

刘欢欢,刘珍珠,王玉荣,等. 鸡源益生菌对肠道病原菌的体外拮抗作用[J]. 江苏农业科学,2020,48(6):151–156.
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2020.06.030

鸡源益生菌对肠道病原菌的体外拮抗作用

刘欢欢¹, 刘珍珠¹, 王玉荣², 樊振², 马贵军², 娄恺³, 晁群芳¹, 曾军³

(1. 新疆大学生命科学与技术学院, 新疆乌鲁木齐 830046; 2. 新疆天康饲料科技有限公司生物添加剂分公司, 新疆乌鲁木齐 830013;
3. 新疆农业科学院微生物应用研究所新疆特殊环境微生物实验室, 新疆乌鲁木齐 830091)

摘要:为探究鸡源益生菌对鸡肠道病原菌的影响,从健康的土鸡肠道内分离并鉴定出 6 株乳酸菌(*Lactobacillus plantarum*)和 1 株丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)。以从腹泻病鸡肠道内分离并鉴定的 3 株病原菌——大肠杆菌(*Escherichia coli*)、沙门氏菌(*Salmonella enterica*)和志贺氏菌(*Shigella sonnei*)为指示菌,采用平板抑菌法挑选出 1 株抑菌活性强的乳酸菌;将这株乳酸菌和丁酸梭菌用比浊法测定 48 h 内的生长曲线和 pH 值变化曲线;采用体外模拟肠道的方式,将 2 株益生菌分别与 3 株致病菌做体外拮抗试验。结果显示,乳酸菌 R5 和 R6 的抑菌能力最强,选取 R5 与丁酸梭菌 D2 研究其体外对致病菌的拮抗性能。体外拮抗研究表明,在 72 h 内乳酸菌 R5 可将病原菌完全杀灭,而丁酸梭菌对 3 种致病菌也均有显著抑菌作用。发现乳酸菌和丁酸梭菌在体外拮抗作用中均有显著的抑菌作用,而乳酸菌 R5 的抑菌效果更好。本研究结果可为益生菌的应用提供理论依据。

关键词:益生菌;乳酸菌;丁酸梭菌;拮抗;肠道致病菌;共培养

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2020)06–0151–05

在禽类养殖行业中,抗生素一直是一种常用的饲料添加剂以防治禽类肠道疾病和促进生长,然而随着抗生素的泛滥使用,也带来了药物残留、病原微生物耐药性增强和养殖环境恶化等负面影响^[1]。益生菌以其成本低廉、效果好、绿色无害而备受青睐,可以减少抗生素施用甚至完全替代抗生素^[2]。

乳酸菌和丁酸梭菌是广泛应用于禽类的益生菌,它们能够通过多种机制对肠道屏障进行调节以抑制病原微生物在肠道内定植和生长,有的还可以通过分泌抗菌物质杀灭有害微生物,因此对细菌引起的腹泻等疾病能起到良好的预防和治疗作用^[3]。

本研究通过从无抗生素喂养的健康土鸡肠道中分离出乳酸菌和丁酸梭菌,以从腹泻病鸡中分离的致病菌为指示菌,筛选出作用较强的益生菌,并研究体外共培养中对致病菌的杀灭作用,为益生菌的应用提供理论依据。

1 材料与方法

收稿日期:2018–12–19

基金项目:新疆农业科学院青年基金(编号:xjnkq–2017005)。

作者简介:刘欢欢(1990—),河南沈丘人,女,硕士,从事饲用益生菌相关研究。E-mail:1376290095@qq.com。

通信作者:晁群芳,副教授,硕士生导师,从事微生物应用相关研究。

E-mail:xjchqf@sina.com。

1.1 材料

1.1.1 菌种来源 益生菌分离自乌鲁木齐南山某个体养殖户无抗生素喂养的健康土鸡;致病菌分离自某养殖场腹泻的病鸡。

1.1.2 培养基 病原菌增菌培养基:NB 和 NA(固体);乳酸菌分离培养基:MRS 琼脂(添加 0.75% CaCO₃);乳酸菌增菌培养基:MRS 肉汤;梭菌选择培养基:TSN 琼脂;强化梭菌液体培养基:RCM 培养基;大肠杆菌鉴别培养基:EMB 琼脂;沙门氏菌与志贺氏菌鉴别培养基:SS 琼脂;均购自青岛高科技工业园海博生物技术有限公司。

