

网络出版时间:2016-08-09 09:40

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2016.09.006

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20160809.0940.012.html

禽用乳酸菌的筛选与功能鉴定

冯会贤¹,梅星星¹,蒋瑞瑞¹,郭克豹²,孙向丽¹,康相涛¹,王彦彬¹

(1 河南农业大学 牧医工程学院,河南省家禽种质资源创新工程研究中心,河南 郑州 450002;

2 河南省信阳市平桥区畜牧局,河南 信阳 464000)

【摘要】【目的】从健康鸡肠道中分离筛选优质乳酸菌,为制备禽用微生态制剂提供技术支持。【方法】选用30日龄健康青年鸡,取其盲肠内容物,通过选择性培养基筛选出具有产酸能力的乳酸菌,对其进行耐pH 3.0胃酸和3 g/L牛胆盐筛选试验及菌株生长曲线、产酸能力测定,并通过平板抑菌试验筛选出具有较强抑菌效果的菌株。最后对此菌株16S rRNA进行克隆测序,经Blast比对和系统进化树分析,对菌株进行鉴定。【结果】从所取鸡盲肠内容物中分离得到L1~L9 9株乳酸菌,其中L2、L4和L9株耐pH 3.0和3 g/L牛胆盐的综合能力较强。经过比较3株菌的生长曲线和产酸曲线,发现L2菌株耐酸耐牛胆盐、生长迅速、产酸能力强,且具有较强的抑制致病性大肠埃希菌的活性。经16S rRNA序列比对和系统进化树鉴定,确定L2为唾液乳酸杆菌。【结论】成功筛选出了1株可用以研制禽用微生态制剂的乳酸菌菌株。

【关键词】 乳酸菌;16S rRNA;大肠杆菌;鸡

【中图分类号】 S853

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2016)09-0035-07

Isolation and functional identification of lactic acid bacteria for poultry

FENG Huixian¹, MEI Xingxing¹, JIANG Ruirui¹, GUO Kebao²,
SUN Xiangli¹, KANG Xiangtao¹, WANG Yanbin¹

(1 Henan Innovative Engineering Researching Center of Poultry Germplasm Resources, College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China; 2 The Bureau of Animal Husbandry of Pingqiao District, Xinyang City, Henan Province, Xinyang, Henan 464000, China)

Abstract: 【Objective】A lactic acid bacteria was isolated from healthy chickens gut to provide technical support for preparing micro-ecological preparation used in poultry. 【Method】Samples were collected from cecum of 30 day old healthy chicken, and lactic acid producing bacteria were screened through selective medium. After being screened by resistance to pH 3.0 hydrochloric acid and 3 g/L bile salts, the growth and acidogenicity of screened strains were determined, and the strain with strong antibacterial ability was screened through plate bacteriostatic experiment. Finally, it was identified by 16S rRNA sequencing, blast alignment and phylogenetic analysis. 【Result】Nine lactic acid bacteria strains (L1—L9) were isolated from chicken cecum, and L2, L4 and L9 had strong resistance to 3 g/L bile salt and pH 3.0. After comparing the growth performance and acid production of the three bacteria, L2 strain was the best with fast growth, high acid producing ability, and strong activity in inhibiting pathogenic *Escherichia coli*. L2 was identified as *Lactobacillus saliva* by 16S rRNA and phylogenetic tree analysis. 【Conclusion】One *Lactobacillus*, which

〔收稿日期〕 2015-03-12

〔基金项目〕 河南省科技攻关项目(152102110058)

〔作者简介〕 冯会贤(1988—),女,河南林州人,在读硕士,主要从事动物微生物与分子免疫学研究。

E-mail: fhx19881011@126.com

〔通信作者〕 王彦彬(1969—),男,河南濮阳人,副教授,硕士生导师,主要从事动物微生物与分子免疫学研究。

E-mail: ybwang2008@126.com

could be used for preparing micro-ecological preparation for poultry, was screened successfully.

