

产肠毒素性大肠杆菌 K88 的致病特性 及其益生菌的筛选

张赛群¹,朱红梅¹,周涵韬¹,黄素芳²,刘波^{2*}

(1. 厦门大学 生命科学学院,福建 厦门 361005;
2. 福建省农业科学院 农业生物资源研究所,福建 福州 350003)

摘要: 在获得绿色荧光蛋白(GFP)标记的菌株 K88-GFP 并证明其与 K88 具有遗传同质性的基础上,以 K88-GFP 为致病菌,腹腔注射侵染小鼠,在不同时间进行眼球采血,测定血液生理生化指标,并采取不同器官或组织,培养后利用紫外光激发 K88-GFP 的绿色荧光,观察计数这种产肠毒素性大肠杆菌(ETEC)在小鼠体内的分布。同时通过体外抑制和活体饲喂试验,进行了益生菌的筛选。结果证实,ETEC 致病菌具有较强的侵袭性,它可以侵袭小鼠肝、肾、心、肺及脑、肌肉等器官和组织,尤其可对肝、肾造成严重的损伤;筛选得到益生菌株 PB J K-2,在体内外均对 K88 具有较好的抑制作用。

关键词: 产肠毒素性大肠杆菌;K88;K88-GFP;致病特性;益生菌

Pathological characteristics of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 and screening of its probiotics

ZHANG Sai-qun¹, ZHU Hong-mei¹, ZHOU Han-tao¹, HUANG Su-fang², LIU Bo²

(1. College of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Institute of Agricultural Biology Resources, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China)

Abstract: Healthy Kunming mice were infected with *Escherichia coli* strain K88-GFP, which was marked with green fluorescence protein (GFP) gene and shared homology with enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) K88, by intraperitoneal injection. Eyeball blood of the infected mice was sampled and the standard blood biochemical indexes were determined at different moment post-injection. Different organs and tissues of the mice-killed at different time points post-injection were sampled and cultured. Then, the distribution of the ETEC in the mice was observed by ultraviolet radiating of the green florescence of K88-GFP clones. Probiotics were screened by using inhibition test *in vitro* and mice feeding test *in vivo*. The results showed that the ETEC was invasive, and could infect murine liver, kidney, heart, lung, brain and muscles but damage seriously the liver and kidney. Probiotics strain PB J K-2 was selected and proved to suppress the pathogeny K88 well *in vivo* and *in vitro*.

Key words: enterotoxigenic *Escherichia coli*; K88; K88-GFP; pathological characteristics; probiotics

产肠毒素性大肠杆菌(enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC)是一类引起人和幼畜(初生仔猪、犊牛、羔羊)腹泻的重要病原菌。初生幼畜感染 ETEC 后,常因剧烈水样腹泻和迅速脱水而死亡,发

病率和死亡率均很高,给养殖业带来了严重的经济损失。

一般认为,ETEC 属于非侵袭性致病菌,但现在已经有一些试验表明该菌具有侵袭性^[1-2]。另外,在

收稿日期: 2007-11-06; 修回日期: 2008-02-18

基金项目: 福建省青年科技人才创新计划项目(2005J064)

作者简介: 张赛群(1973-),女,湖北汉川人,讲师,博士, E-mail: saiqun-zh@163.com。*通讯作者,研究方向为植物保护, E-mail: fzliubo@163.com

感染动物中也发现 ETEC 所致腹泻有的表现血便^[3-5]。因而对 ETEC 的致病特性尚需进一步研究,这对于揭示其致病机理,提高防治水平尤其是提高疫苗研制水平具有重要的意义。同时,筛选益生菌(probiotics)对 ETEC 致病菌进行安全有效的防治也是目前的一个研究热点。益生菌作为一种活菌制剂,具有调节动物体内微生态平衡、提高机体免疫力、促进消化、提高饲料利用率等多方面的优点,与在饲料中添加抗生素或利用疫苗^[6]防治 ETEC 相比,具有多方面的优势,对畜牧业发展具有重要意义^[7]。因此,笔者以本课题组现有的大量菌种资源为依托,同时进行了 K88 益生菌的筛选。

1 材料与方法

1.1 实验动物

18~20 g 健康昆明小鼠,购自福建医科大学动物中心。

1.2 菌株

鸡大肠杆菌、沙门菌由福建省农业科学院畜牧兽医研究所提供;PB JK-2 等 110 个菌株由福建省农业科学院生物所生物农药研究中心从土壤中分离并保存;产肠毒素性大肠杆菌 K88、K88-绿色荧光蛋白(GFP)由厦门大学生命科学学院保存。

1.3 ETEC 感染小鼠致病模型的建立

取 10 μ L K88-GFP 甘油保存液接入 LB 液体培养基中(装量为 25 mL/250 mL 三角瓶),置于 37 $^{\circ}$ C、150 r/min 恒温摇床培养 24 h 后计数菌体。采用梯度稀释法将菌液做 1:20、1:30、1:50、1:100 稀释。

取 18~20 g 健康雌鼠随机分组,每组 10 只。吸取 1 mL 稀释菌液给小鼠腹腔注射,对照组腹腔注射等量的无菌水。观察死亡情况,统计死亡率。根据概论单位法用 DPSS 软件统计分析半数致死量(LD₅₀)。

1.4 ETEC 对小鼠的感染途径

取上述 K88-GFP 菌株 1:10 稀释液 1 mL,给小鼠腹腔注射。对照组腹腔注射等量的无菌水。每隔 2 h 解剖小鼠,无菌采取肝、肺、心、肾、肠的上部(近胃端)、肠的中部、肠的下部(近大肠端)、胃、肌肉、脑等组织样品,称重后分别置于灭菌研钵中加入 5 mL 灭菌生理盐水充分研磨成悬液。将每个样品的悬浮液按 1:10、1:100、1:1000 稀释后,分别取 100 μ L 稀释液涂布到 LB + Ara (6 mg/mL) + Amp (100 μ g/mL) 筛选培养基上。另外,用无菌注射器进行心脏采血或断尾采血,涂布到上述筛选培

培养基上,检测致病菌是否进入血液。所有筛选平板均于 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h,然后用紫外光激发使 K88-GFP 菌落发出绿色荧光,观察并计数荧光菌落数目。