1.1.3 主要仪器设备 单人双面净化工作台(SW–CJ–1F);恒温培养振荡器(ZWY–2102C);电热恒温培养箱(SPX–250BF2);立式压力蒸汽灭菌器(YXQ–LS–75 SII);电热恒温鼓风干燥箱(DHG–9070)。

1.2 方法

1.2.1 菌种分离

1.2.1.1 致病菌的分离 将腹泻病鸡颈静脉放血处死后,用无菌器械进行解剖,截取盲肠,取盲肠内容物 1 g,溶于 9 mL 0.85% 无菌生理盐水,充分振荡混匀后,取上清液 1 mL 依次稀释至 10⁻⁶,将 10⁻⁵、10⁻⁶ 稀释液取 100 μL 均匀涂布于 SS 平板和 EMB 平板,37 °C 培养箱培养 16 h,EMB 上挑选圆润深紫

色且有绿色金属光环的菌落^[4],SS 平板挑取带有黑点的透明菌落和透明或半透明的菌落^[5],对菌落划线纯化后,进行生理生化检测和 16S rDNA 鉴定。

1.2.1.2 乳酸菌的分离 将土鸡颈静脉放血处死后,采用无菌器械对土鸡进行解剖,剪下完整肠道,取盲肠内容物 1 g,稀释方法同“1.2.1.1”节,稀释至 10^{-7} ,取 10^{-6} 、 10^{-7} 的稀释液 100 μL 均匀涂布于含有 0.75% CaCO_3 的 MRS 平板上,37 $^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养 24 h,挑选有溶钙圈且形态不一的菌落^[6],划线纯化培养后,进行生理生化检测和 16S rDNA 鉴定。

1.2.1.3 丁酸梭菌的分离 取健康土鸡肠道的小肠部分肠段,用无菌汤匙,刮取小肠黏液,溶于 9 mL 0.85% 无菌生理盐水中,振荡混匀后,于 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中水浴 10 min,以去除非芽孢细菌,稀释方法同“1.2.1.1”节,稀释至 10^{-3} ,取 10^{-2} 和 10^{-3} 稀释液 100 μL ,均匀涂布于 TSN 平板^[7],37 $^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养至长出菌落,选取疑似丁酸梭菌的菌落,于 RCM 液体培养基内富集培养,选取产酸产气的菌液进行稀释涂布纯化,并进行生理生化检测及 16S rDNA 的鉴定。

1.2.2 平板打孔法抑菌试验

1.2.2.1 乳酸菌的抑菌试验 将筛选到的乳酸菌在 MRS 液体培养基静置培养活化 24 h,致病菌在普通液体培养基(NB)摇床培养 16 h,取灭菌后的营养琼脂(NA)培养基冷却至 46 $^{\circ}\text{C}$ 左右,接入 1% 的致病菌,混匀后,无菌超净工作台下倒平板,待平板冷却凝固后,用打孔器打孔,每个孔内添加 100 μL 的乳酸菌菌液,常温下静置 3 h 后,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱,过夜培养。测量每种乳酸菌的抑菌圈,选择抑菌圈效果最明显的菌株,用于后续共培养试验。

1.2.2.2 丁酸梭菌的抑菌试验 将筛选到的丁酸梭菌接入 RCM 液体培养基,液体培养基加满至锥形瓶瓶口 2~3 cm 处,采用无菌石蜡-凡士林封口,静置培养活化 24 h,抑菌实验方法同上。

1.2.2.3 数据统计 采用 IBM SPSS Statistics 22 软件分析,采用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。

1.2.3 乳酸菌与丁酸梭菌生长性能和 pH 值的测定 将抑菌效果较好的乳酸菌与丁酸梭菌活化 24 h,分别接种于装有 10 mL MRS 液体培养基和 10 mL RCM 液体培养基试管各 54 支,RCM 培养基接种完丁酸梭菌后,用灭菌的石蜡-凡士林封口,37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养,分别于 0.0、0.5、2.0、4.0、6.0、8.0、12.0、14.0、16.0、18.0、20.0、22.0、24.0、28.0、

