



牦犊牛源乳酸菌的筛选鉴定与体外益生特性评价

张学燕, 聂召龙, 王 通, 潘 浩, 孙 璐, 王 磊, 刘书杰, 崔占鸿

(青海大学 畜牧兽医科学院, 青海省牦牛工程技术研究中心, 青海省高原放牧家畜

动物营养与饲料科学重点实验室, 西宁 810016)

摘 要 以3月龄健康牦犊牛胃肠道内容物作为菌源, 筛选得到4株能够同时抑制大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的乳酸菌, 分别编号为XC3、DC1、DC8和A5。经16S rRNA序列分析鉴定, XC3为乳酸片球菌, DC8为罗伊乳杆菌, DC1为戊糖片球菌, A5为植物乳杆菌。经体外试验评价其益生特性, pH=3时, 4株乳酸菌的活菌数均较高; 在3 g/L的牛胆盐培养液中, 菌株XC3的存活率为93.85%, 菌株DC8和A5的存活率分别为51.59%和51.18%, 但菌株DC1的存活率仅为6.77%; 在人工胃液中培育0.5 h和3 h后, 4株菌存活率均高于80%, 在人工肠液中培育0.5 h和3 h后, 存活率均高于70%。结果表明, 乳酸菌XC3、DC8和A5具有潜在的益生作用, 可作为牦犊牛专用益生菌制剂的添加对象。

关键词 乳酸菌; 牦犊牛; 16S rRNA 基因; 体外益生特性

中图分类号 S811.6

文献标志码 A

文章编号 1004-1389(2019)04-0522-08

犊牛腹泻病是青藏高原牦牛养殖中的常见疾病, 严重影响犊牛的早期培育质量, 主要是肠道病原菌和(或)病毒混合感染引起肠道正常菌群结构失衡所致。牦犊牛腹泻最早发生在刚出生时期, 发病期主要在2~5月龄, 腹泻率为17.57%, 致死率为44.91%^[1]。高睿等^[2]研究表明, 引起犊牛腹泻的细菌性病原主要是致病性大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌等; 同时, 病原菌沙门氏菌和大肠杆菌的耐药性表现也比较严重^[3-4]。益生菌是一种能够调节动物胃肠道微生物区系平衡, 有利于动物健康发育和提高生产性能的微生物制剂, 主要表现为提高动物对营养物质的消化吸收及利用, 增强机体免疫功能和抵抗力, 促进动物胃肠道生长发育^[5-6]。乳酸菌作为一种重要的益生菌, 在动物肠道定植生长良好, 能产生大量有机酸类物质, 可在肠道中形成一层菌膜, 有效抵抗病毒和病原微生物的侵袭, 增强对疾病的抵抗力^[7]。乳酸菌及其代谢产物对沙门氏菌有较强的抑制作用^[8], 且能有效抑制大肠杆菌^[9]和金黄色葡萄球菌的生长^[10]。但由于动物种类和生长环境的差异, 益生菌定植于动物胃肠道的细菌

种类和数量会有较大差异, 且来自同源动物的菌种更有利于在动物体内定植。因此, 因地制宜地分离筛选出牦犊牛源益生乳酸菌, 对其腹泻病预防和抗生素治疗药物替代研究非常重要, 也具有很好的生产应用前景。

1 材料与方法

1.1 菌源样品及培养基

菌源样品来自青海省大通种牛场健康的3月龄牦犊牛6头, 屠宰后取胃肠道内容物洋浦冷藏保存, 迅速带回实验室进行菌株分离试验; 指示菌株选用大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌, 由青海省高原放牧家畜动物营养与饲料科学重点实验室提供。MRS液体培养基和MRS固体培养基参照文献^[11]配制; MH肉汤培养基配制: 2 g牛肉粉, 1.5 g可溶性淀粉, 17.5 g酸水解酪蛋白, 用去离子水定容至1 000 mL, pH 7.2, 121 °C灭菌20 min。

1.2 抑病原菌乳酸菌的分离及纯化

菌株分离纯化: 参照文献^[11]的方法进行; 菌株保存: 用灭菌的白色枪头蘸取纯菌株菌落, 接种

收稿日期: 2018-07-09 修回日期: 2019-01-03

基金项目: 教育部“春晖计划”科研项目(z2016095); 青海省“高端创新人才千人计划”拔尖人才; 中国科学院“西部青年学者项目”; 青海省科技厅重大专项(2015-SF-A4-2)。

