

# 藏猪源乳酸菌的分离鉴定及益生特性测定

樊秋月, 林焱\*, 朱伟云

南京农业大学 动物科技学院, 国家动物消化道营养国际联合研究中心, 江苏省消化道营养与动物健康重点实验室, 消化道微生物研究室, 江苏 南京

樊秋月, 林焱, 朱伟云. 藏猪源乳酸菌的分离鉴定及益生特性测定[J]. 微生物学报, 2025, 65(7): 3165-3176.

FAN Qiuyue, LIN Yan, ZHU Weiyun. Isolation, identification, and probiotic property evaluation of lactic acid bacteria from Xizang pigs[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(7): 3165-3176.

**摘要:** 乳酸菌(lactic acid bacteria, LAB)是益生菌的主要来源。我国珍贵的地方猪种藏猪的肠道乳酸菌资源仍有待挖掘。【目的】筛选优质藏猪源乳酸杆菌。【方法】采用平板划线法分离并通过16S rRNA 基因测序鉴定乳酸菌, 进一步选择2株乳酸产量有显著差异的藏猪源罗伊氏黏液乳杆菌和1株实验室此前保存杜×长×大(duroc×landrace×yorkshire, DLY)猪源的罗伊氏黏液乳杆菌, 共3株菌进行耐酸耐胆盐、抗氧化试验、抑菌能力以及耐药性等生物学特性分析和比较。【结果】从藏猪中分离鉴定到21株乳酸菌, 分别为10株非解乳糖链球菌(*Streptococcus alactolyticus*)、6株罗伊氏黏液乳杆菌(*Limosilactobacillus reuteri*) [原名为罗伊氏乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*)], 3株食淀粉乳杆菌(*Lactobacillus amylovorus*)、1株肠膜状明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)和1株阴道黏液乳杆菌(*Limosilactobacillus vaginalis*)。在挑选出的3株菌中, *L. reuteri* T-B5L2的乳酸产量最高, 该菌在pH 3.0和0.1%胆盐的培养基中均表现出较强的生存能力, 其抑制肠致病性大肠杆菌和猪霍乱沙门菌生长的能力最强。3株菌在抗氧化能力上无显著差异。3株菌均对青霉素类和头孢菌素类抗生素较敏感, 对四环素类、氨基糖苷类和糖肽类抗生素有抵抗力。【结论】本研究从藏猪粪便中分离到21株乳酸菌, 其中*L. reuteri* T-B5L2的产酸能力最强。进一步的体外生化特性测定结果表明, *L. reuteri* T-B5L2生长性能良好, 具有耐酸、耐胆盐、抗氧化和抑制病原菌生长的能力, 是一株具有潜力的益生菌。

**关键词:** 藏猪; 乳酸菌; 罗伊氏黏液乳杆菌; 分离; 鉴定; 益生特性

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFD1600904-3)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFD1600904-3).

\*Corresponding author. E-mail: linyan@njau.edu.cn

Received: 2025-01-15; Accepted: 2025-03-20; Published online: 2025-05-26

## Isolation, identification, and probiotic property evaluation of lactic acid bacteria from Xizang pigs

FAN Qiuyue, LIN Yan\*, ZHU Weiyun

National Center for International Research on Animal Gut Nutrition, Jiangsu Key Laboratory of Gastrointestinal Nutrition and Animal Health, Laboratory of Gastrointestinal Microbiology, College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu, China

**Abstract:** Lactic acid bacteria (LAB) are the predominant probiotics with significant health-promoting potential. Xizang pigs, an invaluable indigenous breed in China, harbor a unique and largely unexplored reservoir of intestinal LAB. **[Objective]** To screen high-quality LAB isolated from Xizang pigs. **[Methods]** LAB were isolated by the streak plate method and identified by 16S rRNA gene sequencing. Two *Limosilactobacillus reuteri* strains with significantly different lactic acid production capacities were selected from Xizang pigs. The two strains, together with one *L. reuteri* strain previously preserved in our laboratory, which originated from duroc×landrace×yorkshire pigs, were assessed in terms of acid and bile salt tolerance, antioxidant activity, antibacterial properties, and antibiotic resistance. **[Results]** A total of 21 LAB strains were isolated and identified from the intestinal microbiota of Xizang pigs, including ten *Streptococcus alactolyticus* strains, six *L. reuteri* strains, three *Lactobacillus amylovorus* strains, one *Leuconostoc mesenteroides* strain, and one *Limosilactobacillus vaginalis* strain. Among the three strains screened out, *L. reuteri* T-B5L2 exhibited the highest lactic acid production. Moreover, this strain demonstrated strong survival under pH 3.0 and 0.1% bile salts. *L. reuteri* T-B5L2 exhibited the strongest inhibitory activity against enteropathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella Choleraesuis*. There were no significant differences in antioxidant activity among the three strains. All the three strains exhibited high sensitivity to penicillins and cephalosporins but displayed resistance to tetracyclines, aminoglycosides, and glycopeptides. **[Conclusion]** In this study, 21 LAB strains were isolated from the feces of Xizang pigs, among which *L. reuteri* T-B5L2 exhibited the highest acid production capacity. Further *in vitro* biochemical characterization demonstrated that this strain exhibited good growth performance, acid and bile salt tolerance, antioxidant activity, and the ability to inhibit pathogenic bacteria. These findings suggest that *L. reuteri* T-B5L2 is a promising probiotic candidate with potential applications in improving intestinal health and mitigating pathogenic infections.

**Keywords:** Xizang pig; lactic acid bacteria; *Limosilactobacillus reuteri*; isolation; identification; probiotic properties

乳酸菌(lactic acid bacteria, LAB)是一类耐酸且需氧量低的革兰氏阳性杆菌或球菌,属于乳酸杆菌目<sup>[1]</sup>。乳酸菌能够抑制大肠杆菌和沙门氏菌等致病菌的生长<sup>[2-3]</sup>,这使得乳酸菌成为潜在

的抗生素替代品<sup>[4]</sup>。研究表明,在断奶仔猪中添加乳酸菌有助于维持仔猪肠道菌群平衡,增强免疫力,改善生长性能<sup>[5]</sup>。此外,孔庆辉<sup>[6]</sup>的研究表明,罗伊氏黏液乳杆菌(*Limosilactobacillus*

*reuteri*) [原名为罗伊氏乳杆菌 (*Lactobacillus reuteri*)] 通过增强肠道黏膜的物理、化学、免疫和微生物屏障等多种机制, 调节肠道健康, 从而有效抵御脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 对断奶藏仔猪肠道的损伤, 并缓解肠道的炎症反应。因此, 在养殖业中筛选和运用优质乳酸菌具有重要意义。

