

文章编号: 1674-7054(2022)05-0472-06



海南文昌鸡源抑菌乳酸菌的筛选鉴定

陈泽世, 白国松, 边拯宇, 李连彬

(海南大学 动物科技学院, 海口 570228)

摘要: 为获取具有抑菌活性的海南文昌鸡源乳酸菌, 笔者以海南文昌鸡的肠道粘膜及内容物为样品分离乳酸菌。通过菌株形态观察, 革兰氏染色镜检、过氧化氢试验和 16S rRNA 基因序列测序鉴定乳酸菌; 而后利用乳酸菌对酸和胆盐的耐受性及其抑菌试验从中筛选出热带动物肠道源抑菌乳酸菌。本研究共获得 17 株乳酸菌, 分别为 13 株植物乳杆菌和 4 株粪肠球菌, 其中植物乳杆菌对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和鼠伤寒沙门氏菌均有较高抑制作用, 有一定耐酸耐胆盐的能力; 粪肠球菌抑菌效果均较差。研究表明, 筛选获得的海南文昌鸡源植物乳杆菌 S4-1 综合抑菌效果较好, 可用于畜禽肠道益生菌制剂开发的后续研究。

关键词: 文昌鸡; 乳酸菌; 抑菌; 筛选

中图分类号: Q 939.11 **文献标志码:** A

引用格式: 陈泽世, 白国松, 边拯宇, 等. 海南文昌鸡源抑菌乳酸菌的筛选鉴定 [J]. 热带生物学报, 2022, 13(5): 472-477. DOI: 10.15886/j.cnki.rds wxb.2022.05.007

肉鸡养殖业在我国畜牧业中扮演重要角色, 尤其是海南省的肉鸡规模效率达到 1, 明显优于其他省份^[1]。文昌鸡作为海南省特色畜禽品种, 在当地畜禽养殖业中起到支撑作用, 但在其养殖过程中极易受到肠道疾病的困扰, 如大肠杆菌、沙门氏菌、葡萄球菌等引发的疫病或菌落失调症等。治疗此类疾病往往只有抗生素疗法, 但抗生素的大量使用, 增强了细菌的耐药性和相关产品的药物残留, 严重危害动物和人体健康, 因此, 人们迫切需要寻找到新的产品来替代抗生素^[2]; 此外, 饲料抗生素添加剂于 2020 年开始被全面禁止^[3]。可见, 饲料中添加抗生素替代品的需求进一步加大。

在抗生素替代品的选择中, 乳酸菌具有较大的优势。乳酸菌具有调节肠道菌群平衡、抑制肠道病菌、利于营养物质的消化吸收、提高机体免疫系统能力等作用, 同时其具有生长快、产酸量高等特点^[4]; 乳酸菌作为微生态饲料添加剂在畜牧业中的使用越来越广泛, 是抗生素的理想替代品^[5]。

近年来, 国内外对优良乳酸菌菌株的筛选及益生特性的研究比较活跃^[6-7], 但是对热带动物肠道源乳酸菌的筛选研究较少。海南省拥有独特的热带季风和海洋气候, 炎热潮湿的气候利于细菌的滋生^[8], 加之环境的不同也会影响益生菌的生存以及功能的发挥^[9-10]。因此, 本试验针对热带地区的家禽养殖业, 以海南文昌鸡肠道内容物为样品, 从中分离筛选优质热带动物肠道源抑菌乳酸菌, 为微生态制剂替代抗生素提供更广泛的原料来源和理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 样品来源 试验用海南文昌鸡 4 只经处死后, 采集肠道粘膜及内容物, 分别放于不同编号的 10 mL 试管内, 4 °C 保存备用。

1.1.2 培养基及主要试剂 MRS 琼脂培养基、MRS 肉汤培养基和 LB 肉汤培养基均购自青岛海

收稿日期: 2021-12-15

修回日期: 2022-02-17

基金项目: 海南省基础与应用基础研究计划(自然科学领域)高层次人才项目(2019RC090); 海南大学科研启动基金项目 [KYQDZR1940]

第一作者: 陈泽世(1997-), 男, 海南大学动物科技学院 2019 级硕士研究生. E-mail: 810508405@qq.com

通信作者: 李连彬(1989-), 男, 博士, 讲师, 硕士生导师. 研究方向: 健康养殖. E-mail: 993992@hainanu.edu.cn

博生物技术有限公司。细菌基因组提取试剂盒购自北京全式金生物有限公司。Golden Star T6 Super PCR Mix (1.1×) 购自北京擎科生物科技有限公司。

