

司贺龙,郭云霞,孙志颖,等. 鸡源芽孢益生菌 JM-42 菌株筛选及抑菌物性质分析[J]. 江苏农业科学,2014,42(8):208-211.

鸡源芽孢益生菌 JM-42 菌株筛选及抑菌物性质分析

司贺龙¹, 郭云霞¹, 孙志颖¹, 郝庆红¹, 刘月琴²

(1. 河北农业大学生命科学学院, 河北保定 071001; 2. 河北农业大学动物科技学院, 河北保定 071001)

摘要: 为了筛选对雏鸡腹泻具有显著预防作用的芽孢益生菌, 采用琼脂平板扩散法, 以大肠杆菌菌株为病源指示菌, 从健康鸡肠道中筛选到 1 株具有较强抑菌活性的拮抗细菌 JM-42 菌株, 对该菌株进行形态学、生理生化、16S rDNA 序列分析, 同时采用有机溶剂萃取和盐析法对其代谢产物进行提取, 对其产物物质种类及性质进行分析。结果表明, JM-42 菌株与标准菌株 *Bacillus velezensis* 的同源性最高, 为 99.92%, 且二者在所构建的系统发育树上的同一分支上, 最终鉴定 JM-42 菌株为 *B. velezensis*。通过对其代谢产物进行初步分析得出, 其拮抗物质为蛋白质, 50% 硫酸铵盐析所得到的蛋白质组分活性最强, 且对热及酸碱敏感性较弱, 性质比较稳定。

关键词: 鸡; 芽孢益生菌; 筛选; 鉴定; 抗菌蛋白

中图分类号: S852.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)08-0208-04

益生菌是指通过摄取适当的量, 能够起到有效作用的活菌, 它是通过调节肠道微生物生态平衡, 改善肠道防御功能、维护肠道屏障功能的微生态制剂^[1-2]。目前, 欧盟等国家均出台了相应政策、法律来严格限制甚至禁止抗生素的使用, 作为抗生素功能的替代品, 微生态制剂以其无污染、无残留、促生长并具有提高免疫力、促消化的功能而受到人们的关注。芽孢杆菌可以形成芽孢的兼性厌氧菌, 具有很强的抗逆性, 而且还可以产生多种消化酶及维生素等营养物质^[3], 且芽孢细菌后期的规模化生产可操作性强, 易于推广应用, 因此成为目前微生态制剂的首选菌种。幼龄动物由于生长发育不完全, 易受到环境、饲料、疾病的影响, 导致一些消化道疾病, 为了保证益生菌进入机体内的活性及定植, 本试验从健康鸡肠道中筛选对致病性大肠杆菌有显著拮抗作用的芽孢菌株, 并对其抑菌物质进行初步分析, 为鸡源芽孢益生菌的后期研究奠定基础。

1 材料与与方法

1.1 试验材料

致病性大肠杆菌, 由河北农业大学生命科学学院制药工程系实验室保存。

1.2 样品采集

新鲜的健康鸡肠道, 取自河北省清苑县某肉鸡养殖场。

1.3 培养基

细菌用培养基包括 NA 培养基、NB 培养基^[4]; 生理生化鉴定用培养基依据鉴定手册中的方法^[5]进行配制。

1.4 试验方法

1.4.1 鸡源芽孢杆菌的分离

从健康鸡新鲜盲肠中取 1 g

内容物, 溶于 10 mL 无菌水中, 80 °C 水浴灭菌 20 min。用无菌水 10 倍梯度稀释, 取适当稀释梯度的悬液在平板上涂布, 每个稀释度涂布 3 个平板, 37 °C 恒温箱培养 24 h, 获得单菌落。挑取不同形态单菌落转接到 NA 培养基斜面上纯培养, 每个平板划 4 个菌, 编号, 记录。

1.4.2 鸡源芽孢杆菌的初筛和复筛 将不同菌落分别转接到含大肠杆菌的病原菌平板上, 与大肠杆菌对峙生长, 置于 37 °C 恒温培养 24 h。观察是否有抑菌圈出现, 进而挑选出形成抑菌圈的菌株, 置于 -4 °C 冰箱保存备用。

