

引用:黄会明,陈梦瑶,赵思雨,等. 幼犬源动物乳杆菌的分离及体外益生功能研究[J]. 聊城大学学报(自然科学版),2026,39(3):464-474.

Citation:HUANG Huiming, CHEN Mengyao, ZHAO Siyu, SONG Jiayi, HAN Xue, LIU Qingrong, WEN Min. Isolation and *in vitro* assessment of probiotic properties of *Lactobacillus animalis* isolated from puppies[J]. Journal of Liaocheng University (National Science Edition),2026,39(3):464-474.

文章编号 1672-6634(2026)03-0464-11

DOI 10.19728/j.issn1672-6634.2025100007

幼犬源动物乳杆菌的分离及体外益生功能研究

黄会明¹,陈梦瑶²,赵思雨²,宋嘉仪¹,韩雪²,刘庆容¹,温敏³

(1. 聊城大学 药学与食品工程学院,山东 聊城 252059;2. 聊城大学 农业与生物学院,山东 聊城 252059,
3. 聊城大学 生物制药研究院,山东 聊城 252059)

摘要 本研究旨在从哺乳期健康幼犬粪便中分离获得具有益生功能的乳酸菌。经革兰氏染色和16S rRNA鉴定为动物乳杆菌(*Lactobacillus animalis*) LA-1~LA-5。结果表明:各菌株具有良好生长和产酸能力;LA-1、LA-3和LA-4在pH 2.0处理3 h的存活率超73%;0.3%胆盐处理3 h,菌株存活率均高于50%,LA-3达80%以上;LA-2的自凝聚能力较强,5 h达52.43%;各菌株对三氯甲烷表面疏水率达94%;LA-2对Caco-2细胞的黏附率为51.82%;LA-2和LA-4的DPPH自由基清除能力超过50%;5株菌株对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、沙门氏菌等常见致病菌均有一定的抑制活性,其中LA-1对金黄色葡萄球菌的抑菌圈达17.67±3.33 mm;药敏试验显示各菌株对青霉素、氯霉素和氨苄西林高度敏感,且溶血试验均为阴性。因此,5株动物乳酸杆菌具有良好的体外益生功能,有望作为幼犬源益生菌应用到宠物犬相关食品里。

关键词 幼犬;粪便;益生菌;动物乳杆菌;益生功能

中图分类号 S816

文献标志码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Isolation and *in vitro* assessment of probiotic properties of *Lactobacillus animalis* isolated from puppies

HUANG Huiming¹, CHEN Mengyao², ZHAO Siyu², SONG Jiayi¹,
HAN Xue², LIU Qingrong¹, WEN Min³

(1. School of Pharmaceutica Sciences and Food Engineering, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China;
2. College of Agriculture and Biology, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China;
3. Institute of Biopharmaceutical Research, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China)

Abstract The purpose of this study was to isolate probiotic lactic acid bacteria from the feces of healthy puppies. Five strains were successfully isolated from stool samples collected from puppies. Based on Gram staining and 16S rRNA gene sequencing, all five isolates were identified as *Lactobacillus animalis* and designated as LA-1~LA-5. The results demonstrated that all five strains exhibited excellent growth characteristics and acid production capability. After 3 hours of exposure to pH 2.0, strains LA-1, LA-3, and LA-4 exhibited survival rates above 73%, while exposure to 0.3% bile salts resulted in a survival rate a-

收稿日期:2025-10-27

基金项目:国家自然科学基金项目(22508158);校企合作项目(K23LD76,K24LD181)资助

通信作者:黄会明,女,汉族,博士,讲师,研究方向:宠物营养与肠道微生物,E-mail:hmhuang1988@163.com。

bove 50% for all five strains, with LA-3 exceeding 80%; Notably, strain LA-2 displayed strong auto-aggregation capacity, reaching 52.43% after 5 hours; Moreover, the surface hydrophobicity measured with chloroform was exceptionally high (94%) for all strains. Of particular note, LA-2 also showed a high adhesion rate to Caco-2 cells, at 51.82%; All five strains demonstrated DPPH radical scavenging activity, with LA-2 and LA-4 exhibiting particularly strong effects exceeding 50%. Additionally, every strain inhibited the growth of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Salmonella*. Notably, LA-1 produced an inhibition zone measuring 17.67 ± 3.33 mm against *S. aureus*; All isolates were also highly susceptible to penicillin, chloramphenicol, and ampicillin. Furthermore, hemolysis tests confirmed that all five strains are safe for potential use. Consequently, these five *L. animalis* strains are strong candidate probiotics derived from healthy puppies, with their robust in vitro functionality supporting their potential use in canine nutrition.

Keywords puppy; feces; probiotics; *Lactobacillus animalis*; probiotic function

0 引言

近年来,我国宠物行业迅猛发展,人们对宠物健康越来越重视。肠道微生态与健康、疾病密切相关^[1]。肠道作为营养物质消化吸收的重要器官和身体免疫的重要器官,其健康水平决定机体整体健康^[2]。肠道微生态受年龄、营养和环境等诸多因素的影响,其中年龄是影响肠道微生态结构的重要因素^[3,4]。生命早期不仅是生长发育关键时期,也是肠道菌群发育和各系统迅速成熟时期,此时期肠道微生物群多样性和变异性很高,任何扰动均可影响微生物群定植和代谢活动,改变宿主营养和免疫功能,增加远期疾病(如过敏、肥胖、精神行为异常)发生风险^[5,6]。因此,在生命早期肠道微生物群稳态是决定宠物健康的一个重要因素。

自2020年7月我国施行饲料全面禁抗以来,益生菌产品作为一种新型的饲料添加剂逐步走进大众视野。益生菌属于活体微生物,其核心特点是当被摄入的剂量达到一定标准时,能够对宿主的健康起到积极有益的影响^[7]。使用宿主肠道内的微生物作为益生菌菌株才是最理想的选择^[8]。多项研究表明,幼犬在断奶前的粪便微生物群与成年犬有着显著差异^[9]。此外,幼犬出生后的21天内,肠道乳酸菌的含量提高100倍,表明乳酸菌在增强犬生命早期健康状态中发挥重要作用^[10]。然而,目前市场上鲜有犬源益生菌菌株产品,针对幼犬益生菌研究更加有限。因此,发掘幼犬来源乳酸菌益生菌资源刻不容缓。本研究旨在从哺乳期健康幼犬肠道中分离乳酸菌,以期发现具备潜在开发应用前景的幼犬源乳酸菌,进而为幼犬源益生菌的菌株开发工作及该类菌株在宠物犬相关食品中的应用提供科学支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验菌株:粪便样本采自2月龄以内的健康幼犬;病原指示菌:金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* CMCC26003)、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CCARM3090)、沙门氏菌(*Salomonella typhimurium* CCARM8250)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae* ATCC10031)、大肠杆菌(*Escherichia coli* CMCC44102)均为实验室保存菌株。

