



## 猪源乳酸菌的分离、鉴定及其生物学特性

李雪莉, 王超, 虞德夫, 丁立人, 朱伟云, 杭苏琴\*

南京农业大学消化道微生物研究室, 江苏 南京 210095

**摘要:**【目的】将分离自猪肠道粘膜、食糜和粪便的乳酸菌, 通过产乳酸能力、生长性能、耐酸和耐胆盐性能及抑菌能力评价, 筛选适应养猪生产的潜在益生特性的菌株。【方法】共分离获得 155 株乳酸菌纯菌株, 从中筛选出 4 株产酸能力较强的乳酸菌, 结合生理生化试验及细菌 16S rRNA 测序鉴定其种属, 评价候选乳酸菌的生长情况、耐酸、耐胆盐及抑菌特性。【结果】综合变色时间(8 h)、pH 值(<3.9)和乳酸含量(>100 mmol/L), 筛选出 4 株(L45、L47、L63 和 L79)候选菌株, 经鉴定依次为罗伊氏乳杆菌、植物乳杆菌、约氏乳杆菌和粪肠球菌。该 4 株乳酸菌均可在体外快速生长; L47 和 L79 能够耐受 pH 2.5 的酸性环境, L47 能够耐受 0.5%胆盐环境; 各乳酸菌上清液与指示菌共培养, 发现对 *E. coli* K88 和沙门氏菌均产生了抑制作用, 其中 L47 上清液对指示菌的抑制作用较强。【结论】L47 具有较好的产酸性能与生长性能、可耐受猪胃酸和肠道胆盐环境, 对 *E. coli* K88 和沙门氏菌具有较好的抑制作用, 说明该乳酸菌具有潜在的益生特性。

**关键词:** 猪, 乳酸菌, 分离, 鉴定, 益生性

抗生素作为预防疾病、促进生长、降低死亡率的主要饲料添加剂广泛应用于动物饲料<sup>[1]</sup>。然而, 近年来抗生素滥用造成的细菌耐药性、药物残留等问题日益突出, 严重危害人类健康。因此, 寻找抗生素替代品刻不容缓<sup>[2]</sup>。有研究指出, 益生菌作为抗生素的最佳替代品之一, 具有增强宿主抵抗力、提高机体健康水平、减少疾病发生等优点<sup>[3]</sup>。目前, 乳酸菌是应用最为广泛的益生菌之一<sup>[4]</sup>。

乳酸菌是一类可发酵糖类, 主要产物为乳酸

的无芽孢、革兰氏染色阳性细菌的总称<sup>[5]</sup>。有报道指出, 乳酸菌可通过产生抑菌物质, 维持胃肠道菌群平衡、预防肠道感染, 从而提高机体的抗病能力<sup>[6]</sup>。当前, 养猪生产中使用的部分乳酸菌分离自体外环境, 由于其生活环境与肠道环境差异较大, 导致其应用效果很不稳定<sup>[7]</sup>。从对宿主的益生作用而言, 同源乳酸菌优于异源菌株<sup>[8]</sup>。Cai 等<sup>[9]</sup>研究表明, 哺乳仔猪日粮中添加猪源发酵乳杆菌能够提高其生长性能和免疫力。Huang 等<sup>[10]</sup>发现,

基金项目: 农业部公益性行业专项(201403047)

\*通信作者。Tel: +86-25-84395037; E-mail: suqinhang69@njau.edu.cn

收稿日期: 2017-01-02; 修回日期: 2017-04-17; 网络出版日期: 2017-04-28

猪源发酵乳酸菌能够改善断奶仔猪的生长性能,增强抵抗力,改善肠道微生态平衡。因此,猪源益生乳酸菌的开发和利用尤为重要。

本试验将不同生理阶段猪肠道粘膜、食糜及粪便样品培养于 MRS 标准培养基,经分离、纯化共获得 155 株乳酸菌菌株,通过产酸性能筛选候选菌株,对候选菌株进行生理生化及细菌 16S rRNA 测序鉴定其种属,再对其生长速度、耐酸和耐胆盐性能、抑制病原菌等特性进行评价,筛选出具有良好产酸性能和抗逆性能的乳酸菌菌株,为开发适应养猪生产的益生菌提供理论和实践基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 样品采集和菌株培养、纯化及分离

不同生理阶段猪(仔猪、生长肥育猪、母猪)结肠、盲肠粘膜、食糜和粪便采自江苏省某猪场,将这些样品进行梯度稀释至  $10^{-4}$ – $10^{-6}$ ,在 MRS 琼脂培养基上涂布,37 °C 培养 24–36 h,挑取单菌落,纯化 2–3 次后,将培养物于甘油中 4 °C 保存。