36.0、48.0 h 时各取出 3 支,测定 pH 值和 $D_{600\text{ nm}}$ 值,采用 Excel 2007 软件绘制生长曲线和 pH 值曲线。

1.2.4 益生菌与致病菌的共培养试验

1.2.4.1 乳酸菌与致病菌的共培养试验 将乳酸菌和致病菌活菌数目稀释至同一数量级后,取装有 9 mL MRS 液体培养基的无菌试管,以 1/10 接种量接入致病菌作为对照;另取装有 8 mL MRS 液体培养基的无菌试管,其中 3 支以 1:1 比例接入乳酸菌与致病菌各 1 mL,每组 3 个重复,静置培养,每隔 24 h 取出致病菌纯培养液,和致病菌与乳酸菌混合培养液,并用 SS 与 EMB 平板计数,计算每支试管内致病菌的活菌数。

1.2.4.2 丁酸梭菌与致病菌的共培养试验 丁酸梭菌与致病菌共培养的方法同“1.2.4.1”节。

1.2.4.3 数据统计 采用 IBM SPSS Statistics 22 软件分析,并使用 Excel 2007 作图。

2 结果与分析

2.1 菌种分离鉴定

从健康土鸡中分离出 6 株乳酸菌和 1 株丁酸梭菌,从腹泻病鸡肠道内分离出 3 株致病菌。经过生理生化检测和 16S rDNA 分子鉴定后,3 株致病菌分别为沙门氏菌、大肠杆菌和志贺氏菌;6 株乳酸菌包括 2 株植物乳杆菌,1 株粪肠球菌,1 株乳酸片球菌,1 株海氏肠球菌及 1 株肠膜明串球菌。16S rDNA 鉴定结果及系统进化树见表 1 和图 1。

2.2 平板抑菌试验

6 株乳酸菌和 1 株丁酸梭菌对大肠杆菌、沙门氏菌和志贺氏菌的抑菌效果见表 2。由表 2 可知,除 R9 菌株在大肠杆菌和沙门氏菌平板上无抑菌圈外,6 株乳酸菌对 3 种致病菌均不同程度的抑菌效果;其中,R5 和 R6 对 3 种致病菌的抑菌效果最好,具有显著性差异($P < 0.05$)。而丁酸梭菌 D2 对 3 种致病菌的抑菌效果最弱,没有明显的抑菌圈。

R9 在大肠杆菌和沙门氏菌平板上没有抑菌圈,但是对志贺氏菌却有微弱的抑菌效果;R2 菌株对 3 种致病菌都有抑菌能力,但是抑菌效果显著弱于 R3 和 R4($P < 0.05$);R3 和 R4 之间的抑菌效果没有明显差异($P > 0.05$),它们对大肠杆菌、沙门氏菌和志贺氏菌的抑菌效果较强;而 R5 和 R6 菌株对大肠杆菌和志贺氏菌的抑菌能力最强,具有显著性差异($P < 0.05$),其中 R5 的抑菌圈直径最大,分别达到 8.33 mm 和 9.67 mm。

表 1 分离菌株在 Genbank 数据库中的比较结果

菌株	16S rDNA 同源性 (%)	16S rDNA 鉴定结果	中文名称
E	99	<i>Escherichia coli</i>	大肠埃希菌
SE	99	<i>Salmonella enterica</i>	肠道沙门氏菌
Sh	99	<i>Shigella sonnei</i>	宋内志贺氏菌
R2	99	<i>Enterococcus faecalis</i>	粪肠球菌
R3	99	<i>Enterococcus hirae</i>	海氏肠球菌
R4	99	<i>Lactobacillus plantarum</i>	植物乳杆菌
R5	99	<i>Lactobacillus plantarum</i>	植物乳杆菌
R6	99	<i>Pediococcus acidilactici</i>	乳酸片球菌
R9	99	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	肠膜明串球菌
D2	99	<i>Clostridium butyricum</i>	丁酸梭菌