1.2 试验试剂

抗菌药物药敏纸片购自杭州微生物试剂有限公司;异硫氰酸荧光素(FITC),胰酶及DMEM高糖培养基购自北京索莱宝科技有限公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)自武汉普诺赛生命科技有限公司购买;哥伦比亚血琼脂平板、生化鉴定管和试验所用MRS培养基购自青岛高科技工业园海博生物技术有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 样本处理及菌株分离。取约1g健康幼犬的新鲜粪便样本,用无菌PBS缓冲液按1:9比例稀释并搅拌均匀^[11],再用1mm孔隙的无菌纱布过滤以去除排泄物残留碎片,接着取出筛滤后的上层清液用无菌PBS缓冲液按1:1000比例进一步稀释,取0.1mL稀释液均匀涂抹在MRS琼脂平板表面,然后把平板放

在 37℃ 孵化 24~48 h, 观察不同菌落外形和大小差异挑出单个菌落, 并在 MRS 琼脂平板连续划线分离, 重复 3~4 次直到得到形态一致的纯净菌落, 最后对单一菌落纯化培养物做革兰氏染色并通过显微镜查看细菌形态特性以及菌落着色状况。

1.3.2 菌种鉴定。通过基因组提取试剂盒得到菌株基因 DNA 并将其作为 PCR 反应模板, 然后用细菌通用引物 27F 和 1492R 做 PCR 扩增^[12]。PCR 扩增体系由以下成分组成: 10×PCR Buffer 5 μL, 2.5 mmol dNTPs 5 μL, Forward Primers(10 μmol)5 μL, Reverse Primers(10 μmol)5 μL, DNA 聚合酶(2.5 U·μL⁻¹)1 μL, 模板 2 μL, ddH₂O 27 μL。扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 合格样本交给青岛蔚来生物科技有限公司测定基因序列, 用 NCBI 数据库里的 BLAST 做同源性对比检验, 并且用 MEGA 11.0 相邻连接法(即 Neighbor-Joining 算法)构建系统发育树。

1.3.3 生理生化实验。本实验采用直接接种法, 将经纯化的菌株接种入生化鉴定管后用封口膜把管口严密封闭起来, 根据试剂的不同特性差异化设置培育条件, 1% 的马尿酸钠要在 37℃ 的水浴环境中培育 2 h, 七叶苷、乳糖、菊糖等其它物质则需要在 37℃ 下培育 24~48 h, 最后通过观察生化鉴定管里的显色变化来确定菌株发酵的结果。

1.3.4 生长及产酸特性。先将隔夜培育好的菌株发酵液按 2% 的体积比加到 MRS 液体培养基里面, 并且配制与之等量、无菌的 MRS 液体培养基当作空白对照组。两组培养过程均在 37℃ 厌氧条件下进行, 并按 2 h 间隔定时取样, 所取的样品均分别测定菌液在 600 nm 波长下的吸光值和酸碱度变化。

1.3.5 耐酸耐胆盐实验。耐酸试验: 用 0.5 mol/L 的盐酸溶液将 MRS 培养基的酸碱度分别调为 1.5、2.0、2.5, 经高温灭菌后重新检测培养基的酸碱度。从菌种发酵产物里吸取 200 μL, 添加到 4.8 mL pH 值不同的 MRS 液体营养液中并提取样本。放在 37℃ 厌氧的条件下孵化三小时后再采集样本。采集到的两组样本要稀释到合适浓度, 然后取 100 μL 均匀涂抹在 MRS 固态培养皿表面, 培养 24 h 后统计菌落数目, 计算存活比例。存活率(%) = $N_3/N_0 \times 100\%$ 。式中 N_3 为 3 h 活菌数; N_0 为 0 h 活菌数; 活菌数用 lgCFU·mL⁻¹ 表示。

耐胆盐实验: 在 MRS 液体培养基中添加胆盐, 设置三个浓度梯度 0.1%、0.2%、0.3%(m/V)。取 200 μL 菌株发酵液, 分别接种至上述含不同胆盐浓度的 MRS 培养基中, 使体系总量为 5 mL。接种后将培养基放在 37℃ 的厌氧环境下培养。培养期间, 分别在培养 0 h 和培养 3 h 这两个时间点取样, 采用与耐酸试验相同的平板涂布法处理样品, 进而参考耐酸存活率公式计算菌株的耐胆盐存活率。

1.3.6 自凝聚能力与疏水性试验。隔夜培养好的菌液, 以 6 000 r/min 的速率离心 10 min 获得菌体, 用无菌 PBS 缓冲液将菌体清洗三遍, 调整菌悬液密度使其在 600 nm 波长下的吸光值在 0.5 到 0.7 之间, 记下这个初始值 A_0 , 从菌液悬浮体中吸取 2 mL 恰当浓度的菌液, 用漩涡式振荡器充分混合均匀后放在 37℃ 厌氧环境下孵化, 在静止的不同时间点(0、1、3、5 h)测定菌液的光密度值 OD_{600nm} 并记作 A_t , 取二甲苯、乙酸乙酯、氯仿各 2 mL, 分别与 2 mL 菌液在漩涡混合器里搅拌均匀后常温静置半小时, 待混合液分层后轻轻把底层液相提取出来, 测定该液相在 OD_{600nm} 波长下的吸光度并记录为 A_1 。自凝聚能力(%) = $\frac{(A_0 - A_t)}{A_0} \times$

100%; 疏水性(%) = $\frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \times 100\%$ 。

1.3.7 细胞黏附试验。Caco-2 细胞培育过程: 用含 20% 小牛血清加 1% 双抗的 DMEM 高浓度葡萄糖培养基培育 Caco-2 细胞, 在恒温 37℃ 充满 95% 空气和 5% 二氧化碳混合气体的密闭环境里培育 Caco-2 细胞使其生长^[11]。

试验菌株荧光标记: 把新鲜培育的试验菌悬液在 4℃, 4 000 r/min 离心 5 min 之后去掉上清液, 用无菌 PBS 清洗菌体三次, 洗完之后用提早在室温静置半小时的异硫氰酸酯(FITC)标记液悬浮菌体, 37℃ 避光振荡培养 2 h。孵育完之后按照之前离心的条件(4℃、4 000 r/min、5 min)再离心一次并倒掉上层清液, 再拿无菌 PBS 洗 3 次以便清除没吸附的 FITC, 然后用不含双抗的 20% DMEM 培养基把菌体重新悬浮起来并将菌液的浓度调整到 2×10^8 CFU/mL, 最后对这个菌液在 485 nm 吸收波长与 530 nm 发射波长的条件下测定相对荧光强度(RFU), 把这个数值记作 R_0 , 它表示附着前菌株的相对荧光强度值。

