

新疆冷水鱼肠道肉杆菌遗传差异及抑菌特性分析

魏小晶¹, 赵志霞¹, 罗宝龙¹, 张瑞蕊², 张艳¹, 倪永清^{1,*}, 周红^{1,*}

(1.石河子大学食品学院, 新疆 石河子 832003; 2.石河子大学生命科学学院, 新疆 石河子 832003)

摘要: 从7种新疆冷水鱼肠道中分离筛选低温益生乳酸菌, 根据16S rRNA基因序列结合多重聚合酶链式反应指纹分型技术对菌株遗传结构差异进行分析, 结果显示其中15株隶属于肉杆菌属 (*Carnobacterium*), 包括两个已知 *C. divergens* (10株) 和 *C. maltaromaticum* (4株) 及未鉴定的菌株 *Carnobacterium* spp. 编号 (1株)。采用牛津杯法初筛显示8个菌株代谢物对3种致病菌均有不同程度的抑制作用, 对单核细胞性李斯特菌的抑菌效果最明显。8个菌株发酵上清液经排除有机酸、过氧化氢及蛋白酶实验处理, 发现除菌株BS-JYC-3经胰蛋白酶处理抑菌活性未丧失外, 其余菌株经酶解实验抑菌能力完全丧失, 表明发酵上清液中抑菌物质可能为类细菌素。药敏实验显示所有菌株对氨苄西林、米诺环素和氯霉素表现敏感, 对庆大霉素、四环素、利福平及替考拉宁表现中度敏感。

关键词: 冷水鱼肠道; 肉杆菌; 指纹图谱; 抑菌活性; 抗生素敏感性

Genetic Difference and Antibacterial Characteristics of *Carnobacterium* Isolated from Intestine of Cold-Water Fishes in Xinjiang

WEI Xiaojing¹, ZHAO Zhixia¹, LUO Baolong¹, ZHANG Ruirui², ZHANG Yan¹, NI Yongqing^{1,*}, ZHOU Hong^{1,*}

(1. Food College, Shihezi University, Shihezi 832003, China;

2. College of Life Sciences, Shihezi University, Shihezi 832003, China)

Abstract: Psychrotolerant probiotic lactic acid bacteria were isolated from the guts of 7 cold-water fish species in Xinjiang and were analyzed for genetic structure differences according to the sequences of their 16S rRNA gene by rep-PCR fingerprint typing technology. The results showed that 15 strains of *Carnobacterium* were obtained, including 4 strains of *C. maltaromaticum*, 10 strains of *C. divergens* and 1 unidentified strain of *Carnobacterium* spp.. By the Oxford cup method, it was found that the metabolites of 8 of these strains had different inhibitory effects on three pathogens, and the strongest antibacterial effect was observed against *Listeria monocytogenes*. The fermentation supernatants of the 8 strains were subjected to exclusion of organic acids and hydrogen peroxide or protease treatment. After protease treatment, all the supernatants except BS-JYC-3 completely lost their antibacterial activity, indicating that the bacteriostatic substance in the fermentation supernatants may be a bacteriocin. Drug susceptibility tests showed that all of the 8 strains were very sensitive to ampicillin, minocycline and chloramphenicol, and moderately sensitive to gentamicin, tetracycline, rifampicin and teicoplanin.

Keywords: cold-water fish intestine; *Carnobacterium*; fingerprint; inhibitory activity; antibiotics resistance

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181030-360

中图分类号: Q938

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2019) 22-0068-07

引文格式:

魏小晶, 赵志霞, 罗宝龙, 等. 新疆冷水鱼肠道肉杆菌遗传差异及抑菌特性分析[J]. 食品科学, 2019, 40(22): 68-74.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181030-360. <http://www.spkx.net.cn>

WEI Xiaojing, ZHAO Zhixia, LUO Baolong, et al. Genetic difference and antibacterial characteristics of *Carnobacterium* isolated from intestine of cold-water fishes in Xinjiang[J]. Food Science, 2019, 40(22): 68-74. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181030-360. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2018-10-30

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目 (31360001)

第一作者简介: 魏小晶 (1992—) (ORCID: 0000-0003-4610-8677), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品生物技术。

E-mail: 1571292529@qq.com

*通信作者简介: 倪永清 (1969—) (ORCID: 0000-0003-4876-589X), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品微生物。

