening and identification of bacteriocin-producing lactic acid bacteria[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(12): 248-255 (in Chinese).
- [13] 周晏阳, 孔雪英, 吴梅, 汤承. 1株牦牛源产细菌素植物乳杆菌的益生特性分析[J]. 食品科学, 2018, 39(14): 132-137.
- ZHOU YY, KONG XY, WU M, TANG C. Probiotic characteristics of a bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* strain from yak[J]. Food Science, 2018, 39(14): 132-137 (in Chinese).
- [14] CHARTERIS C, KELLY K, MORELLI M, COLLINS C. Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract[J]. Journal of Applied Microbiology, 1998, 84(5): 759-768.
- [15] BAO Y, ZHANG YC, ZHANG Y, LIU Y, WANG SQ, DONG XM, WANG YY, ZHANG HP. Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products[J]. Food Control, 2010, 21(5): 695-701.
- [16] 张蓓. 藏族传统曲拉制作过程中乳酸菌群变化及曲拉中益生性乳杆菌的筛选和功能性评价[D]. 郑州: 郑州大学博士学位论文, 2017.
- ZHANG B. Study on variation of lactic acid bacteria during traditional Qula preparation and screening and function evaluation of probiotic *Lactobacillus* from Qula[D]. Zhengzhou: Doctoral Dissertation of Zhengzhou University, 2017 (in Chinese).
- [17] 李清, 刘小莉, 王英, 董明盛, 周剑忠. 植物乳杆菌表面性质及对 Caco-2 细胞的黏附[J]. 食品科学, 2015, 36(9): 97-101.
- LI Q, LIU XL, WANG Y, DONG MS, ZHOU JZ. Surface properties and adhesion to Caco-2 cells of *Lactobacillus plantarum* strains[J]. Food Science, 2015, 36(9): 97-101 (in Chinese).
- [18] 熊世进, 高文功, 杨菲菲, 赵雪婷, 秦小彤, 杜同浩, 熊涛. 六株人源益生菌的表面性质与黏附性能研究[J]. 食品工业科技, 2019, 40(9): 126-132.
- XIONG SJ, GAO WG, YANG FF, ZHAO XT, QIN XT, DU TH, XIONG T. Study on surface properties and adhesion ability of six human origin probiotics[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(9): 126-132 (in Chinese).
- [19] 张明, 罗强, 魏婕, 刘巧, 罗璠. 产细菌素屎肠球菌的筛选鉴定及其抑菌特性[J]. 食品科学, 2021, 42(6): 171-177.
- ZHANG M, LUO Q, WEI J, LIU Q, LUO F. Screening for and identification for bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* and its antibacterial properties[J]. Food Science, 2021, 42(6): 171-177 (in Chinese).
- [20] 张永红, 阮文科, 李焕荣, 杨瑞, 崔德凤. 猪源产细菌素肠球菌的分离鉴定[J]. 动物医学进展, 2013, 34(6): 26-32.
- ZHANG YH, RUAN WK, LI HR, YANG R, CUI DF. Isolation and identification of bacteriocin producing *Enterococcus* from swine[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2013, 34(6): 26-32 (in Chinese).
- [21] 刘英丽, 丁立, 谢良需, 王静, 张慧娟. 产细菌素乳酸菌的筛选与鉴定[J]. 食品工业科技, 2017, 38(17): 146-151, 263.
- LIU YL, DING L, XIE LX, WANG J, ZHANG HJ. Screening and identification of bacteriocin produced by lactic acid bacteria[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(17): 146-151, 263 (in Chinese).
- [22] 王净净, 顾青. 1株分泌细菌素屎肠球菌 ZJ19 的筛选和鉴定[J]. 中国食品学报, 2014, 14(1): 251-257.
- WANG JJ, GU Q. Screening of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* ZJ19[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2014, 14(1): 251-257 (in Chinese).
- [23] 胡逸敏, 林仲仪, 马静, 江晨, 刘胤宏, 周辉. 产细菌素乳酸菌的筛选及鉴定[J]. 食品工业科技, 2013, 34(20): 212-215.
- HU YM, LIN ZY, MA J, JIANG C, LIU YH, ZHOU H. Identification and screening of bacteriocin-producing lactic acid bacteria[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(20): 212-215 (in Chinese).
- [24] 李萍, 龙春昊, 赵轩, 赵星宇, 张晓雯, 吕欣, 伊扬磊. II类细菌素的生物合成及其在食品领域的应用[J]. 中国食品学报, 2021, 21(10): 269-286.
- LI P, LONG CH, ZHAO X, ZHAO XY, ZHANG XW, LÜ X, YI YL. Biosynthesis of class bacteriocin and its application in food preservation[J]. Journal of Chinese

- Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(10): 269-286 (in Chinese).
- [25] 王帅静, 李啸, 刘玲彦, 谈亚丽, 肖泽涛, 王庆宇, 裴宇鹏, 冯雪娜. 西藏牦牛粪和乳源中益生菌的筛选与鉴定[J]. 中国酿造, 2021, 40(7): 43-48.
WANG SJ, LI X, LIU LY, TAN YL, XIAO ZT, WANG QY, PEI YP, FENG XN. Screening and identification of probiotics from yak dung and milk in Tibet[J]. China Brewing, 2021, 40(7): 43-48 (in Chinese).
- [26] 白天天, 郭雪峰. 屎肠球菌的特性及其在畜牧生产中的应用研究进展[J]. 中国畜牧杂志, 2021, 57(2): 16-20.
BAI TT, GUO XF. Characteristics of *Enterococcus faecium* and its application in livestock production[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2021, 57(2): 16-20 (in Chinese).
- [27] 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、疏水性和自凝集特性的研究[J]. 中国微生物生态学杂志, 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).
- [28] 张文晓, 白筱翠, 王楠, 田晗, 金慧, 王娟, 张家鑫, 肖纯凌. 呼吸道潜在益生菌 D-19 表面疏水性及自动聚集能力的研究[J]. 中国微生物生态学杂志, 2022, 34(3): 278-283, 288.
ZHANG WX, BAI XC, WANG N, TIAN H, JIN H, WANG J, ZHANG JX, XIAO CL. Surface hydrophobicity and automatic aggregation of potential respiratory probiotics D-19[J]. Chinese Journal of Microecology, 2022, 34(3): 278-283, 288 (in Chinese).
- [29] AARTI C, KHUSRO A, VARGHESE R, ARASU MV, AGASTIAN P, AL-DHABI NA, ILAVENIL S, CHOI KC. *In vitro* studies on probiotic and antioxidant properties of *Lactobacillus brevis* strain LAP2 isolated from Hentak, a fermented fish product of North-East India[J]. LWT, 2017, 86: 438-446.
- [30] 周娟, 金东, 卢珊, 濮吉, 白向宁, 杨晶, 胡守奎, 徐建国. 青藏高原牦牛携带屎肠球菌及其毒力基因和耐药性检测[J]. 中国人兽共患病学报, 2015, 31(4): 298-302.
ZHOU J, JIN D, LU S, PU J, BAI XN, YANG J, HU SK, XU JG. Virulence genes and antibiotic resistance of *Enterococcus faecium* isolated from yaks in Qinghai-Tibet Plateau, China[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2015, 31(4): 298-302 (in Chinese).
- [31] 徐凤, 张焕容, 梁华, 诸明欣, 汤承. 牦牛源肠球菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(4): 1203-1210.
XU F, ZHANG HR, LIANG H, ZHU MX, TANG C. Isolation, identification and antibiotics resistance analysis of *Enterococcus* from yak[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2017, 44(4): 1203-1210 (in Chinese).