Key words: *Lactobacillus*; 16S rRNA; *E. coli*; poultry

鸡大肠埃希菌病是引起鸡生长缓慢和死亡的重要疾病之一,制约着养禽业的发展。生产中常采取抗生素治疗该病,但抗生素在抑制致病性微生物的同时,也破坏了肠道内正常微生物菌群的平衡,因而增加了其他消化道疾病的发生率,甚至出现了一旦不用抗生素,鸡群就发病的怪现象,导致抗生素滥用。另外,抗生素滥用会引起动物肠道病原微生物产生耐药性,并造成动物免疫力下降,导致畜禽产品中药物残留增加以及环境污染等系列问题,进而使畜禽产品在国际市场的竞争力下降,并对人类健康造成潜在威胁^[1]。因此,开发无毒无副作用以及无残留的抗生素替代品已成为当前的研究热点。

以益生菌组成的微生态制剂作为抗生素替代品的首选已被多数从业人员所认可。1998 年美国饲料管制协会(AAFCO)鉴定公布了 43 种可用作微生态制剂的菌种,其中半数以上是乳酸菌^[2]。乳酸菌作为益生菌的一种,可调节消化道微生态平衡、拮抗病原微生物^[3-4]、促进营养成分在动物体内的分解吸收^[5]、降低血清中的胆固醇含量^[6],而且还有抗肿瘤作用^[7-8]。乳酸菌是动物消化道内的主要共生菌之一,已作为饲料微生物添加剂广泛应用于动物养殖中^[9],其进入畜禽肠道后能够与病原菌相互竞争营养物质,阻止病原菌获得其生长增殖所需的营养元素,还能够产生如挥发性脂肪酸和乳酸等一系列有机酸,使肠道内的 pH 降低,从而抑制大肠埃希菌等致病菌的增殖^[10]。目前市场上以乳酸菌为主的微生态制剂大多数适用于哺乳动物,但由于家禽独特的消化系统特点,这些制剂在家禽上的应用具有一定的局限性,实际应用效果不理想。因此研制禽用微生态制剂具有重要意义。

本研究从家禽肠道微生物中分离出乳酸菌,并模拟家禽胃肠道环境对分离到的菌株进行耐酸和耐胆盐筛选,对筛选出的优势菌株进行生长性能、产酸能力以及抗菌活性测定,以期得到耐胃肠道环境且生长迅速、产酸能力强、抗菌效果好的禽用乳酸菌菌株,为开发应用于防治家禽细菌性消化道疾病的微生态制剂提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

MRS 肉汤、乳酸菌选择性分离培养基、pGEM-

T 载体、*pfu* 酶和 DH5 α 感受态细胞,均购自宝赛生物;大肠埃希菌菌株 ATCC25922 和肠炎沙门氏菌,由河南农业大学微生物教研室提供;碳酸钙、牛胆盐、盐酸、氢氧化钠等均为化学纯试剂。

精密酸度 PHS-3C 计,购自上海理达仪器厂;麦氏比浊仪 WI93008,购自东西仪(北京)科技有限公司;紫外可见分光光度计 UV9100B,购自北京莱伯泰科仪器有限公司;牛津杯,购自上海生工。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离纯化与形态鉴定 取 30 日龄健康青年鸡盲肠内容物 1.00 g,用 5 mL 无菌水稀释后,用纱布过滤以除去内容物中的固体残渣。取 0.5 mL 滤液依次用无菌水进行 10 倍倍比稀释至 10^{-7} ,取 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 3 个稀释度稀释液各 100 μ L,均匀涂布于准备好的乳酸菌选择性分离培养基平板上,37 $^{\circ}$ C 厌氧培养 24~48 h,分离出具有溶钙圈的单菌落,并进行反复划线纯化,直至得到纯菌落。

对分离到的乳酸菌进行菌落形态观察,并对分离的单菌落进行革兰氏染色,油镜下观察细菌的形态及染色情况,并根据《伯杰氏细菌学鉴定手册》进行鉴定。

1.2.2 分离菌株的耐酸耐牛胆盐初筛 配制牛胆盐质量浓度为 0.0(对照),3.0 g/L 和 pH 值为 6.3(对照),3.0 的 MRS 培养基。用麦氏比浊仪 WI93008 将初筛得到的乳酸菌菌液密度调整为 1.0×10^8 CFU/mL,分别取 200 μ L 相应的乳酸菌悬液于上述不同 pH 和牛胆盐质量浓度的 MRS 培养基中,每组 3 个重复,37 $^{\circ}$ C 厌氧培养 12 h 后用紫外可见分光光度计 UV9100B 于 600 nm 处检测菌液吸光值 OD_{600} 。