藏猪是我国珍贵的地方猪种, 主要分布在青藏高原<sup>[7]</sup>。与杜×长×大 (duroc×landrace×yorkshire, DLY) 猪相比, 藏猪具有耐粗饲、抗病力强和肉质鲜美等优点<sup>[8]</sup>。由于饲养模式和生长的地理环境不同, 藏猪肠道内含有丰富的菌种资源<sup>[9-10]</sup>。Shang 等<sup>[11]</sup>研究表明, 藏猪结肠肠道菌群的组成和丰度与其优良性状密切相关。同时, 相关研究表明断奶后的藏猪肠道内乳酸杆菌的数量显著高于长白猪<sup>[12]</sup>。目前, 有关藏猪源乳酸菌的研究有限, 且藏猪源乳酸菌资源也较少, 开发和利用藏猪源乳酸菌对丰富益生菌库具有重要意义。本研究采集西藏 3 个猪场的粪样, 分离藏猪粪便中的乳酸菌, 旨在筛选优质藏猪源乳酸菌, 并对其益生特性进行系统评估, 为进一步开发藏猪源乳酸菌提供研究基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

三号胆盐购自北京索莱宝科技有限公司; 细菌微量生化鉴定管购自青岛高科技工业园海博生物技术有限公司; 乳酸测试盒购自南京迈博昊成生物技术有限公司; 药敏纸片购自比克曼生物技术有限公司, 分别为: 四环素 (30 µg/片)、多西环素 (30 µg/片)、强力霉素 (30 µg/片)、米诺环素 (30 µg/片)、链霉素 (10 µg/片)、卡那霉素 (10 µg/片)、阿米卡星 (10 µg/片)、庆大霉素 (120 µg/片)、氨苄西林 (10 µg/片)、青霉素 (10 µg/片)、头孢哌酮 (75 µg/片)、头孢曲松 (30 µg/片)、头孢唑林 (30 µg/片)、头孢呋辛钠 (30 µg/片)、头孢噻啉

(30 µg/片)、万古霉素 (30 µg/片)、恩诺沙星 (10 µg/片)、氯霉素 (30 µg/片); FeSO<sub>4</sub> 购自上海麦克林生化科技股份有限公司; 2,2-联苯基-1-苦基肼基 (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH)、甲醇 (0.791–0.793 g/mL)、邻二氮菲、Omega 细菌 DNA 提取试剂盒、Omega 质粒小量提取 I 型试剂盒均购自南京希宝生物科技有限公司; 荧光定量 PCR 试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

酶标仪, TECAN 公司; 超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; 实时荧光定量 PCR 仪, ThermoFisher Scientific 公司。

### 1.2 样品来源

本研究从西藏林芝朗县一猪场、西藏林芝巴宜区白马镇一猪场以及西藏农牧学院藏猪试验基地 3 个猪场采集了断奶仔猪、保育猪和育肥猪 3 个生长阶段的粪样分离乳酸菌 (表 1)。

### 1.3 菌株

实验室前期从 DLY 猪中分离得到的 4 株乳酸菌: *Lactobacillus amylophilus* D-S1、*Limosilactobacillus mucosae* D-109-4、*Lactobacillus johnsonii* D-S2、*Limosilactobacillus reuteri* D-109-1。产肠毒素大肠杆菌 (*Escherichia coli*) K88 CVCC 1526 由南京农业大学动物医学院汤芳教授惠赠, 猪霍乱沙门菌 (*Salmonella enterica* serovar Choleraesuis, SC) ATCC 13312 购自北纳创联生物科技有限公司。*L. reuteri* D-109-1、*Limosilactobacillus reuteri* T-B5L2 和 *Limosilactobacillus reuteri* T-B5L1 的序列已上传至 GenBank, 登录号分别为: PV094651、PV094652、PV094653。含有 *intI1*、*intI2*、*incN-rep*、*incP-oriT*、*incW-rep*、*tnpA02* 质粒的标准大肠杆菌由南京农业大学资源与环境学院谢婉滢副教授惠赠。

### 1.4 乳酸菌的分离鉴定

用接种环蘸取适量粪样后于 MRS 琼脂培养基上划线, 置于 37 °C 培养 24 h 后, 挑取单菌落

表1 乳酸菌的分离来源

Table 1 Isolated sources of lactic acid bacteria

| 地点<br>Location                                                                         | 猪生长阶段<br>Growth stage of pigs   | 采样时间<br>Sampling time |
|----------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|-----------------------|
| 西藏林芝朗县猪场<br>Pig farm in Lang County, Nyingchi, Xizang                                  | 保育猪 Nursery pigs                | 2023-02-12            |
|                                                                                        | 育肥前期 Early grower-finisher pigs | 2023-02-13            |
|                                                                                        | 育肥后期 Late grower-finisher pigs  | 2023-02-14            |
| 西藏林芝巴宜区白马镇猪场<br>Pig farm in Baima Town, Bayi District, Nyingchi, Xizang                | 断奶仔猪 Weaned piglets             | 2023-02-28            |
|                                                                                        | 保育猪 Nursery pigs                | 2023-02-28            |
|                                                                                        | 育肥猪 Finishing pigs              | 2023-03-05            |
| 西藏农牧学院实验基地<br>Experimental base of Xizang Agricultural and Animal Husbandry University | 断奶仔猪 Weaned piglets             | 2023-03-10            |
|                                                                                        | 保育猪 Nursery pigs                | 2023-03-11            |
|                                                                                        | 育肥猪 Finishing pigs              | 2023-03-12            |

于 MRS 液体培养基中, 37 °C 静置培养 24 h。以纯化后的菌液为模板, PCR 扩增 16S rRNA 基因, 使用乳酸菌的特异性引物<sup>[13]</sup>: 上游引物 F (5'-AGCAGTAGGGAATCTTCCA-3')和下游引物 R (5'-ATTCCACCGCTACACATG-3')。PCR 反应体系(25 μL): 2×*Taq* PCR Mix 12.5 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, 菌液 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 9.5 μL。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s, 61 °C 退火 1 min, 68 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 68 °C 终延伸 7 min。将扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检验<sup>[13]</sup>。将扩增成功的菌株送至北京擎科生物科技股份有限公司进行测序, 最后将测得序列与 NCBI 数据库进行比对。

1.5 产乳酸能力测定

将鉴定完成的所有藏猪乳酸菌以及实验室前期分离到的 4 株 DLY 猪源的乳酸菌菌株进行培养, 37 °C 厌氧培养 24 h, 调节所有乳酸菌菌液的 *OD*<sub>600</sub> 值为 1.0, 后续试验菌液浓度调节均如此。分别以 2% 的比例接种至 10 mL MRS 肉汤中, 每株菌 3 个重复, 37 °C 厌氧培养 24 h。使用乳酸试剂盒测定菌株产乳酸能力, 具体试验步骤参考说明书进行。

