

圈养大熊猫肠道乳酸菌分离及益生特性

李侗^{#1}, 胡昕^{#2}, 张潇月³, 杨晨曦³, 李静³, 曹雪笛³, 石雪雪³, 邹立扣³, 赵珂^{*3}

1 中国大熊猫保护研究中心 大熊猫国家公园珍稀动物保护生物学国家林业和草原局重点实验室, 四川 成都 611830

2 北京动物园管理处 圈养野生动物技术北京市重点实验室, 北京 100044

3 四川农业大学资源学院应用微生物学系, 四川 成都 611130

李侗, 胡昕, 张潇月, 杨晨曦, 李静, 曹雪笛, 石雪雪, 邹立扣, 赵珂. 圈养大熊猫肠道乳酸菌分离及益生特性[J]. 微生物学通报, 2023, 50(9): 4063-4077.

LI Ti, HU Xin, ZHANG Xiaoyue, YANG Chenxi, LI Jing, CAO Xuedi, SHI Xuexue, ZOU Likou, ZHAO Ke. Isolation and probiotic characteristics of lactic acid bacteria from intestinal tract of giant panda in captivity[J]. Microbiology China, 2023, 50(9): 4063-4077.

摘要: 【背景】大熊猫数量稀少、繁殖困难, 在其生长过程中极易感染消化系统疾病甚至死亡。

【目的】分析圈养大熊猫肠道可培养乳酸菌的群落结构与功能, 筛选具有益生特性的乳酸菌菌株, 为大熊猫消化系统疾病的预防和肠道微生物研究提供理论参考及菌种资源。【方法】采用 3 种培养基分离大熊猫粪便中的乳酸菌, 通过革兰氏染色镜检和过氧化氢试验对分离的菌株进行初步鉴定, 基于 BOXA1R-PCR 图谱遗传多样性选取代表菌株进行 16S rRNA 基因测序分析并进行主成分分析(principal component analysis, PCA), 同时分析乳酸菌菌株安全性和益生特性。【结果】通过初步鉴定共分离获得 58 株乳酸菌, 根据 BOXA1R-PCR 结果挑选 20 株菌进行测序, 结果显示 20 株菌分属于明串珠菌属(*Leuconostoc*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、魏斯氏菌属(*Weissella*)和链球菌属(*Streptococcus*)这 4 个属, 主成分分析结果表明不同年龄段的大熊猫肠道乳酸菌群落结构存在差异。20 株乳酸菌均不溶血, 17 株乳酸菌对 11 种抗生素均敏感; 11 株菌耐 pH 值 2.0 酸性条件, 14 株菌对 0.3%的胆盐具有良好的耐受性。5 株菌 SW-51、SW-48、MQ-41、SW-58 和 MX-23 对 3 种指示菌均具有抑菌效果, 50%以上的供试菌株具有自凝聚和共凝聚能力, 3 株菌的产酸和生长速率较一致, 其中乳酸明串珠菌(*Leuconostoc lactis*) MX-23 生长最快且产酸能力最强。【结论】大熊猫肠

资助项目: 北京动物园圈养野生动物技术北京市重点实验室开放课题(ZDK202213)

[#]对本文贡献相同

This work was supported by the Open Project Program of Beijing Key Laboratory of Captive Wildlife Technologies (Beijing Zoo) (ZDK202213).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: zhaoke@sicau.edu.cn

Received: 2023-02-14; Accepted: 2023-04-10; Published online: 2023-06-05

道内蕴藏着丰富的乳酸菌资源，其结构与组成受其年龄影响，具有较好的益生特性和应用前景。

关键词：圈养大熊猫；乳酸菌；分离；益生特性

Isolation and probiotic characteristics of lactic acid bacteria from intestinal tract of giant panda in captivity

LI Ti^{#1}, HU Xin^{#2}, ZHANG Xiaoyue³, YANG Chenxi³, LI Jing³, CAO Xuedi³, SHI Xuexue³, ZOU Likou³, ZHAO Ke^{*3}

1 Key Laboratory of State Forestry and Grassland Administration on Conservation Biology of Rare Animals in the Giant Panda National Park, China Conservation and Research Center for the Giant Panda, Chengdu 611830, Sichuan, China