### 1.2 菌株形态观察

先将少量无菌生理盐水置于干净载玻片上,取少量保存的菌液,充分活化,涂匀玻片,然后干燥、固定,革兰氏染色法染色,镜检,观察菌体形态<sup>[11]</sup>。

### 1.3 菌株产酸能力测定<sup>[12]</sup>

将保存菌株接种至 10 mL 标准 MRS 肉汤中,37 °C 厌氧培养 24 h,充分活化。将活化的 100  $\mu$ L 乳酸菌接种至改良 MRS 培养基 3(即在改良 MRS 培养基 1 基础上添加 0.01 g/L 溴酚蓝指示剂,改良 MRS 培养基 1 即 MRS 基础培养基中醋酸钠和

葡萄糖变更为 35 g/L 麦芽糖和 5 g/L 果糖)中,30 °C 厌氧培养,记录培养液由紫色变为黄色的时间,90 h 后测定该菌液 pH 值,每株 3 个重复。选择产酸速度快(变色时间较短)、终 pH 值较低的乳酸菌,测定其乳酸含量,取 100  $\mu$ L 活化后的乳酸菌接种至改良 MRS 培养基 2(即在改良 MRS 培养基 1 基础上添加 2%  $\text{CaCO}_3$ )中,30 °C 条件下培养 48 h 后取样,测定乳酸浓度,产酸性能较好的菌株进入后续试验。

### 1.4 菌株鉴定

**1.4.1 菌株属的鉴定:**对候选菌株进行生化特性测定,包括过氧化氢酶测定、硝酸盐还原试验、硫化氢产生试验、明胶液化试验、吲哚试验;以及生长试验,包括 10 °C、45 °C 和 60 °C 生长试验,6.5% NaCl 生长试验,pH 9.6 生长试验<sup>[11]</sup>鉴定其种属。

**1.4.2 菌株核酸鉴定:**将保存的菌液充分活化后,95 °C 热裂解,离心获取细菌 DNA,以细菌 DNA 为模板,使用细菌全序列通用引物 8f(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1510r(5'-GGCTACCTTGTTACGA-3')<sup>[13]</sup>进行 PCR 扩增<sup>[14]</sup>,扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,正确的扩增子(约 1400 bp)送 Invitrogen 公司测序,所得序列提交 GenBank 进行 BLAST 比对分析。

### 1.5 菌株生长曲线绘制

按照前述方法先活化菌株,按 1% 的接种量接种于 MRS 培养基,37 °C 培养,于接种后 0 至 20 h,每隔 2 h 取样,测定发酵液的吸光值( $OD_{600}$ ),以培养时间为横坐标,吸光值为纵坐标绘出生长曲线。

### 1.6 候选菌株的耐酸和耐胆盐性能测定<sup>[15]</sup>

**耐酸性能:**将候选菌株接种于 MRS 液体培养基中,37 °C 培养 24 h,取 4 mL 菌液 10000 r/min 离心 5 min,弃上清,分别加入 4 mL 已灭菌的 pH

2.5 和 6.2 (空白对照)的生理盐水, 37°C 保温 2 h 后取 400  $\mu\text{L}$  接种到 10 mL MRS 液体培养基中, 20 h 后测定  $OD_{600}$  值。

**耐胆盐性能:** 与耐酸性能测试相似, 活化菌株, 离心, 弃上清, 加入 4 mL 已灭菌 0.5%胆盐或 0%胆盐溶液(空白对照), 37 °C 保温 2 h 后取样, 接种, 20 h 后测定  $OD_{600}$  值。

### 1.7 候选菌株上清液抑菌性能测定<sup>[7]</sup>

将候选菌株制成  $3 \times 10^8$  CFU/mL 的悬液于 MRS 液体培养基中 37 °C 培养活化 2 代, 将活化好的菌株离心(10000 $\times$ g, 4 °C, 10 min), 上清液经滤膜(0.22  $\mu\text{m}$ )过滤, 收集后分为等量的 2 份, 一份不调 pH, 另一份将 pH 调至 6.5, 检测有机酸是否对指示菌产生抑制作用。指示菌大肠杆菌 K 88 接种于 LB 培养基中 37 °C 培养 24 h, 离心(10000 $\times$ g, 4 °C, 10 min), 弃上清, 菌体悬于灭菌生理盐水, 离心洗涤 1 次, 制成  $3 \times 10^8$  CFU/mL 菌悬液, 取 200  $\mu\text{L}$  接种到琼脂培养基中, 静置 2 h, 待琼脂板凝固后, 用牛津杯(直径 8 mm)在上面打孔。分别取上述不调 pH 和 pH 6.5 的上清液 100  $\mu\text{L}$  加入孔中, 室温静置 3–5 h, 37 °C 培养 48 h, 测量抑菌圈直径, 每组 3 个重复。