1.6 生长曲线测定

菌株的培养以及浓度调节同 1.5 节, 使用分

光光度计测定滚管上同一位置的吸光度值。0–10 h 每 2 h 检测 1 次吸光度值, 10–18 h 每 4 h 测定 1 次吸光度值, 18–24 h 每 2 h 测定 1 次吸光度值, 记录数据并绘制生长曲线。

1.7 生化试验测定

使用细菌微量生化鉴定管对乳酸菌进行生化鉴定, 菌株的培养以及浓度调节同 1.5 节。使用灭菌环蘸取菌液加入到生化鉴定管中, 使用封口膜包裹生化鉴定管, 放入 37 °C 培养箱中培养 12 h, 观察生化鉴定管颜色变化。颜色由紫色变成黄色则为阳性, 未发生颜色变化则为阴性。

1.8 耐酸、耐胆盐能力测定

参考文献[14], 将 1 mol/L 的盐酸添加到 MRS 培养基中, 调节 MRS 培养 pH 值分别为 2.0 和 3.0, 对照组 pH 6.2; 分别配制含有 0.1% 和 0.3% 牛胆盐的 MRS 培养基, 对照组不含牛胆盐, 每组做 3 个重复, 生长比例的计算如公式(1)所示。

生长比例 =  $\frac{\text{试验组 } OD \text{ 值}}{\text{对照组 } OD \text{ 值}} \times 100\%$  (1)

菌株的培养以及浓度调节同 1.5 节, 取 2% 菌液接入 10 mL 培养基中, 37 °C 静置培养 5 h 后, 使用分光光度计测菌液 *OD*<sub>600</sub> 值。

## 1.9 抗氧化能力测定

DPPH 自由基(DPPH·)清除能力测定根据 Brand-Williams 等<sup>[15]</sup>描述的方法, 略作修改。配制  $6 \times 10^{-2}$  mmol/L 的 DPPH 自由基溶液, 配制好的溶液避光保存, 现配现用。取  $OD_{600}$  值为 1.0 时的菌液和 DPPH 自由基按照 1:4 的比例进行混合, 混匀后避光 30 °C 静置培养 30 min, 每株菌 3 个重复。使用酶标仪测定溶液在 517 nm 处的吸光度, DPPH 自由基清除率的计算如公式(2)所示。

$$\text{DPPH 自由基清除率} = \frac{(A_0 - A_F)}{A_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中:  $A_0$  为培养前吸光度值,  $A_F$  为培养后吸光度值。

配制 0.75 mmol/L 的邻二氮菲溶液和 0.75 mmol/L 的  $\text{FeSO}_4$  溶液。菌液浓度同 1.5 节。本研究设空白组( $A_x$ )、对照组( $A_0$ )和试验组( $A_y$ ), 按照 Niu 等<sup>[16]</sup>的试验方法依次加入试剂, 最后充分混匀。37 °C 金属浴 1 h, 测量溶液在 536 nm 处的吸光度, 羟基自由基清除率的计算如公式(3)所示。

$$\text{羟基自由基清除率} = \frac{A_y - A_0}{A_x - A_0} \times 100\% \quad (3)$$

## 1.10 抑菌能力测定

使用打孔法检测菌株抑制病原菌的能力。将培养至对数生长期的 *E. coli* 1526 和 SC 13312 稀释至  $10^7$  CFU/mL 进行抑菌试验。乳酸菌菌液浓度调节同 1.5 节, 10 000 r/min 离心 10 min, 过滤取菌液上清液待用。使用培养皿进行固体培养基制备时, 控制培养基的厚度均匀一致, 约为 4 mm, 以此保证试验的准确性。取 100  $\mu$ L 致病菌菌液, 使用无菌棉花棒将致病菌均匀涂抹在 LB 固体培养基上, 使用 1 mL 无菌枪头在培养基上打孔, 在孔中加入 150  $\mu$ L 的乳酸菌上清液, 每株菌 3 个重复, 37 °C 温箱培养 24 h。使用游标卡尺测量抑菌直径。

## 1.11 耐药性测定

采用药敏纸片法评估待测菌株的抗生素敏

感性。乳酸菌菌液浓度调节同 1.5 节, 使用无菌棉花棒蘸取菌液, 将乳酸菌菌液均匀涂在 MRS 琼脂培养基上, 然后将药敏纸片分布均匀地贴于涂布了菌液的培养基上。37 °C 培养 24 h 后, 使用游标卡尺测量抑制圈的直径, 根据檀茜倩等<sup>[17]</sup>使用的判定标准以判断菌株对抗生素的敏感程度。

测定的抗生素包括: 四环类抗生素(四环素、强力霉素、米诺环素), 氨基糖苷类抗生素(链霉素、卡那霉素、阿米卡星、庆大霉素), 青霉素类抗生素(氨苄西林、青霉素), 头孢菌素类抗生素(头孢哌酮、头孢曲松、头孢唑林、头孢呋辛钠、头孢噻啶), 糖肽类抗生素(万古霉素), 氟喹诺酮类抗生素(恩诺沙星), 酰胺醇类抗生素(氯霉素)。

## 1.12 乳酸菌中可移动遗传元件(mobile genetic elements, MGEs)基因测定

提取 3 株 *L. reuteri* DNA, 采用绝对定量(qPCR)的方法对 3 株 *L. reuteri* DNA 进行 5 个常见的 MGEs 基因(*intI1*、*intI2*、*tnpA02*、*incP-oriT* 和 *incW-rep*)的定量测定。这些基因可以反映乳酸菌中 MGEs 的结构特征、功能或转移能力。MGEs 标记基因引物见表 2。绝对定量试验方法参考 Liu 等<sup>[18]</sup>的方法。

表2 MGEs标记基因引物

Table 2 Primers of MGEs marker genes

| Primers name     | Primer sequences (5'→3')   |
|------------------|----------------------------|
| <i>intI1</i>     | F: GCCTTGATGTTACCCGAGAG    |
|                  | R: GATCGGTCGAATGCGTGT      |
| <i>intI2</i>     | F: TGCTTTTCCCACCCTTACC     |
|                  | R: GACGGCTACCCTCTGTTATCTC  |
| <i>incP-oriT</i> | F: CAGCCTCGCAGAGCAGGAT     |
|                  | R: CAGCCGGGCAGGATAGGTGAAGT |
| <i>incW-rep</i>  | F: GGCCATCGTATCAACGAGAT    |
|                  | R: ATTGGTGCCTCAAAGTAGC     |
| <i>tnpA02</i>    | F: GGGCGGGTCGATTGAAA       |
|                  | R: GTGGGCGGGATCTGCTT       |