2 Beijing Key Laboratory of Captive Wildlife Technologies, Beijing Zoo, Beijing 100044, China

3 Department of Microbiology, College of Resources, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, Sichuan, China

Abstract: [Background] The giant pandas are rare, difficult to be bred, and susceptible to digestive system diseases during the growth process. [Objective] To reveal the community structure features and the roles of lactic acid bacteria (LAB) in the intestinal tract of the giant panda and screen out the LAB strains with probiotic characteristics for the prevention of digestive system diseases and the research on intestinal flora in the giant panda. [Methods] Three culture media were employed to isolate the LAB from the intestines of giant pandas in captivity. The isolates were preliminarily identified by Gram staining microscopy and hydrogen peroxide test. The representative strains were selected for 16S rRNA gene sequencing and Principal component analysis (PCA) based on the genetic diversity of BOXA1R-PCR spectrum, and the safety and probiotics of LAB were further analyzed. [Results] A total of 58 LAB strains were isolated, from which 20 representative strains were selected for 16S rRNA gene sequencing according to BOXA1R-PCR results. The 20 strains belonged to *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, and *Enterococcus*, respectively. The principal component analysis showed that the community structure of LAB varied in the giant pandas at different ages. All the 20 strains showed negative results in hemolysis, and 17, 11, and 14 strains were susceptible to 11 antibiotics, tolerant to acidic conditions of pH 2.0, and tolerant to 0.3% bile salts, respectively. Strains SW-51, SW-48, MQ-41, SW-58, and MX-23 demonstrated strong inhibitory activities to 3 pathogenic bacterial species. Over 50% of the strains showed high auto-aggregation and co-aggregation capacities. Three strains showed consistent acid production and growth rate, among which *Leuconostoc lactis* MX-23 showed the best performance in growth and acid production. [Conclusion] The intestines of giant pandas harbor abundant LAB with valuable probiotic characteristics and application prospects, and the structure and composition of the LAB were influenced by age.

Keywords: giant panda in captivity; lactic acid bacteria; isolation; probiotic characteristic

乳酸菌是一类可发酵碳水化合物产乳酸的细菌统称, 肠道中的乳酸菌是重要的益生菌组成部分, 具有修复受损肠道屏障、调节宿主免疫功能、产生抑菌物质、抑制肠道病原菌的入侵和定殖的功能^[1]。此外, 肠道乳酸菌还可以促进蛋白质、单糖和钙等必需物质的吸收, 降低宿主体内胆固醇, 控制机体内毒素水平等^[2]。动物肠道是乳酸菌定殖并发挥作用的重要场所, 动物的生理参数会因内源性乳酸菌的存在而受到影响。与此同时, 动物体内内源性乳酸菌也会受到环境及宿主本身的种类、年龄和生活习性等因素的影响^[3], 肠道的乳酸菌在与宿主细胞相互作用和进行信息交换的过程中发挥着重要作用^[4]。

大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*)是食肉目(*Carnivora*)熊科(*Ursidae*)熊亚科(*Ailurinae*)的一种哺乳动物, 是我国所独有的国家一级保护动物, 主要栖息地为四川和陕西等地。由于其数量稀少、繁育比较困难, 对大熊猫的有效保护备受社会各界关注。野外和圈养大熊猫的统计数据分析显示: 在大熊猫群体中, 消化系统疾病时有发生且致死率高达 38%以上^[5]。大熊猫肠道内含有大量的微生物, 这些菌群与大熊猫的消化、生理健康有着密切的关系。乳酸菌作为一种肠道内重要的益生菌, 与大熊猫的肠道健康息息相关。但

目前对大熊猫肠道菌群的研究中, 乳酸菌研究较少, 因此, 本试验以大熊猫粪便为研究对象, 对大熊猫肠道乳酸菌进行分离鉴定并探究其益生特性, 以期为大熊猫肠道益生菌剂的开发提供菌种资源和科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品

从中国大熊猫保护研究中心都江堰基地采集 7 只大熊猫的新鲜粪便, 放入无菌塑料袋中, 冰盒保存带回实验室立即进行分离工作。7 只大熊猫均生活在相同的环境中, 饮食结构相同, 身体健康, 具体信息见表 1。

1.2 培养基、主要试剂和仪器

MRS 培养基和 LB 培养基, 广东环凯微生物科技有限公司; 胃蛋白酶、胰蛋白酶、血平板、酪朊水解物、L-胱氨酸、猪胆盐、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine, DPPH)、琼脂粉、PCR 引物、PCR Mix、琼脂糖和凝胶回收试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 抗生素药敏纸片, 杭州微生物试剂有限公司; Tris-饱和酚和乳酸标准品, 北京索莱宝科技有限公司; 葡萄糖、酵母膏、牛肉膏、蛋白胨、盐酸、氯化钠、丙三醇、无水乙醇和吐温-80 等, 成都市科龙化工试剂厂。