### 1.8 统计分析

试验数据经 Excel(2007)进行初步统计后, 应用 SPSS(20.0)进行独立  $t$  检验,  $F$ -test 检验方差同质性,  $P < 0.05$  为差异显著。

## 2 结果和分析

### 2.1 菌株分离筛选

共分离得到猪源乳酸菌 155 株, 杆菌 105 株, 球菌 50 株。革兰氏染色均呈阳性。

### 2.2 分离菌株的产酸能力

155 株乳酸菌经过 90 h 培养, 共得到 11 株变色时间较短(8–11 h)、pH 值较低(<4.0)的乳酸菌(表 1)。测定其乳酸含量, 结果显示, 菌株 L47 发酵液中乳酸浓度最高为 120.00 mmol/L, L83 乳酸浓度最低为 93.63 mmol/L。

### 2.3 乳酸菌株发酵能力的聚类分析

将上述 11 株乳酸菌, 根据产酸速度(酸碱指示剂变色时间)、产乳酸量和最终 pH 值, 应用 SPSS (20.0)、Hierarchical cluster analysis 进行分析。由图 1 可见, 11 株乳酸菌分为两簇, 簇 2 乳酸菌分别为 L45、L47、L63 和 L79, 菌液乳酸含量均高于簇 1, 且菌液终末 pH 值(除 L79 外)均低于簇 1。簇 2 乳酸菌又分为 2 个亚簇, 其中亚簇 2 乳酸菌的相对产酸速度快、乳酸产量高, 终末 pH 值更低。综合考虑乳酸菌的产酸速度、终末 pH 值和产乳酸量, 最终选择 L45、L47、L63 和 L79 四株乳酸菌进入后续试验。

表 1. 产乳酸能力较强和 90 h 培养后 pH 值较低的乳酸菌

Table 1. The isolates with higher lactate production and lower pH values after 90 hours inoculation

Isolates	pH value	t/h	c (Lactate)/(mmol/L)
L18	3.98 $\pm$ 0.02	11	103.19 $\pm$ 4.19
L21	3.97 $\pm$ 0.05	8	103.77 $\pm$ 5.26
L22	3.99 $\pm$ 0.01	8	103.19 $\pm$ 3.54
L37	3.98 $\pm$ 0.06	8	97.39 $\pm$ 8.87
L45	3.72 $\pm$ 0.01	8	113.04 $\pm$ 20.03
L47	3.46 $\pm$ 0.02	8	120.00 $\pm$ 10.04
L48	3.82 $\pm$ 0.19	11	105.08 $\pm$ 2.89
L63	3.70 $\pm$ 0.08	8	105.63 $\pm$ 29.33
L79	3.88 $\pm$ 0.02	8	112.29 $\pm$ 2.20
L81	3.89 $\pm$ 0.01	8	104.47 $\pm$ 4.19
L83	3.90 $\pm$ 0.01	8	93.63 $\pm$ 5.92

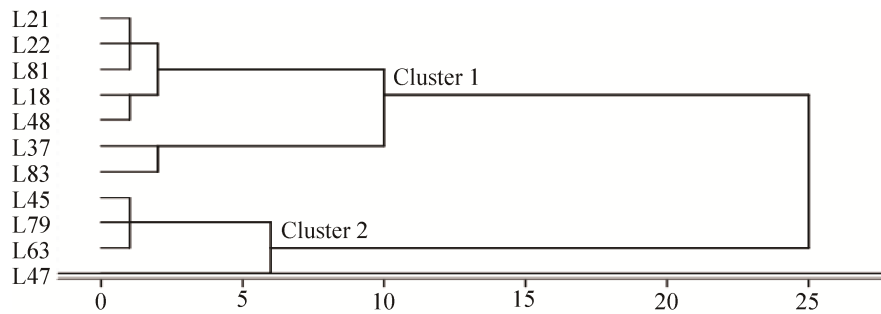


图 1. 11 株产乳酸能力强的乳酸菌的聚类分析图

Figure 1. Cluster analysis of the 11 high lactate producers.