1.2.3 初筛菌株在酸和牛胆盐环境中的抗性^[11] 分别配制牛胆盐质量浓度为 0.0,1.0,2.0,3.0 g/L 和 pH 值为 3.0,4.0,5.0,6.3(对照),7.0 的 MRS 培养基。用麦氏比浊仪 WI93008 将初筛得到的乳酸菌菌液密度调整为 2.0×10^8 CFU/mL,分别取 300 μ L 相应的乳酸菌悬液于上述不同 pH 和牛胆盐质量浓度的 MRS 培养基中,每组 3 个重复,37 $^{\circ}$ C 厌氧培养 4 h 后用紫外可见分光光度计 UV9100B 于 600 nm 处检测菌液吸光值 OD_{600} 。

1.2.4 耐酸耐牛胆盐菌株生长曲线及产酸曲线

分别取耐 pH 3.0 酸和 3.0 g/L 胆盐的菌液 300 μ L (2.0×10^8 CFU/mL)于 100 mL MRS 培养基中,37 $^{\circ}$ C 厌氧静置培养,每隔 4 h 取 1 次样,连续取 72 h,用紫外可见分光光度计 UV9100B 测定各样品的 OD_{600} 值,绘制该菌株的生长曲线;用精密酸度计 PHS-3C 检测 48 h 内所取菌液的 pH 值,绘制其产酸曲线。

1.2.5 菌株体外抑菌活性的测定^[12-13] 将标准大肠埃希菌菌株 ATCC25922 和肠炎沙门氏菌分别接种于营养肉汤中,200 r/min 摇床过夜培养后,用麦氏比浊仪 WI93008 将菌液密度调至 1.0×10^8 CFU/mL,取 100 μ L 菌液均匀涂布于 LB 琼脂平板上,37 $^{\circ}$ C 干燥 30 min 后,在平板上均匀放置 3 个灭菌牛津杯,将培养 16 h 的乳酸菌液加入牛津杯至刚满,小心置于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱培养 12~16 h,测量抑菌圈的直径,用无菌 MRS 作对照。抑菌活性判定标准为:抑菌圈直径 ≤ 5 mm 为抑菌性弱,抑菌圈直径 $>5\sim\leq 10$ mm 为抑菌性较弱,抑菌圈直径 $>10\sim<15$ mm 为抑菌性较强,抑菌圈直径 ≥ 15 mm 为抑菌性强。

1.2.6 16S rRNA 序列鉴定及系统进化树构建 用 16S rRNA 通用引物 16S 27f(5'-AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3')和 16S 1525r(5'-AAG-GAGGTGATCCAGCCGCA-3')扩增乳酸菌 16S rRNA 片段,PCR 反应体系为 10 μ L:2 $\times$ *pfu* Mix 5 μ L,16S 27f(10 μ mol/L)0.2 μ L,16S 1525r(10 μ mol/L)0.2 μ L,菌液 1 μ L,无菌水 3.6 μ L。PCR 反应程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,56.2 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,

DNA Green 染色,检测产物大小。用 DNA 胶回收试剂盒对 PCR 产物进行纯化,用微量紫外分光光度计检测纯化产物浓度。将纯化产物与 pGEM-T 载体连接,随后转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,蓝白斑试验筛选后,挑取阳性克隆菌以通用引物 M13(M13f:5'-TGTAACGACGGCCAGT-3';M13r:5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3')进行 PCR 扩增,并选取阳性克隆送上海生工生物工程有限公司进行测序,将乳酸菌 16S rRNA 测序结果用 Blast 进行同源性比对,对得到的同源性较高的序列采用 MEGA 5.0 构建进化树。

1.3 数据处理

用 Excel 2013 处理乳酸菌耐酸耐胆盐特性和生长曲线及产酸曲线数据。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌的筛选

试验发现,37 $^{\circ}$ C 厌氧培养 16~24 h 后,乳酸菌选择性分离培养基上形成了边缘整齐、表面光滑、有溶钙圈、整齐度均一的乳白色圆形菌落(图 1-A),将分离菌株进行革兰氏染色,油镜下可见呈杆状的革兰氏阳性菌,单个或呈短链状排列(图 1-B)。试验共分离得到 9 株乳酸菌(L1~L9),图 2 为 9 株乳酸菌在 pH 3.0 和 3.0 g/L 牛胆盐模拟胃肠道环境中的生长状况。由图 2 可见,分离出的 9 株菌耐酸和耐牛胆盐的能力有所差异,耐 pH 3.0 较好的菌株为 L2、L4、L6、L7、L8、L9,耐 3.0 g/L 牛胆盐较好的菌株为 L1、L2、L3、L4、L5、L6、L9,综合认为 L2、L4、L9 3 株菌耐酸和耐牛胆盐的能力较好。图 3 为 L2、L4、L9 菌株对模拟胃肠道环境耐受力的表现。