第一作者: 张学燕, 女, 硕士研究生, 研究方向为饲料资源的开发与利用。E-mail: 1724140765@qq.com

通信作者: 崔占鸿, 男, 副研究员, 研究方向为反刍动物营养与饲料科学。E-mail: cuizhanhong27@126.com

于液体 MRS 培养基中, 37 °C 培养 24 h, 加甘油在 -80 °C 下保存。

1.3 抗病原菌乳酸菌的筛选

①配制含琼脂的液体 MH 肉汤培养基; ② 1×10^5 Pa 灭菌 20 min; ③冷却至 50 °C 左右; ④每 20 mL MH 肉汤培养基中加入新培养的指示菌 20 μ L (10^8 CFU/mL), 混匀后倒入培养皿中冷却; ⑤用灭菌镊子将牛津杯放入冷却的固体 MH 肉汤培养皿中; ⑥分别吸取 200 μ L 纯菌株培养液和 MRS 液体培养基加入到牛津杯, 每个样品 3 个重复; ⑦4 °C 冰箱放置固定 30 min; ⑧37 °C 培养箱中培养 24 h, 筛选出能够同时抑制 3 种指示病原菌的乳酸菌菌株, 编号为 XC3、DC8、DC1 和 A5。

1.4 乳酸菌的分子生物学鉴定

①取对数生长后期的纯菌株 2 mL; ②常温下, 4 000 r/min 离心 10 min, 获得菌体; ③用细菌基因组 DNA 提取试剂盒 [Bacterial DNA Kit (50)D3350-01] 提取细菌总 DNA; ④以 1 μ L 纯化的细菌总 DNA 为模板, 用 16S rRNA 基因通用引物对菌株 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增, 扩增产物送上海生工生物工程股份有限公司测序。

1.5 乳酸菌的 16S rRNA 基因序列分析

根据 16S rRNA 基因的测序结果, 登录 NCBI 网站, 使用 BLAST 对比进行菌种的初步确定。结合 GenBank 中乳酸菌属中其他菌种的 16S rRNA 基因序列, 应用 MEGA 7.0 软件, 采用 Neighbor-joining 法构建系统发育树。

1.6 乳酸菌的生长曲线及 pH 变化

将筛选的乳酸菌菌株培养液按 $\varphi = 1\%$ 接种于液体 MRS 培养基中, 37 °C 培养箱培养 48 h, 从 0 h 开始每间隔 2 h 取出 3 个离心管 (3 个平行), 24 h 后分别于 30 h、36 h、48 h 各取 3 个离心管, 测定每管 OD_{600nm} 的吸光光度值和 pH。

1.7 乳酸菌的耐酸及耐胆盐特性测定

用 1 mol/L 盐酸对液体 MRS 培养基进行调整, 使 pH 分别为 2.0、3.0、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0 和 6.4。在不同 pH 的液体 MRS 培养基中按 $\varphi = 1\%$ 接入乳酸菌 XC3、DC8、DC1 和 A5 的培养液, 37 °C 培养 24 h, 测 OD_{600nm} 值。

在液体 MRS 培养基中加入牛胆盐, 制成胆盐质量浓度分别为 0 (对照)、1.5、3 和 6 g/L 的 MRS 液体培养基。在不同胆盐质量浓度的液体 MRS 培养基中按 10 μ L/mL 接入乳酸菌 XC3、

DC8、DC1 和 A5 的培养液, 37 °C 培养 24 h 后, 取 100 μ L 进行平板菌落计数。

菌株存活率 = $a_1/a_0 \times 100\%$; a_1 : 处理组 24 h 后每毫升活菌数 (CFU/mL), a_0 : 对照组 24 h 后每毫升活菌数 (CFU/mL)。

1.8 乳酸菌人工胃肠液耐受性测定

配制 A 液: 16.4 mL $\varphi = 9.5\% \sim 10.5\%$ 的 HCl 用蒸馏水稀释至 pH 为 3.0; 配制 B 液: 500 mL 蒸馏水中加入 6.8 g KH₂PO₄, 溶解后用 4 g/L 的 NaOH 溶液调 pH 至 6.8, 加水稀释至 1 000 mL。配制人工胃液: 100 mL A 溶液中加入 1.0 g 胃蛋白酶, 充分溶解并混匀后用 0.2 μ m 无菌滤膜过滤。配制人工肠液: 用 100 mL B 液体中加入 1.0 g 胰蛋白酶, 充分溶解并混匀后用 0.2 μ m 无菌滤膜过滤。在人工胃液和肠液中按 10 μ L/mL 接入乳酸菌 XC3、DC8、DC1 和 A5 的培养液, 37 °C 140 r/min 摇床培养, 分别在 0、0.5 和 3 h 取样进行平板菌落计数。

1.9 数据处理与分析

所有试验数据先采用 Excel 2016 进行初步分析, 再用 SPSS 20.0 软件进行方差分析, 采用 Duncan's 法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 抑病原菌乳酸菌的分离筛选

在相同浓度指示菌条件下, 从牦犊牛胃肠道内容物中共筛选出 XC3、DC8、DC1 和 A5 4 株同时对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌具有良好抑制作用的菌株 (图 1)。