## 2.4 候选菌株的生化鉴定和 16S rRNA 测序结果

L45、L47 和 L63 发酵葡萄糖产酸但不产气(数据未显示), 过氧化氢酶、硝酸盐、硫化氢还原、明胶和吲哚实验均为阴性, 初步判定为乳酸杆菌属。L79 能发酵葡萄糖产酸不产气(数据未显示), 过氧化氢酶、硝酸盐、明胶、吲哚和硫化氢实验均为阴性, 在 15 °C 和 45 °C 生长, 在 60 °C 不能生长, 能够耐受 6.5% NaCl, 并且能在 pH 9.6 的条件下生长, 初步判定为肠球菌属(表 2)。

将 4 株候选菌株 16S rRNA 序列测序后, 提交 NCBI 进行 BLAST 比对结果显示, L45 与 *Lactobacillus*

表 2. 筛选出的 4 株乳酸菌属的生化鉴定

Table 2. Biochemical characteristics of the 4 lactic acid bacteria isolates

Test	L45	L47	L63	L79
Cell morphology	Rod	Rod	Rod	Cocci
Catalase	-	-	-	-
Nitrate	-	-	-	-
Hydrogen sulfide	-	-	-	-
Gelatin	-	-	-	-
Indole	-	-	-	-
15 °C	N	N	N	G
45 °C	N	N	N	G
60 °C	N	N	N	NG
pH 9.6	N	N	N	G
6.5% NaCl	N	N	N	G

+: positive; -: negative; N: no test; G: growth; NG: no growth.

*reuteri* CT10324-RS-018 序列同源性达到 100%, L47 与 *Lactobacillus plantarum* DF 序列同源性达到 99%, L63 与 *Lactobacillus johnsonii* FI9785 同源性为 99%, L79 与 *Enterococcus faecium* strain LZU-55 同源性为 99% (表 3)。综合乳酸菌属生化鉴定与 16S rRNA 测序结果推断, L45、L47、L63 和 L79 依次为罗伊氏乳杆菌、植物乳杆菌、约氏乳杆菌和粪肠球菌。

## 2.5 菌株生长曲线

如图 2 所示, 4 株乳酸菌在接种 4 h 后快速增殖进入对数生长期, 其中菌株 L45 在接种 14 h 后进入生长稳定期, L45、L63 和 L79 在 12 h 后进入生长稳定期, 说明该 4 株菌株均可在营养丰富的环境中生长, 且 L47 生长更为快速。

表 3. 筛选出的 4 株乳酸菌属 16S rRNA 序列相似性比对  
Table 3. Similarity analysis of bacterial 16S rRNA sequence of the 4 lactic acid bacteria isolates

Test isolates	Sequence affiliation (accession number)	Sequence identity/%
L45	<i>Lactobacillus reuteri</i> CT10324-RS-018 ( KU754503.1 )	100
L47	<i>Lactobacillus plantarum</i> DF (CP 013753.1)	99
L63	<i>Lactobacillus johnsonii</i> FI9785 (FN 298497.1)	99
L79	<i>Enterococcus faecium</i> strain LZU-55 (KT262985.1)	99

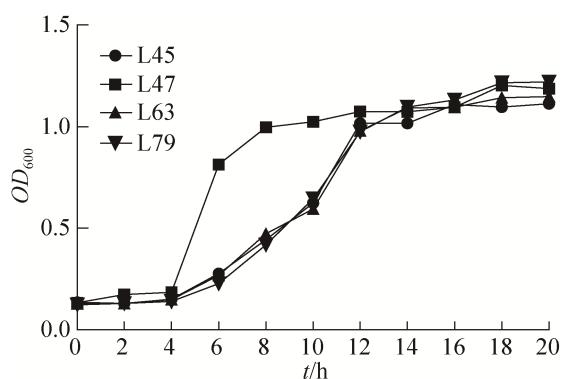


图 2. 筛选出的 4 株乳酸菌的生长曲线

Figure 2. Growth curves of the selected 4 lactic acid bacteria isolates.

## 2.6 候选菌株的耐酸和耐胆盐性能

如表 4 所示, 菌株 L47 和 L79 在 pH 6.2(对照组)和 pH 2.5 条件下  $OD_{600}$  值差异不显著( $P>0.05$ ), 说明这两株乳酸菌能够耐受低 pH; 而 L45 和 L63 在 pH 6.2 与 pH 2.5 条件下  $OD_{600}$  值差异显著( $P<0.05$ ), 说明这两株菌对低 pH 较为敏感。4 株乳酸菌中, L47 在 0.5%胆盐组的  $OD_{600}$  值与对照

组差异不显著( $P>0.05$ ), 说明该乳酸菌能够耐受 0.5%胆盐, 而 L45、L63 和 L79 在对照组与 0.5%胆盐组的  $OD_{600}$  值差异显著( $P<0.05$ ), 说明该 3 株乳酸菌对 0.5%胆盐环境敏感。