表 1 圈养大熊猫信息

Table 1 The information of giant pandas in captivity

Sample No.	Name	Year of birth	Age	Age distribution	Sex
YY	Yaoyuan	1993	28	Elder	Female
ZX	Zixia	1995	26	Elder	Female
TS	Taishan	2005	16	Adult	Male
MX	Meixin	2006	15	Adult	Female
MQ	Meiqian	2006	15	Adult	Female
SS	Susan	2011	10	Adult	Female
SW	Shunwu	2013	8	Adult	Male

酸度计, 上海雷磁仪器有限公司; PCR 仪、通用电泳仪和凝胶成像系统, Bio-Rad 公司; Multiskan FC 酶标仪, Thermo Fisher 仪器公司; 正置荧光显微镜, Carl Zeiss AG 公司; 立式全温振荡培养箱, 上海知楚仪器有限公司; 高速冷冻离心机, Eppendorf 公司; 高效液相色谱仪, Agilent 公司。

1.3 标准菌株

供试的标准菌株: 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) ATCC 27217、肠道致病性大肠杆菌 (enteropathogenic *Escherichia coli*, EPEC) ATCC 25922 和肠炎沙门氏菌 (*Salmonella enterica*) ATCC 13076 均购自中国工业微生物菌种保藏管理中心。

1.4 试验方法

1.4.1 乳酸菌的分离纯化

将 10 g 大熊猫粪便样品加入 90 mL 无菌生理盐水中, 然后进行梯度稀释至 10^{-6} , 采用混菌法将 10^{-6} 稀释液与 MRS 培养基混合, 待培养基冷却凝固后置于 30 °C 培养 3 d, 分离获得的菌株于 MRS 固体培养基上进行纯化和保种。对分离纯化的菌株进行触酶试验、革兰氏染色等理化性质及形态学鉴定^[6]。

1.4.2 BOXA1R-PCR 遗传多样性分析

参照夏雪娟等^[7]的方法提取乳酸菌菌株基因组 DNA, 采用 10 μ L 的反应体系进行 PCR 扩增, 引物为 BOXA1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3')。PCR 反应体系: PCR Mix 5 μ L, 模板 DNA 1 μ L, 引物(10 μ mol/L) 0.2 μ L, ddH₂O 补足 10 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 95 °C 30 s, 40 °C 1 min, 72 °C 2 min, 35 个循环; 72 °C 5 min。反应产物于 80 V 电压下经 2.0% 的琼脂糖凝胶电泳 2 h, 用凝胶成像系统进行电泳检测。

1.4.3 16S rRNA 基因扩增与序列分析

使用通用引物 27f (5'-AGAGTTTGTATCCTG

GCTCAG-3') 和 1495r (5'-CTACGGCTACCTTGTTACGA-3') 对代表菌株进行扩增。PCR 反应体系(30 μ L): PCR Mix 15 μ L, 引物(10 μ mol/L) 各 0.5 μ L, 模板 DNA 1 μ L, 无菌 ddH₂O 补足 30 μ L。PCR 反应条件参照夏雪娟等^[7]的方法, PCR 产物送生工生物工程(上海)股份有限公司完成测序。测序结果在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对。

1.4.4 乳酸菌安全性评价

1) 抗生素敏感性试验

将乳酸菌菌悬液均匀涂布于 MRS 培养基, 根据美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)标准 2012 推荐方法将抗生素药敏片置于培养基上^[8], 37 °C 培养 24 h 后记录各药敏纸片的抑菌圈直径, 并与 CLSI 标准(2012)进行比较, 评估菌株对抗生素的敏感性。

2) 溶血试验

采用细菌多点接种仪将制备好的供试菌接种到含 5% 脱纤维羊血的血琼脂基础培养基中, 每组 3 个重复, 37 °C 培养 48 h, 观察有无溶血圈出现。

1.4.5 乳酸菌益生特性筛选

1) 乳酸菌菌悬液制备

将已纯化的乳酸菌菌株接种于 MRS 液体培养基中, 37 °C 静置培养 24 h, 活化 3 代后于 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min, 使用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS, pH 7.4)洗 3 次, 再加入 PBS 调菌体浓度至 1.0×10^8 CFU/mL。

2) 耐受能力检测^[9]

耐酸能力: 以 5% 的接种量取乳酸菌悬液接种至 pH 值为 2.0、3.0 的 MRS 培养基中, 37 °C 培养 0 h 和 24 h 后涂布于 MRS 平板上, 37 °C 培养 24 h 进行活菌计数, 并按下列公式计算存活率: 存活率(%) = $A_{24}/A_0 \times 100$
式中: A_0 和 A_{24} 分别表示 0 h 和培养 24 h 后的活

