

文章编号 1672-6634(2022)02-0098-06

DOI 10.19728/j.issn1672-6634.2021060014

# 驴源肠道乳酸细菌的筛选 及生物学特性研究

左立康,黄 荣,罗 康,王同浩,董洪圣,王长法,马青山

(聊城大学 农学院、山东省黑毛驴高效繁育与生态饲养工程技术研究中心、  
山东省驴产业科技协同创新中心,山东 聊城 252059)

**摘 要** 以健康德州驴肠道内容物为样品,筛选驴源乳酸细菌。经形态学观察、分子生物学手段对菌种进行鉴定,并对筛选菌种的安全性能、生长特性、产酸性能、产酶性能、耐受性能及抑菌特性等进行初步研究。结果显示,本研究成功分离获得一株驴源乳酸细菌,经鉴定为屎肠球菌,编号 HR-03;安全性试验表明,屎肠球菌 HR-03 不产生溶血圈,无潜在致病性;该菌株还表现出良好的耐酸和耐胆盐性能,且能够抑制致病性大肠杆菌生长。结果提示,屎肠球菌 HR-03 具有优良的生物学特性,可作为后续开发驴源益生菌制剂的候选菌种。

**关键词** 驴;屎肠球菌;筛选鉴定;生物学特性

**中图分类号** S 816.3

**文献标识码** A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



## Screening and Biological Characteristics of Intestinal Lactic Acid Bacteria from Donkey

ZUO Likang, HUANG Rong, LUO Kang, WANG Tonghao,  
DONG Hongsheng, WANG Changfa, MA Qingshan

(School of Agronomy, Liaocheng University, Shandong Engineering Technology Research Center for  
Efficient Breeding and Ecological Feeding of Black Donkey, Shandong Donkey Industry  
Technology Collaborative Innovation Center, Liaocheng 252059, China)

**Abstract** The study used the intestinal contents of healthy Dezhou donkeys as the source of lactic acid bacteria. The screened strains were identified through morphological observation and molecular biology methods, and their safety, growth characteristics, acid production performance, enzyme production performance, tolerance capacity and antibacterial properties were also studied. The results showed that a lactic acid bacterium was isolated in this study, which was identified as *Enterococcus faecium*, named HR-03; safety tests showed that *E. faecium* HR-03 did not produce a hemolytic zone and had no potential pathogenicity; the strain also exhibits good acid resistance and bile salt resistance, and can inhibit the growth of pathogenic *Escherichia coli*, has excellent biological characteristics, and can be used as candidate strain for the subsequent development of probiotic preparations for donkeys.

**Key words** donkey; *Enterococcus faecium*; screening and identification; biological characteristics

收稿日期:2021-06-14

基金项目:国家自然科学基金项目(31671287);山东省“泰山产业领军人才”项目(LJNY201713);山东省驴产业科技协同创新中心开放课题(3193308);聊城大学高层次人才科研启动基金项目(318052023)资助

通讯作者:马青山,男,汉族,博士,讲师,研究方向:益生菌及其发酵技术, E-mail: horsegreenhill@163.com;王长法,男,汉族,博士,教授,研究方向:益生菌及其发酵技术, E-mail: horsegreenhill@163.com。

## 0 引言

目前,我国畜牧业正处于“饲料禁抗”的关键时刻,对“替抗”、“减抗”相关技术和产品具有旺盛的需求。益生菌因其能够促进动物生长、提高饲料利用率<sup>[1]</sup>,调节动物肠道菌群和免疫机能<sup>[2]</sup>,预防腹泻发生<sup>[3,4]</sup>,且具有绿色、安全等方面特点,被认为是畜禽饲料中极具潜力的促生长抗生素替代品。养殖中常用的益生菌菌种包括乳酸细菌、芽孢杆菌和酵母菌类等,其中以乳酸细菌为主。然而,实验室筛得的菌种在养殖试验验证过程中,其功能往往不能较好的重现,这主要是由于实验室筛选益生菌的条件或许同其应用的环境有所区别,从而使益生菌应用后在靶位点难以生长、定植及发挥功能<sup>[5]</sup>,因此,筛选来自同源动物的肠道土著益生菌菌种就显得尤为重要。