## 2.7 候选菌株上清液的抑菌能力

表 5 显示, 4 株未调 pH 的乳酸菌上清液(对照组)对指示菌 *E. coli* K88 和沙门氏菌(ATCC13312)均产生了抑制作用, 其中 L47 上清液对指示菌的抑制作用最强。而 pH 调至 6.5 的 4 株乳酸菌上清液, 均未检测出对指示菌 *E. coli* K88 和沙门氏菌的抑制作用。

## 3 讨论

乳酸菌的抑菌能力主要取决于其产酸能力。有报道指出, 产酸速率、乳酸浓度、菌液终末 pH 值对于发酵乳酸菌发挥抑菌作用十分重要<sup>[16]</sup>。因此, 乳酸菌产酸能力是筛选优良益生菌菌株的重

表 4. 筛选出的 4 株乳酸菌对酸和胆盐的耐受性

Table 4. The tolerance of the 4 lactic acid bacteria isolates to acid and bile salt

Stains	Control group <sup>(1)</sup>	pH2.5 group <sup>(1)</sup>	Control group <sup>(2)</sup>	0.5% bile salts <sup>(2)</sup>
L45	1.122±0.002 <sup>a</sup>	0.852±0.003 <sup>b</sup>	1.022±0.002 <sup>a</sup>	0.421±0.001 <sup>b</sup>
L47	1.188±0.002 <sup>a</sup>	1.186±0.002 <sup>a</sup>	1.003±0.002 <sup>a</sup>	0.997±0.001 <sup>a</sup>
L63	1.147±0.002 <sup>a</sup>	0.754±0.002 <sup>b</sup>	1.032±0.003 <sup>a</sup>	0.113±0.002 <sup>b</sup>
L79	1.051±0.003 <sup>a</sup>	1.039±0.003 <sup>a</sup>	1.144±0.001 <sup>a</sup>	0.117±0.001 <sup>b</sup>

(1) Data in the same column with the different letters mean significant difference ( $P<0.05$ ), and with the same letter mean no significant difference ( $P>0.05$ ). The same as (2).

表 5. 筛选出 4 株乳酸菌对 *E. coli* K88 和 *Salmonella* 的抑菌性能

Table 5. The inhibition ability of the 4 lactic acid bacteria isolates to *E. coli* K88 and *Salmonella*

Test strains	<i>E. coli</i> K88		<i>Salmonella</i> (ATCC13312)	
	Control group	pH 6.5 group	Control group	pH 6.5 group
L45	13.67±0.22	NE	10.10±0.48	NE
L47	16.98±0.36	NE	14.01±0.57	NE
L63	13.56±0.24	NE	10.30±0.45	NE
L79	13.69±0.44	NE	10.23±0.27	NE

NE: without inhibition.

要指标之一。本试验通过对产酸能力测试,从 155 株猪源乳酸菌筛选到 4 株产酸较快、48 h 后产乳酸浓度高于 100 mmol/L、终末 pH 值为 3.46–3.88 的菌株。Brooks 等<sup>[17]</sup>指出,以乳酸菌为主的液体发酵饲料中,乳酸浓度应当高于 100 mmol/L,才能减少肠杆菌科细菌的浓度。Missotten 等<sup>[12]</sup>发现,在体外乳酸菌筛选过程中,3 株乳酸菌的乳酸浓度可快速(17 h)增加、pH 值降低(4.0 左右),且能够最有效地抑制 *E. coli* 增殖。说明本试验通过产酸能力筛选的 4 株菌具有潜在的益菌效果。

生长曲线能够反映细菌的数量变化、生长与代谢状况<sup>[18]</sup>。高擎燊等<sup>[7]</sup>测定 10 株乳酸菌株的生长曲线显示,2 株乳酸菌在接种 6 h 左右进入对数生长期,其他菌株在接种 3–4 h 左右进入对数生长期,在接种后 9–10 h 达到稳定期。吴慧芬等<sup>[19]</sup>发现,乳酸菌株接种 3–4 h 进入对数期,接种 8–10 h 到达稳定期。在本试验中,4 株候选菌株在接种 4 h 后快速进入对数生长期,其中 L47、L63 和 L79 在接种 12 h 后进入生长稳定期,L47 在 14 h 后进入生长稳定期。这与前人结果基本一致,说明该 4 株乳酸菌可在营养丰富的环境下快速生长,满足优良益生菌的特性。