### 1.13 数据统计及分析

使用 Microsoft Excel 对数据进行初步整理, 并利用 GraphPad Prism 进行统计分析。试验数据通过单因素方差分析进行差异显著性检验, 绘图采用 GraphPad Prism 软件完成。结果以“平均值 $\pm$ 标准误”表示, 当  $P<0.05$  时, 差异被认为具有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 乳酸菌的分离鉴定及筛选

经 MRS 培养基分离以及 16S rRNA 基因测序鉴定, 从藏猪的粪样中共分离得到 21 株乳酸菌, 分别为 10 株非解乳糖链球菌(*Streptococcus alactolyticus*)、6 株罗伊氏黏液乳杆菌(*Limosilactobacillus reuteri*)、3 株食淀粉乳杆菌

(*Lactobacillus amylovorus*)、1 株肠膜状明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)和 1 株阴道黏液乳杆菌(*Limosilactobacillus vaginalis*)。由于本研究只探究乳酸菌, 因此后续未对 10 株非解乳糖链球菌进行生物学特性测定。

### 2.2 15 株乳酸菌乳酸产量

测定本研究分离到的 11 株藏猪源乳酸菌和实验室前期从 DLY 猪中分离到的 4 株乳酸杆菌的乳酸产量, 结果显示藏猪源罗伊氏黏液乳杆菌 *L. reuteri* T-B5L2 乳酸产量最高, 为 55.80 mmol/L, 肠膜状明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*) T-Y2Z-1 乳酸产量最低, 为 4.44 mmol/L (图 1)。乳酸是乳酸菌发挥益生作用的重要基础, 由于 *L. reuteri* T-B5L2 乳酸产量最高, 因此本研究进一步分析其益生特性。为了进一步确认产乳酸能力与其益生特性是否呈现正相关关系, 因此

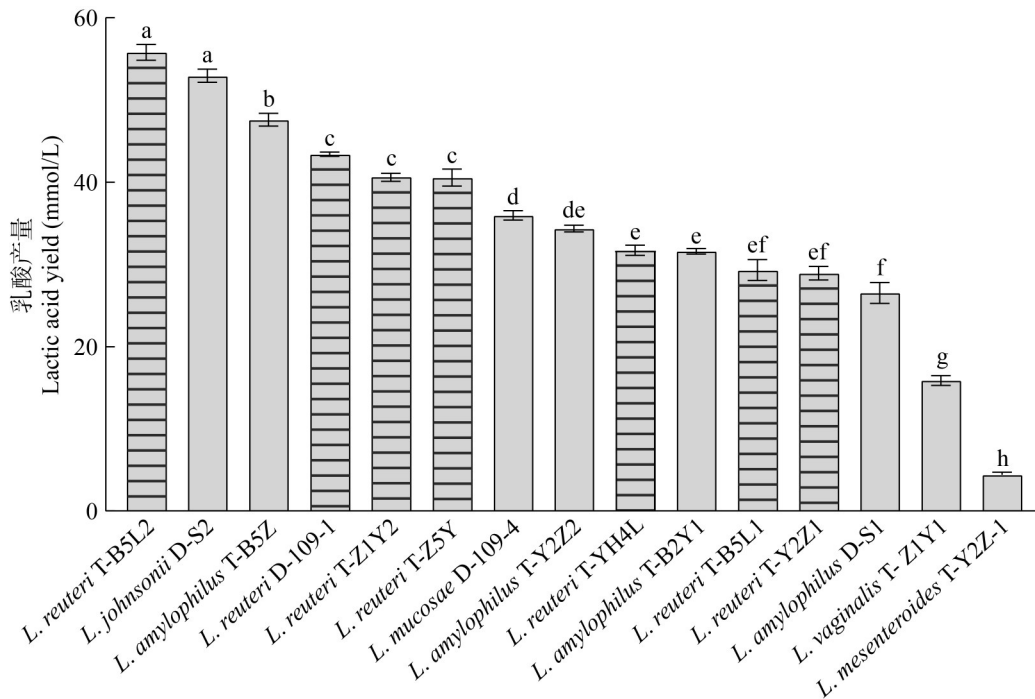


图1 15株乳酸菌乳酸产量。横纹表示该柱为罗伊氏黏液乳杆菌, 不同小写字母表示组间差异显著 ( $P<0.05$ ), 下同。

Figure 1 Lactic acid yield of 15 lactic acid bacteria strains. The horizontal stripes indicate that the column represents *Limosilactobacillus reuteri*. Different lowercase letters indicate significant differences among treatments at  $P<0.05$ . The same as below.

本研究进一步分析了 7 株 *L. reuteri* 的乳酸产量差异(图 1 中带横纹的柱子)。结果显示, *L. reuteri* T-B5L2 乳酸产量显著高于其他 6 株 *L. reuteri* ( $P<0.05$ ), 其中 *L. reuteri* D-109-1、*L. reuteri* T-Z1Y2 和 *L. reuteri* T-Z5Y 这 3 株菌之间乳酸产量无显著差异, 且显著高于 *L. reuteri* T-YH4L、*L. reuteri* T-B5L1 和 *L. reuteri* T-Y2Z1。因此, 后续研究从产乳酸能力不同的 3 个梯度的 *L. reuteri* 中各选 1 株进行后续研究。所选菌株为: 产酸最多的 *L. reuteri* T-B5L2、产酸居中的 *L. reuteri* D-109-1 和产酸偏低的 *L. reuteri* T-B5L1。

2.3 三株 *Limosilactobacillus reuteri* 的生长性能

三株菌生长速度相似, 均在接种 4 h 后进入对数期, 在 18 h 后进入稳定期。20–22 h 时, *L. reuteri* D-109-1 的  $OD_{600}$  值高于 *L. reuteri* T-B5L1 ( $P<0.05$ ); 24 h 时, *L. reuteri* T-B5L2 和 *L. reuteri* D-109-1 的  $OD_{600}$  值均高于 *L. reuteri* T-B5L1 ( $P<0.05$ , 图 2)。

2.4 三株 *Limosilactobacillus reuteri* 生化鉴定结果

生化鉴定结果表明(表 3), 3 株菌均能利用麦芽糖、蔗糖、棉子糖和乳糖。

2.5 三株 *Limosilactobacillus reuteri* 耐酸耐胆盐能力

耐酸试验结果表明(图 3), 当 pH 3.0 时,

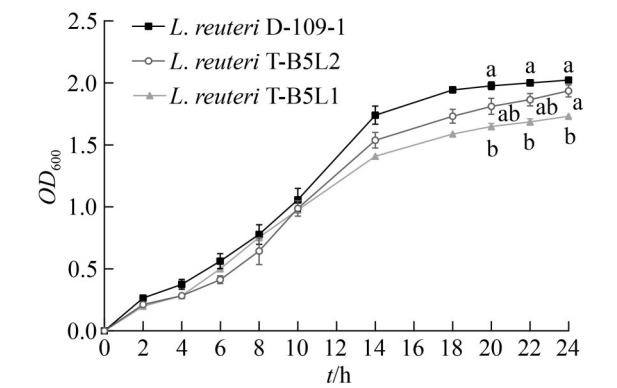


图2 三株罗伊氏黏液乳杆菌生长曲线  
Figure 2 Growth curves of three *Limosilactobacillus reuteri* strains.