驴产业是我国的特色畜牧业,也是关键的扶贫民生产业,然而,在集约化养殖模式下腹泻是影响犏驴驹成活率的主要因素之一,也已成为驴养殖业中的一大难点<sup>[6]</sup>。应用抗生素仅对大肠杆菌引起的腹泻有治疗效果但对应激源等因素引发的腹泻效果不佳,且存在产生耐药菌及二次感染的风险<sup>[7]</sup>,通过应用益生菌制剂,尤其是乳酸菌制剂能够减少应用抗生素带来的负面影响<sup>[8-10]</sup>,但源自驴肠道的益生菌菌种资源还较为匮乏,制约了驴用益生菌制剂的开发和应用。因此,本研究基于原位/宿主益生菌策略(Autochthonous/Host-associated probiotic)从健康驴肠道中筛选乳酸细菌,并对其生物特性进行研究,为开发驴用微生态制剂提供候选菌种资源。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 样品来源及供试菌株

试验样品来自山东省德州市禹城惠民驴场 2 岁德州驴直肠内容物。试验选用的指示菌株由聊城大学农学院分离并保存,2 种供试菌株为金黄色葡萄球菌和大肠杆菌。

### 1.2 主要培养基

MRS 液体培养基:蛋白胨 10 g,牛肉粉 8 g,葡萄糖 20 g,酵母粉 4 g,乙酸钠 5 g,磷酸氢二钾 2 g,硫酸镁 0.2 g,柠檬酸氢二铵 2 g,硫酸锰 0.04 g,蒸馏水 1000 mL,121 °C 灭菌 30 min;

MRS 固体培养基:在 MRS 液体培养基的基础上加入 2% 的琼脂,121 °C 灭菌 30 min。

水解淀粉酶培养基:LB 液体培养基 1000 mL,可溶性淀粉 2 g,琼脂 20 g。

Tween-80 培养基:蛋白胨 1.0 g,酵母膏 0.5 g,CaCl<sub>2</sub> 0.01 g,NaCl 0.5 g,Tween-80 1.0 g,琼脂 1.5~2.5 g。

### 1.3 乳酸菌的分离与纯化及形态观察

取 1 g 驴肠道内容物样品于离心管中,加入 9 mL 无菌蒸馏水,振荡摇匀。10 倍稀释,稀释梯度为 10<sup>-1</sup>~10<sup>-8</sup>。取不同稀释度稀释液 100 μL 均匀涂布于 MRS 平板上,37 °C 培养 24 h。挑取表面光滑、菌落凸起、四周平整、乳白色、菌落直径 1.0~1.5 mm 的单菌落,分区划线接种于 MRS 平板上。纯化 3 代,获得菌种加入 30% 甘油,-80 °C 冰箱保存。

挑取纯化培养 24 h 的单菌落涂片,革兰氏染色观察细菌形态特征,根据《常见细菌系统鉴定手册》选取革兰染色为阳性、形态为杆状或者球状的菌株进行后续研究。

### 1.4 乳酸菌的分子生物学鉴定及安全性分析

纯化的菌种采用正向引物 P1:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',反向引物 P2:5'-GGTTACCTT-GTTACGACTT-3',引物由上海立菲生物技术有限公司(北京)合成,进行 16S rDNA 扩增。PCR 反应体系:2× PCR mix 30 μL,引物各 2.5 μL,菌液 2 μL,ddH<sub>2</sub>O 23 μL。PCR 程序为:95 °C 5 min;95 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 90 s,共 30 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min,PCR 扩增产物在 1.0% 琼脂糖凝胶(含有万分之一浓度的 SYBR<sup>®</sup> Green I)上电泳 30 min,紫外灯下观察,确定产物 PCR 成功并达到要求后,将 PCR 产物送交上海立菲生物技术有限公司(北京)进行序列测定。测序结果在 NCBI 中进行同源性分析。