益生菌在到达肠道之前,必须能够顺利通过胃,因为胃酸导致大多数微生物不能存活<sup>[20]</sup>。本试验中,L47 和 L79 能够耐受 pH 2.5 的酸性环境,而 L45 和 L63 对 pH 2.5 环境敏感,可能是由于不同菌株耐酸性能不同所致。有报道指出,成年猪与断奶仔猪胃 pH 一般为 2.0 至 3.5<sup>[21]</sup>,所以,L47 和 L79 较 L45、L63 可能更容易耐受胃酸环境,到达肠道发挥作用。Missotten 等<sup>[12]</sup>对 10 株乳酸菌进行耐酸试验,结果也显示其耐酸性存在差异。这与我们的结果一致。

益生菌如果能耐受小肠胆盐形成的高渗透压环境,有利于其定植在宿主肠道中<sup>[22]</sup>。有报道指出,分离自猪肠道的乳酸菌可耐受 0.03%–0.50%的胆盐环境<sup>[23–24]</sup>,因此本试验选择 0.5%胆盐对候选菌株耐胆盐性能进行测定,结果显示,L47 能够耐受 0.5%胆盐环境,L45、L63 和 L79 对 0.5%胆盐耐受能力较差。有研究表明,哺乳仔猪胆囊内的胆汁很少,胆汁含量在出生后 3 周内开始增加,猪小肠内的胆汁浓度正常范围为 0.03%–0.30%<sup>[25]</sup>。因此说明 L47 具有较好的耐受肠道胆盐的能力。

乳酸菌的抑菌性能与其产酸能力有关,乳酸菌作为肠道益生菌群之一,通过产生乳酸、乙酸等代谢产物<sup>[26]</sup>,降低肠道 pH 和氧化还原电势,抑制病原微生物的生长<sup>[27]</sup>,调节动物肠道微生物菌群的平衡<sup>[28]</sup>,维护动物健康<sup>[29]</sup>。Ogawa 等<sup>[30]</sup>研究发现,乳酸杆菌对产志贺毒素的大肠杆菌(*Shiga toxin-producing Escherichia coli*)的抑制作用主要通过产生乳酸和降低 pH 实现的。Jin 等<sup>[31]</sup>报道,仔猪小肠分离的 6 株乳杆菌对产肠毒素大肠杆菌 K88、K99 和 987P 有抑制作用,且有机酸是发挥抑菌作用的主要物质。本试验中,4 株乳酸菌上清液对指示菌 *E. coli* K88 与猪源沙门氏菌均有不同程度的抑菌作用,其中 L47 发挥抑菌作用最大,抑菌圈直径分别为 16.98 mm 与 14.01 mm,刘文华<sup>[32]</sup>等研究表明乳酸菌对大肠杆菌形成的抑菌圈直径为 16 mm,该结果与本试验基本一致。与高擎燊<sup>[7]</sup>等筛选出的菌株相比,本试验分离菌株对大肠杆菌和沙门氏菌均表现出更优的抑菌效果。在排除酸效应后,4 株乳酸菌上清液均未检测到抑菌作用,说明 4 株乳酸菌可能主要是通过产生有机酸来发挥抑菌作用的。但也有研究表明乳酸菌除通过乳酸和挥发性酸发挥抑菌效果外,还可通过过

氧化氢、双乙酰、细菌素等代谢产物发挥作用<sup>[33]</sup>。这些活性物质的抑菌作用机理仍需进一步研究。

## 4 结论

从分离纯化的 155 株猪源乳酸菌中筛选出 4 株 (L45、L47、L63 和 L79) 产酸性能高的候选菌株, 经生理生化及 16S rRNA 序列分析鉴定依次为罗伊氏乳杆菌、植物乳杆菌、约氏乳杆菌和粪肠球菌, 通过测定生长性能、耐酸耐胆盐及抑菌性能发现 L47 具有良好的生长性能, 可耐受猪胃酸和肠道胆盐环境, 其上清液能够更好地对 *E. coli* K88 和沙门氏菌发挥抑制作用。这说明该乳酸菌具有应用于养猪生产的优良益生菌的益生特性。