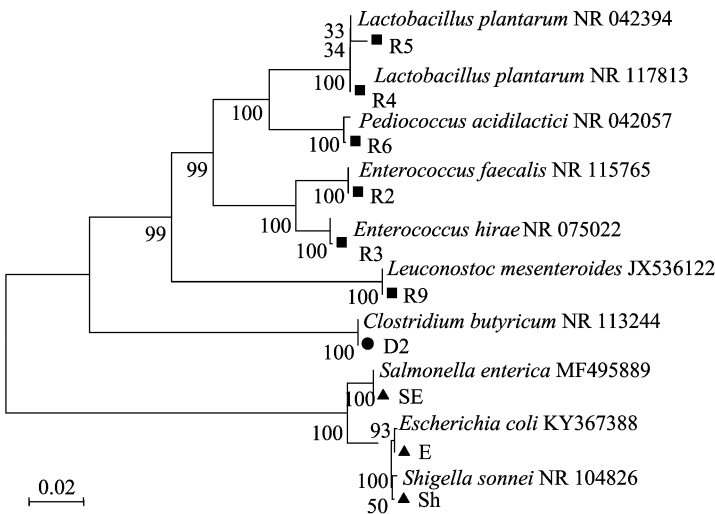


图1 基于 16S rDNA 序列 10 株菌的系统发育树

表 2 益生菌对致病菌的抑菌效果比较

菌株	抑菌圈直径 (mm)		
	大肠杆菌	沙门氏菌	志贺氏菌
R2	1.33 ± 0.33B	4.33 ± 0.57B	2.33 ± 0.57C
R3	7.00 ± 0.00C	9.66 ± 0.57C	7.33 ± 0.57D
R4	7.00 ± 0.01C	10.66 ± 0.57C	7.00 ± 0.00D
R5	8.33 ± 0.57D	9.66 ± 0.57C	9.67 ± 0.57E
R6	8.00 ± 0.00D	9.66 ± 0.57C	9.00 ± 0.00E
R9	0.00 ± 0.00A	0.00 ± 0.00A	1.33 ± 0.57B
D2	0.00 ± 0.00A	0.00 ± 0.00A	0.00 ± 0.00A

注:数据不包含孔径,打孔器外径为 8.0 mm;同列数据后字母相邻表示差异显著 ($P < 0.05$),字母相间表示差异极显著 ($P < 0.01$),字母相同表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

对于大肠杆菌,抑菌效果最好的菌株为 R5 和 R6,抑菌圈直径分别为 8.33 mm 和 8.00 mm;在沙门氏菌的抑菌试验中,效果明显较强的菌株为 R3、R4、R5 和 R6,抑菌圈直径分别为 9.66、10.66、9.66、9.66 mm;对志贺氏菌抑制作用较强的菌株也是 R5 和 R6,抑菌圈直径分别为 9.67、9.00 mm。因

此,R5 和 R6 针对 3 种致病菌的综合效果更强于其他菌株。

R5 和 R6 菌株在培养过程中,因 R5 生长速率强于 R6,因此取 R5 菌株用于后续共培养试验。

2.3 乳酸菌和丁酸梭菌的生长曲线、pH 值曲线

2.3.1 乳酸菌的生长曲线和 pH 值曲线 乳酸菌 R5 的生长曲线和 pH 值曲线见图 2。由图 2 可知,0~2 h 为该菌株的迟滞期,菌株的数目和 pH 值无变化,2 h 后进入对数期,菌数目呈直线快速增长,由于菌数增多,产代谢物乳酸也越多,pH 值随之迅速下降,当 pH 值降低至 3.8 左右时,乳酸菌的生长由于酸抑制而停滞,在 16 h 后逐渐稳定,到达稳定期。

2.3.2 丁酸梭菌的生长曲线和 pH 值曲线 丁酸梭菌 D2 的生长曲线和 pH 值曲线见图 3。由图 3 可知,前 4 h 为丁酸梭菌的迟滞期,4 h 后进入对数期,菌数快速增长,产生的酸性物质越来越多,pH 值快速下降至 4.7~4.8,菌数不再增长,12 h 进入稳定期。