2.2 乳酸菌的 16S rRNA 基因序列分析

通过对菌株 XC3、DC8、DC1 和 A5 的 16S rRNA 基因测序, 对测得的序列进行 Blast 比对, 结果发现菌株 XC3 与乳酸片球菌 (*Pediococcus acidilactici* strain L169 (登录号: GU904688.1)) 相似性为 100%; 菌株 DC8 与罗伊氏乳杆菌 (*Lactobacillus reuteri* strain VB4 (登录号: JQ073738.1)) 相似性为 99%; 菌株 DC1 与戊糖片球菌 (*P. pentosaceus* strain F1S2 (登录号: KF245540.1)) 相似性为 100%; 菌株 A5 与植物乳杆菌 (*L. plantarum* strain KC28 (登录号: CP026743.1)) 相似性为 100%。将菌株 XC3、DC8、DC1 和 A5 的 16S rRNA 基因序列与 GenBank 数据库中部分乳酸菌的 16S rRNA 基因序列进行同源性比较, 应用 MEGA 7.0 软件, 采用

Neighbor-joining 法构建系统发育树(图 2)。结果显示,菌株 XC3 与乳酸片球菌(*P. acidilactici*)亲缘关系最近,其次是棒状皮炎球菌(*P. lolii*);菌株 DC8 与罗伊氏乳杆菌(*L. reuteri*)亲缘关系最近;菌株 DC1 与戊糖片球菌(*P. pentosa-*

ceus)亲缘关系最近;菌株 A5 与乳杆菌(*L. plantarum* L. *brevis*)亲缘关系最近。初步确定菌株 XC3 为乳酸片球菌,DC8 为罗伊氏乳杆菌,DC1 为戊糖片球菌,A5 为植物乳杆菌。

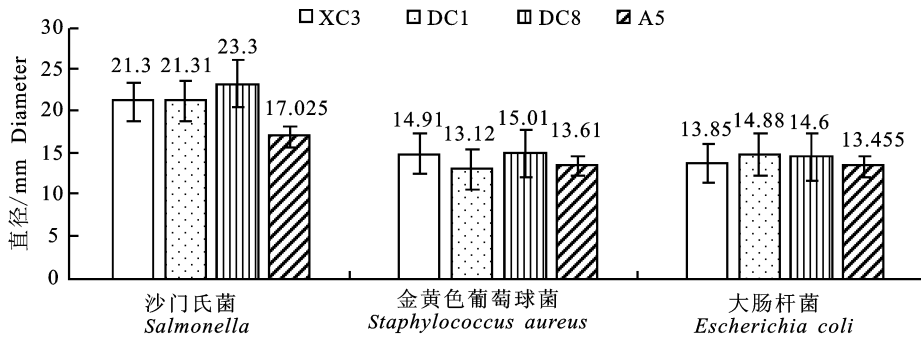


图 1 乳酸菌的抑菌圈直径

Fig. 1 Determination of bacteriostasis circle diameter of lactic acid bacteria

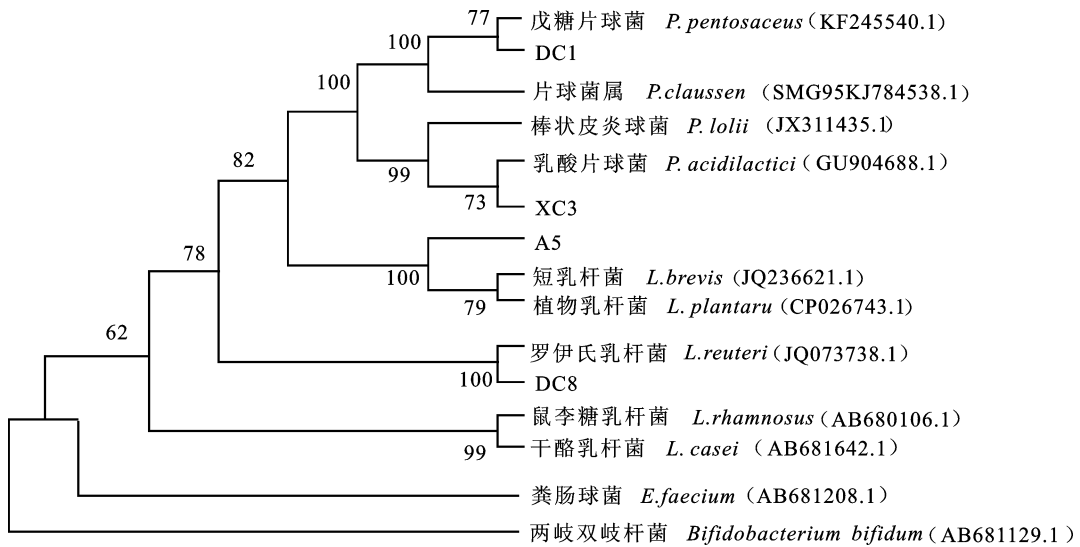


图 2 依据 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic trees based on 16S rRNA gene sequences