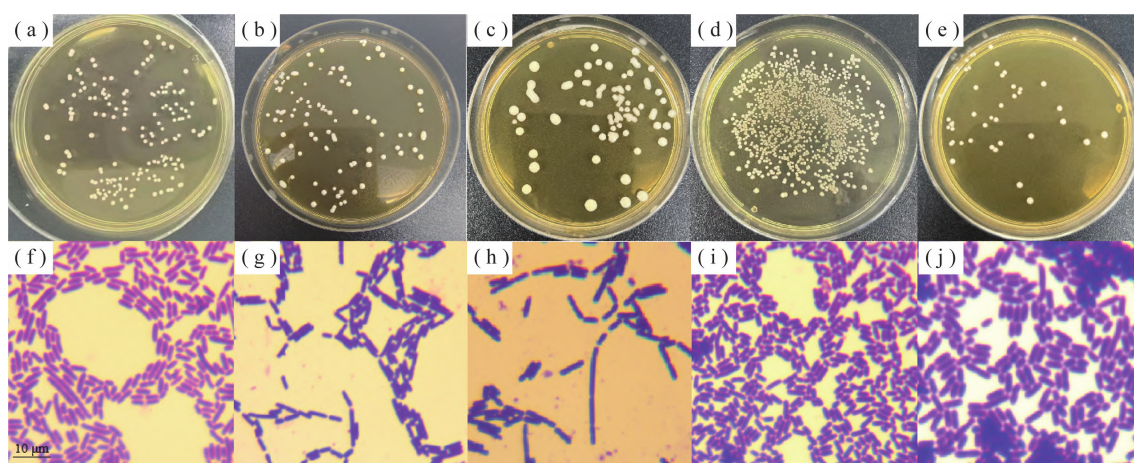
细胞黏附实验:研究采用 Caco-2 细胞,要将细胞密度调整到 $5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$,然后向 24 孔培养板中加入 1 mL 稀释好的细胞,设置三个重复孔。细胞大概培养 24 h 左右长成单层,弃去培养液,用无菌 PBS 缓冲液洗三次,洗完后每孔注入 600 μL FITC 标记好的益生菌悬浮液,接着在 37°C 、5%二氧化碳的环境中避光培育 2 h,之后倒掉培养液并用无菌 PBS 缓冲液去掉未黏附在细胞上的菌株,再加 300 μL 胰蛋白酶溶液到每个孔里并放到培养器中 37°C 分解 5 min,加入 300 μL DMEM 细胞培养基来终止分解过程,在统一的光波长设置下测细胞悬浮液的相对荧光强度值(RFU)记为 R 。细胞黏附率($\%$) $=\frac{R}{R_0} \times 100\%$ 。

1.3.8 DPPH 自由基清除试验。按照步骤 1.3.6 同样的方法收集菌体配制菌悬液。取 2 mL 菌悬液和 0.2 mmol/L DPPH 乙醇溶液混合于离心管中^[11],在 37°C 避光反应 30 min,8 000 r/min 离心 10 min,取上清液在波长 517 nm 条件下测定其吸光值,记为 A_s 。对照管用 2 mL 无菌 PBS 缓冲液代替菌悬液处理后,测定上清液 $\text{OD}_{517 \text{ nm}}$ 值记为 A_c 。空白管用 2 mL 无水乙醇代替 0.2 mmol/L DPPH 乙醇溶液,测定上清液 $\text{OD}_{517 \text{ nm}}$ 值记为 A_0 。重复 3 次实验,取平均值。DPPH 自由基清除率($\%$) $=\left(1-\frac{A_s-A_0}{A_c}\right) \times 100$ 。

1.3.9 抑菌实验。抑菌活性测试采用牛津杯法,取新制备的菌悬液离心处理(6 000 r/min,离心 10 min),把离心后的上层清液留着备用。用无菌 PBS 调整病原菌菌液的浓度 $1 \times 10^6 \text{ CFU/mL}$ 待用。无菌培养皿底部加入 5 mL MRS 固体培养基,培养基待固化后,再在培养皿内均匀摆放牛津杯。将 15 mL MRS 固体培养基冷却至在 $50 \sim 60^\circ\text{C}$,混入 100 μL 致病菌悬浮液搅匀,慢慢倒在放有牛津杯的平板上,等混合液冷却凝固后用无菌镊子拿出牛津杯,这时平板上就出现均匀分布的 $8 \text{ mm} \times 6 \text{ mm}$ 大小的圆形孔洞。将 100 μL 培养菌发酵上清液放入圆形孔洞里,在 4°C 冰箱中让它扩散大概 2 h,继续在 37°C 环境中培育 12 h 左右,最后用游标卡尺测量抑菌透明圈的直径(mm)。

1.3.10 溶血试验。菌株用划线法接种到哥伦比亚血琼脂培养基上, 37°C 厌氧环境下培育 24~48 h,待培育完成后仔细查看菌群周围有无溶血圈,以溶血性金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* CMCC 26003)作阳性菌株作参照。

1.3.11 抗生素敏感性试验。纸片琼脂扩散技术用于抗生素敏感度检测,将新鲜培养的菌液浓度调整为 $2 \times 10^6 \text{ CFU/mL}$,取 100 μL 均匀涂布于 MRS 琼脂培养基上,在室温下静置大概 10 min 让菌液充分吸收后再把抗生素敏感测试纸片均匀铺在平板上, 37°C 厌氧条件下培育 24 h 后用游标尺测出药敏试纸周围透明环的半径并记下来。