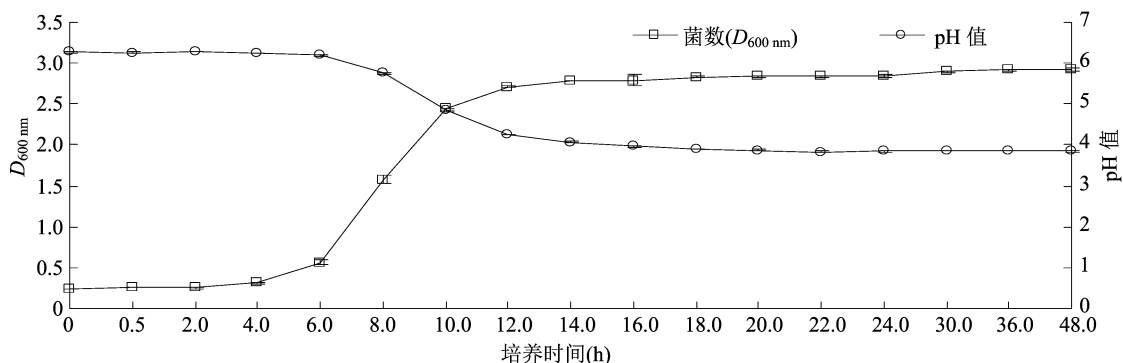


图2 乳酸菌 R5 的生长曲线和 pH 值曲线

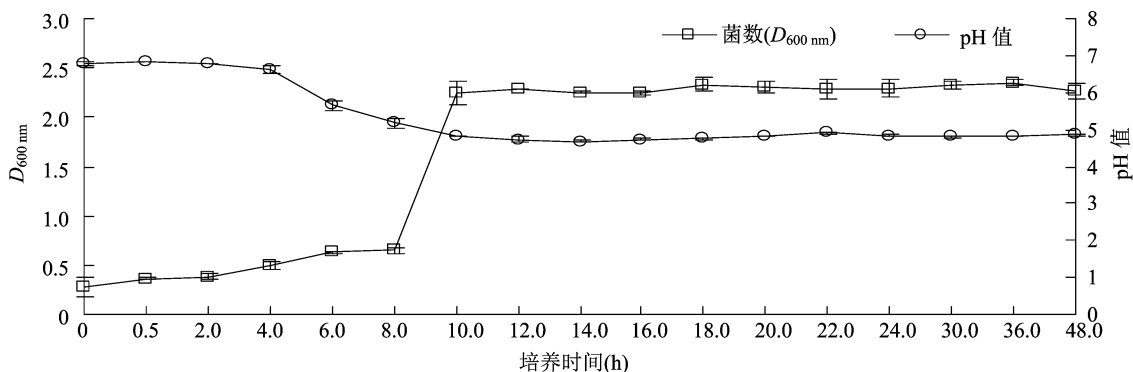


图3 丁酸梭菌 D2 的生长曲线和 pH 值曲线

2.4 益生菌与致病菌共培养试验

2.4.1 乳酸菌分别与大肠杆菌、沙门氏菌和志贺氏菌体外共培养试验 乳酸菌 R5 分别与大肠杆菌、沙门氏菌和志贺氏菌的共培养体系中,大肠杆菌、沙门氏菌和志贺氏菌的数量明显下滑,与致病菌纯培养对比极为明显,具有极显著差异($P < 0.01$);在 24 h 时,混合体系的致病菌已被乳酸菌 R5 抑杀了 4 个数量级;48 h 时,大肠杆菌、沙门氏菌和志贺氏菌浓度已减少至 100 CFU/mL 左右;直至 72 h,各混合体系中致病菌已被完全杀灭。从以上结果可发现,乳酸菌 R5 分别和大肠杆菌、沙门氏菌和志贺氏菌 1:1 共培养,72 h 内可完全杀灭致病菌,体外抑菌作用很强(图 4)。

2.4.2 丁酸梭菌分别与大肠杆菌、沙门氏菌和志贺氏菌体外共培养试验 丁酸梭菌 D2 与大肠杆菌、沙门氏菌和志贺氏菌混合共培养时,D2 虽然不能对大肠杆菌起到杀灭的作用,却能明显地抑制致病菌的生长速度。D2 与大肠杆菌共培养 24 h 时,纯培养对照组的大肠杆菌与混合体系中的大肠杆菌活菌数相差并不明显,无显著性差异($P > 0.05$);培养 48 h 时,2 组中的大肠杆菌数已明显相差 2 个数量级,差异极显著($P < 0.01$);在 72 h 时,共培养体系中的大肠杆菌生长速度滞后于对照组($P < 0.01$)