2.3 乳酸菌的生长曲线及 pH 变化

在一定范围内,菌株悬浮液中细胞浓度与吸光度呈正相关,因此,一定波长下菌株悬浮液的浓度可用光密度反应。从菌种生长曲线图可以看出(图 3),4 株乳酸菌的延迟期比较短,在培养 2 h 后进入对数生长期,乳酸菌 DC1、DC8 和 A5 培养 6 h 后,生长速率下降,乳酸菌 XC3 培养 8 h 后,生长速率下降,但是菌株依旧生长缓慢,培养 12 h 后菌株进入稳定期,培养 48 h 后菌株未进入衰退期。菌株生长速率与菌株培养液的 pH 变化规律相一致(图 4),即乳酸菌 XC3、DC8、DC1 和 A5 在 2~12 h 快速生长,培养液的 pH 迅速下降,12 h

后 pH 基本稳定。

2.4 4 株乳酸菌的耐酸和耐胆盐特性

从图 5 可以看出,随着 pH 的下降,乳酸菌 XC3、DC8、DC1 和 A5 的活菌数均不同程度降低,pH=3 时,4 株乳酸菌的活菌数较高;pH=2 时,4 株乳酸菌的生长受到严重影响,活菌数明显下降,说明 4 株乳酸菌对 pH=2 的酸性环境表现出高度敏感。

由表 1 可以看出,牛胆盐对乳酸菌 XC3、DC8、DC1 和 A5 的生长有抑制作用。随着胆盐质量浓度的增加,对 4 株乳酸菌的抑制作用也逐渐增强。牛胆盐质量浓度对不同乳酸菌菌株的生

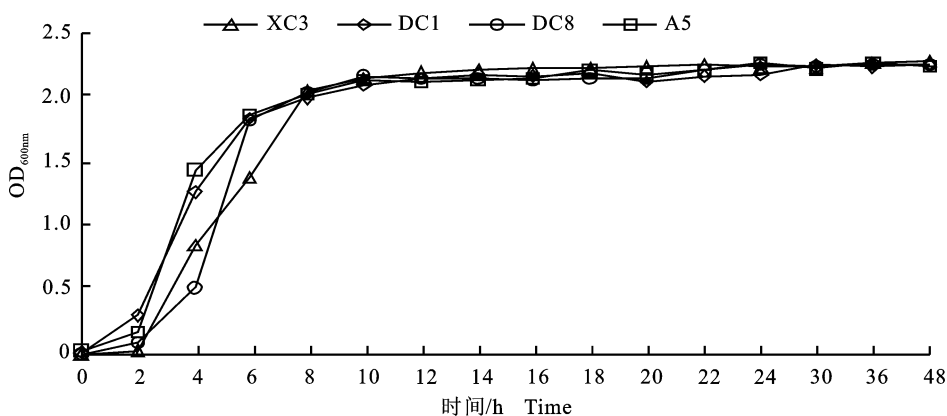


图 3 4 株乳酸菌的生长曲线图

Fig. 3 The growth curve of four lactic acid bacteria

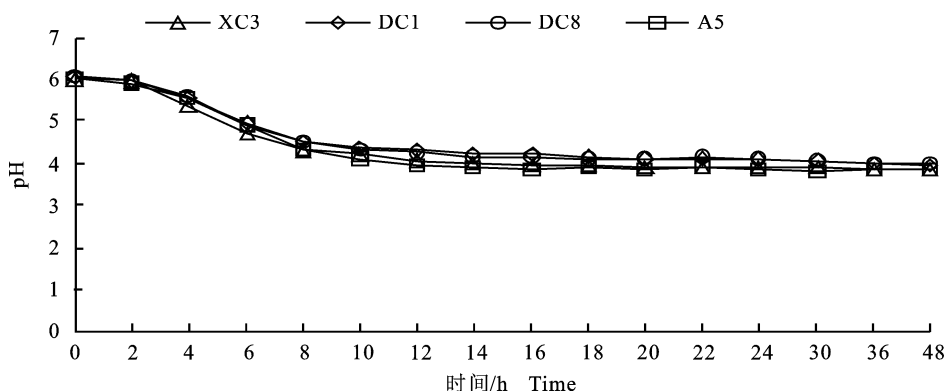
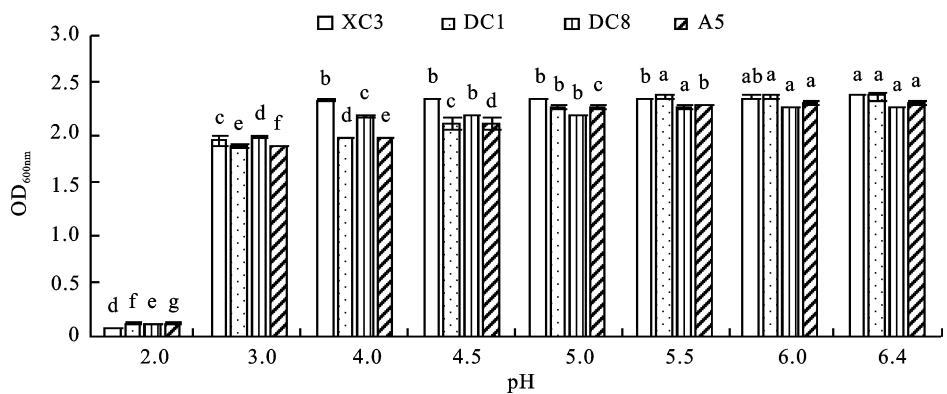