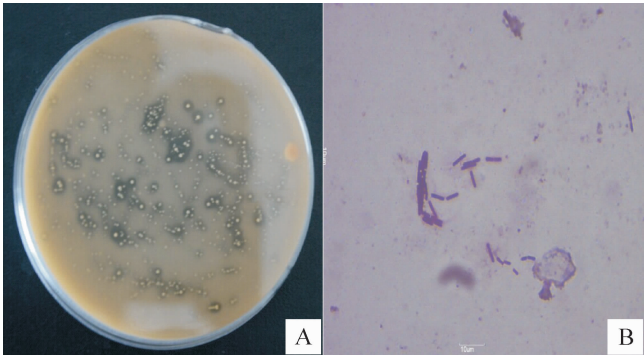


图 1 家禽消化道分离得到乳酸菌的菌落形态
A. 乳酸菌在 MRS 培养基上的菌落形态;B. 乳酸菌显微镜检验形态
Fig. 1 Colony morphology of *Lactobacillus* isolated from digestive tract of poultry
A. Morphology of *Lactobacillus* on MRS medium;B. Morphology of *Lactobacillus* under a microscope

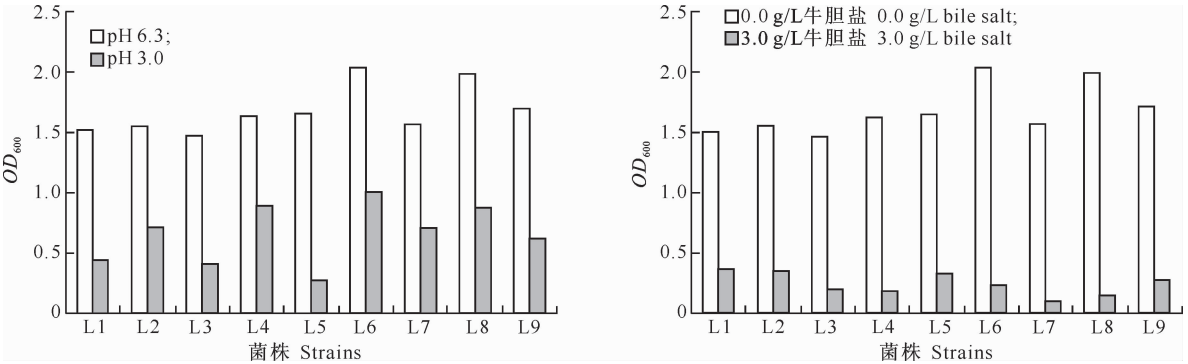


图 2 禽消化道分离得到的 9 株乳酸菌在模拟胃肠道环境中的生长情况

Fig. 2 Growth of 9 *Lactobacillus* strains selected from digestive tract of poultry in simulated environment

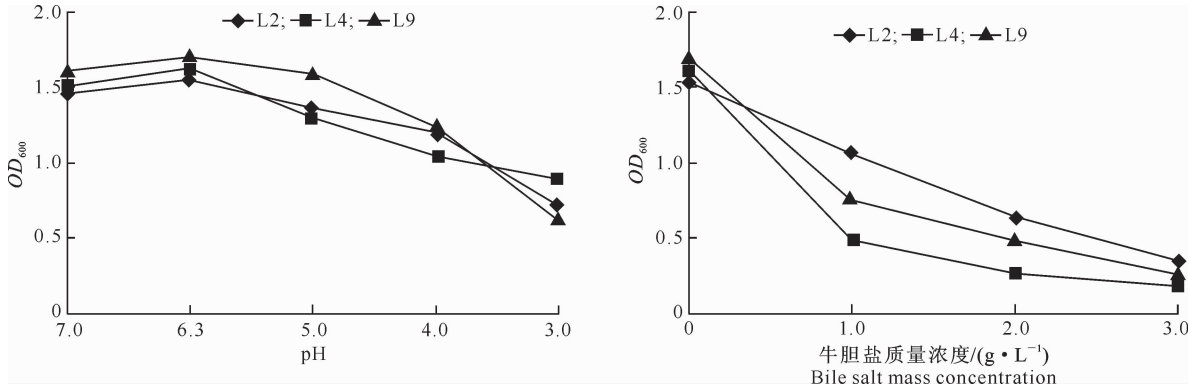


图 3 禽消化道分离乳酸菌耐梯度酸和牛胆盐特性

Fig. 3 Resistance of *Lactobacillus* strains selected from digestive tract of poultry against bile and acid