从初筛的拮抗细菌中选出抑菌活性较高的菌进行复筛。将挑选出来的菌株, 以 NA 培养基活化后, 接种于 NB 培养基中, 37 °C、180 r/min 摇床培养 48 h 后, 取用 0.2 μm 微孔滤膜过滤除菌的拮抗细菌发酵液约 15 μL, 37 °C 培养 24 h, 测量并记录抑菌圈直径。

1.4.3 鸡源芽孢杆菌 JM-42 菌株的种属鉴定 根据菌株的菌落形态特征、菌体形态特征、革兰氏染色性状、芽孢染色性状、有关生理生化鉴别试验, 参照文献^[5]与《伯杰氏细菌鉴定手册》进行属和种的鉴定。

1.4.4 鸡源芽孢杆菌 JM-42 菌株的生理生化鉴定 按照相应属、种鉴定的有关内容进行生理生化鉴定。试验要求分别进行接触酶试验、H₂S 产生试验、吲哚试验、明胶液化试验、氨基酸脱羧酶试验、淀粉水解、V-P 试验、M.R 试验、柠檬酸盐利用和糖、醇发酵等。

1.4.5 鸡源芽孢杆菌 JM-42 菌株的 16S rDNA 的鉴定

1.4.5.1 鸡源芽孢杆菌 JM-42 菌株基因组 DNA 的提取及其 PCR 扩增和序列测定 取对数生长期菌株的发酵液(培养 4~12 h) 750 μL 至 EP 管中, 4 °C 下 10 000 r/min 离心 10 min, 重复 3 次。用无菌水振荡洗沉淀 2 次(洗残留的发酵液), 4 °C 下 10 000 r/min 离心 10 min。加 400 μL TE(Tris-HCl 和 EDTA 混合液)溶解沉淀。液面下加入 20 μL 溶菌酶(50 mg/mL), 轻轻摇匀混合, 置于 37 °C 温育过夜, 间歇摇动 EP 管, 加 400 μL CTAB, 65 °C 水浴 40 min。冷却至室温, 加入 400 μL 酚-三氯甲烷(1:1), 轻轻混匀, 4 °C 下 12 000 r/min 离心 10 min。移取上清, 加入 350 μL 三氯甲烷, 轻轻混匀,

收稿日期: 2014-03-19

基金项目: 河北省教育厅项目(编号: Z2013140)。

作者简介: 司贺龙(1975—), 男, 河北蔚县人, 博士研究生, 从事分子生物学研究。E-mail: helongsi@hebau.edu.cn。

通信作者: 郭云霞, 硕士, 主要从事动物营养及饲料学研究。Tel: (0312)7528256; E-mail: gyx310@163.com。

4 ℃ 下 12 000 r/min 离心 10 min。取上清,加入等体积冰冻异丙醇,轻轻摇匀,置于 -20 ℃ 冰箱 1~4 h,沉淀 DNA。取出后,12 000 r/min 离心 10 min。沉淀以 75% 乙醇洗 2 次,风干(至完全去除乙醇气味),得到 DNA 粗品。

纯化 DNA:加入 200 μL TE 溶解沉淀,液面下加入 RNA 酶(20 mg/mL),37 ℃ 保温 30 min。加入 400 μL 酚-三氯甲烷(1:1),轻轻混匀,4 ℃ 下 12 000 r/min 离心 10 min。移取上清,加入 350 μL 三氯甲烷,轻轻混匀,4 ℃ 下 12 000 r/min 离心 10 min。取上清,加入 1/10 体积的 2 mol/L KAc 溶液和 2 倍体积的无水乙醇,置于 -20 ℃ 保藏 1~12 h。取出,4 ℃ 下 10 000 r/min 离心 10 min。用 75% 乙醇洗 2 次,风干。加 20~30 μL TE 溶解沉淀,于 -20 ℃ 保藏。