*L. reuteri* T-B5L2 的生长比例最高, 显著高于 *L. reuteri* T-B5L1 ( $P<0.05$ )。当 pH 2.0 时, 3 株菌的生长比例相较 pH 3.0 时均有所下降, 且 3 株菌间无显著差异。耐胆盐试验结果表明, 当培养基中含有 0.1% 胆盐时, 3 株菌均有较高的生长比例, 其中 *L. reuteri* T-B5L2 的生长比例最高; 随着胆盐浓度的提高, 当培养基中含有 0.3% 胆盐时, 3 株菌的生长比例均下降, 且不存在显著差异。

2.6 三株 *Limosilactobacillus reuteri* 抗氧化能力

三株菌对 DPPH 自由基和羟基自由基( $OH\cdot$ )均有一定的清除能力, 但未表现出存在显著差异。然而, *L. reuteri* T-B5L2 表现出更高的清除能力趋势(图 4)。

表3 三株罗伊氏黏液乳杆菌生化鉴定

| 菌株<br>Strains             | 纤维二糖<br>Cellobiose | 麦芽糖<br>Maltose | 甘露醇<br>Mannitol | 水杨苷<br>Salicin | 山梨醇<br>Sorbitol | 蔗糖<br>Sucrose | 棉子糖<br>Raffinose | 菊糖<br>Inulin | 乳糖<br>Lactose |
|---------------------------|--------------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|---------------|------------------|--------------|---------------|
| <i>L. reuteri</i> T-B5L2  | –                  | +              | –               | –              | –               | +             | +                | –            | +             |
| <i>L. reuteri</i> T-B5L1  | –                  | +              | –               | –              | –               | +             | +                | –            | +             |
| <i>L. reuteri</i> D-109-1 | –                  | +              | –               | –              | –               | +             | +                | –            | +             |

+: 阳性; –: 阴性。  
+: Positive; –: Negative.

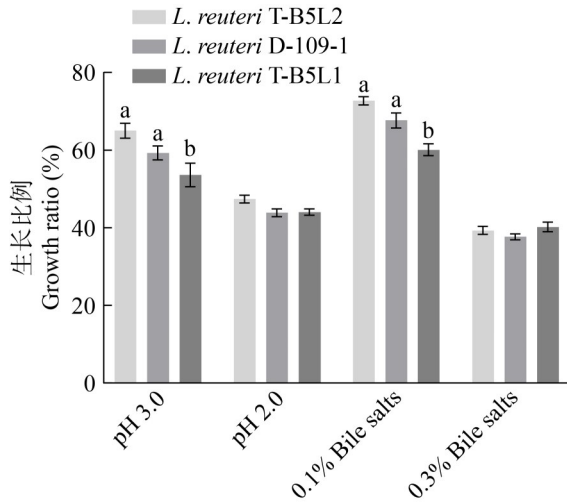


图3 三株罗伊氏黏液乳杆菌耐酸耐胆盐能力  
Figure 3 Acid and bile salt tolerance of three *Limosilactobacillus reuteri* strains.

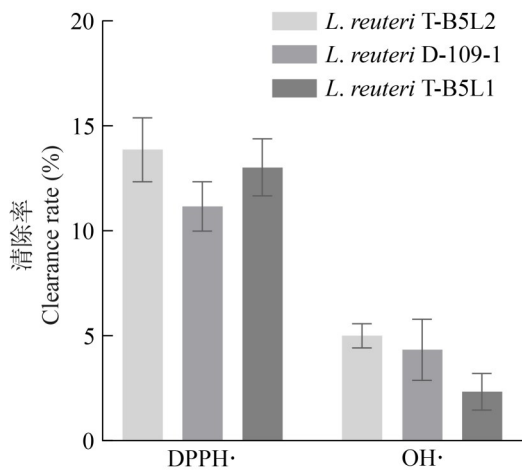


图4 三株罗伊氏黏液乳杆菌的抗氧化能力  
Figure 4 Antioxidant capacity of three *Limosilactobacillus reuteri* strains.

## 2.7 三株 *Limosilactobacillus reuteri* 的抑菌能力

三株菌抑制 SC 13312 生长的能力均强于抑制 *E. coli* K88 1526 的能力。进一步比较 3 株菌, 发现 *L. reuteri* T-B5L2 抑制 2 株致病菌的能力均最强 ( $P < 0.05$ )。 *L. reuteri* T-B5L1 和 *L. reuteri* D-109-1 抑制 *E. coli* K88 1526 的能力无显著差

异, 但 *L. reuteri* D-109-1 抑制 SC 13312 的能力显著高于 *L. reuteri* T-B5L1 (图 5)。

## 2.8 三株 *Limosilactobacillus reuteri* 的耐药性

检测 3 株 *L. reuteri* 对 17 种抗生素(7 类抗生素)的敏感性。结果表明 3 株菌均对四环类抗生素、氨基糖苷类抗生素和糖肽类抗生素具有抵抗力, 对青霉素类、头孢菌素类抗生素较敏感, 对酰胺醇类抗生素中度敏感。其中 *L. reuteri* T-B5L2 对头孢菌素类的 4 种抗生素的敏感性与其他 2 株菌存在差异(表 4)。

## 2.9 三株 *Limosilactobacillus reuteri* MGEs 基因的测定

对 5 个 MGEs 标记基因(*intI1*、*intI2*、*tnpA02*、*incP-oriT* 和 *incW-rep*)在 3 株 *L. reuteri* 上进行绝对定量(图 6)。H<sub>2</sub>O 的基因拷贝数作为对照, 结果显示不同菌株的 MGEs 基因拷贝数存在差异, 其中 *L. reuteri* T-B5L2 在 *intI1*、*intI2*、*incW-rep* 和 *incP-oriT* 这 4 个基因的丰度上高于 *L. reuteri* D-109-1 和 *L. reuteri* T-B5L1 ( $P < 0.05$ )。在 *tnpA02* 基因上, 3 株菌的基因拷贝数与 H<sub>2</sub>O 的检测值相近, 说明 3 株菌可能均不含该基因。

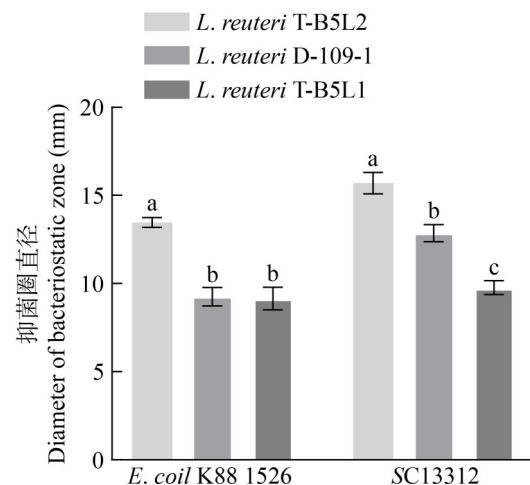


图5 三株罗伊氏黏液乳杆菌的抑菌能力  
Figure 5 Inhibitory ability of three *Limosilactobacillus reuteri* strains.