E-mail: niyqlzu@sina.com

周红 (1969—) (ORCID: 0000-0002-5570-6671), 女, 高级实验师, 本科, 研究方向为食品微生物。

E-mail: zhh_food@shzu.cn.com

动物肠道是一个开放的生态系统,其中栖息着大量的微生物^[1]。肠道微生物作为宿主消化系统的重要组成部分,在促进宿主的食物消化、维持微生态平衡及调节免疫等方面起着不可替代的作用^[2-3]。研究发现,肠道微生物与宿主之间形成了复杂而又相对稳定的动态关系,确保宿主的健康和肠道微生物的平衡。此外,不同物种间或者同一物种不同群体之间,甚至是同一群体不同个体之间的肠道微生物结构都有差异^[4-5]。Cummings等^[6]发现单胃动物的肠道微生物与其生理代谢功能紧密相关。鱼类作为一种独特的脊椎单胃动物,属于变温动物,体温随水温的变化而变化,其微生态系统的构成主要取决于食性和生存的水体环境^[7],也使得鱼类肠道微生物明显不同于陆生脊椎动物。

近年来,有关鱼类消化道微生物的研究开始备受关注^[8],大部分集中于鱼类食性、生存环境和肠道微生物的相关性研究。相对于人类和陆生高等脊椎动物,由于鱼类属于变温动物,其生存的大部分水体环境温度较低,为筛选到耐低温的益生乳酸菌提供了良好的来源,尤其是产细菌素的耐低温乳酸菌在食品的生物保鲜技术方面具有广阔的市场前景。研究发现,部分乳酸菌除能代谢产生有机酸及过氧化氢等物质外,还能产生细菌素类活性物质^[9],能有效地抑制食品中病原菌及腐败菌的生长繁殖^[10-11],这些具有抑菌特性的低温乳酸菌在饲料行业及食品冷藏保鲜中极具应用潜力^[12]。有研究报道,鱼类肠道不仅能分离得到*Lactobacillus*和*Enterococcus*,同时还分离出多种*Canobacterium*菌株^[13]。Sugita等^[14]从鱼肠道分离出*Aeromonas caviae*、*A. hydrophila*、*Pseudomonas* spp.及*Clostridium* spp.等细菌对部分气单胞菌属及人源病原菌显示不同程度的抗菌效果。目前,国内外从水产品中分离筛选具有抑菌效果肉杆菌的研究也有报道,Ring等^[15]从大西洋鲑鱼、嘉鱼等4种鱼肠道中筛选到7株鳟鱼肉杆菌(*C. piscicola*)和3株广布肉杆菌(*C. divergens*),分析了它们对水产品致病菌的抗菌特性,研究表明这些肉杆菌能够产生有效拮抗水产品中腐败菌和致病菌的抗菌肽。然而,肉杆菌在带给人们益处的同时也出现了一些亟待解决的问题,如有些肉杆菌产生了抗生素耐药性或自身存在天然耐药性,肉杆菌耐药性与食品安全性相关问题逐步引起了人们的关注,益生肉杆菌的安全性评估已十分必要。

新疆额尔齐斯河是我国唯一注入北冰洋水系的外流河,常年水温在20℃以下,其中多产冷水鱼类,为研究冷水鱼肠道低温肉杆菌提供了可靠来源。本实验从新疆冷水鱼肠道中分离筛选低温肉杆菌,对其遗传结构差异进行分析,筛选明显具有抑菌活性的肉杆菌,对该菌株发酵上清液中组分进行分析和该菌株对部分药物的敏感性进行实验,以期低温肉杆菌作为益生素在鱼类饲料添加剂方面的应用提供科学依据,为食品的低温贮藏保鲜及肉杆菌的安全性评估提供一定的参考依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

采自新疆额尔齐斯河流域的冷水鱼包括河鲈(*Perca fluviatilis*)、红尾鱼(*Rasbora borapetensis*)、银鲫(*Carassius auratus gibelio*)、鳊鱼(*Siniperca chuatsi*)、黑斑狗鱼(*Esox reicherti*)、叉尾斗鱼(*Macropodus opercularis*)及高体雅罗鱼(*Leuciscus baicalensis*)。每种鱼按年龄、体质量标记后置于4℃冰箱保藏,12 h内运回实验室。

聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增引物 上海捷瑞生物有限公司; Marker 天根生化科技(北京)有限公司; PCR Master Mix、ddH₂O 生工生物工程(上海)股份有限公司; 0.22 μm微孔滤膜 上海兴亚净化材料厂; 培养基(Elliker、MRS、LB)、抗生素 北京博奥拓达科技有限公司。