(图 5-a)。丁酸梭菌 D2 和沙门氏菌混合培养组与沙门氏菌单纯对照组在 72 h 内生长曲线相比,混合组的沙门氏菌生长明显弱于对照组,2 组沙门氏菌活菌数明显相差 1 个数量级,在 24、48 h 均具有显著性差异($P < 0.05$),而共培养 72 h 后,混合试验组和对照组差异极显著($P < 0.01$)(图 5-b)。D2 与志贺氏菌共培养中,志贺氏菌的活菌数在平缓增长,生长趋势明显弱于志贺氏菌纯培养对照组,在 24、48、72 h 均具有显著性差异($P < 0.05$)。以上结果表明,丁酸梭菌的体外抑菌效果相比乳酸菌较弱,但对大肠杆菌、沙门氏菌和志贺氏菌的生长趋势,具有明显的抑制作用。

3 讨论与结论

乳酸菌和丁酸梭菌属于动物肠道内常见的益生菌,它们对于维持动物肠道微生态平衡、促进营养吸收和增强免疫系统能力都发挥着重要的作用。本研究中,从健康土鸡肠道内分离出的乳酸菌和丁酸梭菌对鸡源性致病菌具有显著的抑制作用。

万荣峰等的研究表明,3 株乳酸菌分别与大肠杆菌体外共培养,同时接菌时可在 96 h 内杀灭所有大肠杆菌,提前接入乳酸菌后培养 24 h,再接入病原菌,可在 72 h 内将大肠杆菌完全杀灭^[8]。陈丹等分

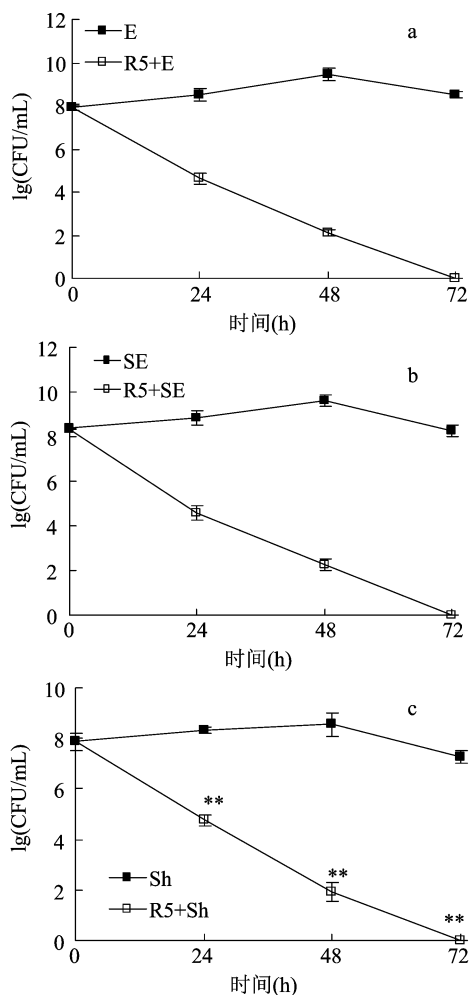
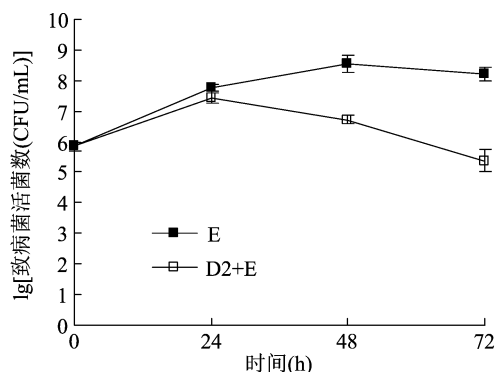