图 4 4 株筛选乳酸菌培养液的 pH 变化

Fig. 4 Changes of pH in culture medium of four lactic acid bacteria



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$) Different lowercase letters represent significant difference ($P < 0.05$)

图 5 不同 pH 下 4 株乳酸菌的生长情况

Fig. 5 Growth of four lactic acid bacteria at different pH

长具有不同的抑制作用。乳酸菌菌株在 1.5 g/L 的牛胆盐培养液中培养 24 h 后, 菌株 XC3 的耐受性最强, 存活率达到 98.46%, 菌株 DC8、A5 和 DC1 的存活率分别为 87.30%、86.72% 和 51.88%; 乳酸菌菌株在 3 g/L 的牛胆盐培养液中培养 24 h 后, 菌株 XC3 的存活率为 93.85%, 菌

株 DC8 和 A5 的存活率降为 51.59% 和 51.18%, 菌株 DC1 受到较强抑制作用, 存活率仅为 6.77%; 培养液中胆盐质量浓度为 6 g/L 时, 4 株乳酸菌菌株的生长均受到极强抑制, 存活率均低于 10%。

表 1 4 株乳酸菌在不同胆盐质量浓度培养液中培养 24 h 后的活菌数及存活率

Table 1 The viable counts of four lactic acid bacteria in bile salt with different mass concentration after 24 h

菌株 Strain	活菌数/(CFU/mL) Viable counts				存活率/% Survival rate		
	0 g/L	1.5 g/L	3.0 g/L	6.0 g/L	1.5 g/L	3.0 g/L	6.0 g/L
XC3	1.30×10 ⁹	1.28×10 ⁹	1.22×10 ⁹	0.11×10 ⁹	98.46	93.85	8.46
DC1	1.33×10 ⁹	0.69×10 ⁹	0.09×10 ⁹	0.06×10 ⁹	51.88	6.77	4.51
DC8	1.26×10 ⁹	1.10×10 ⁹	0.65×10 ⁹	0.10×10 ⁹	87.30	51.59	7.94
A5	1.23×10 ⁹	1.06×10 ⁹	0.63×10 ⁹	0.09×10 ⁹	86.72	51.18	7.68

2.5 乳酸菌对人工胃液和肠液的耐受性

由表 2 和表 3 可以看出,与 0 h(对照组)相比较,4 种乳酸菌生长均受胃蛋白酶和胰蛋白酶的抑制,处理 0.5 和 3 h 后活菌数均有所下降。但

是 4 种乳酸菌菌株对人工胃液、肠液有一定的耐受性,人工胃液处理 0.5 和 3 h 后,4 株乳酸菌的存活率均高于 80%,经人工肠液处理 0.5 和 3 h,存活率均高于 70%。

表 2 人工胃液处理下 4 株乳酸菌的活菌数及存活率

Table 2 Effect of artificial gastric juice on survivability and survival rate of four lactic acid bacteria

菌株 Strain	活菌数/(CFU/mL) Viable counts			存活率/% Survival rate	
	0 h	0.5 h	3 h	0.5 h	3 h
XC3	0.63×10 ⁸	0.62×10 ⁸	0.60×10 ⁸	98.73	94.90
DC1	0.79×10 ⁸	0.69×10 ⁸	0.66×10 ⁸	98.62	96.06
DC8	0.62×10 ⁸	0.62×10 ⁸	0.60×10 ⁸	87.06	84.01
A5	0.74×10 ⁸	0.69×10 ⁸	0.70×10 ⁸	93.01	94.09

表 3 人工肠液处理下 4 株乳酸菌的活菌数及存活率

Table 3 Effect of artificial intestinal juice on survivability and survival rate of Lactic acid bacteria

菌株 Strain	活菌数/(CFU/mL) Viable counts			存活率/% Survival rate	
	0 h	0.5 h	3 h	0.5 h	3 h
XC3	0.74×10 ⁸	0.67×10 ⁸	0.66×10 ⁸	91.08	89.73
DC1	0.73×10 ⁸	0.54×10 ⁸	0.54×10 ⁸	94.80	93.27
DC8	0.65×10 ⁸	0.62×10 ⁸	0.61×10 ⁸	74.73	73.90
A5	0.69×10 ⁸	0.62×10 ⁸	0.61×10 ⁸	90.09	88.63