单核细胞性李斯特菌(*Listeria monocytogenes* CGMCC 1.9136)、大肠杆菌(*Escherichia coli* EPEC O127:K63 CICC 10411)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* CICC 21600) 中国工业微生物菌种保藏管理中心。

1.2 仪器与设备

5810R高速冷冻离心机 德国Eppendorf公司; TC-512 PCR仪 德国Biometra公司; PowerPac Universal水平电泳仪、Gel DOC XR凝胶成像系统 美国Bio-Rad公司; UVmini-1240紫外分光光度计 日本岛津公司。

1.3 方法

1.3.1 菌株分离纯化

将处理好的冷水鱼肠道样品依次按10倍梯度稀释,分别选取10⁻²、10⁻³、10⁻⁴和10⁻⁵梯度的菌悬液均匀涂布于MRS和Elliker培养基上,每个稀释度涂布3个平板,分别置于无氧和有氧的条件下,16℃培养3~5 d。发现菌悬液稀释度为10⁻³时平板上菌落均匀明显,且菌落数在30~300 CFU/皿之间。挑取平板表面单一菌落进行划线分离,传代划线培养3~4次直至纯化,对每个菌株进行镜检,革兰氏染色以及接触酶实验,从而达到对疑似乳酸菌的初步分离筛选,-20℃保存备用。

1.3.2 菌株生理生化鉴定

按照Dong Xiuzhu等^[16]方法进行糖发酵实验,实验重复3次并做空白对照。

1.3.3 最适生长温度的测定

将筛选得到的菌株活化后按2%的接种量接种于MRS液体培养基中,分别设4、15、18、24、30、37℃6个温度梯度,培养箱中培养24 h,采用紫外分光光度计于420 nm波长处测定OD值。

表2 肉杆菌糖发酵代谢谱

Table 2 Sugar metabolism spectra of 15 *Carnobacterium* strains

菌株编号	革兰氏染色	接触酶反应	生长温度范围/℃	碳源代谢谱									
				蔗糖	葡萄糖	甘露糖	半乳糖	鼠李糖	棉子糖	阿拉伯糖	山梨糖	甘露糖醇	山梨糖醇
M17-GYM-2	+	-	4~30*~37	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-
M17-GYM-3	+	-	4~18*~37	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-
EB2.4	+	-	4~24*~37	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-
BS-JYC-3	+	-	4~24*~37	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
E-HLM-6	+	-	4~24*~30	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
E-BYC-2	+	-	4~24*~37	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-
E-BYC-1	+	-	4~24*~37	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-
E-BYC-4	+	-	4~24*~37	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-
M17-HWYC-3	+	-	4~24*~37	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+
E-HBGC-4	+	-	4~24*~37	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+
M17-HWYC-4	+	-	4~24*~37	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+
E-BYC-3	+	-	4~18*~37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E-GYM-2	+	-	4~24*~37	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
M-TZM-3	+	-	4~30*~37	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
E-HWYC-4	+	-	4~24*~30	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-

注: *.最适生长温度; +.阳性, -.阴性。

2.3 基于rep-PCR指纹图谱分析

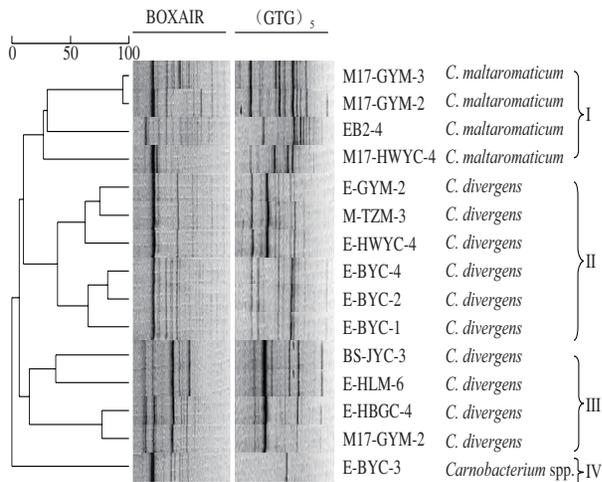


图1 基于rep-PCR扩增的15株肉杆菌的聚类图

Fig. 1 Dendrogram of 15 *Carnobacterium* strains according to their genetic profile obtained by rep-PCR