图4 乳酸菌 R5 与大肠杆菌、沙门氏菌和志贺氏菌的体外共培养

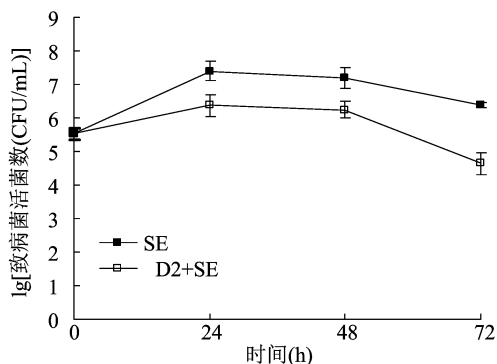
离的干酪乳杆菌在与禽致病大肠杆菌体外拮抗研究中表明,96 h 内可完全杀灭致病菌,而在培养 24 h 前,混合组大肠杆菌的数目与对照组差异并不显著^[9]。本研究中,乳酸菌 R5 菌株与大肠杆菌 1 : 1 同时接入,72 h 时可杀灭所有大肠杆菌;混合组大肠杆菌在前 24 h 就呈现出极显著差异 ($P < 0.01$),R5 菌株对禽致病菌沙门氏菌和志贺氏菌的杀灭作用差异同样极显著 ($P < 0.01$),这说明本研究中分离的 R5 菌株在体外拮抗致病菌方面较强,具有进一步研究和应用的价值。

谢树贵等在酒窖底泥中分离出 1 株丁酸梭菌,对沙门氏菌和大肠杆菌共培养 48 h 后,均具有显著的抑菌能力^[10],而在本研究中,从肠道中分离的丁酸梭菌对大肠杆菌和沙门氏菌也有显著的抑制作用,但相比于谢树贵等分离的丁酸梭菌,抑菌效果一般,其原因可能是本试验分离出的丁酸梭菌对酸抑制更为敏感。

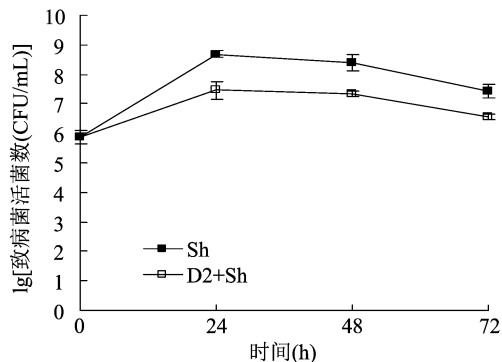
本研究中,从健康土鸡肠道分离的乳酸菌和丁



a. 丁酸梭菌与大肠杆菌的体外共培养试验



b. 丁酸梭菌与沙门氏菌的体外共培养试验



c. 丁酸梭菌与志贺氏菌的体外共培养试验

图5 丁酸梭菌 D2 与大肠杆菌体外共培养结果

酸梭菌对致病菌均有一定的抑菌效果,其中乳酸菌 72 h 可完全杀灭致病菌,而丁酸梭菌则会通过阻碍致病菌的生长速度,抑制其快速生长,乳酸菌的抑菌效果明显强于丁酸梭菌。

后续研究需探讨乳酸菌 R5 和 D2 抑菌作用机制和产酶特性研究。

参考文献:

- [1] 潘淑勤,韩浩月,Fernando L,等. 抗生素的副作用及抗生素替代物[J]. 国外畜牧学(猪与禽),2018,38(1):43-45.
- [2] 邓泽元. 益生菌及其应用研究进展[J]. 乳业科学与技术,2018,41(1):26-32.
- [3] 许珂,魏萍. 益生菌作用机制的研究进展[J]. 中国微生态

史荣华,周 扬,颜彩霞,等. 1 例蛋鸡腺病毒感染的诊断及对 SPF 鸡的致病性[J]. 江苏农业科学,2020,48(6):156-159.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.06.031

1 例蛋鸡腺病毒感染的诊断及对 SPF 鸡的致病性

史荣华¹,周 扬¹,颜彩霞¹,杨 瑞¹,张建军¹,李一民¹,任 丹²,高 巍²

(1. 国药集团扬州威克生物工程有限公司,江苏扬州 225127; 2. 扬州大学兽医学院,江苏扬州 225009)