3 讨论

细菌性腹泻是新生犊牛的一种常发性疾病,犊牛一旦感染,生长发育受到一定程度的影响,生产性能降低,造成不可忽视的经济损失。大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌等致病菌是引起动物细菌性腹泻的主要病原菌^[12]。乳酸菌及其代谢产物产生的酸性内环境,对大肠杆菌和沙门氏菌的生长与繁殖表现出不同程度的抑制作用^[13-14]。本研究将筛选菌源定位于同种动物(牦犊牛的胃肠道内容物),通过抗病原菌特性筛选出能够同时抑制大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌的乳酸菌,从而得到适合应用于牦犊牛生产的微生物添加剂菌种。通过 16S rRNA 基因序列分析与鉴定表明菌株 XC3 为乳酸片球菌,菌株

DC8 为罗伊氏乳杆菌,菌株 DC1 为戊糖片球菌,菌株 A5 为植物乳杆菌。

微生物在生长过程中,总共经历 4 个时间段,分别为适应期、对数期、稳定期和衰亡期。测定菌株的生长曲线对于确定合适的培养时间具有重要作用,常将微生物对数中后期和稳定期的菌液作为微生物制剂研究对象。本研究中观察乳酸菌 XC3、DC8、DC1 和 A5 的生长曲线发现,4 株乳酸菌在液体 MRS 培养基中培养 12 h 后进入稳定时期,细菌数较高,稳定性较好,是生产上用于接种的最适合菌龄。发酵液 pH 可直观地反映菌株的产酸能力,随着培养时间的增加,乳酸菌 XC3、DC8、DC1 和 A5 培养液的 pH 均不同程度下降,培养 12 h 后菌液的 pH 下降速度减慢,基本趋于稳定状态,适合应用于微生物制剂的制备。

目前已有关于体外法筛选益生菌的相关报道^[15]。益生菌对瘤胃和肠道内环境的较高耐受性是筛选优良益生菌的重要指标之一^[16-17]。乳酸菌 pH 和胆盐质量浓度的耐受性提高了乳酸菌进入动物肠道的定植能力^[18]。酸耐受性是检测乳酸菌益生作用的重要指标,乳酸菌只有耐受胃液的低 pH 环境,才可能在胃肠道环境中定植,发挥其益生功能^[19]。本研究结果表明,乳酸菌 XC3、DC8、DC1 和 A5 在 pH=2 的环境中受到严重影响,活菌数迅速降低,在 pH=3 的环境,菌株的活菌数较高,说明乳酸菌对低酸的胃内环境有抵御力。胆盐耐受性是检测乳酸菌能否在胃肠道定植,并在肠道发挥益生作用的关键指标^[20]。胆盐会使膜蛋白解离,细胞内容物渗漏,导致细胞死亡^[21]。乳酸菌需要耐受 3 g/L 胆盐的肠道内环境才能在肠道中定植^[22]。本研究中,胆盐质量浓度为 3 g/L 时,乳酸菌 XC3 生长状况良好,乳酸菌 DC8 和 A5 的生长受到一定影响,但存活率在 50% 以上,说明乳酸菌 XC3、DC8 和 A5 能够耐受肠道内胆盐形成的高渗透压环境。乳酸菌 DC1 在胆盐质量浓度为 3 g/L 的环境中生长受到严重影响,存活率仅有 6.77%,说明乳酸菌 DC1 对肠道内的胆盐环境抵御力弱。

胃液中的胃蛋白酶等抗菌物质是抵御乳酸菌进入肠道的第一道天然屏障。本研究利用人工胃液检测各菌株的生长情况,乳酸菌 XC3、DC8、DC1 和 A5 在人工胃液中生长 3 h 存活率均大于 80%,由此推测乳酸菌 XC3、DC8、DC1 和 A5 作为益生菌对胃内酸性环境具有较强抵抗力,大部分都可以在胃内存活。同时,益生乳酸菌若要在动物肠道存活及增殖,需要能够耐受胆盐和胰液对菌体的破坏作用^[23]。模拟人工肠液试验结果表明,乳酸菌 XC3、DC8、DC1 和 A5 在人工肠液中生长 3 h 存活率均大于 70%,说明乳酸菌 XC3、DC8、DC1 和 A5 作为益生菌对肠道内环境有较强抵抗力,能够在肠道中成功定植并生长。

4 结论

以牦犊牛的胃肠道内容物为菌源,分离筛选出对沙门氏菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌 3 种致病菌具有较强抑制作用的乳酸菌 XC3、DC8、DC1 和 A5,经 16S rRNA 基因序列分析鉴定,确定 XC3 为乳酸片球菌,DC8 为罗伊乳杆菌,DC1 为戊糖片球菌,A5 为植物乳杆菌;通过对筛选乳