注:(a~e) 为 LA-1~LA-5 在 MRS 固体平板形态图;(f~j) 为 LA-1~LA-5 革兰氏染色后镜检图(1 000 $\times$)。

图1 5株试验菌株形态图

Fig.1 Morphology diagram of 5 test strains

1.3 数据处理

使用 SPSS 18.0 软件中的 LSD 进行组间的数据两两比较($p < 0.05$ 表示差异显著);利用 GraphPad Prism 9.0 软件作图。

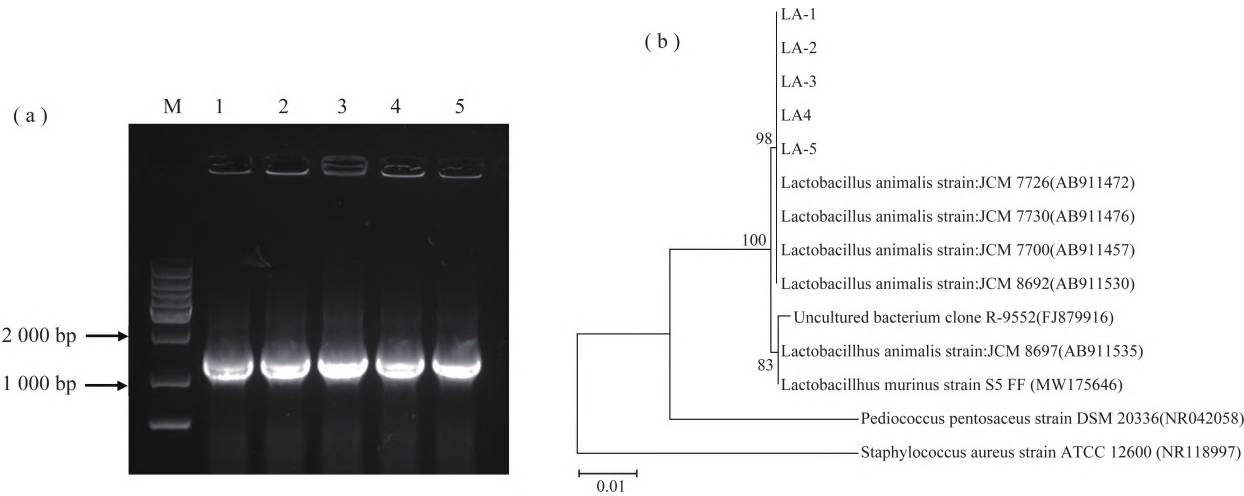
2 结果与分析

2.1 菌株的分离及形态学观察

用平板划线技术在 MRS 固体培养基里分离和纯化菌株,将五株分离菌命名为 LA-1~LA-5。从图 1 能看出所有菌株的菌落是表面平坦光滑、白色的独立圆形菌落,并且五株菌株的革兰氏染色结果皆为紫色杆菌,所以判断五株菌株都属于革兰氏阳性菌。

2.2 细菌 16s rRNA 分子生物学鉴定

PCR 扩增产物经电泳分析,由图 2(a)可看出 5 个样本的条带长度约为 1 500 bp,根据 BLAST 同源分析构建的进化树如图 2(b)所示,所以这五株菌株可判定为动物乳杆菌属(*Lactobacillus animalis*)。



注:M:1 kb ladder;1-5:LA-1~LA-5 菌株 PCR 扩增条带。

图 2 5 株菌株琼脂糖凝胶电泳及进化树图

Fig. 2 Results of agarose gel electrophoresis and evolutionary tree of 5 strains

2.3 生理生化鉴定

由表 1 可知 5 株菌株均能利用乳糖、水杨苷、麦芽糖和纤维二糖。除 LA-3 以外,其余 4 株菌不能利用菊糖和山梨醇,除 LA-2 以外,其余 4 株菌都能利用棉子糖和蔗糖,LA-2 和 LA-3 可以利用甘露醇。实验结果表明 5 株菌株对不同糖的发酵程度存在一定的差异。

表 1 菌株的生化鉴定结果

Tab. 1 Biochemical identification results of strains

项目	LA-1	LA-2	LA-3	LA-4	LA-5
七叶苷	—	+	+	—	—
乳糖	+	+	+	+	+
菊糖	—	—	+	—	—
棉子糖	+	—	+	+	+
蔗糖	+	—	+	+	+
山梨醇	—	—	+	—	—
水杨苷	+	+	+	+	+
甘露醇	—	+	+	—	—
麦芽糖	+	+	+	+	+
纤维二糖	+	+	+	+	+
1%马尿酸钠	—	—	—	—	—

注: + 表示阳性, — 表示阴性。

2.4 生长及产酸曲线

由图 3 的生长及产酸曲线分析可知,5 株菌株的生长分为延滞期、对数生长期和稳定期三个阶段。在开始培养的 2 h 内,5 株菌株均处于延滞期,此阶段培养基的 pH 值变化幅度较小。自 2 h 至 10 h,菌株进入对

数生长期,同时培养基的 pH 值从 6.11 下降至约 4.3。培养 10 h 后,菌株浓度变化不再显著,但仍呈现出上升趋势,直至约 18 h 时停止生长;其 pH 在 10 h 后继续下降,18 h 后 pH 基本稳定在 4.0 左右。

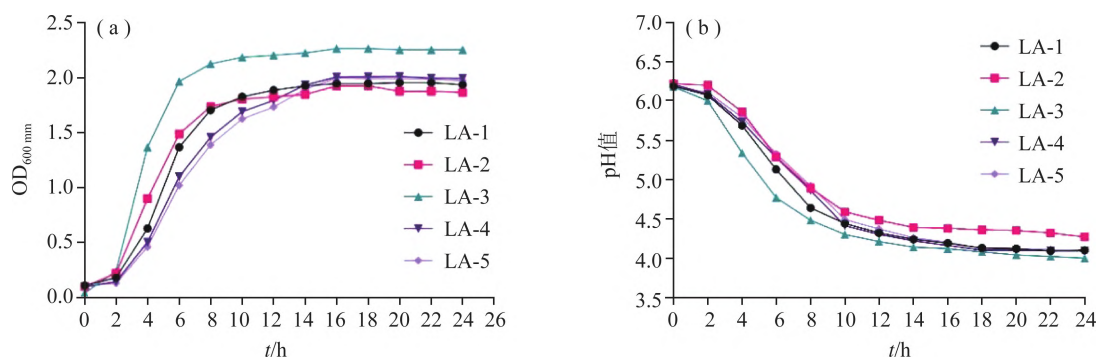


图3 5株菌株生长曲线及 pH 变化图

Fig. 3 Growth curves and pH changes of 5 strains

2.5 耐酸耐胆盐实验

2.5.1 耐酸实验。表2数据显示,pH 值降低会影响菌株的生存能力。5株菌株在 pH 值为 3.0 的条件下培育 3 h 后,生命活力都较强,特别是 LA-3、LA-4 和 LA-5 三株菌的存活率达到 100%,这说明它们在此条件下能够良好增殖。在 pH 2.5 环境中处理相同时间后,5株菌株的存活率均维持在 95%以上。然而,当 pH 降低至 2.0 时,所有菌株的生存能力都明显受到影响:LA-1、LA-3 和 LA-4 表现出较强的耐酸特性,存活率保持在 73%以上;相比之下,LA-2 和 LA-5 对酸性环境的适应能力相对较弱,但依然有超过 49% 的存活率。说明 5 株菌株都具有较强的耐酸能力,可以很好的在胃肠道中生存。

表2 各菌株在不同 pH 下的存活率/%

Tab. 2 Survival rate of each strain at different pH/%

菌株	ρ_1 (pH=2)	ρ_2 (pH=2.5)	ρ_3 (pH=3)
LA-1	79.92±4.69	97.89±1.18	95.76±3.03
LA-2	49.27±7.25	97.42±0.45	99.00±0.22
LA-3	73.68±2.40	98.50±0.16	100
LA-4	84.84±0.28	95.87±0.55	100
LA-5	54.73±3.66	97.52±0.33	100