摘要:2018 年 11 月,山东省某蛋鸡场 80 日龄左右鸡群出现采食下降、精神沉郁、消瘦等症状,日死亡率达 1%,临床剖检病变主要为心包积液、肝脏有出血点、肾脏肿大等。为明确患病蛋鸡死亡原因及确定病原,无菌采取病死鸡肝脏、肾脏等,并展开病毒分离、PCR 检测等实验室诊断,结果表明,病料接种鸡胚,胚体有明显出血症状,肝脏有出血点,PCR 扩增产物测序结果与已发表的血清 4 型禽腺病毒 *Hexom* 基因同源率为 99%。上述结果表明,该分离株为血清 4 型禽腺病毒。将分离到的腺病毒对 2 周龄 SPF 鸡进行攻毒试验研究其致病性,每日观察鸡的精神状态,记录死亡情况,发现胸肌接种 0.3 mL/羽的病毒剂量对 SPF 鸡的致死率高达 100%,死亡时间在 72~144 h;对死亡鸡剖检均可见明显的心包积液,肝脏出血坏死;组织病理学观察发现肝细胞核内形成嗜碱性包涵体。

关键词:蛋鸡;腺病毒;诊断;致病性

中图分类号:S858.31 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)06-0156-04

禽腺病毒(fowl adenovirus, FAdV)属于腺病毒科禽腺病毒属,分为 I、II 和 III 3 个群,其中 I 群禽腺病毒(fowl adenovirus group I, FAdV-I)具有共同的群抗原,依据其分子结构特征分为 5 个群(A~E)、12 个血清型^[1-2]。FAV 急性感染主要表现为包涵体肝炎、心包积液及肌胃糜烂等症状^[3]。该病多发于肉鸡、肉杂鸡,近期也开始感染产蛋鸡的育成鸡,并且育成鸡发病死亡率还比较高。2018 年 11 月山东某蛋鸡场发生的疑似禽腺病毒感染鸡群,临床表现为心脏包膜中有淡黄色液体,肝脏表面有出血点,经实验室病毒分离与鉴定为血清 4 型禽腺病毒感染。分离到的病毒对 SPF 鸡的临床致死率很高,表现症状典型。

1 材料与方法

1.1 病料信息

病料来源于山东省某蛋鸡场,80 日龄海兰蛋鸡,剖检疑似禽腺病毒感染,无菌采集具有典型病变的肝、脾、肾等组织用于病毒分离。

1.2 试验材料

SPF 鸡胚购自北京梅里亚维通实验动物技术有限公司,由国药集团扬州威克生物工程有限公司实验室孵化及饲养。

DNA 提取纯化试剂盒购自上海凯杰公司,2 × Easy TaqSuperMix,普通琼脂糖凝胶购自北京全式金生物技术有限公司,DL 2000 DNA Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司,根据 GenBank 中 I 群禽腺病毒的 *Hexom* 基因序列保守区,设计合成引物,F: 5′-AATTTTCGACCCCATGACGCCAGG-3′; R: 5′-TGGCGAAAGGCGTACGGAAGTAAGC-3′,引物由华大基因公司合成,其他试剂均为国产试剂。

收稿日期:2019-01-29

作者简介:史荣华(1987—),男,江苏泰州人,硕士研究生,主要从事病毒免疫学研究。E-mail:692745288@qq.com。

学杂志,2009,21(1):90-92.

[4]米建华,于 波,王光宝. EMB 琼脂中伊红美蓝适宜配比的选择[J]. 微生物学通报,1982,9(5):233-235.

[5]杨更发,魏兰芬,许 激,等. 沙门氏菌-志贺氏菌培养基的质量研究[J]. 预防医学情报杂志,2000(1):54-55.

[6]李明珠,李 辉,王 丹. 乳饮品中耐胃酸乳酸菌的分离鉴定与筛选[J]. 中国酿造,2014,33(9):42-44.

[7]李圣杰,丁 轲,姜芳芳,等. 鸡源高产淀粉酶丁酸梭菌的分离鉴

定[J]. 中国畜牧兽医,2015,42(11):3073-3079.

[8]万荣峰,江善祥. 3 株乳酸菌体外拮抗致病性大肠杆菌试验[J]. 畜牧与兽医,2007,39(3):50-52.

[9]陈 丹,宋振辉,秦定红,等. 一株干酪乳杆菌的分离鉴定及其对禽致病性大肠杆菌的拮抗作用[J]. 畜牧与兽医,2017,49(12):83-86.

[10]谢树贵,戴 青,赵述森,等. 酒窖底泥中丁酸梭菌的分离及其特性研究[J]. 微生物学通报,2007,34(6):1047-1051.