将受试菌点接于哥伦比亚兔血琼脂平板(青岛,海博生物),置于 37 °C 培养箱培养 24~48 h,观察是否有溶血圈以及溶血圈类别。

### 1.5 乳酸菌生长曲线与产酸能力测定

生长曲线测定:将菌液在 MRS 液体培养基中按 1% 比例接种,37 °C 培养,每 2 h 取样一次,分光光度计

测其 OD600 值,绘制生长曲线。

产酸能力测定:将菌液在 MRS 肉汤中按 1% 比例接种,37 °C 培养,每 6 h 取样一次,通过 pH 仪测其 pH 值,绘制菌株产酸曲线。

### 1.6 乳酸菌的产酶能力分析

产淀粉酶试验:将受试菌接种于水解淀粉酶培养基上,37 °C 过夜培养。滴加碘液,显色,为防止光分解,5 min 内观察。

脂肪酶试验:将受试菌接种于 Tween-80 培养基上,37 °C 过夜培养,室温再培养 1~2 天。观察是否有沉淀圈。

### 1.7 乳酸菌的耐受性研究

耐酸性试验:利用 0.5 mol/L HCl 溶液和 0.1 mol/L NaOH 溶液调节 MRS 液体培养基 pH 值,分别为 2、3、4、5、6、7、8、9,121 °C 灭菌 30 min 后,按 1% 比例接入待测乳酸菌种子液,设置 3 个重复。37 °C 培养 24 h,分光光度计测其 OD600 值。

耐胆盐性试验:配制含猪胆盐的质量分数分别为 0.1%、0.2%、0.3% 的 MRS 液体培养基,121 °C 灭菌 30 min 后,按 1% 比例接入待测乳酸菌种子液,设置 3 个重复。37 °C 培养 24 h,分光光度计测其 OD600 值。

### 1.8 乳酸菌的抑菌性试验

以实验室保藏的金黄色葡萄球菌和大肠杆菌为指示菌,采用国标滤纸片法进行乳酸菌的抑菌试验<sup>[11]</sup>。指示菌为经过 37 °C 培养过夜培养,与生理盐水 1:9 稀释,涡旋器混匀后涂布 LB 平板,加入载有待测乳酸菌的滤纸片。37 °C 培养 24 h,观察指示菌生长情况,游标卡尺测量抑菌圈直径。

## 2 结果

### 2.1 形态特征及革兰氏染色结果

分离菌株在 MRS 平板上 37 °C 培养 24 h 后,菌落呈不透明灰白色、表面光滑凸起、边缘整齐、直径 1 mm 左右大小的圆形(图 1)。革兰氏染色阳性,显微镜镜检观察菌株 HR-03 为圆形或椭圆形(图 2)。



图 1 菌株 HR-03 在 MRS 平板上的菌落形态

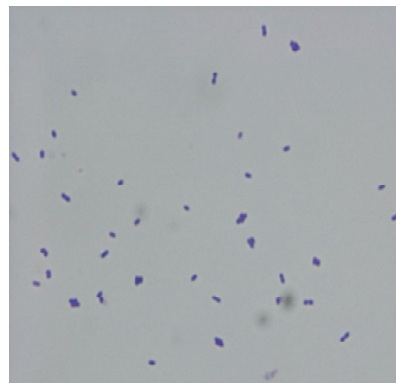


图 2 菌株 HR-03 革兰氏染色结果

### 2.2 分子生物学鉴定结果

测序结果在 NCBI Blast 网站上进行同源性比较,菌株 HR-03 同屎肠球菌同源性高于 99%,结合进化树分析可知(图 3),菌株 HR-03 鉴定为屎肠球菌。