凡是离心后吸取上清液的步骤,必须使用处理过的枪头。剪去枪尖 2 mm 左右,目的是减少对 DNA 片段的剪切力,提高收率。

JM-42 的基因组 DNA 扩增引物为细菌的 16S rDNA 通用引物,正向引物 PrimerA:5′-AGAGTTTGATCTCTGGCTCAG-3′,反向引物 PrimerB:5′-CTACGGCTACCTTGTACGA-3′。PCR 扩增的条件为:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,57 ℃ 退火 40 s,72 ℃ 延伸 90 s,共 32 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。得到的 PCR 产物经试剂盒纯化后,送往上海生物工程技术有限公司测序。

1.4.5.2 鸡源芽孢杆菌 JM-42 菌株 16S rDNA 序列分析及系统发育树绘制 利用 BLAST 方式将测定好的 JM-42 菌株的 16S rDNA 序列与 GenBank 中所有已测定的芽孢杆菌属 16S rDNA 基因序列进行同源序列分析比对,选取序列相似性高的菌株用 ClustaX 1.8 软件对比序列的相似性,并利用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树。

1.4.6 鸡源芽孢杆菌 JM-42 菌株的产物性质分析

1.4.6.1 溶剂萃取 将 JM-42 菌株活化后用 NB 培养基进行静置液体发酵。取 48 h 发酵液 4 份,每份 100 mL,离心后分别用 1/3 体积的三氯甲烷、乙醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取,萃取液在通风处内自然挥发至干燥,分别用 5.0 mL 蒸馏水溶解后,用琼脂打孔扩散法在病原菌平板上测定抗菌活性,在同一平板上同时测定发酵液、萃取液的抗菌活性,并以蒸馏水作为阴性对照、发酵液作阳性对照。

1.4.6.2 硫酸铵盐析 取 48 h 发酵液 200 mL,离心后在不断搅拌情况下缓慢添加硫酸铵 30%、60%、80% 饱和度,于 4 ℃ 冰箱沉淀过夜,10 000 r/min 离心 10 min 得沉淀,加 0.01 mol/L Tris-HCl(pH 值 7.4)缓冲液溶解,透析,冻干。用 0.01 mol/L Tris-HCl(pH 值 7.4),经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,制成 10 mg/mL 抗菌物溶液,用于拮抗活性测定。用琼脂打孔扩散法在病原菌平板上测定透析液抗菌活性,在同一平板上同时作蒸馏水阴性对照和发酵液阳性对照。

1.4.6.3 粗蛋白稳定性研究 将粗提拮抗蛋白用无菌水配成浓度为 10 mg/mL 的溶液。分别测定粗蛋白对热、pH 值的稳定性和对胰蛋白酶的敏感性,从而初步判断抗菌物质的稳定性。

粗蛋白热稳定性的测定:将拮抗蛋白的粗提取液分别在 40、60、80、100 ℃ 以及 0.1 MPa、121 ℃ 各处理 20 min,然后进行抑菌活性的测定。以常温处理的蛋白液作对照,25 ℃ 培养

2 d 后观察抑菌结果,并测量抑菌圈直径,比较分析结果。

粗蛋白 pH 值稳定性的测定:将拮抗蛋白的粗提液与磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液等体积混合,再用 0.01 mol/L 盐酸或氢氧化钠分别调 pH 值至 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 进行抑菌活性的测定,25 ℃ 培养 2 d 后观察抑菌结果,以琼脂打孔扩散法,观察不同 pH 值发酵液的抑菌效果,比较分析结果。

粗蛋白对胰蛋白酶的敏感性:将抗菌粗蛋白提取液分装于 Ep 管中,1:1 加入 2 mg/mL 胰蛋白酶溶液,以加无菌水的发酵上清液作对照,用琼脂打孔扩散法,在病原菌平板上选择合适的间距打孔,作 3 个平行,在 37 ℃ 恒温孵育 0、0.5、1.0、1.5、2.0 h,观察经胰蛋白酶处理不同时间的抗菌粗蛋白的抑菌效果,测量抑菌圈直径作记录。以上各处理和对照分别用抑菌圈法测定其抑菌活性。