1.5 ETEC 感染小鼠的血液生理生化分析

将小鼠随机分组,每组 18 只。取 1 mL 不同稀释度(1:10, 1:40, 1:70, 1:100)的菌液给小鼠腹腔注射。对照组腹腔注射等量的无菌水。每隔 2 h 眼球采血,每组 3 只。采血后,立即取 20 μ L 未凝固的血,加入到 500 μ L EDTA K2 抗凝剂中,用 Sysmex KX-21N 血球计数仪分析红细胞(RBC)、红细胞压积(HCT)、平均红细胞体积(MCV)、红细胞分布宽度 SD(RDW-SD)、红细胞分布宽度 CV(RDW-CV)、血红蛋白(HGB)、平均血红蛋白量(MCH)、平均血红蛋白浓度(MCHC);白细胞(WBC)、淋巴细胞数(W-SCC)、中间细胞数(W-MCC)、中性粒细胞数(W-LCC)、淋巴细胞百分比(W-SCR)、中间细胞百分比(W-MCR)、中性粒细胞百分比(W-LCR);血小板(PLT)、血小板分布宽度(PDW)、血小板平均体积(MPV)、大血小板比率(P-LCR)等血常规指标。剩余的血液静置凝固后离心,取血清检测谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶/谷草转氨酶(ALT/AST)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TCHO)、尿素氮(BUN)、尿酸(UA)等生化指标。所有血液样本均由福建省中医学院国医堂检验科检测。所有数据均采用 DPSS 软件进行统计分析,通过 *t* 检验进行差异显著性分析。

1.6 益生菌 PB JK-2 的筛选及鉴定

采用平板对峙法进行初筛,并用琼脂扩散法复筛。筛选得到的益生菌根据培养特征、形态特征、生理生化特征^[8]及 16 S rDNA 序列分析^[9]、脂肪酸测定(利用美国 Midi 公司生产的 shellock 微生物鉴定系统)进行分类确认。

16 S rDNA 的 PCR 扩增引物为: Pf (+): 5'-GGTTAA GTCCCGCAACGA GCGC-3', Pr (-): 5'-AGGAGGTGA TCCAACCGCA-3'。PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。

1.7 益生菌 PB JK-2 对 K88 的抑制作用

采用琼脂扩散法在体外筛选益生菌 PB JK-2 对 K88 的最佳抑制条件。取平均体重为 20 g 的小鼠 100 只,随机分为 10 组,5 个处理组,5 个对照组,每组 10 只,处理组每只小鼠腹腔注射 PB JK-2 发酵液的 1:4 稀释液 1 mL,对照组小鼠腹腔注射 PB JK-2 的液体培养基 1 mL。48 h 以后分别再腹腔注射

1 10、1 18、1 32、1 56、1 100 稀释的 K88-GFP 菌液(根据毒性试验设计要求,在全致死及完全不致死的剂量浓度内按等比梯度设计毒性试验浓度范围)1 mL。观察 48 h 内小鼠的死亡情况。

2 结果与分析

2.1 K88-GFP 培养液的菌体计数

K88-GFP24 培养 24 h 后的菌液浓度为 23.81×10^9 CFU/mL。

2.2 ETEC 感染小鼠致病模型的建立

小鼠感染 ETEC 后,表现不活跃,精神抑郁,采食量减少,体重急剧下降,同时伴有倒毛,高浓度组还出现血尿、后肢瘫痪等症状。死亡率的高低与菌液浓度呈正比;在感染初期的 12 h 内,用 1 20 稀释液和 1 30 稀释液攻毒的小鼠急剧死亡,导致死亡率迅速上升;12 h 后小鼠死亡速度明显变缓,死亡率也逐渐趋向稳定。一般小鼠若能度过 48 h 危险期则不会死亡。

K88-GFP 的 LD_{50} 为 4.86×10^8 CFU/只,半数死亡时间为 12 h。

2.3 ETEC 对小鼠的感染途径

ETEC 感染小鼠的脑、肝、肾、胃、肠上部(近胃端)在 3 个时间点采取的样本发现绿色荧光的 K88-GFP 菌株;心、肠中部在 0 h 未检测到致病菌,在 2 h 和 4 h 均有致病菌;肌肉样本在 0 h 和 4 h 未检测到致病菌,2 h 检测到致病菌;肺样本在 0 h 和 4 h 未检测到致病菌,2 h 有菌的定植。而对照组小鼠各器官中均无 K88-GFP 分布。另外,感染小鼠的血液中也发现了少量 K88-GFP。

从菌落数/器官鲜重的比值来看,各器官中分布最多的是肝、肾;心、肺、肠上部分布比较多;脑、肌肉、胃、肠中部分布比较少;肠下部没有分布。

2.4 ETEC 感染小鼠的血常规分析

ETEC 感染小鼠后导致小鼠血液中 RBC、WBC 等生理指标发生变化(见表 1)。差异显著性分析结果表明,ETEC 对小鼠的红细胞及相关指标影响不大,但对小鼠的白细胞及相关指标影响较大,对小鼠的血小板及相关指标的影响次之。

2.5 ETEC 感染小鼠的血液生化分析

ETEC 感染小鼠后导致小鼠血液中 ALT、AST 等生化指标发生变化(见表 2)。差异显著分析结果表明,ALT、AST 以及 BUN、UA 指标变化显著,表明 K88 对小鼠肝、肾有较大的伤害。

2.6 益生菌 PB JK2 的筛选和鉴定

用平板对峙培养法对福建省生物资源库中现有

的包括 PB JK2 菌株在内的 110 种细菌进行了初筛,找到 7 株能对 K88、鸡大肠杆菌、沙门菌产生对峙作用的菌株,然后通过琼脂扩散法复筛发现只有 PB JK2 能对这 3 种靶标菌株产生抑菌圈。经对 PB JK2 根据培养特征、形态特征、生理生化特征、16 S rDNA 序列分析及脂肪酸测定进行分类确认,证实 PB JK2 为一种短短芽孢杆菌(*Brevibacillus brevis*)。