1.1.3 标准菌株 菌株均由本实验室提供, 信息如表 1 所示, 标准菌株于-80 °C 低温保存, 保存完好, 未被污染。

表 1 标准菌株信息

标准菌株种类	菌株编号
金黄色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i>)	ATCC 29213
大肠杆菌(<i>Escherichia coli</i>)	ATCC 25922
鼠伤寒沙门氏菌(<i>Salmonella</i>)	ATCC 50013

1.1.4 主要仪器 电子天平(PA2004C, 上海佑科仪器仪表有限公司); 立式压力蒸汽灭菌器(YXQ.L-75, 鸡西市辰丰医疗器械制造有限公司); 恒温培养摇床(FS-70B, 黄骅菲斯福实验仪器有限公司); 微波炉(20MX34-L, 中山东菱威力电器有限公司); 冰箱(BCD-218STPS, 海尔智家股份有限公司); 电热鼓风干燥箱(WGL-230B, 黄骅菲斯福实验仪器有限公司); 超净工作台(SW-CJ-2F, 苏州净化设备有限公司); 医用低温箱(MDF-U5386S, 松下健康医疗器械有限公司)等。

1.1.5 细菌基因组提取 按照试剂盒说明书提取菌株的 DNA, 保存于-20 °C 备用。

1.1.6 引物序列 扩增菌株 16S rRNA 基因序列所用的引物如表 2 所示。

表 2 16S rRNA 基因序列测序所用引物序列

引物名称	序列(5' to 3')
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT

1.2 菌株的分离纯化及保种 取 1 g 肠道内容物, 溶入到生理盐水中, 摇匀, 以 10 倍为梯度, 逐渐稀释到 10^{-5} , 取最后 2~3 个稀释梯度的液体 20 μ L, 利用涂布棒涂到已加入 2% CaCO_3 的 MRS 固体培养基上, 利用封口膜封口, 37 °C 下放置 2 d。挑选形态较好且产生钙圈的单菌落置于 MRS 肉汤培养基中, 继续培养 16~24 h, 将菌液接种到平板上培养 2 d, 即完成 1 次纯化。纯化 3 次之后, 获得形态较为一致的菌落。取已培养

16~24 h 的菌液与 50% 的灭菌丙三醇等量, 加入到 2 mL 小离心管中进行混合, 设置 3 个重复, 做好标记, 放超低温冰箱内备用。

1.3 分离菌的鉴定筛选

1.3.1 形态学特征 观察分离的菌株, 挑选在培养基上产生溶钙圈且呈乳白色、凸起、边缘整齐、稍大的单菌落, 进行过氧化氢和革兰氏染色鉴定。

1.3.2 过氧化氢鉴定 在干净的载玻片上滴加 2 滴 10% H_2O_2 溶液, 从培养的菌板上利用移液枪挑取单菌落置于 H_2O_2 溶液中。观察是否产生小气泡, 出现气泡为阳性, 不产生为阴性。保留结果为阴性的菌株, 用于革兰氏染色鉴定。

1.3.3 革兰氏染色鉴定 将 1.3.2 中的不产生气泡的菌按照革兰氏染色试剂盒的说明进行操作, 在光学显微镜下观察其特性。紫色为革兰氏阳性, 蓝色为阴性。保留阳性菌。

1.3.4 16S rRNA 基因序列鉴定 PCR 扩增采用通用引物 27F 和 1492R, 使用 Golden Star T6 Super PCR Mix (1.1×) 进行 PCR 扩增, 模板选用 1.1.5 中保存的菌株 DNA。具体要求见表 3、4。

表 3 PCR 反应条件

阶段	温度/°C	时间/s	循环数
预变性	95	180	
变性	95	30	30
退火	55	30	30
延伸	72	90	30
保存	4		

表 4 PCR 反应体系

试剂	使用量/ μ L
模板	2
27F	2
1492R	2
Golden Star T6 Super PCR Mix (1.1×)	44
总体积	50

扩增后配制 2% 的琼脂糖凝胶进行电泳。PCR 产物送至生工生物公司进行测序分析。将 16S rRNA 基因序列测定的结果上传到 NCBI 网站, 进行 BLAST 同源性比对, 确定菌株种类。