2 结果与分析

2.1 拮抗细菌的初筛

将分离得到的不同特征的耐高温单菌落经纯化后分别与大肠杆菌进行对峙生长试验,从初筛的 70 株拮抗细菌中选出抑菌活性较高的 20 株菌进行复筛。

2.2 拮抗细菌的复筛

对 20 株形态不同的活性较高的菌株进行复筛,共分离得到具有较高拮抗作用的菌株 5 株,其抑菌圈直径均不小于 11 mm(表 1),其中菌株 JM-42 抑菌圈直径为 14.2 mm,能有效抑制大肠杆菌的生长。

表 1 复筛抑菌试验结果

菌株	抑菌圈直径(mm)
JM-2	11.0
JM-10	11.0
JM-21	12.7
JM-42	14.2
JM-35	13.4

2.3 拮抗细菌 JM-42 菌株的种属鉴定

JM-42 菌株菌落形态为乳白色大菌落,圆形,半透明,边缘整齐,表面光滑,质地湿润无隆起,为革兰氏阳性菌,显微镜下观察菌体呈杆状,单生,长 1.2 μm,宽 0.6 μm,散在或成对排列,芽孢间生,呈椭圆形,稍膨大长约 0.6 μm,宽约 0.3 μm。

2.4 拮抗细菌 JM-42 菌株的生理生化鉴定

以该试验现象终点现象为试验结果(表 2)。通过查看文献,依据菌株的菌体、菌落形态及生理生化结果,初步判断 JM-42 菌株为芽孢杆菌属的 *Bacillus velezensis* 芽孢杆菌。

2.5 拮抗细菌 JM-42 菌株 16S rDNA 序列的同源性鉴定

对提取的 JM-42 菌株基因组 DNA 的 16S rDNA 序列进行扩增测序,将测定的 JM-42 菌株的 16S rDNA 与 GenBank 中所有已测定的原核生物的 16S rDNA 序列进行比对,使用 PHVLIprogrampackage 软件处理所得到的数据,得到该菌株与相关菌株的进化距离,并构建系统发育树。构建系统发育树所用的相关菌株 16S rDNA 序列的登录号及与该菌株相似性见表 3,系统发育树见图 1。由于菌株 JM-42 的 16S rDNA 序

表2 拮抗细菌 JM-42 菌株生理生化特征

项目	结果	项目	结果	项目	结果
接触酶	-	苯丙氨酸脱氨酶	-	果糖	+
H ₂ S 产生	-	产氨	-	甘露醇	+
吲哚	+	明胶液化	+	2% 耐盐试验	+
淀粉水解	+	木糖	+	5% 耐盐试验	+
V-P	-	葡萄糖	+	7% 耐盐试验	+
M.R	+	蔗糖	+	10% 耐盐试验	+
柠檬酸盐利用	+	麦芽糖	+		
石蕊牛奶	酸凝	乳糖	+		

注: + 表示阳性; - 表示阴性。

列与芽孢杆菌属的相应标准菌株同源性大部分在 99% 左右, 结合该菌株的形态、生理生化特征, JM-42 菌株与 *Bacillus velezensis* 的标准菌株 AY603658 的同源性最高, 为 99.92%, 因此鉴定菌株 JM-42 菌株为 *B. velezensis*。

表3 菌株 JM-42 与参比菌株的 16S rDNA 序列相似性

序列号	种名	菌种号	相似性 (%)
EF433406	<i>B. amyloliquefaciens</i>	BCRC11601	99.68
NR_024696	<i>B. vallismortis</i>	DSM11031	99.68
DQ993673	<i>B. malacitensis</i>	LMG22477	99.12
DQ993671	<i>B. axarquiensis</i>	LMG22476	99.12
NR_024693	<i>B. mojavensis</i>	IFO15718	99.12
NR_024689	<i>B. atrophaeus</i>	JCM9070	99.36
AY603658	<i>B. velezensis</i>	CR-502	99.92
AY876289	<i>B. pumilus</i>	ATCC7061	96.98
NR_025373	<i>B. shackletonii</i>	LMG18435	94.42
AB267380	<i>Alkalibacillus silvisoli</i>	HN2	91.73