2.7 PB JK2 对感染 K88-GFP 的小鼠模型的疾病控制作用

体外试验发现,PB JK2 发酵 48 h 后对 K88 具有较好的抑制效果。因此,活体试验中处理组采用先腹腔注射 PB JK2,48 h 后再感染 K88;对照组则先腹腔注射培养液,48 h 后再感染 K88。试验发现,处理组小鼠在感染 K88 后的 48 h 内死亡率少于对照组,在 12 h 内,1 10、1 18、1 32、1 56、1 100 稀释菌液各处理组小鼠均未死亡,而相应对照组的死亡率分别为 70%、60%、50%、0、0;在 24 h 内,各处理组的死亡率分别为 40%、10%、10%、0、0,而相应对照组的死亡率分别为 80%、60%、50%、0、0。经计算,48 h 内对照组的 LD_{50} 为 7.85×10^8 CFU/只,处理组的 LD_{50} 为 10.53×10^8 CFU/只。

3 讨论

3.1 应用 K88-GFP 的优势

目前,一般采用以下几种方法研究 ETEC 在动物体内的定植。Jones 等^[10]和 Hornich 等^[11]用无菌仔猪研究了 K88 在肠道的黏附与定植,以排除其他菌的干扰;还可根据菌株的溶血、黏附特征采取荧光抗体标记的抗血清凝集反应或单克隆抗体技术鉴定攻毒菌株^[12-13]或根据生理、生化特征来鉴定分离菌株^[4]。上述方法操作起来都比较复杂,近年来,应用 GFP 标记法进行宿主和病原菌相互作用的研究已有报道。Valdivia 等^[14]利用 GFP 研究了鼠伤寒沙门菌(*Salmonella typhimurium*)等 3 种病原菌与哺乳动物细胞的相互作用,国内邝哲师等^[15]报道,用 GFP 标记芽孢杆菌,研究其在仔猪和雏鸡体内的动态分布。通过 GFP 标记特定致病菌,可以排除动物体内复杂的生态环境的干扰,因此,可以在自然生活的动物体上进行试验,而且操作简便,灵敏度高。

本研究所利用的 K88-GFP 标记菌株,已经通过遗传背景、血清学检测、培养特性、致病性等相关分析,证明其与 K88 具有几乎一致的特性^[16]。因此,本研究得到的 K88-GFP 的致病机理可以视作与 K88 的致病机理相同。同时本研究发现,K88-GFP

表 1 不同稀释度 K88-GFP 感染小鼠的血常规分析

Table 1 Blood normal analysis of mice infected by different dilutions of K88-GFP

感染后时间 Time post-infection	稀释度 Dilutions	RBC/ (10 ¹² ·L ⁻¹)	HCT/ %	MCV/fL	RDW-SD/fL	RDW-CV/ %	HGB/ (g ·L ⁻¹)
Hour 0.5	1 1	7.00 ±0.60 ^a	37.00 ±13.88 ^a	52.73 ±0.75 ^a	33.27 ±3.55 ^a	17.03 ±2.34 ^a	112.33 ±40.38 ^a
	1 100	6.94 ±0.37 ^a	36.87 ±2.31 ^a	53.10 ±0.56 ^a	38.90 ±7.20 ^a	20.33 ±4.84 ^a	110.33 ±6.51 ^a
	1 70	6.73 ±1.10 ^a	35.33 ±5.37 ^a	52.53 ±0.67 ^a	37.80 ±4.39 ^a	20.17 ±3.74 ^a	104.67 ±15.31 ^a
	1 40	7.41 ±0.24 ^a	40.10 ±1.59 ^a	54.17 ±1.40 ^a	35.30 ±6.93 ^a	17.33 ±4.40 ^a	120.67 ±3.21 ^a
Hour 2	1 10	7.29 ±0.73 ^a	39.17 ±5.15 ^a	53.60 ±1.85 ^a	33.77 ±1.72 ^a	16.63 ±1.97 ^a	116.70 ±14.20 ^a
	1 1	6.79 ±1.48 ^{ab}	35.77 ±7.66 ^{ab}	52.70 ±1.04 ^a	33.80 ±2.52 ^a	17.47 ±2.40 ^{ab}	111.30 ±22.00 ^{ab}
	1 100	8.25 ±1.21 ^a	44.00 ±6.42 ^a	53.37 ±1.18 ^a	33.83 ±3.09 ^a	17.87 ±1.24 ^{ab}	134.00 ±18.68 ^a
	1 70	5.26 ±1.67 ^b	27.80 ±8.67 ^b	52.93 ±0.67 ^a	32.40 ±0.53 ^a	16.00 ±0.66 ^b	88.67 ±27.15 ^b
Hour 4	1 40	7.25 ±0.77 ^{ab}	38.57 ±3.43 ^{ab}	53.33 ±3.53 ^a	33.97 ±2.84 ^a	17.87 ±3.01 ^{ab}	120.00 ±9.54 ^{ab}
	1 10	8.31 ±0.75 ^a	44.17 ±3.40 ^a	53.17 ±1.68 ^a	38.70 ±7.73 ^a	21.47 ±4.31 ^a	132.67 ±9.29 ^a
	1 1	7.43 ±0.26 ^a	40.83 ±0.75 ^a	54.97 ±1.00 ^a	37.40 ±6.43 ^a	18.47 ±4.67 ^a	121.00 ±3.46 ^a
	1 100	6.81 ±0.40 ^a	36.00 ±3.27 ^a	52.93 ±4.31 ^a	35.20 ±3.31 ^a	18.70 ±5.01 ^a	107.67 ±14.84 ^a
Hour 6	1 70	7.76 ±0.71 ^a	42.03 ±4.97 ^a	54.07 ±2.24 ^a	33.80 ±3.72 ^a	16.43 ±1.72 ^a	126.33 ±13.32 ^a
	1 40	6.23 ±0.80 ^a	34.57 ±3.58 ^a	55.57 ±1.72 ^a	38.57 ±6.27 ^a	18.77 ±3.37 ^a	103.33 ±8.39 ^a
	1 10	7.26 ±0.08 ^a	38.53 ±12.30 ^a	52.80 ±2.18 ^a	38.93 ±4.83 ^a	21.73 ±2.06 ^a	115.67 ±34.50 ^a
	1 1	7.99 ±0.45 ^A	42.30 ±2.26 ^A	52.97 ±0.47 ^A	38.80 ±5.46 ^A	20.67 ±3.02 ^a	120.30 ±7.57 ^A
Hour 6	1 100	6.47 ±0.52 ^B	33.77 ±2.82 ^B	52.17 ±0.38 ^A	41.00 ±7.03 ^a	22.20 ±4.82 ^a	101.33 ±8.96 ^{AB}
	1 70	6.25 ±0.56 ^{BC}	31.00 ±3.10 ^{BC}	49.55 ±0.55 ^B	35.25 ±0.65 ^a	19.55 ±0.55 ^a	95.50 ±7.50 ^B
	1 40	5.67 ±1.37 ^{BC}	28.90 ±6.20 ^{BC}	51.23 ±2.05 ^{AB}	37.30 ±6.32 ^a	20.23 ±3.11 ^a	87.67 ±18.58 ^B
	1 10	5.05 ±0.85 ^C	27.13 ±5.28 ^C	53.63 ±2.12 ^A	36.70 ±3.58 ^a	18.43 ±3.29 ^a	83.00 ±17.00 ^B