2.2 优势菌株 L2、L4 和 L9 的生长曲线

由图 4 可知,分离乳酸菌株 L2、L4、L9 的潜伏期均很短,很快就进入对数生长期。L2、L9 菌株前 16 h 生长迅速, OD_{600} 值直线上升;16~44 h,除 L9 在 40 h 出现一个峰值外,L2、L4 菌体密度基本趋于平衡, OD_{600} 值稳定在 2.5 左右;44~72 h 细菌生长

进入衰亡期,菌体迅速死亡。L4 菌株前 10 h 生长较快,10~48 h 期间 OD_{600} 值基本稳定在 2.2 左右,随后即进入菌体衰亡期;菌株 L9 较 L2 稍早进入稳定期,在 30~44 h 期间 L2 菌株有缓慢生长的趋势, OD_{600} 值基本维持在 2.5 左右。

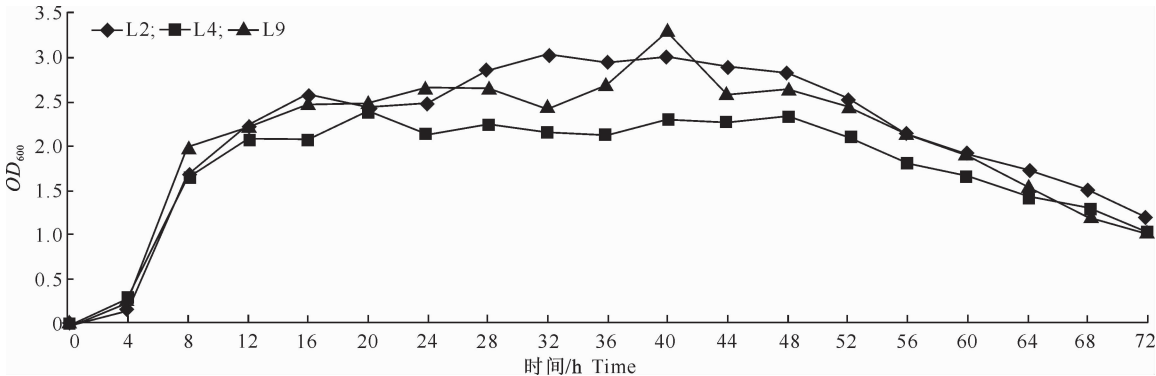


图 4 禽消化道筛选所得优势乳酸菌菌株 L2、L4、L9 72 h 生长曲线

Fig. 4 Growth of L2, L4, and L9 selected from digestive tract of poultry within 72 h

2.3 优势菌株 L2、L4 和 L9 的产酸曲线

MRS 液体培养基的初始 pH 为 6.37,加入细菌

密度为 2.0×10^8 CFU/mL 的 L2、L4、L9 菌液 300 μ L 后 pH 分别变为 6.01,6.21 和 6.17。由图 5 可

见,37 ℃ 厌氧培养条件下,3 株菌前 16 h 很快进入对数生长期,代谢速度加快,产酸量明显增加,pH 值迅速下降,其中 L2 菌株最为明显;16 h 后 L4、L9 菌株几乎不再产酸,pH 稳定在 4.5 左右,而 L2 菌