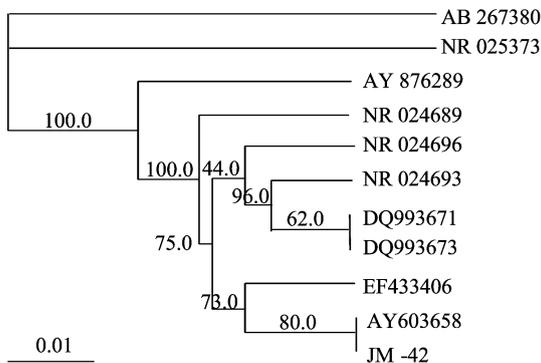


图1 依据 16S rDNA 序列构建的拮抗细菌 JM-42 菌株及相关菌株的系统发育树

2.6 JM-42 菌株抑菌物质初步鉴定

2.6.1 芽孢益生菌 JM-42 菌株有机溶剂萃取 利用氯仿、乙醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取各个菌株的发酵液, 用琼脂打孔扩散法在致病性大肠杆菌平板上测定萃取液、萃余液对大肠杆菌的抗菌活性。结果发现, 4 种有机溶剂的萃取液均无抑菌活性, 萃余液有一定的抑菌活性, 萃取液无拮抗活性, 因此可判定 JM-42 菌株发酵产物为蛋白类物质^[6]。

总体来说, 抗菌物质不易溶解于有机溶剂中且抗菌物质对有机溶剂较稳定, 活性没有被完全破坏。由表 4 可知, 在乙酸乙酯的水相中对大肠杆菌的抑菌圈直径是 8 mm, 其次是

正丁醇、三氯甲烷; 在乙醚的水相中抑菌圈直径是 2 mm, 可能在有机溶剂乙醚中最不稳定。在有机相中抑菌圈直径最大的是乙酸乙酯, 是 3 mm, 其他均为 0 mm。

表4 抗菌物质在不同溶剂中的抑菌圈直径

项目	抑菌圈直径 (mm)			
	发酵液	萃余液	萃取液	空白
乙酸乙酯	11	8	3	0
三氯甲烷	11	6	0	0
乙醚	12	2	0	0
正丁醇	12	7	0	0

2.6.2 芽孢益生菌 JM-42 菌株硫酸铵盐析 用硫酸铵浓度为 30%、60%、80% 提取出的粗蛋白分别作抑菌试验, 结果如图 2 所示。对芽孢益生菌 JM-42 菌株而言, 用浓度为 50% 的硫酸铵盐析得到的粗蛋白抑菌活性最大, 为 24 mm, 其次分别为 30% 硫酸铵, 抑菌圈直径 19 mm, 再次为 80% 硫酸铵, 抑菌圈直径 20 mm, 均比发酵液 (抑菌圈直径 14 mm) 大。所以选用 50% 硫酸铵沉淀蛋白。

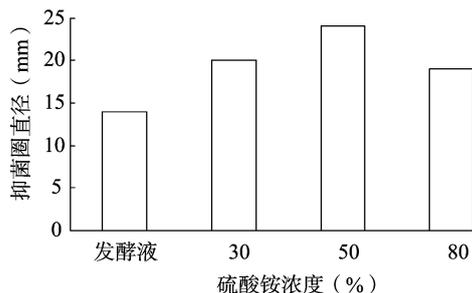


图2 JM-42 菌株硫酸铵盐析对大肠杆菌的抑菌圈直径的影响

2.6.3 粗蛋白稳定性研究

2.6.3.1 粗蛋白热稳定性的测定 抗菌蛋白热稳定性测定结果 (图 3) 表明, 随着温度的升高, 抗菌粗蛋白对大肠杆菌沙门氏菌、痢疾杆菌的抑菌圈直径逐渐减小, 但不是太明显; 而在 121 °C 时, 抑菌圈直径下降较明显, 抑菌活性下降较大。但是总体上来说抑菌活性变化不太明显。