对15株肉杆菌进行rep-PCR指纹图谱分析,采用Gel Compar II软件将两种不同引物对应的指纹图谱进行聚类,由BOX-PCR和(GTG)₅-PCR指纹聚类图(图1)可以清晰看出,15株肉杆菌的指纹图谱带型较丰富,能够反映菌株在种水平上的遗传差异。其中BOX-PCR指纹图谱的条带主要集中在400~5 000 bp范围内,包括3~10个明显的亮带,大多数产物的条带数多于5条,并有一些弱带;(GTG)₅-PCR指纹图谱在350~5 000 bp范围内并有1~12个相对明显的条带。比较由2种不同引物产生的指纹图谱可知,大多数PCR产物条带在350~5 000 bp之间。

由图1可知,在45%的相似性水平上,所有的菌株被聚类成4簇,Cluster I由4株*C. maltaromaticum*组成,其

中菌株M17-GYM-3、M17-GYM-2和EB2-4的带型相似,而菌株M17-HWYC-4的带型与它们相差较大,尤其是(GTG)₅-PCR扩增的指纹图谱条带更为明显。Cluster II和Cluster III都由*C. divergens*组成,在60%的相似性水平上均可被进一步划分为2个小组,且每一小组指纹图谱带型相近。Cluster IV仅由1株肉杆菌属*Carnobacterium* spp.组成,菌株E-BYC-3与其他菌株的带型相差最大,独自成一组。带型统计显示,4株*C. maltaromaticum*有2种带型,10株*C. divergens*有4种带型,*Carnobacterium* spp.仅有1种带型。本实验中15株肉杆菌遗传多样性丰富,这些肉杆菌种间具有明显的差异,种内带型多样,存在极高的遗传多态性。

2.4 抑菌活性菌株的筛选

采用牛津杯法对15株肉杆菌进行抑菌活性的初筛,其中8株肉杆菌对大肠杆菌、单核细胞性李斯特菌和金黄色葡萄球菌均有较好的抑制作用(表3)。

表3 具有抑菌活性肉杆菌的初筛结果

Table 3 Primary screening of *Carnobacterium* for antibacterial activity

菌株编号	宿主	指示菌		
		大肠杆菌	单核细胞性李斯特菌	金黄色葡萄球菌
E-BYC-1	高体雅罗鱼	++	+++	++
E-BYC-2	高体雅罗鱼	+	++	++
E-HLM-6	河鲈	++	++	+++
M17-GYM-3	鳊鱼	++	+++	+
M17-HWYC-4	红尾鱼	+++	+++	++
M-TZM-3	叉尾斗鱼	++	++	++
BS-JYC-3	银鲫	++	++	+
E-HBGC-4	黑斑狗鱼	++	+++	++

注: -.阴性(8 mm); +.阳性(8~11 mm); ++. 11~14 mm; +++ .大于14 mm。

2.5 肉杆菌无细胞发酵上清液的抑菌物质分析

表4 肉杆菌菌株的无细胞发酵上清液不同处理后对单核细胞性李斯特菌抑菌活性的影响

Table 4 Effect of exclusion of organic acids and hydrogen peroxide on the antibacterial activity of cell-free fermentation supernatants of *Carnobacterium* strains against *L. monocytogenes*

菌株名称	宿主来源	初始pH	抑菌圈直径/mm		
			未经任何处理	pH 6.5	pH 6.5并排除过氧化氢
M17-GYM-3	鳊鱼	3.90	19.05	13	12
M17-HWYC-4	红尾鱼	4.47	20	18	17.2
M-TZM-3	叉尾斗鱼	4.82	16.10	15	14
E-BYC-2	高体雅罗鱼	3.93	18.00	17	15.8
E-BYC-1	高体雅罗鱼	3.95	17.00	15.2	14.1
BS-JYC-3	银鲫	3.88	17.15	16	14
E-HBGC-4	黑斑狗鱼	4.13	21.00	19	18
E-HLM-6	河鲈	4.42	15.90	14.5	13

乳酸菌在发酵过程中会产生大量的有机酸、过氧化氢、抗菌肽和细菌素等抑菌物质,为明确肉杆菌发酵上清液中的抑菌物质组成,以单核细胞性李斯特菌为指

示菌, 初筛得到8株肉杆菌对其均有较好的抑制作用。经酸排除后, 如表4所示, 菌株M17-GYM-3的抑菌能力明显下降, 而其余菌株的发酵上清液均具有明显的抑菌能力, 表明有机酸可能对菌株M17-GYM-3抑菌能力的影响较大; 肉杆菌发酵上清液经排除酸和过氧化氢后, 仍具有明显的抑菌能力, 表明过氧化氢对菌株发酵上清液中抑菌活性的影响较小, 其中菌株M17-HWYC-4和E-HBGC-4对单核细胞性李斯特菌的抑菌效果最为明显。