株继续产酸但产酸量明显减少,pH 值下降缓慢,36 h 以后,菌体几乎不再产酸,pH 趋于稳定,维持在 3.7 左右。

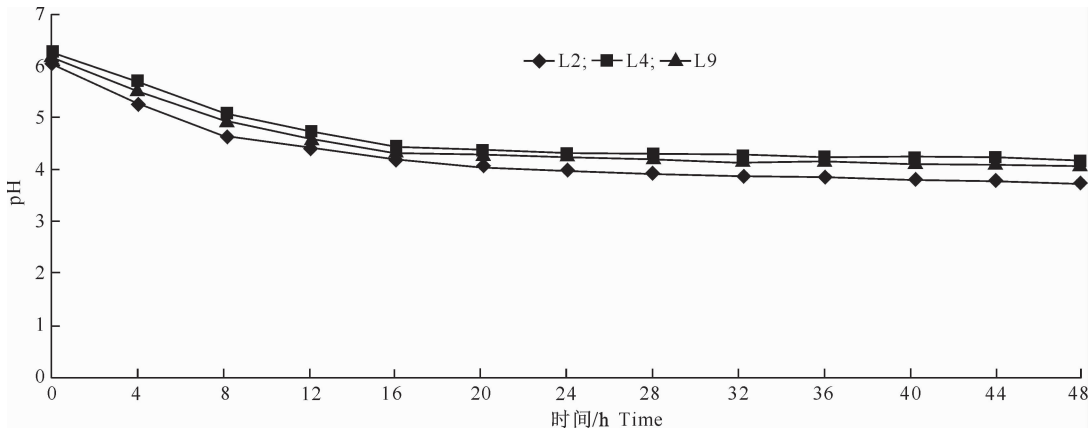


图 5 禽消化道筛选所得优势乳酸菌菌株 L2、L4、L9 48 h 产酸曲线

Fig. 5 Acid production of L2, L4, and L9 strains selected from digestive tract of poultry within 48 h

2.4 优势菌株 L2、L4 和 L9 的抑菌活性

经测定,菌株 L2、L4、L9 对大肠埃希菌 ATCC25922 的抑菌圈直径分别为 18,9,和 8 mm,对肠炎沙门氏菌的抑菌圈直径分别为 6,0 和 8 mm (图 6)。可知,L2 菌株对大肠埃希菌 ATCC25922 具有较强的抑制作用,而 L4、L10 菌株对大肠埃希

菌也有一定程度的抑制作用,但抑菌作用较弱;3 菌株对肠炎沙门氏菌的抑制效果均不如对大肠埃希菌 ATCC25922 的抑制效果,其中 L2、L10 对肠炎沙门氏菌的抑菌作用较弱,而 L4 对肠炎沙门氏菌几乎无抑菌作用。

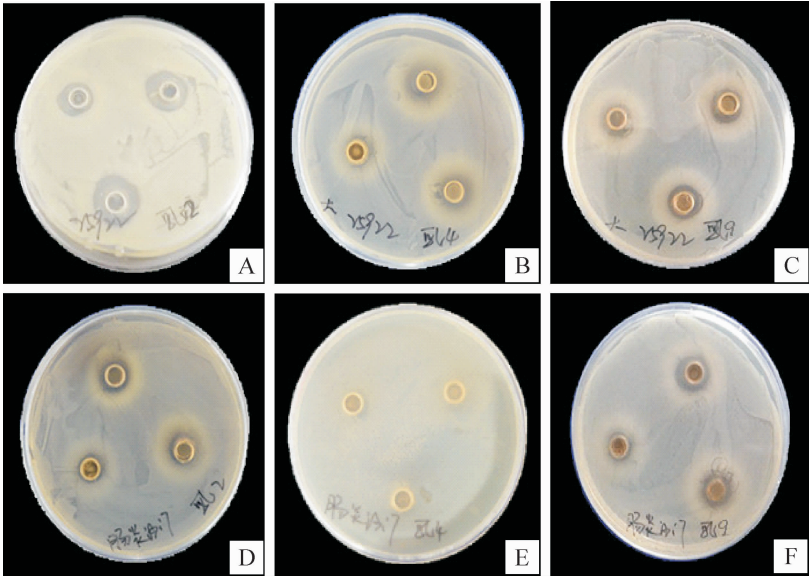


图 6 禽消化道分离所得优势菌株 L2、L4、L9 对大肠埃希菌和肠炎沙门氏菌的抑菌效果

A—C 分别为 L2、L4、L9 对大肠埃希菌的抑菌效果;D—F 分别为 L2、L4、L9 对肠炎沙门氏菌的抑菌效果

Fig. 6 Inhibitory effect of L2, L4 and L9 selected from digestive tract of poultry against *E. coli* and *Salmonella*

A—C show antimicrobial effects of L2, L4 and L9 against *E. coli* while D—F show that against *Salmonella*

2.5 L2 菌株的 16S rRNA 序列鉴定及进化分析

经 PCR 扩增得到 L2 菌株 16S rRNA 全长序列,约为 1 500 bp (图 7),经测序后,在 NCBI 的

GenBank 核酸序列数据库中进行 Blast 序列比对。结果显示,L2 菌株与唾液乳酸杆菌 (*Lactobacillus salivarius*) 的 16S rRNA 序列同源性达到 99%。结