2.5.2 耐胆盐实验。表3表明,5株动物乳杆菌存活率随胆盐含量增加而降低,在 0.1%胆盐酸盐条件下这五株菌株生长性能良好且 LA-2 和 LA-3 的存活率超过 100%;胆盐酸盐浓度到 0.2%时所有菌株存活率都在 61%以上并且 LA-2 存活率达到 94.27%;胆盐酸盐浓度升至 0.3%时对这五株菌株存活率有明显负面影响,但仍表现出较好的耐受性,其中菌株 LA-2 和 LA-3 存活率可达 76.47%和 81.85%。总体而言 5 株动物乳酸杆菌的成活率随着胆盐浓度的升高不断下降,其中,LA-2 和 LA-3 的耐胆盐能力最强。

表3 各菌株在不同胆盐浓度下的存活率/%

Tab. 3 Survival rate of each strain at different bile salt concentrations/%

菌株	ρ_4 (0.1%)	ρ_5 (0.2%)	ρ_6 (0.3%)
LA-1	79.06±0.00	72.79±1.39	72.74±1.46
LA-2	100	94.27±0.16	76.47±3.80
LA-3	100	81.32±3.50	81.85±1.46
LA-4	73.52±8.72	73.57±0.75	69.40±3.64
LA-5	68.53±0.52	61.75±3.21	52.04±6.04

2.6 自凝聚能力与疏水性实验

由图4可知,5株菌株自凝聚能力大小为:LA-2>LA-1>LA-5>LA-3>LA-4,其中菌株 LA-2 的自凝聚能力最强,处理 5 h 可达到 52.43%,相较于其余 4 菌株差异不显著($p>0.05$)。总体来看,各菌株的自凝

聚能力随着时间的延长不断提高。5 株菌株对三氯甲烷的疏水性均较高,疏水性均高于 94%,高于二甲苯和乙酸乙酯;LA-4 和 LA-5 对乙酸乙酯的疏水性能达到 59%以上,对二甲苯的疏水性高于 70%,高于其他 3 株菌株。

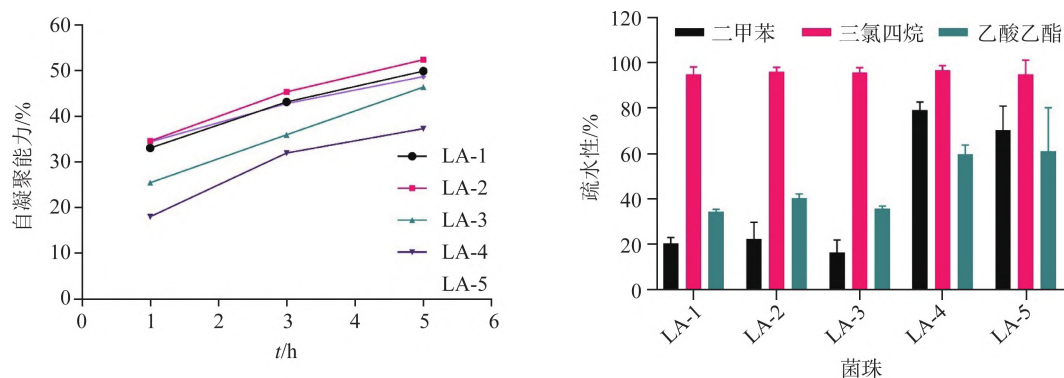
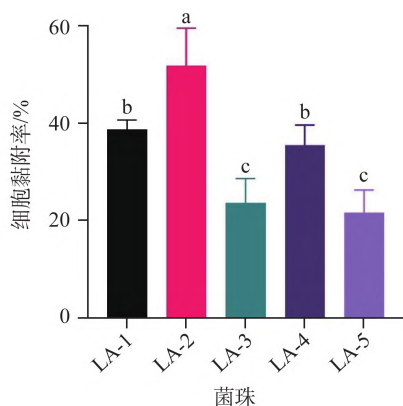


图 4 各菌株自凝聚力及疏水性结果图

Fig. 4 Self-cohesion and hydrophobicity of each strain

2.7 细胞黏附试验

用 Caco-2 细胞作为实验对象检测 5 株菌株的细胞黏附能力。从图 5 可看出,5 株菌株的黏附率在 21.65%~51.82%之间。其中菌株 LA-2 的黏附率可达(51.82±0.91)%,黏附能力高于其余 4 株菌株($p < 0.05$)。



注:不同菌株之间的不同字母表示差异显著($p < 0.05$)。

图 5 5 株菌株对 Caco-2 细胞的黏附率结果

Fig. 5 Adhesion rate of 5 strains to Caco-2 cells

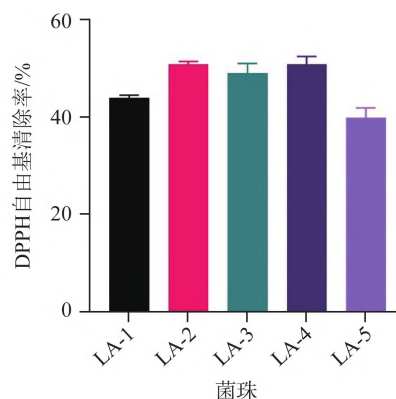


图 6 各菌株 DPPH 自由基清除率

Fig. 6 DPPH free radical scavenging rate of each strain

2.8 DPPH 自由基清除能力实验

从图 6 可看出,5 株动物乳杆菌 DPPH 自由基清除能力均在 40.3%~51.2%之间。其中菌株 LA-2 和 LA-4 的 DPPH 自由基清除率较高,超过 50%,经计算,各菌株之间自由基清除能力并无统计学差异($p > 0.05$)。

2.9 抑菌实验

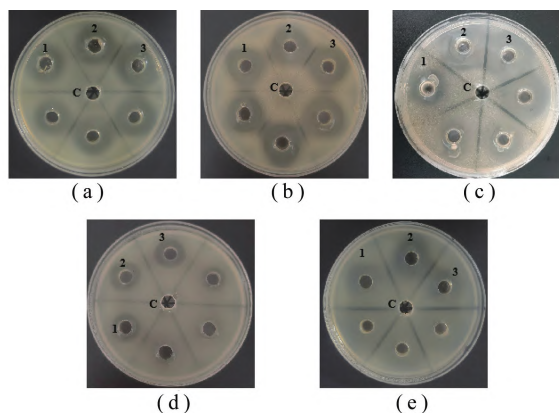
利用牛津杯法测定 5 株菌株发酵液的抗菌效能,表 4 和图 7 显示 5 个菌种的抗菌活性较为广泛但抗菌效力随菌种不同有独特差异。LA-1 广谱抑菌能力很出色,对所有受试病原菌的抑菌圈大小都超过 14 mm,其中对金黄色葡萄球菌的抑制尤其明显,抑菌圈直径达(17.67±3.33)mm。LA-2 对大肠杆菌抑制能力最强(13.13±0.37)mm、LA-3 对沙门氏菌抑制效果最佳(15.33±0.33)mm,此外,LA-4 和 LA-5 分别抑制大肠杆菌(15.5±1.00)mm 以及金黄色葡萄球菌(16±0.50)mm 的效能最佳。研究表明 5 株动物乳杆菌有抑制多种病原性微生物的潜力,但是它们各自的抗菌范围和抑制能力不一样且个体差异明显。