## 参考文献

- [1] Cromwell GL. Why and how antibiotics are used in swine production. *Animal Biotechnology*, 2002, 13(1): 7–27.
- [2] Gorbach SL. Antimicrobial use in animal feed-time to stop. *New England Journal of Medicine*, 2001, 345(16): 1202–1203.
- [3] Schiffrin EJ, Blum S. Interactions between the microbiota and the intestinal mucosa. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2002, 56 Suppl 3: S60–S64.
- [4] Rubio R, Jofré, A, Martín B, Aymerich T, Garriga M. Characterization of lactic acid bacteria isolated from infant faeces as potential probiotic starter cultures for fermented sausages. *Food Microbiology*, 2014, 38: 303–311.
- [5] Leroy F, de Vuyst L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 2004, 15(2): 67–78.
- [6] Lähteinen T, Lindholm A, Rinttilä T, Junnikkala S, Kant R, Pietilä TE, Levonen K, von Ossowski I, Solano-Aguilar G, Jakava-Viljanen M, Palva A. Effect of *Lactobacillus brevis* ATCC 8287 as a feeding supplement on the performance and immune function of piglets. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2014, 158(1/2): 14–25.
- [7] Gao QY, Li PH, Huang RH, Zhu WY, Mao SY. Studies on the resistance and probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from the swine gut. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2015, 47(10): 41–46. (in Chinese)
- [8] 高擎燊, 李平华, 黄瑞华, 朱伟云, 毛胜勇. 猪源乳酸菌的抗逆性及益生性研究. *畜牧与兽医*, 2015, 47(10): 41–46.
- [9] Timmerman HM, Veldman A, van den Elsen E, Rombouts FM, Beynen AC. Mortality and growth performance of broilers given drinking water supplemented with chicken-specific probiotics. *Poultry Science*, 2006, 85(8): 1383–1388.
- [10] Cai CJ, Cai PP, Hou CL, Zeng XF, Qiao SY. Administration of *Lactobacillus fermentum* 15007 to young piglets improved their health and growth. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 2014, 23(3): 222–227.
- [11] Huang CH, Qiao SY, Li DF, Piao XS, Ren JP. Effects of Lactobacilli on the performance, diarrhea incidence, VFA concentration and gastrointestinal microbial flora of weaning pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2004, 17(3): 401–409.
- [12] 凌代文. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
- [13] Missotten JAM, Goris J, Michiels J, van Coillie E, Herman L, De Smet S, Dierick NA, Heyndrickx M. Screening of isolated lactic acid bacteria as potential beneficial strains for fermented liquid pig feed production. *Animal Feed Science and Technology*, 2009, 150(1/2): 122–138.
- [14] Ding LX, Yokota A. Phylogenetic analysis of the genus *Aquaspirillum* based on 16S rRNA gene sequences. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, 212(2): 165–169.
- [15] 李晨博. 植物乳杆菌和干酪乳杆菌对仔猪生长相关指标及其肠道微生物菌群多样性的影响. 南京农业大学硕士学位论文, 2014.
- [16] Yang XJ, Brisbin J, Yu H, Wang Q, Yin FG, Zhang YG, Sabour P, Sharif S, Gong J. Selected lactic acid-producing bacterial isolates with the capacity to reduce *Salmonella* translocation and virulence gene expression in chickens. *PLoS One*, 2014, 9(4): e93022.
- [17] 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. *Livestock Science*, 2007, 108(1/3): 232–235.
- [18] Brooks PH, Beal JD, Niven S, Demeckova V. Liquid feeding of pigs. II. Potential for improving pig health and food safety. *Animal Science Papers and Reports*, 2003, 21(S1): 23–39.
- [19] 王巧丽. 猪源罗伊氏乳杆菌的筛选、特性研究及应用. 甘肃农业大学硕士学位论文, 2013.