合形态学特征,可判定为同种。由系统进化树(图 8)可知,来自人、鸡、猪胃肠道的唾液乳酸杆菌具有

很高的同源性。

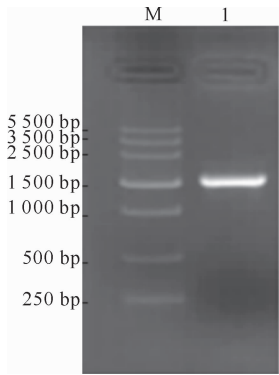


图 7 禽消化道分离所得优势乳酸菌株 L2 16S rRNA 序列 PCR 产物电泳结果
M. Marker;1. L2 菌株

Fig. 7 Electrophoresis of the 16S rRNA PCR product of the L2 strain selected from digestive tract of poultry
M. Marker;1. L2 strain

3 讨论与结论

目前,随着乳酸菌的广泛应用,对其研究也越来越深入,乳酸菌在增强机体免疫功能和预防消化道感染方面发挥着重要作用^[14-16]。乳酸菌能通过细菌本身或细胞壁成分提高黏膜表面和血清中的 IgA、IgM、IgG 水平,增强体液免疫,促进 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞的增殖,加强细胞免疫^[17];还能够竞争性排斥病原菌的黏附、产生多种抑菌物质,进而起到预防肠道感染的作用^[18]。

研究报道,乳酸菌在提高机体生长性能的同时^[19],对肠杆菌科细菌在肠道各部位的定殖水平有明显降低作用。有研究报道,乳酸菌代谢产生的乳酸和挥发性脂肪酸能够降低沙门氏菌在肠道的定殖水平^[20],进而影响到肠道微生物区系的平衡。乳酸菌素、乳酸、丙酸是乳酸菌在代谢过程中产生的抑菌物质,目前对乳酸菌拮抗致病菌机理研究较多的是乳酸菌素及乳酸菌产生的酸性物质。本研究中,与 L4、L9 菌株相比,L2 菌株对大肠杆菌 ATCC25922 具有较强的抑制作用,可能就与其较强的产酸能力有关。

人们对乳酸菌的研究主要侧重于开发新菌株上,而 Angelis 等^[21]则认为,若从菌种的安全性及对宿主肠道的黏附性方面考虑,乳酸菌菌种最好分离

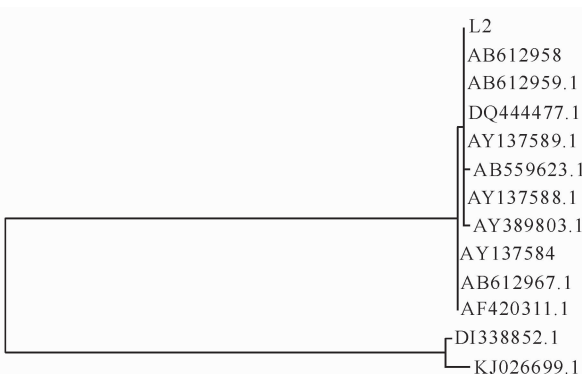


图 8 乳酸菌菌株 L2 与同源性较高细菌 16S rRNA 序列的系统进化树

AB612958、AB612959.1、AB612967.1 分离自鸡肠道,DQ444477.1 分离自人胃,AB559623.1 分离自猪盲肠;其他菌来源未知
Fig. 8 Phylogentic tree of 16S rRNA of L2 and other bacteria
AB612958、AB612959.1 and AB612967.1 are isolated from chicken intestinal tract,DQ444477.1 was isolated from human stomach,AB559623.1 was isolated from pig cecum;
The origin of others *Lactobacillus* was not reported

自宿主肠道内的优势菌群。而本研究中的菌株 L2 分离自健康鸡盲肠内容物,其在模拟胃肠道环境中能够耐受 pH 3.0 和 3 g/L 牛胆盐;其对数生长期较长,产酸能力较强;L2 16S rRNA 序列与唾液乳酸杆菌的同源性可达 99%,其对大肠杆菌具有较强的抑制作用,也可在一定程度上抑制肠炎沙门氏菌的生长。