酸菌的耐酸、耐胆盐,人工胃液和肠液耐受性等体外益生特性研究,确定 XC3、DC1 和 A5 具有潜在的益生作用,能作为牦犊牛益生菌制剂的添加对象。

参考文献 Reference:

- [1] 文艺. 牦犊牛腹泻病因分析与防治试验报告[J]. 畜牧兽医杂志, 2008, 27(2): 19-21.
WEN Y. Cause of disease analysis and cure measure experiment of severity diarrhea about baby yak[J]. *Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2008, 27 (2): 19-21.
- [2] 高睿, 张彦明, 张振仓, 等. 陕西省犊牛细菌性腹泻病原分离鉴定及敏感中药的筛选和初步应用[J]. 西北农业学报, 2007, 16(4): 195-197.
GAO R, ZHANG Y M, ZHANG ZH C, et al. Pathogen isolation and identification of cattle bacterial diarrhea in Shaanxi and screening sensitive Chinese herb and preliminary application[J]. *Acta Agricultural Boreali-occidentalis Sinica*, 2007, 16(4): 195-197.
- [3] 李华坤, 孙朋. 江苏徐州市鸡白痢沙门氏菌的分离鉴定与耐药性分析[J]. 中国动物检疫, 2014, 31(12): 47-49.
LI H K, SUN P. Identification and analysis of drug resistance of *Salmonella pullorum* in Xuzhou area[J]. *China Animal Health Inspection*, 2014, 31(12): 47-49.
- [4] 石彬, 孙艳, 泽仁拥忠, 等. 凉山州不同动物源大肠杆菌耐药性调查[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2018(4): 115-119.
SHI B, SUN Y, ZERENYONGZHONG, et al. Investigation of drug resistance of *E. coli* from different animal origins in Liangshan Prefecture[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2018(4): 115-119.
- [5] 章文明, 汪海峰, 刘建新. 乳酸杆菌益生作用机制的研究进展[J]. 动物营养学报, 2012, 24(3): 389-396.
ZHANG W M, WANG H F, LIU J X. Mechanism of action of probiotic function of *Lactobacilli*[J]. *Chinese Journal of Traditional Veterinary Science*, 2012, 24(3): 389-396.
- [6] ROLFE R D, ROBERTS S B, HEYMAN M B, et al. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health[J]. *Journal of Nutrition*, 2000, 130 (2S Suppl): 396S.
- [7] 陆克文. 新型猪用复合益生菌制剂的研制与开发[D]. 南京: 南京农业大学, 2011.
LU K W. Development of new combined probiotics preparatum used in swine[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2011.
- [8] KEERSMAECKER S C J D, VERHOEVEN T L A, JOS D, et al. Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG against *Salmonella typhimurium* is due to accumulation of lactic acid[J]. *Fems Microbiology Letters*, 2006, 259(1): 89-96.
- [9] OGAWA M, SHIMIZU K, NOMOTO K, et al. Inhibition of