感染后时间 Time post-infection	稀释度 Dilutions	MCH/ pg	MCHC/ (g ·L ⁻¹)	WBC/ (10 ⁹ ·L ⁻¹)	W-SCC/ (10 ⁹ ·L ⁻¹)	W-MCC/ (10 ⁹ ·L ⁻¹)	W-LCC/ (10 ⁹ ·L ⁻¹)
Hour 0.5	1 1	16.10 ±0.36 ^a	305.33 ±6.03 ^a	3.47 ±1.29 ^a	2.43 ±0.99 ^a	0.13 ±0.06 ^a	0.90 ±0.26 ^A
	1 100	15.93 ±0.40 ^a	299.33 ±8.96 ^a	3.10 ±0.96 ^a	2.77 ±0.92 ^a	0.10 ^{ab}	0.23 ±0.15 ^B
	1 70	15.60 ±0.36 ^a	296.67 ±5.13 ^a	1.87 ±0.55 ^a	1.53 ±0.49 ^a	0.03 ±0.06 ^b	0.30 ±0.10 ^B
	1 40	16.37 ±0.12 ^a	301.33 ±7.51 ^a	2.50 ±1.25 ^a	2.07 ±1.22 ^a	0.10 ^{ab}	0.33 ±0.15 ^B
Hour 2	1 10	15.97 ±0.40 ^a	298.30 ±3.51 ^a	2.50 ±0.46 ^a	2.10 ±0.36 ^a	0.10 ^{ab}	0.30 ±0.10 ^B
	1 1	16.43 ±0.85 ^a	312.00 ±10.1 ^{ab}	4.47 ±0.95 ^A	2.57 ±0.59 ^a	0.17 ±0.06 ^a	1.73 ±0.41 ^A
	1 100	16.27 ±0.25 ^a	304.67 ±3.21 ^{ab}	1.40 ±0.30 ^B	1.10 ±0.26 ^b	0.10 ^a	0.20 ±0.10 ^B
	1 70	16.90 ±0.72 ^a	319.00 ±10.15 ^a	1.30 ±0.10 ^B	0.80 ±0.56 ^b	0.10 ^a	0.40 ±0.53 ^B
Hour 4	1 40	16.63 ±1.50 ^a	311.33 ±9.61 ^{ab}	1.83 ±0.51 ^B	1.43 ±0.49 ^{ab}	0.10 ^a	0.30 ±0.10 ^B
	1 10	16.00 ±0.61 ^a	300.33 ±2.08 ^b	1.60 ±0.53 ^B	1.03 ±0.81 ^b	0.13 ±0.06 ^a	0.43 ±0.23 ^B
	1 1	16.27 ±0.40 ^a	296.33 ±7.09 ^a	4.50 ±0.26 ^A	3.03 ±0.40 ^A	0.23 ±0.06 ^A	1.23 ±0.25 ^a
	1 100	15.83 ±2.01 ^a	298.33 ±14.01 ^a	1.50 ±0.46 ^B	0.63 ±0.83 ^B	0.13 ±0.06 ^B	0.73 ±0.50 ^{ab}
Hour 6	1 70	16.27 ±0.55 ^a	301.00 ±4.35 ^a	1.30 ±0.26 ^B	0.97 ±0.20 ^B	0.10 ^B	0.23 ±0.15 ^b
	1 40	16.63 ±0.76 ^a	299.67 ±6.81 ^a	1.83 ±1.04 ^B	1.17 ±1.27 ^B	0.13 ±0.06 ^B	0.53 ±0.49 ^{ab}
	1 10	15.90 ±0.46 ^a	301.67 ±7.02 ^a	1.90 ±0.70 ^B	1.43 ±0.64 ^B	0.10 ^B	0.37 ±0.12 ^b
	1 1	15.07 ±0.32 ^b	284.30 ±4.62 ^B	3.30 ±0.56 ^a	2.67 ±0.51 ^a	0.10 ^a	0.53 ±0.06 ^a
Hour 6	1 100	15.67 ±0.21 ^{ab}	299.67 ±4.62 ^A	2.10 ±1.21 ^a	1.30 ±0.85 ^a	0.13 ±0.06 ^a	0.67 ±0.31 ^a
	1 70	15.30 ±0.20 ^{ab}	308.50 ±6.50 ^A	1.85 ±0.65 ^a	1.30 ±0.60 ^a	0.10 ^a	0.45 ±0.05 ^a
	1 40	15.57 ±0.67 ^{ab}	303.67 ±1.15 ^A	3.90 ±2.81 ^a	3.43 ±2.70 ^a	0.10 ^a	0.37 ±0.15 ^a
	1 10	16.40 ±1.08 ^a	305.33 ±8.02 ^A	3.63 ±2.19 ^a	2.97 ±2.12 ^a	0.10 ^a	0.57 ±0.25 ^a