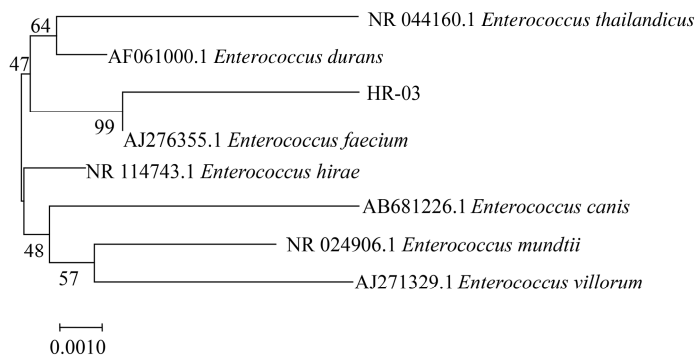


图 3 通过 16SrDNA 核酸序列构建的系统进化树

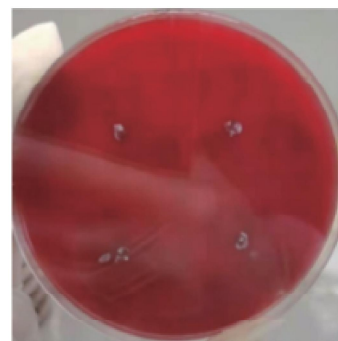


图 4 分离菌在兔血琼脂平板上产生溶血圈情况

### 2.3 分离菌的安全性试验

如图 4 所示,点接分离的四株受试菌于兔血琼脂平板上,37 °C 培养 24 h,无溶血圈,菌株具有较好的安全性。

### 2.4 生长特性和产酸能力试验结果

如图 5、6 所示,屎肠球菌 HR-03 在 0~6 h 迅速生长,6 h 后进入对数生长期,pH 值迅速下降;12 h 后进入生长平缓期,pH 值也逐步趋于稳定,最终菌株 HR-03 发酵上清液 pH 值为 4.57。

### 2.5 乳酸菌的产酶能力分析

将受试菌分别接种于水解淀粉培养基和 Tween-80 培养基上,37 °C 培养 24 h,未观察到透明圈和沉淀圈,菌株 HR-03 无产淀粉酶和脂肪酶能力。

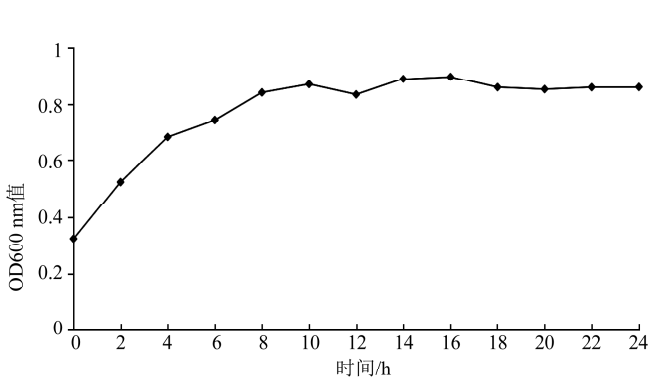


图 5 菌株 HR-03 的生长曲线

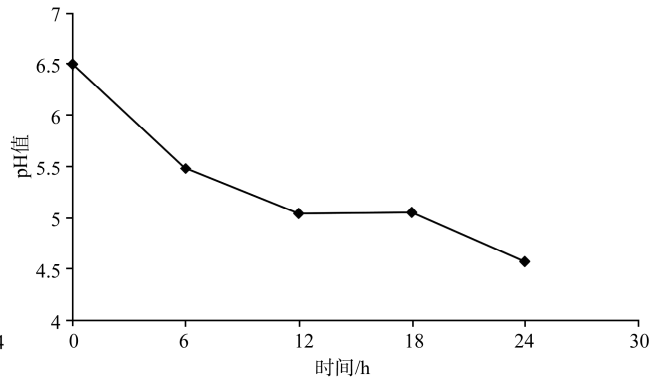


图 6 菌株 HR-03 的产酸曲线

### 2.6 乳酸菌的耐受性研究

2.6.1 耐酸性。由图 7 可知,菌株 HR-03 在 pH 值为 2~9 的 MRS 肉汤中均能存活,其中在 pH 6~7 之间 OD600 值最高,表明屎肠球菌 HR-03 最适生长 pH 值为 6~7。在 pH 值为 2~5 之间菌株 HR-03 的 OD600 值随着 pH 值的降低而明显下降,表明酸性环境对菌株 HR-03 的生长有抑制作用,但仍有细菌生长。由此可见,菌株 HR-03 具有较强的耐酸性。