1.3.5 抑菌试验 (1) 配制固体 LB 培养基, 灭菌

并置于 60 ℃ 的水浴锅中进行保温备用。

(2)将乳酸菌的单菌落移入 MRS 培养基中,于 37 ℃ 培养 16~24 h 作为种子液。取 0.1 mL 种子液接种到 0.9 mL 灭菌的 MRS 培养液中,在 37 ℃ 培养 16~24 h。将标准菌株(大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌和金黄色葡萄球菌)接种于 LB 培养液中进行过夜培养。

(3)待步骤(1)准备的 LB 琼脂培养基降到 50 ℃ 后分别加入标准菌株作为指示菌。按照 0.25% 的比率进行添加,混合充分后倒入已安放好 4 个牛津杯的一次性培养皿中,每个皿加入 14 mL 培养基。20 min 后,将牛津杯取出,4 个孔各自注入不同的乳酸菌上清液 100 μL。乳酸菌上清液加入后,常温放置 2~3 h,待液面下降到培养皿皿底后,移到培养箱中培养。

(4)24 h 后,利用千分尺测量抑菌圈的直径,记录数据。

1.3.6 乳酸菌的耐酸试验 (1)将 MRS 液体培养基配置好,使用稀盐酸和氢氧化钠溶液调节 pH 到 2.5。

(2)将初步抑菌试验获得的菌株接种到培养液中,于 37 ℃ 培养 12~24 h。

(3)将已培养好的菌液涡旋 40 s,以 10 为倍数进行梯度稀释(0.1 mL 菌液加入到 0.9 mL 0.9% 氯化钠溶液中),逐步稀释到 10^{-6} ,取 100 μL 菌液进行涂布,做 3 次重复试验,涂好的培养皿用封口膜进行封口,培养 36~48 h。

(4)取 100 μL 上述的菌液接种到 900 μL pH 2.5 的培养液中,培养 2 h 后取出。

(5)2 h 后取出,以 10 为梯度进行稀释,逐渐稀释到 10^{-6} ,取 100 μL 涂板。同样,每个菌重复 3 次以上操作,用于对照。

(6)培养 36~48 h 后,统计菌落的数量。

1.3.7 乳酸菌的耐胆盐试验 试验方法同 1.3.6。将 pH 2.5 的 MRS 溶液替换为 0.25% 的 PBS 胆盐溶液进行试验,同样设置 3 个重复。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌的分离纯化及初步筛选 通过 MRS 琼脂培养基培养,进行分离纯化获得了可以产生溶钙圈、形态为圆形、边缘整齐、呈乳白色等的单菌落。经过过氧化氢阴性和革兰氏染色阳性鉴定,共筛选到 17 株菌株,其鉴定结果见表 5。

2.2 16S rRNA 基因序列测定鉴定结果 提取经

表 5 乳酸菌初步筛选结果

菌株	菌株形态特征	过氧化氢试验	革兰氏染色
S2-4	菌落较大,有突起,呈乳白色,边缘光滑	阴性	阳性
S2-2	菌落较大,有突起,呈乳白色,边缘光滑	阴性	阳性
S3-2	菌落较大,有突起,呈乳白色,边缘光滑	阴性	阳性
S4-1	菌落较小,有突起,呈乳白色,边缘光滑	阴性	阳性
S4-5	菌落较大,有突起,呈乳白色,边缘光滑	阴性	阳性
S4-6	菌落较大,有突起,呈乳白色,边缘光滑	阴性	阳性
S4-8	菌落较小,有突起,呈乳白色,边缘光滑	阴性	阳性
K1-6	菌落较小,有突起,呈乳白色,边缘光滑	阴性	阳性
K2-2	菌落较大,有突起,呈乳白色,边缘光滑	阴性	阳性
K3-7	菌落较小,有突起,呈乳白色,边缘光滑	阴性	阳性
K4-5	菌落较大,有突起,呈乳白色,边缘光滑	阴性	阳性
H3-6	菌落较小,有突起,呈乳白色,边缘光滑	阴性	阳性
H4-1	菌落大,有突起,呈乳白色,边缘光滑	阴性	阳性
K4-6	菌落较小,突起较小,呈略透明,边缘光滑	阴性	阳性
K2-3	菌落较小,突起较小,呈略透明,边缘光滑	阴性	阳性
K4-7	菌落较小,突起较小,呈略透明,边缘光滑	阴性	阳性
K3-3	菌落较小,突起较小,呈略透明,边缘光滑	阴性	阳性