感染后时间 Time post-infection	稀释度 Dilutions	W-SCR/ %	W-MCR/ %	W-LCR/ %	PL T/ (10 ⁹ ·L ⁻¹)	PDW/fL	MPV/fL	P-LCR/ %
Hour 0.5	1 1	69.13 ±2.73 ^A	4.67 ±1.10 ^a	26.20 ±1.66 ^A	701.3 ±498.6 ^a	6.67 ±0.31 ^a	5.90 ±0.10 ^b	3.03 ±0.15 ^b
	1 100	88.23 ±4.67 ^B	2.50 ±0.26 ^b	9.27 ±4.54 ^B	658.3 ±271.8 ^a	6.93 ±0.32 ^a	6.30 ±0.26 ^a	4.87 ±1.50 ^a
	1 70	82.17 ±0.91 ^B	2.93 ±1.20 ^{ab}	14.90 ±0.35 ^B	575.3 ±84.9 ^a	7.20 ±0.17 ^a	6.20 ^{ab}	4.27 ±0.97 ^{ab}
	1 40	81.67 ±6.98 ^B	3.57 ±0.91 ^{ab}	14.77 ±6.20 ^B	808.7 ±42.4 ^a	6.63 ±0.32 ^a	6.03 ±0.12 ^{ab}	3.53 ±1.05 ^{ab}
Hour 2	1 10	83.20 ±1.87 ^B	4.37 ±1.07 ^{ab}	12.43 ±1.13 ^B	650.3 ±20.2 ^a	6.83 ±0.32 ^a	6.10 ±0.17 ^{ab}	3.57 ±0.29 ^{ab}
	1 1	57.13 ±1.02 ^a	4.30 ±0.17 ^a	38.57 ±4.18 ^a	799.0 ±79.1 ^A	6.53 ±0.31 ^A	5.87 ±0.15 ^b	4.00 ±0.44 ^a
	1 100	79.13 ±4.21 ^a	4.93 ±0.15 ^a	15.93 ±4.25 ^a	589.7 ±117.6 ^{AB}	6.77 ±0.06 ^B	5.83 ±0.06 ^b	4.03 ±0.99 ^a
	1 70	61.23 ±39.90 ^a	6.03 ±2.58 ^a	32.73 ±37.34 ^a	299.0 ±80.7 ^C	6.80 ±0.46 ^B	6.07 ±0.32 ^{ab}	4.63 ±0.99 ^a
Hour 4	1 40	77.63 ±5.71 ^a	3.40 ±0.79 ^a	18.97 ±5.73 ^a	401.3 ±44.6 ^{BC}	6.97 ±0.15 ^B	6.03 ±0.15 ^{ab}	3.73 ±1.16 ^a
	1 10	56.17 ±42.93 ^a	9.43 ±9.24 ^a	34.40 ±33.70 ^a	265.0 ±231.2 ^C	9.40 ±1.32 ^B	6.50 ±0.50 ^a	4.77 ±4.16 ^a
	1 1	67.30 ±7.35 ^a	5.03 ±1.07 ^a	27.67 ±6.43 ^a	895.7 ±54.2 ^A	6.93 ±0.32 ^a	6.17 ±0.15 ^a	3.90 ±0.61 ^a
	1 100	35.43 ±42.39 ^a	8.63 ±5.10 ^a	55.93 ±39.31 ^a	558.3 ±209.8 ^B	6.73 ±0.11 ^a	6.00 ±0.10 ^a	3.57 ±1.27 ^a
Hour 6	1 70	77.83 ±10.01 ^a	4.40 ±0.98 ^a	17.77 ±10.36 ^a	380.3 ±10.1 ^{BC}	6.87 ±0.45 ^a	6.30 ±0.26 ^a	5.77 ±1.04 ^a
	1 40	55.83 ±37.76 ^a	8.00 ±5.70 ^a	36.69 ±32.70 ^a	243.3 ±176.9 ^C	7.83 ±1.23 ^a	6.73 ±0.92 ^a	5.93 ±3.23 ^a
	1 10	72.30 ±10.89 ^a	4.43 ±1.25 ^a	23.27 ±9.97 ^a	194.7 ±175.3 ^C	8.00 ±3.72 ^a	7.93 ±2.41 ^a	12.37 ±10.76 ^a
	1 1	80.00 ±3.02 ^a	3.20 ±0.35 ^a	16.80 ±2.75 ^{BC}	828.7 ±149.1 ^A	6.77 ±0.06 ^a	6.00 ±0.17 ^a	3.00 ±1.11 ^a
Hour 6	1 100	58.07 ±10.28 ^b	6.47 ±1.68 ^a	35.47 ±8.60 ^A	334.7 ±108.6 ^B	7.80 ±1.66 ^a	6.20 ±0.30 ^a	3.47 ±1.07 ^a
	1 70	66.25 ±8.45 ^{ab}	4.00 ±1.56 ^a	29.30 ±7.10 ^{AB}	268.0 ±120.0 ^B	7.70 ±0.60 ^a	6.15 ±0.05 ^a	3.25 ±0.55 ^a
	1 40	83.27 ±10.29 ^a	3.57 ±3.75 ^a	13.17 ±7.00 ^C	179.0 ±109.3 ^B	9.73 ±1.74 ^a	6.77 ±0.61 ^a	5.47 ±2.68 ^a
	1 10	79.10 ±9.33 ^a	2.60 ±1.31 ^a	18.30 ±8.51 ^{BC}	190.7 ±173.4 ^B	9.53 ±2.08 ^a	6.50 ±0.30 ^a	5.20 ±0.76 ^a

同一时间,同一行内标有不同小写字母的均数之间差异显著 ($P < 0.05$),标有不同大写字母的均数之间差异极显著 ($P < 0.01$),下表同
 At the same time, the difference between data with the different small letters within a line is significant ($P < 0.05$) and the difference between data with the different capital letters is very significant difference ($P < 0.01$). The same as follows

表 2 不同稀释度 K88-GFP 感染小鼠的血液生化分析

Table 2 Analysis of biochemical substances in serum of mice infected by different dilutions of K88-GFP