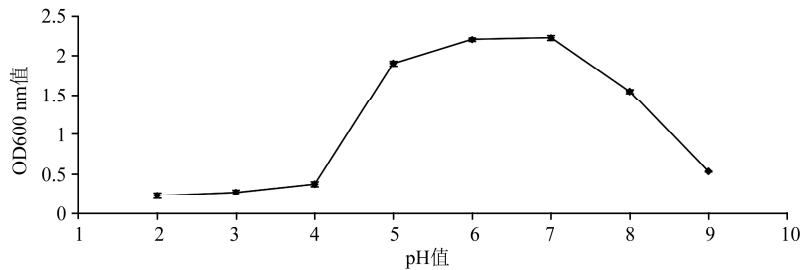


图 7 不同 pH 值对菌株 HR-03 生长的影响

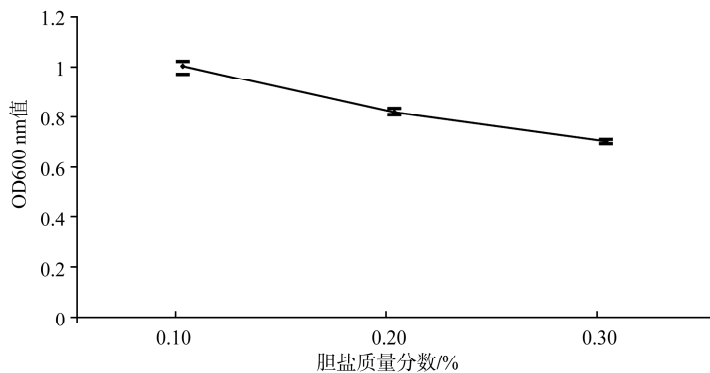


图 8 不同质量分数胆盐对菌株 HR-03 生长的影响

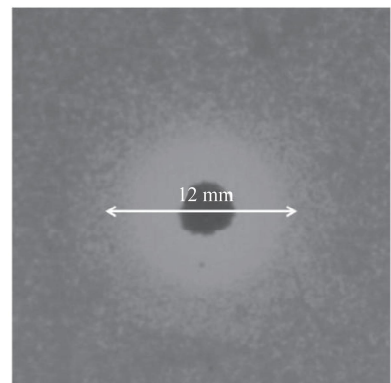


图 9 菌株 HR-03 对大肠杆菌抑制结果

2.6.2 耐胆盐性。由图 8 可知,屎肠球菌 HR-03 能够耐受质量分数为 0.10% 的猪胆盐,其 OD600 值也随着

胆盐质量分数的增加而下降,表明高浓度的胆盐对菌株 HR-03 的生长有抑制作用,当胆盐质量分数为 0.30% 时,菌株的 OD600 值仍在 0.7 左右,由此可见,菌株 HR-03 具有良好的耐胆盐能力。

### 2.7 乳酸菌的抑菌试验

如图 9 所示,屎肠球菌 HR-03 对大肠杆菌抑菌圈直径为 12 mm,有较强抑制作用;而对金黄色葡萄球菌没有产生抑菌圈,无抑制作用。

## 3 讨论

屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)是动物肠道中正常菌群的重要组成部分,定植于动物肠道黏膜表面可降低肠道内 pH 值、抑制病原菌生长、减少体内毒素含量,维持肠道健康、提高动物免疫能力<sup>[12-15]</sup>。屎肠球菌作为饲料添加剂应用于畜禽养殖已有多年历史,其优良性能已得到广大畜牧生产者的认可。然而,在畜牧生产中往往出现乳酸菌等益生菌应用效果不稳定等情况发生,这一方面或许是由于乳酸菌不耐高温,导致产品中乳酸菌活菌数波动较大,从而影响应用效果<sup>[16]</sup>;另一方面主要是由于非同源菌株很难定植在动物肠道内,或是定殖后因为各种因素无法发挥理想效果<sup>[5]</sup>,章文明等<sup>[17]</sup>研究也发现,同源益生菌对动物更加安全,效果更为稳定,由此可见,筛选动物同源益生菌菌种,并对其特性进行研究对于开发新的益生菌制剂至关重要。

本研究从健康德州驴肠道内容物中分离纯化得到一株乳酸菌 HR-03,利用形态特征观察、分子生物学手段鉴定为屎肠球菌,并对其安全性能、生长性能、产酸性能、产酶性能、耐受性能及抑菌特性等进行了初步研究,获得安全性高、耐受性好且具有抑制病原菌性能的屎肠球菌 HR-03,可作为后续开发驴源益生菌制剂的候选菌种。以往研究中,筛选驴源益生菌的研究报道较为有限,王卓等<sup>[18]</sup>从驴肠道内分离鉴定出罗伊氏乳杆菌,并对其安全性进行了研究,结果表明分离的乳酸菌对小鼠安全,而且能够增强小鼠免疫力,这同本试验中筛选的屎肠球菌无潜在致病性结果一致;刘宇等<sup>[19]</sup>也从驴粪便样本中分离出具有较好安全性的干酪乳杆菌 LV1,并对其生长性能、pH 耐受性进行了研究,但并未对筛选菌种的产酶、抑菌等性能进行分析。