对8株肉杆菌发酵上清液进行蛋白酶K、胰蛋白酶和胃蛋白酶处理。如表5所示, 除菌株BS-JYC-3经胰蛋白酶处理抑菌活性未丧失外, 其余菌株通过3种酶的酶解实验后抑菌能力完全丧失, 即肉杆菌发酵上清液中的抑菌物质对蛋白酶敏感, 具有蛋白质的性质^[23], 抑菌物质组分中可能存在类细菌素。

表5 3种蛋白酶处理肉杆菌菌株发酵上清液后对单核细胞性李斯特菌抑菌活性的影响

Table 5 Effect of digestion with three proteases on the antibacterial activity of cell-free fermentation supernatants of *Carnobacterium* strains against *L. monocytogenes*

酶处理	抑菌圈直径/mm							
	M17-GYM-3	M17-HWYC-4	M-TZM-3	E-BYC-2	E-BYC-1	BS-JYC-3	E-HBGC-4	E-HLM-6
蛋白酶K	8.00	8.50	8.00	8.00	8.20	8.00	8.30	8.00
胰蛋白酶	8.00	8.00	8.00	8.30	8.40	16.70	8.90	8.00
胃蛋白酶	8.30	8.60	8.00	8.20	8.00	8.00	9.00	8.00
对照	19.05	20.00	16.10	18.00	17.00	17.15	21.00	15.90

注: 牛津杯内径为6.0 mm, 外径为8.0 mm。

2.6 抑菌活性肉杆菌菌株系统发育分析

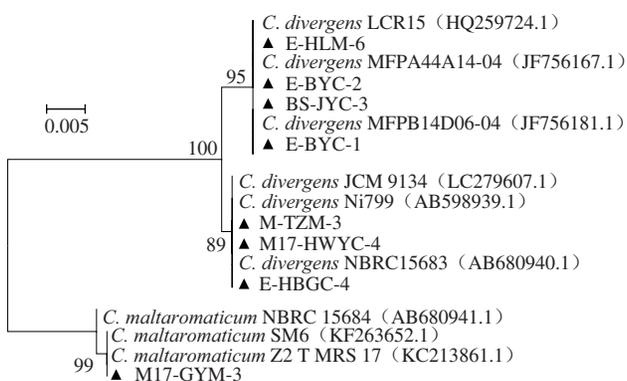


图2 基于16S rRNA序列肉杆菌的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *Carnobacterium* based on 16S rRNA gene sequence

将8株具有抑菌活性肉杆菌的16S rRNA部分基因序列与GenBank数据库中已知的16S rRNA基因序列进行同源性比对, 选取序列相似性高的菌株构建系统发育树见图2, 该8株乳酸菌菌株均属于肉杆菌属。其中菌株E-HLM-6、E-BYC-2、BS-JYC-3和E-BYC-1与*C. divergens*的序列相似性达99%, M-TZM-3、M17-HWYC-3、E-HBGC-4在同一分枝, 与*C. divergens*亲

缘关系较近, 菌株M17-GYM-3与已知种*C. maltaromaticum*的序列相似性达99%以上。

2.7 抗生素耐药性分析

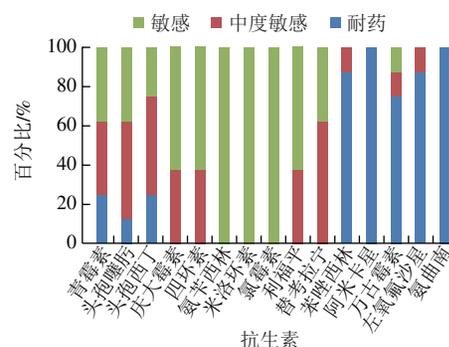


图3 8株具有抑菌活性肉杆菌的抗生素耐药性分析

Fig. 3 Antibiotic resistance analysis of 8 *Carnobacterium* strains with bacteriostatic activity

如图3所示, 8个菌株对氨苄西林、米诺环素和氯霉素表现敏感, 对庆大霉素、四环素、利福平、替考拉宁表现中度敏感, 而所有的菌株对阿米卡星、氨基糖苷、苯唑西林、万古霉素和左氧氟沙星等几种抗生素表现耐药。