感染后时间 Time post-infection	稀释度 Dilutions	ALT/ (U · L ⁻¹)	AST/ (U · L ⁻¹)	AST/ALT	TG/ (mmol · L ⁻¹)	TCHO/ (mmol · L ⁻¹)	BUN/ (mmol · L ⁻¹)	UA/ (mmol · L ⁻¹)
Hour 0.5	1 1	63.33 ±12.74 ^B	151.33 ±25.14 ^b	2.43 ±0.50 ^{ab}	0.77 ±0.36 ^a	1.60 ±0.27 ^a	5.61 ±0.67 ^{ABC}	164.00 ±34.12 ^a
	1 100	78.67 ±37.10 ^B	236.00 ±98.40 ^a	3.14 ±0.89 ^a	0.87 ±0.35 ^a	1.92 ±0.22 ^a	6.37 ±0.40 ^A	176.33 ±27.60 ^a
	1 70	65.00 ±20.81 ^B	121.33 ±16.86 ^b	1.97 ±0.45 ^{ab}	0.84 ±0.22 ^a	1.96 ±0.05 ^a	6.20 ±0.56 ^{AB}	148.67 ±23.63 ^a
	1 40	127.67 ±16.87 ^A	176.33 ±9.07 ^{ab}	1.40 ±0.21 ^b	0.75 ±0.35 ^a	1.94 ±0.48 ^a	4.60 ±0.76 ^C	153.67 ±8.14 ^a
	1 10	57.67 ±6.51 ^B	151.00 ±41.40 ^b	2.62 ±0.69 ^{ab}	0.47 ±0.03 ^a	2.00 ±0.58 ^a	5.20 ±0.10 ^{BC}	139.30 ±15.80 ^a
Hour 2	1 1	75.67 ±22.30 ^B	174.30 ±33.00 ^b	2.37 ±0.49 ^{BC}	0.59 ±0.18 ^a	1.76 ±0.31 ^a	4.73 ±0.40	119.00 ±26.20
	1 100	63.67 ±32.47 ^B	177.00 ±49.57 ^b	3.04 ±1.07 ^B	0.51 ±0.19 ^a	1.52 ±0.09 ^a	5.05 ±1.48	166.00 ±80.60
	1 70	167.67 ±61.78 ^A	328.33 ±139.30 ^a	1.96 ±0.27 ^C	0.59 ±0.08 ^a	1.93 ±0.41 ^a	8.07 ±2.70	154.67 ±25.54
	1 40	70.67 ±12.58 ^B	283.33 ±36.67 ^{ab}	4.09 ±0.92 ^A	0.59 ±0.17 ^a	1.58 ±0.14 ^a	6.20	141.00
	1 10	50.67 ±11.37 ^B	232.33 ±38.99 ^{ab}	4.69 ±0.89 ^A	0.54 ±0.20 ^a	1.91 ±0.20 ^a	7.90	103.00
Hour 4	1 1	66.00 ±1.00 ^b	142.00 ±11.53 ^B	2.15 ±0.16 ^A	0.38 ±0.02 ^a	2.22 ±0.09 ^a	4.43 ±0.45 ^D	121.33 ±9.02 ^B
	1 100	79.33 ±18.77 ^{ab}	170.00 ±7.00 ^B	2.22 ±0.50 ^B	0.35 ±0.13 ^a	1.80 ±0.17 ^a	6.20 ±0.90 ^{CD}	91.50 ±0.50 ^B
	1 70	98.67 ±37.29 ^a	229.00 ±78.94 ^B	2.42 ±0.61 ^B	0.74 ±0.26 ^a	1.76 ±0.21 ^a	7.47 ±1.12 ^{BC}	114.67 ±26.65 ^B
	1 40	92.00 ±0.77 ^{ab}	194.00 ±19.00 ^B	2.12 ±0.18 ^B	0.79 ±0.32 ^a	1.91 ±0.16 ^a	8.97 ±1.16 ^B	86.33 ±8.74 ^B
	1 10	82.00 ±14.73 ^{ab}	451.00 ±99.51 ^A	5.52 ±0.87 ^B	0.79 ±0.42 ^a	1.94 ±0.01 ^a	12.90 ±2.10 ^A	202.00 ±37.80 ^A
Hour 6	1 1	41.00 ±6.08 ^C	128.30 ±12.90 ^C	3.15 ±0.14 ^a	0.45 ±0.14 ^a	1.99 ±0.32 ^a	4.77 ±0.74 ^C	120.00 ±20.10 ^b
	1 100	181.00 ±80.02 ^A	400.00 ±118.90 ^A	2.32 ±0.39 ^a	0.66 ±0.14 ^a	2.01 ±0.29 ^a	11.03 ±1.95 ^B	126.67 ±14.57 ^b
	1 70	83.50 ±19.50 ^{BC}	193.00 ±3.00 ^{BC}	2.40 ±0.62 ^a	0.48 ±0.10 ^a	2.04 ±0.04 ^a	9.90 ±0.90 ^B	140.00 ±21.00 ^b
	1 40	154.67 ±66.98 ^{AB}	301.00 ±68.24 ^{AB}	2.22 ±0.99 ^a	0.48 ±0.34 ^a	1.92 ±0.19 ^a	13.67 ±1.74 ^A	169.33 ±60.80 ^{ab}
	1 10	183.00 ±76.27 ^A	351.00 ±174.40 ^{AB}	2.07 ±1.34 ^a	0.37 ±0.08 ^a	1.82 ±0.15 ^a	14.43 ±0.85 ^A	253.33 ±93.72 ^a

的试验结果比 K88 的试验结果更稳定,重复性更高,这可能是由于感染部位的 K88-GFP 能够借助其 GFP 标记以及和标记偶联的氨苄抗性进行筛选并观察计数,排除了样品中由体内其他微生物导致的干扰的缘故,同时荧光观察计数法更简单方便。

3.2 ETEC 对小鼠的感染途径

一般认为 ETEC 是非侵袭性的,集中分布于肠内,可在小肠的黏膜上定植。而张西云等^[5]在进行猪源溶血性大肠杆菌对小鼠毒力试验时发现,腹腔注射溶血性大肠杆菌引起死亡的小鼠部分表现血尿、血便或鼻孔出血。Kakar 等^[3]研究产肠毒素性大肠杆菌 H10407 及其他 2 种肠道致病菌在小鼠引起肾炎时,发现在肾和尿中,产肠毒素性大肠杆菌的数量最多。于守平等^[4]用鸡病原性大肠杆菌感染小鼠,无菌条件采取肝及心血进行细菌分离培养,均检测到大肠杆菌。

本试验中小鼠感染 ETEC 6 h 后,也发现高浓度组小鼠出现血尿。同时发现在感染后不同时间里,小鼠肝、肾、胃、肠上部、脑、肌肉以及血液中均检测到 K88-GFP。因此可以推断, K88 具有较强的侵袭性,它可能通过消化道或呼吸道黏膜进入血液,引起全身性感染,引发败血症。

3.3 ETEC 感染后小鼠血液生理生化指标变化的意义

在毒理学亚慢性毒性试验中,有关血液生理生化值的分析与测定是反映供试物对实验动物毒性效应的重要判断指标^[17]。

白细胞是机体防御系统的重要组成部分。本研究发 现 K88 对白细胞及相关指标的影响较大。白细胞在 0~6 h 内基本低于 CK 组,这说明 K88 感染对机体造成了较大的伤害。

谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)是肝毒性研究中应用最为广泛的指标。小鼠的 ALT 主要分布于肝、心和小肠,AST 主要分布于肝、心和脑,两者均主要来源于肝,肝中的 AST 水平要高于 ALT 水平。在对肝坏死的分析中,血清 ALT 的来源具有肝特异性,而 AST 并非肝坏死的特异指标^[17],研究表明,ALT、AST 的平行增加提示肝坏死^[18]。本试验结果表明,在 0.5~6 h 时各试验组小鼠的 ALT、AST 比对照组小鼠显著升高,1 70 稀释的 K88-GFP 菌液注射小鼠的 ALT 比对照升高了 1 倍,1 100 和 1 10 稀释液注射小鼠的 ALT 比对照升高了 3 倍;1 70 稀释液注射小鼠的 AST 比对照升高 0.5 倍,1 100 稀释液注射小鼠的 AST 比对照升高了 2 倍,说明 ETEC 可严重影响小鼠的肝功能。

BUN 和 UA 是常用的反映肾小球滤过功能的重要检测指标,当肾发生各种病变,正常的排泄功能遭到破坏时,即引起血液 BUN、UA 浓度增高。在本试验中由于第 2 h 的试验数据不足,未能进行统计学分析;第 4 h 采样分析发现 1 10、1 40、1 70 稀释液感染的小鼠其 BUN 值与对照相比均极显著升高($P < 0.01$);第 6 h 时,各个稀释倍数菌液感染的小鼠其 BUN 值与对照相比均极显著升高($P <$

0.01)。而且从分析结果可见,ETEC 的侵染浓度与 BUN 值的变化呈正相关。同时,高浓度的 ETEC 侵染时,还会导致 UA 值明显上升,在第 4 h 和 6 h 时分别与对照差异极显著 ($P < 0.01$) 和显著 ($P < 0.05$)。这说明 ETEC 对小鼠的肾功能有严重影响,这与采血时发现第 4 h、第 6 h 注射高浓度 K88-GFP 菌液的小白鼠出现血尿的症状相符。

从血液生化指标的分析结果可以看到, K88 对动物肝、肾功能指标的影响较大,而这与感染后对各脏器 K88 计数发现在肝、肾中的数量最多的结果相符合。

目前,对 K88 等 ETEC 致病菌致病的分子机理已经进行了较为深入的研究,但主要集中在毒素的肠内受体及相互作用方面^[19],本研究结果可为 ETEC 致病分子机理的研究提供新方向和思路。

3.4 建立 ETEC 小鼠攻毒模型的意义

K88 病原对不同动物的致病特性和引起的全身性变化并不完全相同,但目前多以小鼠为实验动物建立 ETEC 攻毒模型^[5,10,20]。本研究以小鼠为实验动物所建立的 K88 攻毒模型所获得的研究结果对揭示 K88 的致病机理能提供较好的帮助。另一方面,本研究首次采用解剖分析致病菌在不同器官的分布特点与血液分析相结合的方法,而且两者的试验结果得到了相互印证,较为确切地说明了 K88 的侵袭性及导致动物死亡的原因。

3.5 益生菌 PB JK2 的应用前景

本研究筛选得到的益生菌 PB JK2 为短短芽孢杆菌,属芽孢杆菌属。芽孢杆菌在抑制动物病原细菌、维持和调整肠道微生态平衡中的作用已有报道^[21-24]。本研究筛选得到的益生菌 PB JK2,有望为益生菌家族添加新的资源,对动物疾病防治具有指导作用。但是对其使用技术尚需进行进一步研究。如本试验研究发现,PB JK2 的发酵时间会影响其抑菌活性,同时也发现先接种致病菌,24 h 后再接种芽孢杆菌则无抑菌作用。其中的机理尚需进一步探讨,而在实践中作为产品开发与应用时,也需充分考虑发酵时间的影响及应用方法。另外本研究中,益生菌 PB JK2 被证明对感染 K88 的小鼠模型的疾病控制有较好的作用,研究还发现,低浓度的 K88-GFP 处理对照组不致死,而 PB JK2 处理组中有 20% 小鼠死亡。因此推测,PB JK2 可能也具有低毒力,在开发产品时应考虑与其他益生菌的相互作用,更好地发挥益生效果。

参考文献(References)