初筛获得的 17 株乳酸菌的基因组 DNA,利用通用引物扩增其 16S rRNA 基因序列。经测序后,在 NCBI 上进行 BLAST 同源性比对,结果如表 6。表 6 显示本实验筛选的 17 株菌的相似度均达到 97% 及以上,其中,13 株菌为植物乳杆菌,4 株菌为粪肠球菌。

表 6 同源性比对结果

编号	种属	相似度/%	编号	种属	相似度/%
S2-4	植物乳杆菌	98	K3-7	植物乳杆菌	100
S2-2	植物乳杆菌	98	K4-5	植物乳杆菌	98
S3-2	植物乳杆菌	98	H3-6	植物乳杆菌	98
S4-1	植物乳杆菌	98	H4-1	植物乳杆菌	98
S4-5	植物乳杆菌	98	K4-6	粪肠球菌	99
S4-6	植物乳杆菌	97	K2-3	粪肠球菌	99
S4-8	植物乳杆菌	98	K4-7	粪肠球菌	99
K1-6	植物乳杆菌	98	K3-3	粪肠球菌	99
K2-2	植物乳杆菌	98			

注:“相似度”指与NCBI数据库相应菌株16S rRNA序列结果的比对相似度。

2.3 抑菌试验结果 如表 7 所示,这些菌株对标准菌株的抑菌圈直径之和均在 41 ~ 45 mm 之间,抑菌效果接近,其中编号为 S4-1 的菌株抑菌圈直径之和最大,为 44.3 mm。

表 7 不同对照组抑菌圈直径之和

编号	抑菌圈直径之和/mm	编号	抑菌圈直径之和/mm
S2-4	42.89	K1-6	42.80
S2-2	43.66	K2-2	42.97
S3-2	43.20	K3-7	42.87
S4-1	44.30	K4-5	43.10
S4-5	41.71	H3-6	41.65
S4-6	42.40	H4-1	41.61
S4-8	42.37		

注:另外4株菌株未见明显抑菌圈。

由图 1 可得,筛选所获得的 13 株植物乳杆菌对 3 种病原菌均有抑制作用,抑菌圈直径接近 14 mm,为中度敏感^[1]的类型。不同植物乳杆菌对不同病原菌的抑菌效果存在一定的差异,其中植物乳杆菌 S4-1 对金黄色葡萄球菌的抑制作用最强,抑菌圈直径超过 15 mm。

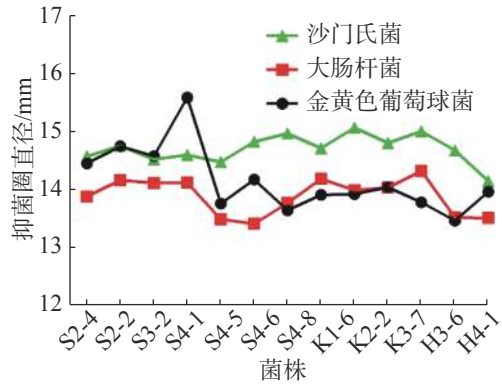


图 1 不同菌株的抑菌圈直径

2.4 乳酸菌的耐酸试验结果 乳酸菌在 pH 2.5 的培养液中培养 2 h 的存活率如图 2 所示。植物乳杆菌 K1-6 的耐酸性能最好。不同的菌株存活率差异较大,植物乳杆菌均有一定的耐 pH 的特性。

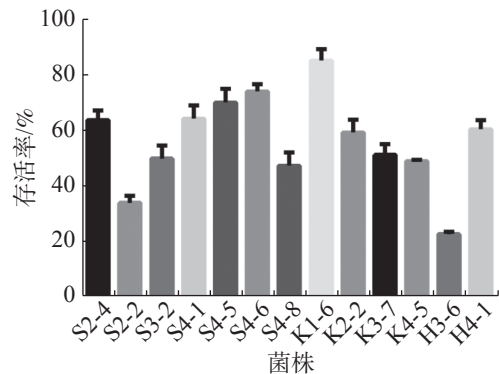


图 2 乳酸菌菌株在 pH 2.5 处理下的存活率

2.5 乳酸菌的耐胆盐试验结果 乳酸菌在胆盐浓度为 0.25% 的情况下保持 2 h 的存活率,如图 3 所示。S4-5 和 H3-6 的乳酸菌存活率较高,K3-7 的菌株存活率较低,不同菌株间的差异较大。