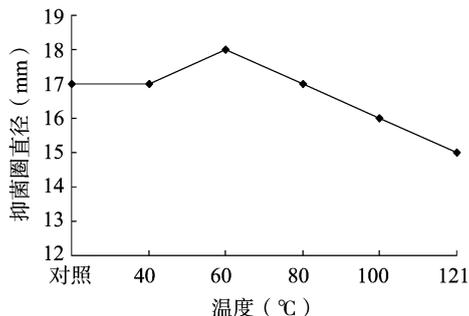


图3 JM-42 菌株抗菌物在不同温度中的稳定性

2.6.3.2 粗蛋白 pH 值稳定性的测定 抗菌蛋白粗提液酸碱稳定性测定结果 (图 4) 表明, 在大肠杆菌板 pH 值 4.0 ~ 10.0 范围内抑菌圈直径变化起伏, 但也可以看出在 pH 值 5.0 ~ 7.0 范围内抑菌圈最大, 所以抑菌活性最强。在此范围内抗菌蛋白粗提液最稳定。而在 pH 值 8.0 ~ 10.0 范围内抑菌圈直径变化较 pH 值 5.0 ~ 7.0 范围小, 总体来说抑菌活

性很好。因此,该抗菌粗蛋白在较广泛的 pH 值范围内都有较好的抑菌活性,酸碱适应性较强,但偏酸性。

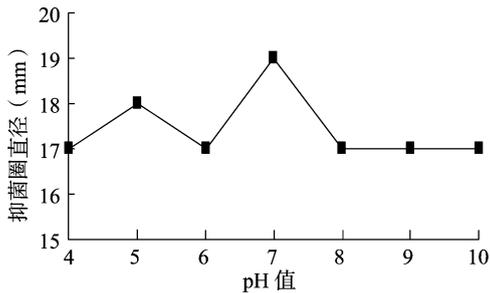


图4 JM-42 菌株抗菌物在不同 pH 值中的稳定性

2.6.3.3 粗蛋白对胰蛋白酶敏感性试验 通常以抑菌物质是否被蛋白酶降解作为区分细菌素与类细菌素的标准。抑菌物质粗提液经胰蛋白酶处理后,检测其抑菌活性,结果见图5。由图5可知,经胰蛋白酶处理后在病原菌平板上仍会出现抑菌圈,与对照相比持平或略有提高,说明该抗菌粗蛋白并未被胰蛋白酶溶解,从而说明该抗菌蛋白对胰蛋白酶不太敏感。

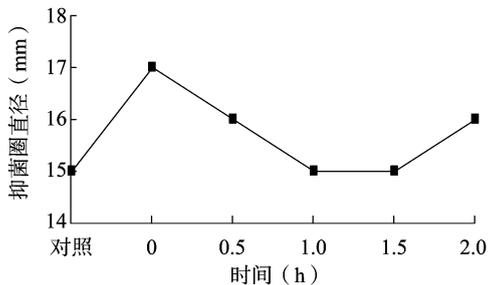


图5 JM-42 菌株抗菌物对胰蛋白酶的敏感性

3 结论与讨论

芽孢益生菌作为微生态制剂的一种重要来源细菌,在维护动物肠道健康、促进微生态平衡等方面发挥着重要的作用。芽孢细菌在逆境环境下形成芽孢,在温度、pH 值、营养条件粗时萌发生长,产生营养物质,发挥其益生作用。但芽孢杆菌在常规动物肠道发挥生理功能,可能是通过与其他微生物相互作用的结果,而非单一的芽孢杆菌在倡导生长代谢造成的^[7]。通过拮抗作用来筛选益生菌,是最直接有效的途径^[8]。本试验从鸡肠道中筛选出对致病性大肠杆菌具有显著拮抗作用的菌株,经复筛可以确定, JM-42 菌株的代谢产物中含有较高的抑菌活性物质,能产生有效的抑菌作用,经形态学、生理生化、16S rDNA 序列分析得出鸡源 JM-42 菌株为 *Bacillus velezensis*。