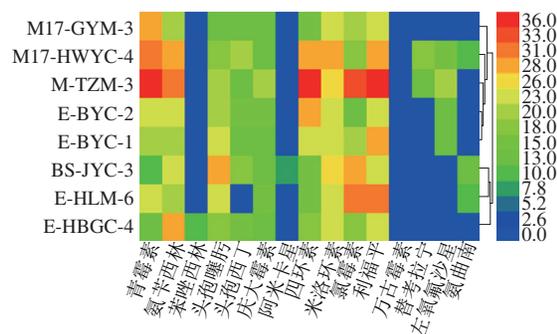


图4 基于抑菌圈直径对8株具有抑菌特性肉杆菌的抗生素抗性的热图分析

Fig. 4 Heat map analysis of antibiotic resistance of 8 strains of bacteriostatic *Carnobacterium* based on the diameter of inhibition zone

图4可以直观反映8株肉杆菌产生的抗生素抑菌圈直径大小, 宏观反映乳酸菌的抗生素耐药情况。颜色从蓝色向绿色、黄色和红色的渐变过程代表了抗生素抑菌圈直径从小到大的递增过程。从热图整体分析, 蓝色区域主要集中在苯唑西林、阿米卡星、万古霉素、替考拉宁、左氧氟沙星和氨基糖苷6种抗生素中, 表明这些抗生素对几乎所有的菌株无抑菌圈产生, 即表现耐药; 而图中多数颜色主要集中在绿色到红色的渐变过程中, 表明大部分菌株的抑菌圈直径呈依次增大的趋势, 即抗生素耐药情况呈中度敏感或敏感。从热图横向分析, 其中菌株M-TZM-3中红色区域出现最多, 表明有多种抗生素产生的抑菌圈直径最大; 菌株E-BYC-2和E-BYC-1的颜色区域分布相似, 即它们的耐药表型相近。从纵向分析,

同种类型的抗生素耐药性也可能不同,如青霉素类中苯唑西林所占的蓝色区域远多于青霉素和氨苄西林,即苯唑西林耐药性远大于青霉素和氨苄西林。

3 讨论

研究发现大部分乳酸菌代谢产生有机酸、过氧化氢及细菌素等抑菌物质,能有效抑制食品中腐败菌及致病菌的生长,在开发低温微生物源生物保鲜剂方面极具应用潜力^[24]。分子生物学方法被越来越多地应用于乳酸菌的分离与鉴定,本实验结合乳酸菌的传统分离鉴定方法,最终确定有15株乳酸菌为肉杆菌。根据Morita^[22]对耐冷菌的定义,15株肉杆菌的最适生长温度为24~30℃,属于耐冷菌的范畴。本实验分离到的15株肉杆菌,其中*C. maltaromaticum* 4株, *C. divergens* 10株, *Carnobacterium* spp. 1株。rep-PCR指纹技术是一种快速、易于操作和可重复性的工具,具备高的分辨能力,可用于区分在种、亚种及菌株水平上的多种与食品相关的乳酸菌^[25]。Gevers^[25]和Švec^[26]等采用该指纹图谱技术研究了乳酸菌的遗传分化,(GTG)₅-PCR被发现是最适合乳酸菌高分辨率的鉴定方法,为更准确地反映15株肉杆菌菌株间的遗传多样性,本研究采用BOXAIR和(GTG)₅两种不同引物的rep-PCR指纹图谱技术对筛选到的肉杆菌进行遗传差异性分析,发现15株低温肉杆菌种间具有明显的差异,种内带型多样,存在极高的遗传多态性,与Bello等^[27]的研究结果一致。

Martin-Visscher等^[28]研究表明*C. maltaromaticum* UAL307发酵液的有效成分为IIa类细菌素,陈琳等^[29]从植物乳杆菌KLDS1.0391的发酵液中截留出了细菌素,Tulini等^[30]从鱼中筛选出的*C. maltaromaticum* C2所产抗菌肽等物质能有效抑制腐败菌和致病菌的生长。本实验对从新疆冷水鱼肠道中分离得到的每株肉杆菌进行抑菌活性检测,初筛得到8株肉杆菌对病原菌有明显的抑菌活性,从系统发育来看,7株属于*C. divergens*、1株属于*C. maltaromaticum*。以单核细胞性李斯特菌为指示菌,通过酸排除、过氧化氢酶实验及蛋白酶消化实验最终确定肉杆菌的抑菌物质成分中可能存在类细菌素。因此,对新疆冷水鱼肠道中低温肉杆菌产细菌素的进一步深入研究是非常关键的。