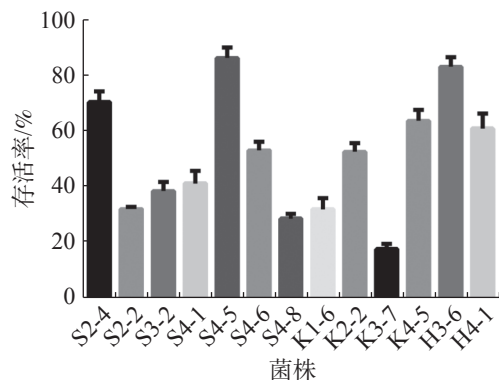


图 3 乳酸菌菌株在 0.25% 胆盐处理下的存活率

3 讨论

海南岛地处热带,具有高温高湿的环境。这

种炎热潮湿的气候一方面利于细菌的滋生,影响动物的健康养殖;另一方面高温高湿环境会影响动物肠道微生物的组成^[12-13],影响益生菌功效的发挥。目前针对热带地区益生菌筛选鉴定的研究较少,因此本研究选择海南文昌鸡的肠道内容物,通过 16S rRNA 基因序列测序、耐受试验和抑菌试验等一系列体外评价,筛选出在当地环境下抑菌效果较好的乳酸菌株,为开发热带畜禽养殖乳酸菌制剂提供材料。

目前研究表明,乳酸菌在畜禽肠道中,能够形成一层菌膜,帮助机体抵抗病原菌的侵袭,提高畜禽的抵抗力。养殖环境中存在的大肠杆菌、金黄色葡萄球菌及沙门氏菌是引起畜禽肠道疾病的主要病原菌^[11]。因此在本试验中选择了这 3 种菌作为评价益生菌体外抑菌能力强弱的指示菌。试验的结果也表明文昌鸡肠道源的多株植物乳杆菌对这 3 株病原菌均具有抑菌活性。这符合前人大量关于乳酸菌抑菌的理论研究的结论,如乳酸菌会释放一些有机酸、细菌素等小分子物质,这些物质具有一定的抑菌能力^[14]。本试验中筛选到植物乳杆菌 S4-1 对大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌和金黄色葡萄球菌均具有抑菌效果,其对金黄色葡萄球菌的抑菌能力最强,具有开发为饲用乳酸菌的潜力。

拥有良好抑菌特性的外源乳酸菌要在畜禽肠道内发挥其生物学效应,还必须保证其能通过畜禽的胃进入肠道。畜禽的胃中具有低的 pH 环境,因此益生菌必须具有较高的酸耐受性^[5]。而不同的菌株耐受低 pH 值的能力也不同,因此本试验对初步筛选的益生菌也进行了酸耐受性的试验。此外,畜禽肠道中具有较高浓度的胆汁,胆汁对细菌有较强的破坏能力,胆盐对乳酸菌的细胞膜具有溶解性,导致乳酸菌的死亡^[15]。因此为了保证较多数的活菌能在肠道中生长和繁殖,发挥其生物学效应,必须筛选出对胆盐具有一定耐受力的乳酸菌。因此本研究在体外也评价了益生菌的胆盐耐受性。结果表明,植物乳杆菌 S4-1 具有较高的酸耐受性和一定的胆盐耐受性,综合抑菌效果最好。笔者认为该菌具有作为热带及其他地区畜禽饲用乳酸菌的潜力。

不同来源的益生菌具有不同的温度适应性,谢瞳^[16]等通过对 10 种益生菌研究发现其耐高温能力存在差异。菌株的高温耐受性有助于其在畜

禽肠道生长和后期工业应用,也是优良益生菌的特性之一。相较于其他地区的乳酸菌,本实验所筛选出的植物乳杆菌 S4-1 来源热带地区,在耐高温方面具有先天优势。此外,前人研究表明,在鸡和猪的日粮中添加乳酸菌,均能有效改善肠道菌群结构,降低肠道中大肠杆菌数量^[17-18]。但本实验尚未进行动物体内实验,植物乳杆菌 S4-1 对机体的影响有待进一步验证。

参考文献:

- [1] 宋彦亭, 张忠明, 洪仁彪, 等. 海南省文昌鸡产业高质量发展分析与展望[J]. *中国热带农业*, 2021, 100(3): 14-18.
- [2] 黄强, 彭玉麟, 栾超. 禁抗下功能性饲料添加剂的营养健康作用[J]. *饲料工业*, 2020, 41(23): 49-58.
- [3] 马朵妈麻. 全面禁用抗生素饲料添加剂, 保证肉食品安全[J]. *食品安全导刊*, 2020, 292(33): 20-21.
- [4] 刘文华, 任慧英, 邹玲, 等. 一株优良乳酸菌的分离鉴定与特性研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2008, 35(2): 152-155.
- [5] 王利红. 鸡源乳酸菌的分离筛选及其对肉鸡生产性能的影响[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2014.
- [6] 徐国辉, 周顺, 郭广鑫. 一株鱼源乳酸菌的分离鉴定及其生物学特性[J]. *青岛农业大学学报(自然科学版)*, 2020, 37(3): 219-224.
- [7] DOS SANTOS L E, GINANI V C, DE ALENCAR E R. Isolation, identification and screening of *lactic acid bacteria* with probiotic potential in silage of different species of forage plants, cocoa beans, and artisanal salami [J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2021, 13(1): 173-186.
- [8] LI X, HUANG T, XU K, et al. Molecular characteristics and virulence gene profiles of *Staphylococcus aureus* isolates in Hainan, China [J]. *BMC Infect Dis.*, 2019, 19(1): 873.
- [9] WANG J C, ZHAO W, GUO S, et al. Different growth behaviors and metabolomic profiles in yogurts induced by multistrain probiotics of *Lactobacillus casei* Zhang and *Bifidobacterium lactis* V9 under different fermentation temperatures [J]. *Journal of Dairy Science*, 2021, 104(10): 10528-10539.
- [10] ANA A B, MGORETTI L, CAROLINA I, et al. Impact of growth temperature on exopolysaccharide production and probiotic properties of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from kefir grains [J]. *Food Microbiology*, 2018, 69: 212-218.
- [11] 王银梦, 夏洪泽, 张晓涵, 等. 牦牛犊牛肠源益生性抑菌乳酸菌的筛选与鉴定[J]. *饲料研究*, 2020, 43(12): 92-95.
- [12] 杨季, 王思博, 赵旦华, 等. 鸡肠道微生物组成及影响因素的研究进展[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2020, 597(9): 34-37.

- [13] 沈丽艳, 杨玉婷, 高欢, 等. 长期相对高、低环境温度对肉鸡回肠微生物多样性的影响[J]. 云南农业大学学报(自然科学版), 2021, 36(4): 598–607.
- [14] 杨逢清, 王泽炜, 李华斌, 等. 边鸡肠道乳酸菌的分离鉴定及筛选[J]. 中国兽医学报, 2020, 40(11): 2134–2138.
- [15] 周罗雄. 益生屎肠球菌胆盐耐受调控机制的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019.
- [16] 谢瞳, 吕虹雨, 朱佳佳, 等. 几株益生菌的性能比较研究[J]. 动物医学进展, 2021, 42(12): 26–30.
- [17] 杨阳, 刘向前, 张弘弛. 不同益生菌对断奶仔猪生长性能、养分消化及后肠菌群的影响[J]. 中国饲料, 2021, 682(14): 33–36.
- [18] 张春宝. 乳酸菌制剂对肉种鸡肠道菌群数量的影响[J]. 中国畜禽种业, 2019, 15(10): 177–178.

Screening and identification of lactic acid bacteria with bacteriostatic activity from Wenchang Chicken in Hainan

CHEN Zeshi, BAI Guosong, BIAN Zhengyu, LI Lianbin
(College of Animal Science and Technology, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: Lactic acid bacteria were isolated from the intestinal mucosa and contents of Wenchang Chicken in Hainan to obtain the strains of lactic acid bacteria with bacteriostatic activity. The isolates were determined and identified by morphological observation, Gram staining, hydrogen peroxide test, and 16S rRNA gene sequencing, and their acid and bile tolerance were tested by using the acid tolerance test and the bile salt tolerance test to screen the lactic acid bacteria with bacteriostatic activity from the intestinal tracts of tropical animals. A total of 17 strains of lactic acid bacteria were selected from the isolates, including 13 strains of *Lactobacillus plantarum* and 4 strains of *Enterococcus faecalis*. Of the 17 strains isolated, the strains of *L. plantarum* showed a high inhibition of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, and had some tolerance to acid and bile, while the strains of *Enterococcus faecalis* had low bacteriostatic effect. Comprehensive evaluation showed that the strain S4-1 of *L. plantarum* showed a higher bacteriostatic effect. The strain S4-1 of *L. plantarum* isolated from Wenchang Chicken in Hainan can hence be used as a follow-up study for the development of probiotic preparations for livestock intestines.

Keywords: Wenchang chicken; lactic acid bacteria; bacteriostasis; screen

(责任编辑:罗启香 责任编辑:叶 静)