细菌素是某些细菌产生的具有抗菌活性的多肽、蛋白质或蛋白质复合物^[9],目前由益生菌中的乳酸菌所产生的细菌素有 40 余种^[10]。益生菌中的乳酸菌在代谢过程中除细菌素外,还能产生乙酸、乳酸及过氧化氢等具有抑菌活性的物质。因此,为了排除这些非细菌素物质的干扰,本研究利用硫酸铵盐析对代谢产物进行粗蛋白的分离,结果发现 50% 硫酸铵对粗蛋白提取量最大,抑菌效果最明显。因此,证明了 JM-42 菌株发酵液中提取物的抗菌活性是类细菌素所致,而不是有

机酸和过氧化氢所致。

JM-42 抗菌蛋白在较广泛的 pH 范围内都有较好的抑菌活性,酸碱适应性较强;在外界温度为 40 ℃ 时抑菌活性最强,但在 40~100 ℃ 下抑菌活性稍有减弱,在 121 ℃ 下明显有所减弱,但在此温度下仍有抑菌圈出现,说明 JM-42 抗菌蛋白粗提液具有较好的热稳定性。20 世纪 80 年代初, Hultmark 等研究在滞育德惜比古天蚕蛹中利用大肠杆菌诱导时发现一类新型的抗菌蛋白,该蛋白分子量在 7 ku,不同于溶菌酶的 15 ku,与氨基酸组成相似,具有热稳定性^[11],与申吉泓等报道^[12]一致。在用胰蛋白酶处理解育的过程中仍出现抑菌圈,说明该抗菌粗蛋白对胰蛋白酶不敏感。JM-42 作为饲料添加剂应用于饲料中,在动物消化道产生的抗菌蛋白不会被胰蛋白酶降解,能发挥其抗菌作用。抗菌肽成分为易消化吸收的氨基酸,可作为畜禽饲料添加剂取代或部分取代目前饲喂动物所用的抗生素,减少抗生素对动物体的危害。目前,利用酵母产生抗菌肽酵母制剂,在预防及治疗仔猪白痢、雏鸡白痢方面有明显效果。总之,该蛋白质性质较稳定,耐热耐酸能力强,对病原细菌有较强的抑制能力,由蛋白类物质或非单一抗菌物质所组成,有关其组分和结构鉴定方面须要进一步研究。本研究结果为益生菌的进一步应用提供技术支持。

参考文献:

- [1] Shah N P. Functional cultures and health benefits[J]. International Dairy Journal, 2007, 17(11): 1262-1277.
- [2] Reid G, Jass J, Sebuly M T, et al. Potential uses of probiotics in clinical practice[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2003, 16(4): 658-672.
- [3] 郭小华, 赵志丹, 熊海容. 益生芽孢杆菌肠道微生态学进展[J]. 中国微生态学杂志, 2010, 22(12): 1136-1139.
- [4] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物学实验教程[M]. 北京: 北京大学出版社, 1999: 54.
- [5] 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.
- [6] 王伟, 李术娜, 姜军坡, 等. 大丽轮枝菌拮抗细菌 7-63 菌株的鉴定与抗菌物质分析[J]. 湖北农业科学, 2009, 48(6): 1389-1392.
- [7] Cardona M E, Norin E, Midtvedt T. Biochemical functions of *Bacillus licheniformis* in gnotobiotic mice[J]. Microbial Ecology in Health and Disease, 2003, 15(1): 40-42.
- [8] 张红英, 杨霞, 金钺, 等. 鸡肠源芽孢杆菌的分离、鉴定和抗菌活性[J]. 中国微生态学杂志, 2007, 19(6): 504-506.
- [9] 袁静, 李元端, 刘变芳, 等. 乳酸菌的细菌素及乳链菌肽在食品工业中的发酵与应用[J]. 哈尔滨商业大学学报: 自然科学版, 2002, 18(5): 544-549, 533.
- [10] 张艾青, 刘书亮, 敖灵. 产广谱细菌素乳酸菌的筛选和鉴定[J]. 微生物学通报, 2007, 34(4): 753-756.
- [11] Hultmark D, Steiner H, Rasmuson T, et al. Insect immunity purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*[J]. European Journal of Biochemistry, 1980, 106(1): 7-16.
- [12] 申吉泓, 杨宇如, 唐孝达. 抗菌肽作用机制研究现状[J]. 国外医学: 肿瘤学分册, 2003, 30(5): 347-350.