尽管致病性乳酸菌并不多见,但耐药性问题是乳酸菌在应用安全方面的首要问题^[31],菌株对抗生素的敏感性也是最主要的安全特性^[32]。Liu Chang等^[33]对46株乳杆菌研究耐药性发现这些菌株对氯霉素、红霉素、四环素敏感,对万古霉素、链霉素、庆大霉素耐药。Temmerman等^[34]对187株乳酸菌检测耐药性,发现有

30株嗜热链球菌对四环素、红霉素、青霉素和氯霉素敏感,对卡那霉素、万古霉素耐药。本研究采用纸片扩散法对8株具有抑菌活性的肉杆菌进行15种抗生素敏感性测定,结果表明,所有菌株对氨苄西林、米诺环素和氯霉素表现敏感,而对阿米卡星、氨基糖苷、苯唑西林、万古霉素和左氧氟沙星等几种抗生素表现耐药,这可能与鱼类的生活习性、食物链及鱼类生活的水体环境被污染等原因有关,也可能是部分菌株本身存在天然耐药性^[35]。后续将会对更多低温肉杆菌的产细菌素特性及耐药基因进行更深入研究,以期低温肉杆菌作为益生菌在鱼类饲料添加剂方面的应用提供科学依据,为食品防腐保鲜技术及肉杆菌的安全性评估提供一定的参考依据。

参考文献:

- [1] 王珊珊,王佳堃,刘建新. 肠道微生物对宿主免疫系统的调节及其可能机制[J]. 动物营养学报, 2015, 27(2): 375-382. DOI:10.3969/j.issn.1006-267x.2015.02.007.
- [2] MCFALLNGAI M, HADFIELD M G, BOSCH T C. Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013, 110(9): 3229-3236. DOI:10.1073/pnas.1218525110.
- [3] RINGØ E, OLSEN R E, GIFSTAD T Ø, et al. Prebiotics in aquaculture: a review[J]. Aquaculture Nutrition, 2010, 16(2): 117-136. DOI:10.1111/j.1365-2095.2009.00731.x.
- [4] WEI S, MORRISON M, YU Z. Bacterial census of poultry intestinal microbiome[J]. Poultry Science, 2013, 9(2): 671-683. DOI:10.3382/ps.2012-02822.
- [5] RAWLS J F, MAHOWALD M A, LEY R E, et al. Reciprocal gut microbiota transplants from zebrafish and mice to germ-free recipients reveal host habitat selection[J]. Cell, 2006, 127(2): 423-433. DOI:10.1016/j.cell.2006.08.043.
- [6] CUMMINGS J H, MACFARLANE G T. Colonic microflora: nutrition and health[J]. Nutrition, 1997, 13(5): 476-478.
- [7] KENDALL C, ESTHERR A, WLINN M, et al. Intestinal microbiota in fishes: what's known and what's not[J]. Molecular Ecology, 2014, 23(8): 1891-1898. DOI:10.1111/mec.12699.
- [8] RINGØ E, BENDIKSEN H R, WESMAJERVI M S, et al. Lactic acid bacteria associated with the digestive tract of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)[J]. Journal of Applied Microbiology, 2000, 89(2): 317-322. DOI:10.1046/j.1365-2672.2000.01116.x.
- [9] VARSHA K, NAMPOOTHIRI K. Appraisal of lactic acid bacteria as protective cultures[J]. Food Control, 2016, 69(1): 61-64. DOI:10.1016/j.foodcont.2016.04.032.
- [10] CALOMATA P, ARLINDO S, BOEHME K, et al. Current applications and future trends of lactic acid bacteria and their bacteriocins for the biopreservation of aquatic food products[J]. Food and Bioprocess Technology, 2008, 1(1): 43-63. DOI:10.1007/s11947-007-0021-2.
- [11] ANGMO K, KUMARI A, SAVITRI, et al. Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh[J]. LWT-Food Science and Technology, 2016, 66: 428-435. DOI:10.1016/j.lwt.2015.10.057.
- [12] KONISKY J. Colicins and other bacteriocins with established modes of action[J]. Annual Review of Microbiology, 1982, 36(1): 125-144. DOI:10.1146/annurev.mi.36.100182.001013.