表4 三株罗伊氏黏液乳杆菌对抗生素的敏感性

Table 4 Antibiotic sensitivity of three *Limosilactobacillus reuteri* strains

| 类别 Category                           | 抗生素名称 Antibiotic name   | <i>L. reuteri</i> T-B5L2 | <i>L. reuteri</i> D-109-1 | <i>L. reuteri</i> T-B5L1 |
|---------------------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 四环类抗生素<br>Tetracycline antibiotic     | 四环素 Tetracycline        | R                        | R                         | R                        |
|                                       | 强力霉素 Doxycycline        | R                        | R                         | R                        |
|                                       | 米诺环素 Minocycline        | R                        | R                         | R                        |
| 氨基糖苷类抗生素<br>Aminoglycoside antibiotic | 链霉素 Streptomycin        | IR                       | R                         | R                        |
|                                       | 卡那霉素 Kanamycin          | R                        | R                         | R                        |
|                                       | 阿米卡星 Amikacin           | R                        | R                         | R                        |
| 青霉素类抗生素<br>Penicillin antibiotic      | 庆大霉素 Gentamicin         | S                        | R                         | S                        |
|                                       | 氨苄西林 Ampicillin         | S                        | S                         | S                        |
|                                       | 青霉素 Penicillin          | S                        | S                         | S                        |
| 头孢菌素类抗生素<br>Cephalosporin antibiotic  | 头孢哌酮 Cefoperazone       | S                        | R                         | R                        |
|                                       | 头孢曲松 Ceftriaxone        | S                        | IR                        | IR                       |
|                                       | 头孢唑林 Cefazolin          | R                        | S                         | S                        |
|                                       | 头孢呋辛钠 Cefuroxime sodium | IR                       | S                         | S                        |
|                                       | 头孢噻啉 Cefacil            | S                        | S                         | S                        |
| 糖肽抗生素<br>Glycopeptide antibiotic      | 万古霉素 Vancomycin         | R                        | R                         | R                        |
| 氟喹诺酮类抗生素<br>Quinolone antibiotics     | 恩诺沙星 Enrofloxacin       | IR                       | S                         | IR                       |
| 酰胺醇类抗生素<br>Aminoalcohol antibiotics   | 氯霉素 Chloramphenicol     | IR                       | IR                        | IR                       |

R: 低敏感性(抑菌圈直径≤14 mm); IR: 中敏感性(抑菌圈直径15–19 mm); S: 高敏感性(抑菌圈直径≥20 mm)。  
R: Low sensitivity (inhibition zone diameter≤14 mm); IR: Intermediate sensitivity (inhibition zone diameter 15–19 mm); S: High sensitivity (inhibition zone diameter≥20 mm).

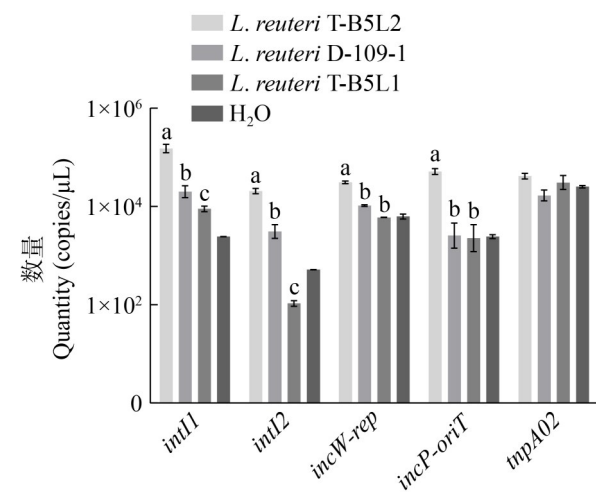


图6 三株罗伊氏黏液乳杆菌中MGEs的绝对定量

Figure 6 The absolute quantification of MGEs in the three *Limosilactobacillus reuteri*.

3 讨论

本研究共分离到 21 株乳酸菌，其中链球菌 10 株，所占比例最高，但由于链球菌普遍不作为益生菌，因此本研究未对其进行深入研究。此外，本研究还分离到 1 株 *L. mesenteroides* T-Y2Z-1，但该菌通常分离自发酵食品和植物<sup>[19]</sup>。因此，推测 *L. mesenteroides* T-Y2Z-1 可能是通过食源性摄入进入肠道的过路菌，而非肠道原籍菌。

乳酸菌的主要代谢特性是通过发酵碳水化合物产生乳酸<sup>[20]</sup>，且乳酸菌发挥抑菌作用与乳酸浓度密切相关<sup>[21]</sup>。此外，Lee 等<sup>[22]</sup>研究发现乳酸能够促进肠道干细胞介导的上皮发育。因此，本研究通过比较菌株之间的乳酸产量差异筛选

乳酸菌进行生物学特性测定。结果显示, *L. reuteri* 菌株之间的乳酸产量存在显著差异, 这可能是因为不同 *L. reuteri* 菌株在基因组成上存在差异, 特别是在碳水化合物代谢相关基因方面, 这些差异可能导致不同菌株在产酸能力上的不同<sup>[23-24]</sup>。测定结果显示藏猪源 *L. reuteri* T-B5L2 的乳酸产量最高。为了使后续指标结果更具可比性, 仅选择 *L. reuteri* 进行后续试验。大量文献也表明, *L. reuteri* 是一种具有潜力的益生菌<sup>[25-27]</sup>, 因此选择 *L. reuteri* 具有重要意义。

作为益生菌, *L. reuteri* 需要具备肠道耐受性才能到达肠道发挥作用<sup>[28]</sup>。因此, 本研究检测了乳酸菌的耐酸和耐胆盐能力。结果表明 *L. reuteri* T-B5L2 的耐酸和耐胆盐能力均较强, 说明其在肠道中具有更强的耐受性和存活能力。

乳酸菌对 DPPH 自由基和羟基自由基(OH·) 的清除能力可反映其抗氧化能力<sup>[29]</sup>。本研究表明, 相较于清除羟基自由基, 3 株 *L. reuteri* 对 DPPH 自由基的清除能力更强。相关研究表明, 乳酸菌的抗氧化能力主要与其细胞膜成分和胞内抗氧化物质有关<sup>[30]</sup>。推测 *L. reuteri* T-B5L2 能够产生抗氧化物质。