作为饲养动物的益生菌,能否耐受胃酸和胆盐是衡量一个菌种性能是否优良的重要指标。以往研究发现,屎肠球菌具有较好的耐酸性,Guerra 等<sup>[20]</sup>研究表明屎肠球菌 CECT410 在 pH=2.0 的条件下可以存活;卢冰霞等<sup>[21]</sup>从健康鸡盲肠中分离出 1 株屎肠球菌 J4,该菌株在 pH 值为 2.0 的条件下也可存活。同以上结果一致,本试验分离的屎肠球菌 HR-03 在 pH 值为 2.0 的条件下也能存活,且在 pH 值为 4.0 的 MRS 肉汤中培养 24 h 后,其 OD600 值仍在 0.3 以上,表明此菌株具有较好的耐酸性。胆盐有助于脂肪的消化,可促进脂肪酸和维生素的吸收,但对微生物具有抑杀作用。研究发现,屎肠球菌对胆盐也具有较好的耐受性,王炜宏等<sup>[22]</sup>分离出的 1 株屎肠球菌,用含胆盐的质量分数为 0.3% 的 MRS 肉汤处理后,菌株存活率仍能保持在 50% 以上。本试验中分离出的屎肠球菌 HR-03 也具有较好的胆盐耐受性,同以往研究结果一致。

菌种的产酶、抑菌等特性同益生菌制剂的能否发挥作用有重要关系。以往研究发现,屎肠球菌具有较好的抑菌活性但产酶活性较低,Valenzuela 等<sup>[23]</sup>研究发现,分离的屎肠球菌对金黄色葡萄球菌和李斯特菌具有较好的抑制作用。本研究发现屎肠球菌 HR-03 对致病性大肠杆菌有明显抑制作用,抑菌圈直径为 12 mm,但对金黄色葡萄球菌没有抑制效果,这或许同不同屎肠球菌菌株产生的不同代谢产物有关。另外,Zeyner 等<sup>[24]</sup>研究发现,仔猪饲喂屎肠球菌 SF68 后,可以明显抑制肠道内致病性大肠杆菌的生长,这同本研究结果一致,本研究筛选的驴源屎肠球菌 HR-03 对致病性大肠杆菌也有明显抑制作用,而且产酸性能较好,这对于防控大肠杆菌导致的驴驹腹泻具有重要意义。

## 4 结论

本研究从健康驴肠道内容物中,分离筛选得到一株安全性、耐受性良好,且能够抑制病原性大肠杆菌的屎肠球菌 HR-03。作为驴源肠道菌种,有利于在驴肠道内定植,可为后续驴用益生菌制剂研制提供菌种资源。