- [13] RINGØ E, LØVMO L, KRISTIANSEN M, et al. Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review[J]. *Aquaculture Research*, 2010, 41(4): 451-467. DOI:10.1111/j.1365-2109.2009.02339.x.
- [14] SUGITA H, SHIBUYA K, SHIMOOKA H, et al. Antibacterial abilities of intestinal bacteria in freshwater cultured fish[J]. *Aquaculture*, 1996, 145(1/2/3/4): 195-203. DOI:10.1016/S0044-8486(96)01319-1.
- [15] RING E, WESMAJERVI M S, BENDIKSEN H R, et al. Identification and characterization of *Carnobacterium* isolated from fish intestine[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2001, 24(2): 183-191. DOI:10.1078/0723-2020-00020.
- [16] DONG X Z, CAI M Y. Common bacterial system identification manual[M]. Beijing: Science Press, 2001: 364-398.
- [17] JUSTÉ A, THOMMA B P H J, 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. DOI:10.1016/j.fm.2008.04.009.
- [18] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAC 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(25): 4876-4882. DOI:10.1093/nar/25.24.4876.
- [19] TAKURA 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. DOI:10.1093/molbev/msr121.
- [20] 刘健, 王海雁, 赵淑江. 牛津杯法测定五倍子对大黄鱼病原弧菌的体外抑菌活力[J]. *海洋科学*, 2009, 33(11): 44-47.
- [21] Clinical and Laboratory Standards Institute. M100/S22-2012 performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-second informational supplement[S]. CLSI, 2012.
- [22] MORITA R Y. Psychrophilic bacteria[J]. *Bacteriological Reviews*, 1975, 39(2): 144-167.
- [23] TODOROV S D, DICKS L M T. *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2005, 36(1): 318-326. DOI:10.1016/j.enzmictec.2004.09.009.
- [24] TODOROV S D, VAN REENEN C A, DICKS L M T. Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST13BR, a strain isolated from barley beer[J]. *Journal of General and Applied Microbiology*, 2004, 50(2): 149-157. DOI:10.2323/jgam.50.149.
- [25] GEVERS D, HUYS G, SWINGS J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 205(1): 31-36. DOI:10.1016/S0378-1097(01)00439-6.
- [26] ŠVEC P, VANCANNEYT M, SEMAN M, et al. Evaluation of (GTG)_n-PCR for identification of *Enterococcus* spp.[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2010, 247(1): 59-63. DOI:10.1016/j.femsle.2005.04.030.
- [27] BELLO B D, RANTSIOU K, BELLIO A, et al. Microbial ecology of artisanal products from North West of Italy and antimicrobial activity of the autochthonous populations[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2010, 43(7): 1151-1159. DOI:10.1016/j.lwt.2010.03.008.
- [28] MARTIN-VISSCHER L A, VAN BELKUM M J, GARNEAU-TSODIKOVA S J, et al. Isolation and characterization of carnocyclin A, a novel circular bacteriocin produced by *C. maltaromaticum* UAL307[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(5): 4756-4763. DOI:10.1128/AEM.00817-08.
- [29] 陈琳, 孟祥晨. 超滤法分离植物乳杆菌KLDS1.0391发酵液中的细菌素[J]. *食品科学*, 2011, 32(5): 198-201.
- [30] TULINI F L, LOHANS C T, BORDON K C F, et al. Purification and characterization of antimicrobial peptides from fish isolate *Carnobacterium maltaromaticum* C2: carnobacteriocin X and carnolysins A₁ and A₂[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2014, 173: 81-88. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.019.
- [31] SANDERS M E, AKKERMANS L M A, HALLER D, et al. Safety assessment of probiotics for human use[J]. *Gut Microbes*, 2010, 1(3): 164-185. DOI:10.4161/gmic.1.3.12127.
- [32] PARK M S, JI G E. Development of probiotics and industrialization[J]. *Food Science and Industry*, 2014, 47(1): 19-28.
- [33] LIU C, ZHANG Z Y, DONG K E, et al. Antibiotic resistance of probiotic strains of lactic acid bacteria isolated from marketed foods and drugs[J]. *Biomedical & Environmental Sciences*, 2009, 22(5): 401-412. DOI:10.1016/S0895-3988(10)60018-9.
- [34] TEMMERMAN R, POT B, HUYS G, et al. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 81(1): 1-10. DOI:10.1016/S0168-1605(02)00162-9.
- [35] LIU X, LU S, GUO W, et al. Antibiotics in the aquatic environments: a review of lakes, China[J]. *Science of The Total Environment*, 2018, 627: 1195-1208. DOI:10.1016/j.scitotenv.2018.01.271.