*E. coli* K88 和沙门氏菌是导致猪腹泻的常见致病菌因此, 本研究检测了乳酸菌上清液对这 2 种致病菌的抑制能力。结果表明, 在 3 株菌中, *L. reuteri* T-B5L2 的抑菌能力最强, 且其抑制 SC 13312 的能力强于抑制 *E. coli* K88 1526, 这与此前的研究结果一致<sup>[31]</sup>。推测 *L. reuteri* T-B5L2 的抑菌能力强可能与其上清液中乳酸含量有关。

随着抗生素的大量使用, 益生菌的耐药性也引起了关注。因此, 本研究检测了 3 株菌对抗生素的敏感性。结果显示, 3 株菌对多种抗生素具有抵抗力, 这与先前研究中分析益生菌产品和常见益生菌补充剂的耐药基因组结果一致<sup>[32]</sup>。乳酸菌基因组中普遍含有抗生素耐药基因。益生菌的耐药性是一把双刃剑: 一方面, 耐药性有助于它们在肠道环境中生存; 另一方

面, 乳酸菌的耐药基因存在水平转移的可能性<sup>[33]</sup>, 而耐药基因的转移与细菌基因组中的可移动遗传元件(MGEs)密切相关。本研究进一步检测了 3 株菌的 MGEs, 结果显示 *L. reuteri* T-B5L2 的 MGEs 基因最多, 说明其转移耐药基因的风险可能最高。与耐药基因类似, 可移动遗传元件也是一把“双刃剑”: 一方面, 它增加了耐药基因转移的风险; 另一方面, 它也增加了细菌本身对环境的适应性<sup>[34]</sup>, 加速了种群的遗传多样性进化, 提升了整体适应潜力<sup>[35]</sup>。目前, 许多获批的益生菌膳食补充剂中均含有耐药基因<sup>[34]</sup>, 表明在应用时人们更重视益生菌的益生效果, 而对耐药基因转移的担忧相对较少。

## 4 结论

本研究从藏猪粪便中分离到 21 株乳酸菌, 其中 *L. reuteri* T-B5L2 的产酸能力最强。进一步的体外生化特性测定结果显示, 该菌生长性能良好, 具有耐酸、耐胆盐、抗氧化和抑制病原菌生长的能力, 表明 *L. reuteri* T-B5L2 是一株具有潜力的益生菌。

## 作者贡献声明

樊秋月: 实验操作、数据分析、论文写作; 林焱: 实验方案设计和指导、论文修改; 朱伟云: 整体实验方案设计、论文审查。

## 作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

## 参考文献

- [1] MERUVU H, HARSA ST. Lactic acid bacteria: isolation-characterization approaches and industrial applications[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2023, 63(26): 8337-8356.
- [2] YOO Y, LEE J, CHO J, YOON Y. Antimicrobial properties of *Limosilactobacillus reuteri* strains for control of *Escherichia coli* and *Salmonella* strains, diarrhoea cause in weaning pigs[J]. Veterinarni Medicina, 2023, 68(5): 191-199.

- [3] WALSHAM ADS, MacKENZIE DA, COOK V, WEMYSS-HOLDEN S, HEWS CL, JUGE N, SCHÜLLER S. *Lactobacillus reuteri* inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to human intestinal epithelium[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 244.
- [4] STEFAŃSKA I, KWIECIEŃ E, JÓŹWIAK-PIASECKA K, GARBOWSKA M, BINEK M, RZEWUSKA M. Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria strains of potential use as feed additives-the basic safety and usefulness criterion[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2021, 8: 687071.
- [5] LIU H, JI HF, ZHANG DY, WANG SX, WANG J, SHAN DC, WANG YM. Effects of *Lactobacillus brevis* preparation on growth performance, fecal microflora and serum profile in weaned pigs[J]. *Livestock Science*, 2015, 178: 251-254.
- [6] 孔庆辉. 罗伊氏乳杆菌 TPC32 对 LPS 诱导断奶藏仔猪肠道损伤的保护作用研究[D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2024.  
KONG QH. Protective effect of *Lactobacillus reuteri* TPC32 on LPS induced intestinal injury in Xizang's weaned piglets[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2024 (in Chinese).
- [7] YANG YT, LI YX, XIE YG, QIAO SY, YANG LJ, PAN HB. Comparative study on jejunal immunity and microbial composition of growing-period Xizang's pigs and duroc×(landrace×yorkshire) pigs[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2022, 9: 890585.
- [8] SHEN JK, ZHANG J, ZHAO Y, LIN ZS, JI LB, MA X. Xizang's pig-derived probiotic *Lactobacillus amylovorus* SLZX20-1 improved intestinal function via producing enzymes and regulating intestinal microflora[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2022, 9: 846991.
- [9] 李卓君. 海拔高度及饲养方式对藏猪肠道菌群结构及其特征的影响[D]. 南昌: 江西农业大学硕士学位论文, 2017.  
LI ZJ. Investigation on the effects of feeding and altitude on gut microbial composition and structure of Xizang's pigs[D]. Nanchang: Master's Thesis of Jiangxi Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [10] 谭占坤, 池福敏, 商振达, 商鹏, 刘锁珠, 强巴央宗. 西藏高原放牧藏猪结肠微生物的特异性研究[J]. *饲料研究*, 2021, 44(8): 68-72.  
TAN ZK, CHI FM, SHANG ZD, SHANG P, LIU SZ, QIANGBA YZ. Colonic microbial specificity of grazing Xizang pigs on Xizang Plateau[J]. *Feed Research*, 2021, 44(8): 68-72 (in Chinese).
- [11] SHANG P, WEI MB, DUAN MQ, YAN FF, CHAMBA Y. Healthy gut microbiome composition enhances disease resistance and fat deposition in Xizang pigs[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 965292.
- [12] 李江凌, 陈晓晖, 刘锐, 王秋实, 龚建军, 曾凯, 廖党金, 高荣, 吕学斌. 藏猪、长白猪肠道微生物菌群的定量分析及比较研究[J]. *中国猪业*, 2016, 11(3): 61-64.  
LI JL, CHEN XH, LIU R, WANG QS, GONG JJ, ZENG K, LIAO DJ, GAO R, LÜ XB. Quantitative analysis and comparative study of gut microbiota in Xizang pigs and Landrace pigs[J]. *China Swine Industry*, 2016, 11(3): 61-64 (in Chinese).
- [13] WALTER J, HERTEL C, TANNOCK GW, LIS CM, MUNRO K, HAMMES WP. Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(6): 2578-2585.
- [14] DOWDELL P, CHANKHAMHAENGDECHA S, PANBANGRED W, JANVILISRI T, AROONNUAL A. Probiotic activity of *Enterococcus faecium* and *Lactococcus lactis* isolated from Thai fermented sausages and their protective effect against *Clostridium difficile*[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2020, 12(2): 641-648.
- [15] BRAND-WILLIAMS W, CUVELIER ME, BERSSET C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 1995, 28(1): 25-30.
- [16] NIU DK, FENG N, XI ST, XU JJ, SU Y. Genomics-based analysis of four porcine-derived lactic acid bacteria strains and their evaluation as potential probiotics[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2024, 299(1): 24.
- [17] 檀茜倩, 周振彧, 崔方超, 王当丰, 吕欣然, 李学鹏, 励建荣. 产β-葡萄糖苷酶鸡乳杆菌的益生功能评价及其在发酵红茶汤中的应用[J/OL]. *食品工业科技*, 2024: 1-18. (2024-10-29). <https://link.cnki.net/doi/10.13386/j.issn1002-0306.2024010123-2024070296>.  
TAN XQ, ZHOU ZY, CUI FC, WANG DF, LÜ XR, LI XP, LI JR. Probiotic characterization of β-glycosidase producing *Lactobacillus gullinarum* and its application in the fermentation of black tea soup[J/OL]. *Science and Technology of Food Industry*, 2024: 1-18. (2024-10-29). <https://link.cnki.net/doi/10.13386/j.issn1002-0306.2024010123-2024070296> (in Chinese).
- [18] LIU W, XIE WY, LIU HJ, CHEN C, CHEN SY, JIANG GF, ZHAO FJ. Assessing intracellular and extracellular distribution of antibiotic resistance genes in the commercial organic fertilizers[J]. *Science of the Total Environment*, 2024, 929: 172558.
- [19] DU RP, ZHOU ZJ, HAN Y. Functional identification of the dextranase gene of *Leuconostoc mesenteroides* DRP105[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(18): 6596.
- [20] KULLAR R, GOLDSTEIN EJC, JOHNSON S, McFARLAND LV. *Lactobacillus* bacteremia and probiotics: a review[J]. *Microorganisms*, 2023, 11(4): 896.
- [21] MISSOTTEN JAM, MICHIELS J, GORIS J, HERMAN L, HEYNDRICKX M, de SMET S, DIERICK NA. Screening of two probiotic products for use in fermented liquid feed[J]. *Livestock Science*, 2007, 108(1/2/3): 232-235.
- [22] LEE YS, KIM TY, KIM Y, LEE SH, KIM S, KANG SW, YANG JY, BAEK IJ, SUNG YH, PARK YY, HWANG SW, EUNJU O, KIM KS, LIU SQ, KAMADA N, GAO N, KWEON MN. Microbiota-derived lactate accelerates intestinal stem-cell-mediated epithelial development[J]. *Cell Host & Microbe*, 2018, 24(6): 833-846.e6.
- [23] SAULNIER DM, SANTOS F, ROOS S, MISTRETTA TA, SPINLER JK, MOLENAAR D, TEUSINK B,