## 参 考 文 献

- [1] RAMLUCKEN U, LALLOO R, ROETS Y, et al. Advantages of *Bacillus*-based probiotics in poultry production[J]. *Livestock Science*, 2020, 241: 104215.
- [2] CHEN C, LI J, ZHANG H, et al. Effects of a probiotic on the growth performance, intestinal flora, and immune function of chicks infected with *Salmonella pullorum*[J]. *Poultry Science*, 2020, 99(11): 5316-5323.
- [3] YANG Y, PARK J H, KIM I H. Effects of probiotics containing (*Lactobacillus planetarium*) and chlortetracycline on growth performance, nutrient digestibility, fecal microflora, diarrhea score and fecal gas emission in weanling pigs[J]. *Livestock Science*, 2020, 241: 104186.
- [4] DOWARAH R, VERMA A K, AGARWAL N, et al. Effect of swine based probiotic on performance, diarrhoea scores, intestinal microbiota and gut health of grower-finisher crossbred pigs[J]. *Livestock Science*, 2017, 195: 74-79.
- [5] TARKHANI R, IMANI A, HOSEINIFAR S H, et al. Comparative study of host-associated and commercial probiotic effects on serum and mucosal immune parameters, intestinal microbiota, digestive enzymes activity and growth performance of roach (*Rutilus rutilus caspicus*) fingerlings[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 98: 661-669.
- [6] 王仁虎. 引起驴驹腹泄的致病性大肠杆菌分离鉴定及复合疫苗研制[D]. 聊城: 聊城大学, 2018.
- [7] VON BAUM H, MARRE R. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications[J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2005, 295(6): 503-511.
- [8] BARBA-VIDAL E, MART N-OR E S M, CASTILLEJOS L. Practical aspects of the use of probiotics in pig production; a review[J]. *Livestock Science*, 2019, 223: 84-96.
- [9] AROWOLO M A, HE J. Use of probiotics and botanical extracts to improve ruminant production in the tropics; a review[J]. *Animal Nutrition*, 2018, 4(3): 241-249.
- [10] PYLES M B, FOWLER A L, BILL V T, et al. Effect of probiotics on antibiotic-induced changes in fecal bacteria of horses[J]. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2017, 52: 82-83.
- [11] 黄秀梨. 微生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1998.
- [12] ZHANG Z F, KIM I H. Effects of *Enterococcus faecium* DSM 7134 supplementation in different energy and crude protein density diets on ileal amino acid digestibility and intestinal shedding of lactobacilli and *Escherichia coli* in finishing pigs[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2015, 201: 115-119.
- [13] ZHANG Z F, LEE J M, KIM I H. Effects of *Enterococcus faecium* DSM 7134 on weanling pigs were influenced by dietary energy and crude protein density[J]. *Livestock Science*, 2014, 169: 106-111.
- [14] GIANNENAS I, DOUKAS D, KARAMOUTSIOS A, et al. Effects of *Enterococcus faecium*, mannan oligosaccharide, benzoic acid and their mixture on growth performance, intestinal microbiota, intestinal morphology and blood lymphocyte subpopulations of fattening pigs[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2016, 220: 159-167.
- [15] SAEIDI E, YARAHMADI H M, FAKHRAEI J, et al. Effect of feeding fructooligosaccharides and *Enterococcus faecium* and their interaction on digestibility, blood, and immune parameters of adult horses[J]. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2021, 99: 103410.
- [16] GUAN H, SHUAI Y, YAN Y, et al. Microbial community and fermentation dynamics of corn silage prepared with heat-resistant lactic acid bacteria in a hot environment[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(5): 719.
- [17] 章文明. 仔猪源高粘附性乳酸杆菌的分离鉴定、肠道定植及其粘附相关表面蛋白功能分析[D]. 杭州: 浙江大学, 2014.
- [18] 王卓, 冯培祥, 刘晓颖, 等. 驴源罗伊氏乳杆菌的安全性评价[J]. *特产研究*, 2020, 42(3): 39-43.
- [19] 刘宇, 尹珺伊, 陈楠楠, 等. 驴源短小芽孢杆菌 LV2 分离鉴定及其生物学特性[J]. *中国兽医学报*, 2019, 39(4): 666-670+694.
- [20] GUERRA N P, BERNÁRDEZ P F, MÉNDEZ J, et al. Production of four potentially probiotic lactic acid bacteria and their evaluation as feed additives for weaned piglets[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2007, 134(1): 89-107.
- [21] 卢冰霞, 周英宁, 梁家幸, 等. 一株鸡源发酵乳杆菌益生菌的分离鉴定[J]. *广西农学报*, 2020, 35(1): 21-24+39.
- [22] 王炜宏, 丁修良. 饲用屎肠球菌生物学特性评价[C]. // 山东畜牧兽医学会禽病学专业委员会(SPDC)第二届禽病学术研讨会论文集, 2011年卷, 山东潍坊: 山东畜牧兽医学会, 2011.
- [23] VALENZUELA A S, BENOMAR N, ABRIQUEL H, et al. Isolation and identification of *Enterococcus faecium* from seafoods; Antimicrobial resistance and production of bacteriocin-like substances[J]. *Food Microbiology*, 2010, 27(7): 955-961.
- [24] ZEYNER A, BOLDT E. Effects of a probiotic *Enterococcus faecium* strain supplemented from birth to weaning on diarrhoea patterns and performance of piglets[J]. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2006, 90(1/2): 25-31.