表4 5株菌株的抑菌圈结果

Tab. 4 Results of the inhibition zone of the five strains

菌株	耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	肺炎克雷伯菌	沙门氏菌
LA-1	14.17±0.33 ^a	16.50±1.50 ^a	17.67±3.33 ^a	15.17±2.33 ^a	14.33±0.33 ^a
LA-2	0.00±0.00 ^d	13.13±0.37 ^c	10.33±0.67 ^c	0.00±0.00 ^c	9.67±0.83 ^a
LA-3	12.87±0.77 ^b	14.83±0.83 ^b	14.00±0.50 ^b	14.83±0.83 ^a	15.33±0.33 ^a
LA-4	12.87±0.77 ^a	15.50±1.00 ^{ab}	14.33±0.67 ^{ab}	9.67±0.33 ^b	9.66±1.67 ^a
LA-5	14.67±0.33 ^c	15.07±1.07 ^c	16.00±0.50 ^b	12.00±0.00 ^b	14.33±0.67 ^a

注:同列比较,不同字母表示数据存在显著差异($p < 0.05$)。



注:(a)~(e)分别是MRSA,金黄色葡萄球菌,大肠杆菌,肺炎克雷伯菌和沙门氏菌,1-3表示LA-5上清液,C表示MRS空白培养基对照。

图7 LA-5对5种病原菌的抑菌效果

Fig. 7 Inhibitory activity of Strain LA-5 against pathogenic indicator bacteria

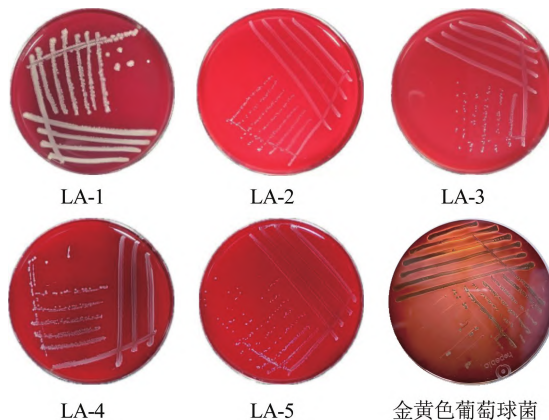


图8 各菌株溶血实验结果

Fig. 8 Hemolysis experimental results of each strain

2.10 溶血实验

图8显示,通过与阳性对照菌株比较可看出5株菌株并未出现透明或半透明形态的溶血圈,基于此可确定这5株菌株不具备溶血性能力,可以安全使用。

2.11 药敏实验

对5株菌株进行了7种常用抗生素(诺氟沙星、氯霉素、头孢唑啉、青霉素、环丙沙星、氨苄西林、庆大霉素)的敏感性测试,结果如表5所示,5株菌株对青霉素、氯霉素和氨苄西林三种抗生素高度敏感。LA-2、LA-4和LA-5对头孢唑啉敏感性极高,不表现抗性;LA-1~LA-4对环丙沙星中度敏感,LA-1对诺氟沙星中度敏感。此外,菌株对除以上所述的其余抗生素敏感性低,表现出较高抗性。

3 讨论

乳酸杆菌是人和动物胃肠道菌群中的核心成员,在促进宿主健康方面发挥着多重作用。研究表明,这类细菌不仅能刺激机体生长、强化免疫系统,还能分泌抗菌物质并增强肠道屏障功能^[12]。Strompfová等^[13]研究表明,在狗粮内掺入专为犬类发酵的乳杆菌CCM7421,能有效提升犬只肠道内乳杆菌的数量,进而减少腹泻事件。Biagi等^[14]工作显示,喂食犬源动物乳杆菌后,犬粪便中的产气荚膜梭菌明显减少,同时乳酸杆菌水平提升了10 000倍。基于这些发现,本研究从健康幼犬(1~56日龄)粪便中分离出5株动物乳杆菌,并通过体外实验评估其益生潜力,筛选出对幼犬有显著益生效益的菌株。

3.1 菌株对环境的耐受性

益生菌要发挥功效,首先必须耐受消化道严苛环境。胃酸抵抗能力是筛选益生菌的重要标准^[15]。犬胃液pH值范围较宽(2~7),其杀菌效果与pH密切相关^[16]。李艳欣^[17]报道的12株犬源乳杆菌(L1-L12)在

pH2.8 条件下 3 h 存活率保持在 60%。陈晓玉等^[18]分离的 5 株菌株中, B5 在 pH2 环境中存活率达 56%, 而 LA-1、LA-3 和 LA-4 表现更优, 存活率超过 70%。当环境 pH 升至 3 时, 所有菌株存活率均达 95% 以上, 证明其具备穿越胃部、定植肠道的潜力。耐受胆汁酸的能力也是评价益生菌在消化系统内能否有效发挥作用的关键指标, 胆汁里的盐分会破坏掉细菌细胞壁从而抑制其繁殖, 因此肠道中的乳杆菌必须具备一定的抵抗能力^[19]。研究结果表明, 5 株菌株在含 0.3% 胆盐的培养基处理 3 h, 存活率都超 50%, 这表明它们有适应肠道环境的潜力。总的来说, 筛选获得的 5 株动物乳杆菌酸性耐受能力和胆盐抗性都很不错, 可以作为益生菌候选菌株。

表 5 各菌株的抗生素敏感性
Tab. 5 Antibiotic susceptibility of each strain

抗生素 名称	抑菌圈直径/mm					敏感性				
	LA-1	LA-2	LA-3	LA-4	LA-5	LA-1	LA-2	LA-3	LA-4	LA-5
青霉素	33.20±1.36	36.90±0.44	17.87±0.95	36.05±0.21	28.60±0.57	S	S	S	S	S
氯霉素	26.50±1.13	26.55±0.42	20.15±1.08	22.18±0.78	29.20±0.10	S	S	S	S	S
氨苄西林	25.10±0.76	32.60±0.85	30.17±0.35	32.70±0.05	28.30±1.23	S	S	S	S	S
头孢唑林	0±0	30.13±1.12	13.05±0.06	36.08±0.18	25.05±0.56	R	S	R	S	S
环丙沙星	17.11±1.21	18.15±1.12	16.98±0.22	18.25±0.07	0±0	I	I	I	I	R
诺氟沙星	14.25±1.12	12.05±0.91	10.01±1.11	0±0	0±0	I	R	R	R	R
庆大霉素	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	R	R	R	R	R