- in vitro growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic *Lactobacillus* strains due to production of lactic acid[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, 68(1):135.
- [10] OTERO M C, NADERMACIAS M E. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂-producing *Lactobacillus gasseri* isolated from the vaginal tract of cattle[J]. *Animal Reproduction Science*, 2006, 96(1):35-46.
- [11] 董晓丽, 张乃锋, 周盟, 等. 一株乳酸菌 GF103 的分离鉴定及体外益生效果评价[J]. *动物营养学报*, 2012, 24(9):1832-1838.
- DONG X L, ZHANG N F, ZHOU M, *et al.* Isolation and identification of *Lactobacillus* sp. GF103 and assess it as potential probiotics in vitro[J]. *Journal of Animal Nutrition*, 2012, 24(9):1832-1838.
- [12] 孙树民, 孙连伟, 除金江. 犊牛腹泻病的诊治[J]. *中兽医学杂志*, 2005(2):20.
- SUN SH M, SUN L W, CHU J J. Diagnosis and treatment of diarrhea in calves[J]. *Chinese Journal of Traditional Veterinary Science*, 2005(2):20.
- [13] SHU Q, QU F, GILL H S. Probiotic treatment using *Bifidobacterium lactis* HN019 reduces weanling diarrhea associated with rotavirus and *Escherichia coli* infection in a piglet model[J]. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition*, 2001, 33(2):171-177.
- [14] 黄沧海, 谯仕彦, 李德发, 等. 益生乳酸杆菌抑制大肠杆菌的研究[J]. *中国畜牧杂志*, 2003, 39(6):27-28.
- HUANG C H, QIAO SH Y, LI D F, *et al.* Study on the inhibition of *E. coli* by beneficial lactobacilli[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2003, 39(6):27-28.
- [15] ROSS G R, GUSILS C, OLISZEWSKI R, *et al.* Effects of probiotic administration in swine [J]. *Journal of Bioscience & Bioengineering*, 2010, 109(6):545-549.
- [16] VASILJEVIC T, SHAH N P. Probiotics from Metchnikoff to bioactives[J]. *International Dairy Journal*, 2008, 18(7):714-728.
- [17] CHAN E S, LEE P P, RAVOMDRA P, *et al.* A standard quantitative method to measure acid tolerance of probiotic cells[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2010, 86(1):385-391.
- [18] 李肖, 李海洋, 房艳华, 等. 饲用优良乳酸菌鉴定及生物学特性研究[J]. *西北农业学报*, 2017, 26(11):1655-1663.
- LI X, LI H Y, FANG Y H, *et al.* Screening and characteristics of excellent lactic acid bacteria for silage additive and probiotics[J]. *Acta Agricultural Boreali-occidentalis Sinica*, 2017, 26(11):1655-1663.
- [19] 刘虹, 姚文, 于卓腾, 等. 一组鸡源乳酸菌产乳酸及其耐受特性研究[J]. *微生物学通报*, 2006, 33(5):1-5.
- LIU H, YAO W, YU ZH T, *et al.* Lactic acid production and tolerance property of lactic acid bacteria from broiler intestine[J]. *Microbiology China*, 2006, 33(5):1-5.
- [20] KLEESSEN B, BUNKE H, TOVAR K, *et al.* Influence of two infant formulas and human milk on the development of the faecal flora in newborn infants[J]. *Acta Paediatrica*, 1995, 84(12):1347-1356.
- [21] BEGLEY M, GAHAN C G, HILL C. The interaction between bacteria and bile[J]. *Fems Microbiology Reviews*, 2005, 29(4):625-651.
- [22] HYRONIMUS B, LE M C, SASSI A H, *et al.* Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, 61(2):193-197.
- [23] 张国庆, 董晓芳, 佟建明, 等. 一株芽孢杆菌的分离和鉴定[J]. *微生物学通报*, 2010, 37(8):1159-1163.
- ZHANG G Q, DONG X F, TONG J M, *et al.* Isolation and identification of a *Bacillus* sp. starin[J]. *Microbiology China*, 2010, 37(8):1159-1163.

Screening and Identification of Lactic Acid Bacteria and Probiotic Characteristics in Vitro on Yak Calves

ZHANG Xueyan, NIE Zhaolong, WANG Tong, PAN Hao, SUN Lu,
WANG Lei, LIU Shujie and CUI Zhanhong

(Qinghai Yak Engineering Technology Research Center, Key Laboratory of Plateau Grazing Animal Nutrition and Feed Science of Qinghai Province, Qinghai Academy of Animal Husbandry and Veterinary Sciences, Qinghai University, Xining 810016, China)

Abstract Four strains of lactic acid bacteria XC3, DC1, DC8 and A5 were screened from the gastrointestinal contents of 3-month-old healthy yaks, which could simultaneously inhibit *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Staphylococcus aureus*. The 16S rRNA sequence analysis showed that XC3 was *Pediococcus acidilactici*, DC8 was *Lactobacillus reuteri*, DC1 was *Pediococcus pentosaceus* and A5 was *Lactobacillus plantarum*. The probiotic characteristics of four strains were evaluated by in vitro experiments. When pH=3, the number of viable bacteria of four strains was higher. The survival rates of XC3, DC8 and A5 were 93.85%, 51.59% and 51.18% respectively in 3 g/L bovine bile salt medium, but the survival rates of DC1 were only 6.77%. After incubation in artificial gastric juice for 0.5 h and 3 h, the survival rates of four strains were higher than 80%, and after incubation in artificial intestinal juice for 0.5 h and 3 h, the survival rates were higher than 70%. The results showed that *Lactobacillus* XC3, DC8 and A5 had potential probiotic effects and could be used as additives for yak special probiotics.

Key words Lactic acid bacteria; Yak calves; 16S rRNA ; Probiotics in vitro

Received 2018-07-09

Returned 2019-01-03

Foundation item Chunhui Plan Research Project of the Ministry of Education(No. z2016095); Top-notch Personnel Project of High-end Innovative Talents Thousand People Plan in Qinghai Province; the Western Young Scholar Project of the Chinese Academy of Sciences; the Major Special Projects of Qinghai Science and Technology Department(No. 2015-SF-A4-2).

First author ZHANG Xueyan, female, master student. Research area: feed resources development and utilization. E-mail: 1724140765@qq.com

Corresponding author CUI Zhanhong, male, associate research fellow. Research area: ruminant nutrition and feed science. E-mail: cuizhanhong27@126.com

(责任编辑: 顾玉兰 Responsible editor: GU Yulan)