- [19] 吴惠芬. 猪源乳酸菌的分离鉴定及其益生作用研究. 南京农业大学硕士学位论文, 2003.
- [20] Lavilla-Lerma L, Pérez-Pulido R, Martínez-Bueno M, Maqueda, M, Valdivia E. Characterization of functional, safety, and gut survival related characteristics of *Lactobacillus* strains isolated from farmhouse goat's milk cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 163(2/3): 136–145.
- [21] Wang T. Weaning stress of piglets and application of nutritional regulatory measures. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2009, 41(5): 1–4. (in Chinese)  
王恬. 仔猪断奶应激及营养调控措施的应用. 畜牧与兽医, 2009, 41(5): 1–4.
- [22] Luo Y, Ma BC, Zou LK, Cheng JG, Cai YH, Kang JP, Li B, Gao XH, Wang P, Xiao JJ. Identification and characterization of lactic acid bacteria from forest musk deer feces. *African Journal of Microbiology Research*, 2012, 6(29): 5871–5881.
- [23] García-Ruiz A, De Llano DG, Esteban-Fernández A, Requena T, Bartolomé B, Moreno-Arribas MV. Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine. *Food Microbiology*, 2014, 44: 220–225.
- [24] Shen ZY, Zhao SM, Liang YX. Screening of lactic acid bacteria strains for pig additives and the study of its probiotic properties *in vitro*. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2007, 26(3): 348–352. (in Chinese)  
沈中艳, 赵述森, 梁运祥. 耐胃肠道环境及肠道病原菌拮抗的猪源乳酸菌的分离与筛选. 华中农业大学学报, 2007, 26(3): 348–352.
- [25] Ewing WN, Tucker LA. *The Living Gut*. Nottingham: University of Nottingham, 1994.
- [26] Nagpal R, Kumar A, Kumar M, Behare PV, Jain S, Yadav H. Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. *FEMS Microbiology Letters*, 2012, 334(1): 1–15.
- [27] Wu HF, Mao SY, Yao W, Zhu WY. Lactic acid production and antagonistic effect of lactic acid bacteria from piglet intestine. *Microbiology China*, 2005, 32(1): 79–84. (in Chinese)  
吴惠芬, 毛胜勇, 姚文, 朱伟云. 猪源乳酸菌产乳酸及其抑菌特性研究. 微生物学通报, 2005, 32(1): 79–84.
- [28] Liu H, Zhang J, Zhang SH, Yang FJ, Thacker PA, Zhang GL, Qiao SY, Ma X. Oral administration of *Lactobacillus fermentum* 15007 favors intestinal development and alters the intestinal microbiota in formula-fed piglets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(4): 860–866.
- [29] Takahashi S, Egawa Y, Simojo N, Tsukahara T, Ushida K. Oral administration of *Lactobacillus plantarum* strain Lq80 to weaning piglets stimulates the growth of indigenous lactobacilli to modify the lactobacillal population. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2007, 53(6): 325–332.
- [30] Ogawa M, Shimizu K, Nomoto K, Tanaka R, Hamabata T, Yamasaki S, Takeda T, Takeda Y. Inhibition of *in vitro* growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic *Lactobacillus* strains due to production of lactic acid. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, 68(1/2): 135–140.
- [31] Jin LZ, Marquardt RR, Baidoo SK. Inhibition of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88, K99 and 987P by the *Lactobacillus* isolates from porcine intestine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2000, 80(5): 619–624.
- [32] Liu WH, Ren HY, Zou L, Zou M, Wen JX, Yang ZX. Identification and characteristic study of an excellent lactic acid bacterium. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2008, 35(2): 152–155. (in Chinese)  
刘文华, 任慧英, 邹玲, 邹明, 温建新, 杨朝霞. 一株优良乳酸菌的分离鉴定与特性研究. 中国畜牧兽医, 2008, 35(2): 152–155.
- [33] Hao ZX, Liao H, Liu D, Guo L, Liu J, Ge H, Yang SL, Zhang ML, Yan QG. Isolation and identification of *Lactobacillus* from swine and the bacteriostatic experiment *in vitro*. *Swine Production*, 2015, (2): 126–128. (in Chinese)  
郝中香, 廖红, 刘丹, 郭玲, 刘杰, 葛红, 杨绍林, 张曼丽, 颜其贵. 猪源乳酸杆菌的分离鉴定及体外抑菌试验. 养猪, 2015, (2): 126–128.



# Isolation, identification and characterization of lactic acid bacteria from swine

Xueli Li, Chao Wang, Defu Yu, Liren Ding, Weiyun Zhu, Suqin Hang\*

Laboratory of Gastrointestinal Microbiology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China

**Abstract:** [Objective] We isolated, identified and characterized lactic acid bacteria (LAB) from the intestinal digesta, mucosa and feces of piglets, to explore the potential probiotic stains for the swine production. [Methods] A total of 155 lactic acid bacteria were isolated. Four isolates with high lactate production were identified by conventional biochemical method and bacterial 16S rRNA sequence, and their potential probiotic properties were assessed. [Results] Four LAB isolates (L45, L47, L63 and L79), *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus johnsonii* and *Enterococcus faecium* were identified based on lactate production at 8 h (> 100 mmol/L) and final pH at 90 h (< 3.9). The 4 isolates grew rapidly *in vitro*. They tolerated low pH and bile salt. Strains L47 and L79 tolerated pH 2.5, and L47 tolerated 0.5% bile salts. When the 4 isolates were co-cultured with *E. coli* K88 and *Salmonella*, the growth of *E. coli* K88 and *Salmonella* was inhibited. L47 demonstrated stronger inhibition effect than other 3 isolates. [Conclusion] L47 strain presented a higher lactate production, better growth, higher tolerance against pH 2.5 and 0.5% bile salt, and stronger antimicrobial effect on *E. coli* K88 and *Salmonella*, indicating that L47 isolate may have the potential probiotic properties for swine production.

**Keywords:** swine, lactic acid bacteria, isolate, identify, probiotic properties

(本文责编: 张晓丽)

---

Supported by Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (201403047)

\*Corresponding author. Tel: +86-25-84395037; E-mail: suqinhang69@njau.edu.cn

Received: 2 January 2017; Revised: 27 April 2017; Published online: 28 April 2017