注: S: 高度敏感; I: 中度敏感; R: 抗性。

3.2 菌株的益生特性

益生菌的肠道定植效果与其黏附上皮细胞的能力密切相关, 这是益生菌发挥益生功能的关键前提^[20]。研究表明, 菌株的自凝集特性和表面疏水性共同影响其黏附效率——较强的自凝集能力促进细菌聚集, 而疏水表面能减缓近壁运动速度, 从而增强黏附稳定性^[21]。根据现有分类标准, 细菌自凝集能力可分为三个等级: 16%~35% 为低级, 35%~50% 属中级, 超过 50% 则为高级^[22]。表面疏水性则按以下阈值划分: 疏水率大于 50% 为高疏水型, 疏水率 20%~50% 属中等疏水型, 疏水率小于 20% 视为非疏水型^[23]。张媛媛团队^[24]报道的犬源乳酸片球菌 GLP236 表现出优异的黏附特性, 其 8 小时自凝集率达 57.02%, 疏水率高达 62.56%。本试验中, LA-2 菌株展现出更快的自凝集特性, 5 小时内自凝集率即达到 52.43%, 属于高等自凝集菌株。值得注意的是, 所有测试菌株对三氯甲烷的疏水率均超过 94%, 均具备高度疏水特征。

在黏附能力评估方面, Caco-2 细胞模型被公认为理想的体外肠道屏障模拟系统^[25]。Liu 等^[26]从犬粪便分离的 11 株乳酸菌中, L177 对 Caco-2 细胞的黏附率最高(36.17%)。本试验数据显示, 5 株受试菌均能有效黏附肠上皮细胞, 其中 LA-2 表现尤为突出, 其黏附率达到 51.82%。这些证据充分说明, 本研究筛选的益生菌株具备显著的肠道定植优势。

活性氧(ROS)在生物体里长时期生成和清除不平衡就会引发氧化应激反应, 从而直接或者间接损害肠道健康^[27], 研究发现有益菌能提升身体的抗氧化能力。Bao 等^[28]研究人员指出, 在高脂饲料喂养的情况下, 植物乳杆菌 P-8 能让大鼠肝脏的抗氧化能力大幅增强。再者, DPPH 是一种特性稳定的活性基团, 益生菌对这种基团的去除效率可有效评估益生菌的抗氧化能力^[29], 一般认为, 若 DPPH 自由基清除效率超 30%, 则该物质抗氧化能力较强^[30]。段瑞峰^[31]从健康比格犬中分离到动物乳杆菌 B12 的 DPPH 自由基清除率的是 31%。本试验 5 株分离菌株的菌液 DPPH 自由基清除能力均大于 40%, 表明 5 株菌株均具备通过抑制氧化应激来有效保护肠道健康的潜力。

抑菌活性是益生菌抑制肠道中有害微生物的一个重要指标, 具有抗菌活性的乳酸菌可以预防胃肠道感染^[32]。魏雪等^[33]从犬粪便中分离到的 J40 乳酸菌对大肠杆菌和沙门氏菌的增殖有抑制作用, 可有效降低犬的腹泻率。特定的病原菌菌液被用于该实验来评估五类菌株样本抑制病原体生长的效果, 结果显示这五种益生菌在各自独特层面对病原体有抑制作用。

3.3 菌株的体外安全评价

益生菌的安全性是开发和应用过程中不可忽视的重要条件, 其中抗生素耐药性和溶血活性是评估菌株

安全性的核心参数^[20]。本研究测试的5株益生菌对青霉素、氯霉素和氨苄西林等抗生素表现出高度敏感性,然而对庆大霉素、诺氟沙星等药物则显示出耐药性,且不同菌株间存在明显差异。Danielsen等^[34]研究指出,多数乳杆菌对庆大霉素和诺氟沙星具有天然抗性;张丽芳等^[35]的试验也证实,14株乳杆菌对氨苄西林、青霉素及氯霉素均敏感,与本研究的结论一致。现已有文献提出,某些乳酸菌的抗生素抗性可能源于其携带的特定抗性基因,且这种抗性通常是内源性的,未必具有转移特性^[36]。后续实验过程中可以对菌株进行全基因组序列分析及体内实验进一步验证菌株的耐药性。此外,溶血活性测试显示,5株候选益生菌均未在血平板上形成溶血圈,表明其具备良好的生物安全性。在实际生产应用中,需对益生菌进行严格的安全性评估,并深入分析其基因型与益生功能之间的关联。

4 结论

本研究成功从1至56日龄的健康幼犬粪便中分离并鉴定出5株动物乳杆菌,分别命名为LA-1~LA-5。进一步研究结果表明,这5株菌株展现出良好的生长性能和产酸能力,对极端酸性环境及高胆盐条件表现出高度耐受性。同时,它们具备一定的清除DPPH自由基能力和较强的黏附力,以及良好的抑菌效果。此外,这5株菌株对常见抗生素表现出高度敏感性,且无溶血活性,因此具备作为候选犬源益生菌株的潜力。

参 考 文 献

- [1] GARRIGUES Q, APPER E, CHASTANT S, et al. Gut microbiota development in the growing dog: a dynamic process influenced by maternal, environmental and host factors[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2022, 9: 964649.
- [2] WIERTSEMA S P, VAN BERGENHENGOUWEN J, GARSSSEN J, et al. The interplay between the gut microbiome and the immune system in the context of infectious diseases throughout life and the role of nutrition in optimizing treatment strategies[J]. *Nutrients*, 2021, 13(3):886.
- [3] YOU I, KIM M J, YOU I, et al. Comparison of gut microbiota of 96 healthy dogs by individual traits: breed, age, and body condition score[J]. *Animals*, 2021, 11(8): 2432.
- [4] HASAN N, YANG H Y. Factors affecting the composition of the gut microbiota, and its modulation[J]. *PeerJ*, 2019, 7:e7502.
- [5] PILLA R, SUCHODOLSKI J S. The gut microbiome of dogs and cats, and the influence of diet[J]. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 2021, 51(3):605-621.
- [6] ZHUANG L, CHEN H H, ZHANG S, et al. Intestinal microbiota in early life and its implications on childhood health[J]. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 2019, 17(1):13-25.
- [7] 刘凯莉, 罗建威, 岳珂, 等. 益生菌在犬猫上的应用研究进展[J]. *畜牧与饲料科学*, 2022, 43(3):46-52.
- [8] 李光玉, 赵梦迪, 张媛媛. 犬、猫益生菌应用研究进展[J]. *饲料工业*, 2024, 45(13):1-7.
- [9] DEL CARRO A, CORRÒ M, BERTERO A, et al. The evolution of dam-litter microbial flora from birth to 60 days of age[J]. *BMC Veterinary Research*, 2022, 18(1):95.
- [10] BUDDINGTON R K. Postnatal changes in bacterial populations in the gastrointestinal tract of dogs[J]. *American Journal of Veterinary Research*, 2003, 64(5):646-651.
- [11] 陈晓玉. 宠物犬来源益生菌筛选、鉴定及特性研究[D]. 聊城: 聊城大学, 2024.
- [12] 田其真, 唐晨晨, 沈丹晴, 等. 唾液乳酸杆菌 TCSL1 对幼犬生长性能、血液学与血清生化指标及肠道健康的影响[J]. *中国畜牧兽医*, 2020, 47(11):3757-3766.
- [13] STROMPOVÁ V, KUBAŠOVÁ I, LAUKOVÁ A. Health benefits observed after probiotic *Lactobacillus fermentum* CCM 7421 application in dogs. [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(16):6309-6319.
- [14] BIAGI G, CIPOLLINI I, POMPEI A, et al. Effect of a *Lactobacillus animalis* strain on composition and metabolism of the intestinal microflora in adult dogs[J]. *Veterinary Microbiology*, 2007, 124(1/2):160-165.
- [15] 赵小茜, 魏旭丹, 陈戴玲, 等. 乳酸菌耐酸耐胆盐机制研究进展[J]. *乳业科学与技术*, 2017, 40(3):33-36.
- [16] WILLMANN S, THELEN K, BECKER C, et al. Mechanism-based prediction of particle size-dependent dissolution and absorption: ciltazol pharmacokinetics in dogs[J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2010, 76(1):83-94.
- [17] 李艳欣. 犬源乳酸菌的筛选及其对番泻叶介导的犬腹泻的防治试验[D]. 长春: 吉林大学, 2018.
- [18] 陈晓玉, 温敏, 张宇, 等. 犬源益生菌的筛选及特性研究[J]. *中国饲料*, 2024(9):72-78.
- [19] 刘宏宇, 汪立平, 艾连中, 等. 乳酸菌的抗氧化活性和耐酸耐胆盐性能的研究[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(2):92-96.
- [20] 王佳慧. 人源益生菌的分离鉴定及体内外抗氧化益生潜能研究[D]. 兰州: 兰州理工大学, 2021.