- VERSALOVIC J. Exploring metabolic pathway reconstruction and genome-wide expression profiling in *Lactobacillus reuteri* to define functional probiotic features[J]. PLoS One, 2011, 6(4): e18783.
- [24] MORITA H, TOH H, FUKUDA S, HORIKAWA H, OSHIMA K, SUZUKI T, MURAKAMI M, HISAMATSU S, KATO Y, TAKIZAWA T, FUKUOKA H, YOSHIMURA T, ITOH K, O'SULLIVAN DJ, McKAY LL, OHNO H, KIKUCHI J, MASAOKA T, HATTORI M. Comparative genome analysis of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum* reveal a genomic island for reuterin and cobalamin production[J]. DNA Research, 2008, 15(3): 151-161.
- [25] WU HQ, XIE S, MIAO JF, LI YC, WANG ZH, WANG MJ, YU QH. *Lactobacillus reuteri* maintains intestinal epithelial regeneration and repairs damaged intestinal mucosa[J]. Gut Microbes, 2020, 11(4): 997-1014.
- [26] YU ZH, CHEN JH, LIU YX, MENG QG, LIU H, YAO QY, SONG WX, REN XF, CHEN X. The role of potential probiotic strains *Lactobacillus reuteri* in various intestinal diseases: new roles for an old player[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1095555.
- [27] SAVIANO A, BRIGIDA M, MIGNECO A, GUNAWARDENA G, ZANZA C, CANDELLI M, FRANCESCHI F, OJETTI V. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 (*Limosilactobacillus reuteri*) in diarrhea and constipation: two sides of the same coin? [J]. Medicina, 2021, 57(7): 643.
- [28] LEE J, YUN HS, CHO KW, OH S, KIM SH, CHUN T, KIM B, WHANG KY. Evaluation of probiotic characteristics of newly isolated *Lactobacillus* spp.: immune modulation and longevity[J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 148(2): 80-86.
- [29] WANG AN, YI XW, YU HF, DONG B, QIAO SY. Free radical scavenging activity of *Lactobacillus fermentum* *in vitro* and its antioxidative effect on growing-finishing pigs[J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 107(4): 1140-1148.
- [30] SHARMA P, SHARMA A, LEE HJ. Antioxidant potential of exopolysaccharides from lactic acid bacteria: a comprehensive review[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 281: 135536.
- [31] JIN LZ, HO YW, ABDULLAH N, ALI MA, JALALUDIN S. Antagonistic effects of intestinal *Lactobacillus* isolates on pathogens of chicken[J]. Letters in Applied Microbiology, 1996, 23(2): 67-71.
- [32] JACOBSEN L, WILCKES A, HAMMER K, HUYS G, GEVERS D, ANDERSEN SR. Horizontal transfer of Tet(M) and erm(B) resistance plasmids from food strains of *Lactobacillus plantarum* to *Enterococcus faecalis* JH2-2 in the gastrointestinal tract of gnotobiotic rats[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2007, 59(1): 158-166.
- [33] CAMPEDELLI I, MATHUR H, SALVETTI E, CLARKE S, REA MC, TORRIANI S, ROSS RP, HILL C, O'TOOLE PW. Genus-wide assessment of antibiotic resistance in *Lactobacillus* spp.[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2019, 85(1): e01738-18.
- [34] FROST LS, LEPLAE R, SUMMERS AO, TOUSSAINT A. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution[J]. Nature Reviews Microbiology, 2005, 3(9): 722-732.
- [35] NIU XM, XU YC, LI ZW, BIAN YT, HOU XH, CHEN JF, ZOU YP, JIANG J, WU Q, GE S, BALASUBRAMANIAN S, GUO YL. Transposable elements drive rapid phenotypic variation in *Capsella rubella*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2019, 116(14): 6908-6913.