【参考文献】

[1] Servin A L. Antagonistic activities of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* against microbial pathogens [J]. FEMS Microbiol Rev, 2004,28(4):405-440.
[2] Ewing W N. The living gut [M]. England: University of Nottingham, 1994:49.
[3] Sakamoto L, Igarashi M, Kimura K, et al. Suppressive effect of *Lactobacillus gasseri* OLL 2716(LG21) on *Helicobacter pylori* infection in humans [J]. J Antimicro, 2001,47(5):709-710.
[4] Kushal R, Anand S K, Chander H. Effect of the feeding micro-entrapped co-culture of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* on the immune response and protection of mice infected with *Salmonella typhimurium* [J]. Dairy Sci Tech, 2006,86:387-399.
[5] Fooks L J, Full R, Gibson G R. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology [J]. Int Dairy J, 1999,9:53-61.
[6] Pereira D I, Cibson G R. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and *Bifidobacteria* isolated from the human gut [J]. Appl Envir, 2002,68(9):4689-4693.

- [7] Park H D, Rhee C H. Antimutagenic activity of *Lactobacillus plantarum* KLAB21 isolated from kimchi Korean fermented vegetables [J]. Biotechnology Letters, 2001, 23 (19): 1583-1589.
- [8] Rafter J. Lactic acid bacteria and cancer: mechanistic perspective [J]. Br J Nutr, 2002, 88: 89-94.
- [9] 王 晶, 季海峰, 王四新, 等. 饲用乳酸菌制剂的研究现状及在养猪生产中的应用 [J]. 动物营养与饲料科学, 2010, 37(3): 38-41.
- Wang J, Ji H F, Wang S X, et al. Research status of feeding *Lactobacillus* and its application in swine production [J]. Animal Nutrition and Feed Science, 2010, 37(3): 38-41.
- [10] Isolauri E, Salminen S, Ouwehand A C. Microbial-gut interactions in health and disease [J]. Clinical Gastroenterology, 2004, 18(2): 299.
- [11] Hyronimus B, Le Marrec C, Hadj Sassi A, et al. Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria [J]. International Journal of Food Microbiology, 2000, 61(2): 193-197.
- [12] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物学实验教程 [M]. 北京: 北京大学出版社, 2000.
- Qian C R, Huang Y X. Laboratory experiments in microbiology [M]. Beijing: Peking University Press, 2000.
- [13] 马绪荣, 苏德模. 药品微生物学检验手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- Ma X R, Su D M. Microbiological examination of drug handbook [M]. Beijing: Science Press, 2001.
- [14] Geary T M, Brooks P H, Morgan D T, et al. Performance of weaner pigs fed ad libitum with liquid feed at different dry matter concentrations [J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 1996, 72(1): 17-24.
- [15] Vanwinsen R L, Purlings B A, Lipman L A, et al. Effect of fermented feed on the microbiol population of the gastrointestinal tracts of pigs [J]. Applied and Environment Microbiology, 2001, 67(7): 3071-3076.
- [16] Fimland G, Johnsen L, Dalhus B, et al. Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins [J]. Journal of Peptide Science, 2005, 11(11): 688-696.
- [17] 陈世琼, 李平兰. 特殊性能乳酸菌在治疗仔猪腹泻中的应用前景 [J]. 饲料研究, 2003(1): 20-22.
- Chen S Q, Li P L. Application prospect of special properties of lactic acid bacteria in the treatment of diarrhea in piglets [J]. Feed Research, 2003(1): 20-22.
- [18] 赵洪梅, 杨金生, 杨文涛, 等. 乳酸菌对肠粘膜免疫调节的影响 [J]. 吉林农业, 2011(5): 328-329.
- Zhao H M, Yang J S, Yang W T, et al. Effects of lactic acid bacteria on regulation of intestinal mucosal immunity [J]. Jilin Agriculture, 2011(5): 328-329.
- [19] Robinson P H, Erasmus L J. Effects of analyzable diet components on responses of lactating dairy cows to *Saccharomyces cerevisiae* based yeast products; a systematic review of the literature [J]. Anim Feed Sci Technol, 2009, 149: 185-198.
- [20] Magnusson J, Strum K, Roos S, et al. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria [J]. FEMS Microbiol Lett, 2003, 219: 129-135.
- [21] Angelis M D, Siragusa S, Berloco M, et al. Selection of potential probiotic *Lactobacilli* from pig feces to be used as additives in pelleted feeding [J]. Research in Microbiology, 2006, 157: 792-801.