- [21] QI M, GONG X J, WU B, et al. Landing dynamics of swimming bacteria on a polymeric surface: effect of surface properties[J]. *Langmuir*, 2017, 33(14):3525-3533.
- [22] ANGMO K, KUMARI A, SAVITRI et al. Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2016, 66:428-435.
- [23] 温贺, 肖凤艳, 段翠翠, 等. 植物乳杆菌 Sc52 益生特性评价及其在降血糖产品中的应用[J]. *食品科学*, 2018, 39(6):148-154.
- [24] 张媛媛, 赵梦迪, 李悦垚, 等. 犬源乳酸片球菌 GLP236 的分离鉴定、体外益生功能及小鼠安全性评价[J]. *动物营养学报*, 2023, 35(12):8148-8160.
- [25] SCHRECK K, MELZIG M F, SCHRECK K, et al. Intestinal saturated long-chain fatty acid, glucose and fructose transporters and their inhibition by natural plant extracts in caco-2 cells[J]. *Molecules*, 2018, 23(10):2544.
- [26] LIU Y J, WANG J L, ZHENG H H, et al. Multi-functional properties of lactic acid bacteria strains derived from canine feces[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2024, 5(11):1404580.
- [27] KUMAR V, KHAN A A, TRIPATHI A, et al. Role of oxidative stress in various diseases; relevance of dietary antioxidants[J]. *Journal of Phytopharmacology*, 2015, 4(2):126-132.
- [28] BAO Y, WANG Z L, ZHANG Y, et al. Effect of *Lactobacillus plantarum* P-8 on lipid metabolism in hyperlipidemic rat model[J]. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2012, 114(11): 1230-1236.
- [29] 陈楠, 余泽旭, 季暄, 等. 犬源抗氧化益生菌的筛选及功效评定[J]. *动物营养学报*, 2024, 36(2):1303-1314.
- [30] JI K, CHO Y S, KIM Y T. Tyrosinase inhibitory and anti-oxidative effects of lactic acid bacteria isolated from dairy cow feces[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2018, 10(1):43-55.
- [31] 段瑞峰. 犬源降糖益生菌的筛选及其对 1 型糖尿病小鼠的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2023.
- [32] ZHAO M D, ZHANG Y Y, LI Y Y, et al. Complete genome sequence and probiotic properties of *Pediococcus acidilactici* CLP03 isolated from healthy *Felis catus*[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2025, 17(2):903-917.
- [33] 魏雪, 胡少震, 康文丽, 等. 具有缓解犬腹泻功能乳酸菌的分离鉴定及益生功能评价[J]. *饲料研究*, 2022, 45(12):52-57.
- [34] DANIELSEN M, WIND A. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 82(1):1-11.
- [35] 张丽芳, 田洪涛, 张玉兰, 等. 健康人体及保健品中乳酸菌和双歧杆菌的抗药性分析[J]. *中国食品学报*, 2009, 9(6):144-151.
- [36] 李姗姗. 潜在益生乳杆菌的抗生素敏感性研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2012.

(责任编辑:刘庆松)

(上接第 456 页)

- [31] TIMENETSKY J, SANTOS L M, BUZINHANI M, et al. Detection of multiple *Mycoplasma* infection in cell cultures by PCR[J]. *Revista Brasileira de Pesquisas Medicas e Biologicas*, 2006, 39(7): 907-914.
- [32] DABRAZHNETSKAYA A, VOLOKHOV D V, LIN T L, et al. Collaborative study report: evaluation of the ATCC experimental *Mycoplasma* reference strains panel prepared for comparison of NAT-based and conventional *Mycoplasma* detection methods[J]. *Biologicals*, 2013, 41(6), 377-383.
- [33] JEAN A, TARDY F, ALLATIF O, et al. Assessing *Mycoplasma* contamination of cell cultures by qPCR using a set of universal primer pairs targeting a 1.5 kb fragment of 16S rRNA genes[J]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0172358.
- [34] SALLING H K, BANG-CHRISTENSEN S R. Multi-primer qPCR assay capable of highly efficient and specific detection of the vast majority of all known *Mycoplasma*[J]. *Biologicals*, 2016, 44(3): 129-138.
- [35] DREOLINI L, CULLEN M, YUNG E, et al. A rapid and sensitive nucleic acid amplification technique for *Mycoplasma* screening of cell therapy products[J]. *Molecular Therapy Methods & Clinical Development*, 2020, 17: 393-399.
- [36] KLEINSTIVER B P, SOUSA A A, WALTON R T, et al. Engineered CRISPR-Cas12a variants with increased activities and improved targeting ranges for gene, epigenetic and base editing[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(3): 276-282.
- [37] MAUNSELL F P, DONOVAN G A. *Mycoplasma bovis* infections in young calves[J]. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 2009, 25(1): 139-177.
- [38] BAJERSKI F, BÜRGER A, GLASMACHER B, et al. Factors determining microbial colonization of liquid nitrogen storage tanks used for archiving biological samples[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(1): 131-144.

(责任编辑:刘庆松)