[1] ELSINGHORST E A, KOPECKO D J. Molecular cloning of

- epithelial cell invasion determinants from enterotoxigenic *Escherichia coli* [J]. *Infect Immun*, 1992, 60(6): 2409-2417.
- [2] ELSINGHORST E A, WEITZJ A. Epithelial cell invasion and adherence directed by the enterotoxigenic *Escherichia coli* tiblocus is associated with a 104-kilodalton outer membrane protein [J]. *Infect Immun*, 1994, 62(8): 3463-3471.
- [3] KAKAR K, SHARMA S, ASNANI P J, et al. Experimental haematogenous pyelonephritis in mice with uropathogenic, enteropathogenic and enterotoxigenic *Escherichia coli* [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1986, 52(2): 153-161.
- [4] 于守平,王光辉,胡桂学. 鸡病原性大肠杆菌的分离鉴定及体外抑菌试验 [J]. 辽宁畜牧兽医, 2005(7): 32-33.
- YU Shou-ping, WANG Guang-hui, HU Gui-xue. Separation and identification of *Escherichia coli* from chicken and its antibiotic *in vitro* [J]. *Liaoning Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2005(7): 32-33. (in Chinese)
- [5] 张西云,陆艳,朵红,等. 猪溶血性大肠杆菌致死小鼠病理形态学观察 [J]. 甘肃畜牧兽医, 2004, 34(3): 23-24.
- ZHANG Xi-yun, LU Yan, DUO Hong, et al. Observation of pathological condition on dead mice killed by pig hemolysis *Escherichia coli* [J]. *Gansu Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2004, 34(3): 23-24. (in Chinese)
- [6] 卫广森,陆承平,陈溥言. 新生仔猪大肠埃希氏菌性腹泻 K88ac-ST1-L-TB 三价基因工程灭活疫苗生产工艺的研究 [J]. 中国兽医科学, 2006, 36(9): 707-712.
- WEI Guang-sen, LU Cheng-ping, CHEN Pu-yan. Studies on commercial producing process of K88ac-ST1-L-TB trivalent gene engineering inactivated vaccine against colibacillus diarrhea of newborn piglets [J]. *Veterinary Science in China*, 2006, 36(9): 707-712. (in Chinese)
- [7] 罗晓花,孙新文. 益生菌作用机理及目前应用情况 [J]. 饲料博览, 2007(9): 16-18.
- LUO Xiao-hua, SUN Xin-wen. Mechanism and current application of probiotics [J]. *Food Review*, 2007(9): 16-18. (in Chinese)
- [8] 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.
- DONG Xiuzhu, CAI Miaoying. *Systematic Identification Manual for Common Bacteria* [M]. Beijing: Science Press, 2001. (in Chinese)
- [9] 张彤,方汉平. 微生物分子生态技术: 16S rRNA/DNA 方法 [J]. 微生物学通报, 2003, 30(2): 97-101.
- ZHANG Tong, FANG Han-ping. Microorganism molecular ecology technology: 16 S rRNA/DNA method [J]. *Microbiology*, 2003, 30(2): 97-101. (in Chinese)
- [10] JONES G W, RUTTER J M. Role of the K88 antigen in the pathogenesis of neonatal diarrhea caused by *Escherichia coli* in piglets [J]. *Infect Immun*, 1972, 6(6): 918-927.
- [11] HORNICH M, ŠALAJKA E, ARMANOVÁ Z, et al. Histopathological changes produced by two enteropathogenic strains of *Escherichia coli* in gnotobiotic piglets [J]. *J Comp Pathol*, 1975, 85(2): 277-283.
- [12] GOLDHAR J, ZILBERBERG A, OFEK I. Infant mouse mo-

- del of adherence and colonization of intestinal tissues by enterotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from humans [J]. *Infect Immun*, 1986, 52(1) :205-208.
- [13] HOHMANN A, WILSON M R. Adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to intestinal epithelium *in vivo* [J]. *Infect Immun*, 1975, 12(4) :866-880.
- [14] VALDIVIA R H, HROMOCKYI A E, MONACK D, *et al.* Applications for green fluorescent protein(GFP) in the study of hostpathogen interactions[J]. *Gene*, 1996, 173(1) :47-52.
- [15] 邝哲师, 张玲华, 田兴山, 等. 绿色荧光蛋白标记的芽孢杆菌在幼龄畜禽体内的动态分布[J]. 华南师范大学学报:自然科学版, 2005, 49(2) :23-26.
KUANG Zhe-shi, ZHANG Ling-hua, TIAN Xing-shan, *et al.* Dynamic distribution of GFP-marked bacillis in young animals [J]. *Journal of South China Normal University: Natural Science*, 2005, 49(2) :23-26. (in Chinese)
- [16] 朱红梅, 周涵韬, 张赛群, 等. 产肠毒素性大肠杆菌的绿色荧光蛋白转化及表达研究[J]. 厦门大学学报:自然科学版, 2006, 45(S1) :43-46.
ZHU Hong-mei, ZHOU Han-tao, ZHANG Sai-qun, *et al.* Study on the transformation and expression of green fluorescent protein gene in the enterotoxigenic *Escherichia coli* [J]. *Journal of Xiamen University: Natural Science*, 2006, 45(S1) :43-46. (in Chinese)
- [17] 纪云晶. 实用毒理学手册[M]. 北京:中国环境科学出版社, 1991.
JI Yun-jing. *Practical Manual of Toxicology* [M]. Beijing: China Environmental Science Press, 1991. (in Chinese)
- [18] THOMAS L. 临床试验诊断学:试验结果的评价和评估[M]. 吕元, 朱汉民, 沈霞, 等译. 上海:上海科技出版社, 2004.
THOMAS L. *Clinical Experiment Diagnosis: Value and Evaluate Experimental Results* [M]. Translated by L Ū Yuan, ZHU Han-min, SHEN Xia, *et al.* Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2004. (in Chinese)
- [19] 尤建嵩, 牛冬燕, 崔乃忠, 等. 大肠杆菌耐热肠毒素 b 及其致动物腹泻的机理[J]. 中国兽医科学, 2006, 36(10) :847-851.
YOU Jian-song, NIU Dong-yan, CUI Nai-zhong, *et al.* *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b(STb) and its mechanism causing diarrhea in animals[J]. *Veterinary Science in China*, 2006, 36(10) :847-851. (in Chinese)
- [20] 陈德坤, 王文秀, 孔庆波, 等. 用小鼠复制仔猪水肿病的模型试验[J]. 动物医学进展, 2003, 24(4) :79-80.
CHEN De-kun, WANG Wen-xiu, KONG Qing-bo, *et al.* Establishing weaned pig edema disease model on mouse with enterotoxigenic *E. coli* or it 's exotoxin[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2003, 24(4) :79-80. (in Chinese)
- [21] KYRIAKIS S C, TSILOYIANNIS V K, VLEMMAS J, *et al.* The effect of probiotic LSP122 on the control of post-weaning diarrhea syndrome of piglets [J]. *Res Vet Sci*, 1999, 67(3) :223-228.
- [22] RAGIONE R M L, CASULA G, SILMON M, *et al.* *Bacillus subtilis* spores competitively exclude *Escherichia coli* O78 K80 in poultry[J]. *Vet Microbiol*, 2001, 79(2) :133-142.
- [23] 程安春, 何明清, 陈孝跃. SA₃₈ 蜡样芽孢杆菌在体外对几种致病菌的生物拮抗试验[J]. 中国兽医杂志, 1994, 20(2) :12-13.
CHENG An-chun, HE Ming-qing, CHEN Xiao-yue. Antibiosis of *Bacillus licheniformis* on pathogenic microorganisms *in vitro* [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 1994, 20(2) :12-13. (in Chinese)
- [24] 全艳玲. 地衣芽孢杆菌对有害微生物的拮抗作用[J]. 食品科学, 2002, 23(8) :67-69.
QUAN Yan-ling. Antibiosis of *Bacillus licheniformis* on pathogenic microorganism [J]. *Food Science*, 2002, 23(8) :67-69. (in Chinese)

(责任编辑 左翠萍)