菌数量(CFU/mL)。

耐胆盐能力: 以 5% 的接种量取乳酸菌悬液接种至含有质量浓度为 3 g/L 的牛胆盐 MRS 培养基中, 37 °C 培养 0 h 和 4 h 后进行活菌计数, 并按下列公式计算存活率:

$$\text{存活率}(\%) = A_4/A_0 \times 100$$

式中: A_0 和 A_4 分别表示培养 0 h 和 4 h 后的活菌数量(CFU/mL)。

3) 抑菌能力测定

取 2.5 mL 菌液接种于 50 mL MRS 培养基中, 37 °C 培养 24 h 后于 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min 取上清液, 参考 Zhang 等^[10]的方法测定菌株对金黄色葡萄球菌(*S. aureus*) ATCC 27217、肠道致病性大肠杆菌(EPEC) ATCC 25922、肠炎沙门氏菌(*S. enterica*) ATCC 13076 的抑菌能力, 筛选出具有抑菌活性的乳酸菌。

4) 自凝聚和共凝聚能力检测

分别制备供试菌株和 1.1.3 中的病原指标菌株的菌悬液($OD_{600}=0.6$), 参考 Wang 等^[11]的方法检测乳酸菌的自聚集和共聚集能力。

5) 产酸能力及产乳酸量测定

将 500 μ L 活化菌液接种于装有 10 mL MRS 培养基的试管中, 37 °C 培养 32 h, 在培养期间

每隔 2 h 测定培养液的 OD_{600} 和 pH, 绘制菌株的生长曲线和产酸曲线, 并将培养 32 h 后的培养液上清液用 0.22 μ m 有机滤膜过滤, 采用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)测定过滤液乳酸含量。液相色谱条件: 色谱柱为 C18 柱, 流动相为乙腈和超纯水, 等梯度洗脱, 洗脱液为乙腈:超纯水(体积比为 5:95), 流速 0.3 mL/min, 柱温 25 °C, 检测波长 210 nm, 进样体积 10 μ L。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离纯化及形态学鉴定

本研究共分离获得 73 株乳酸菌, 其中 YY 样品分离获得 8 株乳酸菌, ZX 获得 17 株, MX 获得 5 株, TS 获得 9 株, MQ 获得 15 株, SS 获得 5 株, SW 获得 14 株。73 株乳酸菌生长于纯化 MRS 培养基上的菌落特征均表现为表面湿润, 乳白色, 约米粒大小, 而且有酸味, 具有明显的乳酸菌菌落特征(图 1A)。将纯化的菌株进行革兰氏染色观察(图 1B), 其中有 58 株菌革兰氏染色为阳性且呈触酶阴性(图 1C)。综合菌株显微形态、革兰氏染色及触酶试验结果, 将 58 株菌初步鉴定为乳酸菌。

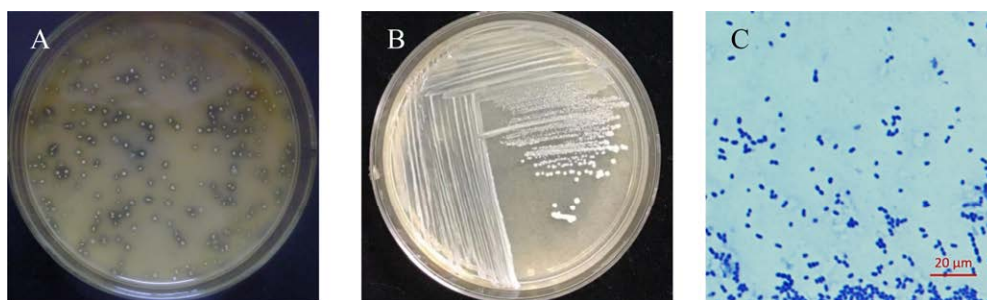


图 1 大熊猫肠道乳酸菌的分离及显微形态 A: 样品 SW 乳酸菌分离. B: 乳酸菌 SW-58. C: 菌株 SW-58 光学显微形态

Figure 1 Isolation of intestinal lactic acid bacteria (LAB) of giant pandas and microscopic morphology of strains. A: Isolation LAB from sample SW. B: LAB SW-58. C: Microscopic morphology of LAB SW-58.

2.2 大熊猫肠道乳酸菌 BOXA1R-PCR 和 16S rRNA 基因测序分析

为探究大熊猫肠道乳酸菌的遗传多样性,对分离纯化菌株进行 BOXA1R-PCR 扩增,遗传图谱类型见表 2,58 株菌被分成 6 种不同的遗传图谱类型。基于 BOXA1R 遗传图谱,选择 7 只大熊猫在 6 种不同遗传类型的 20 株代表菌株进行 16S rRNA 基因测序分析,测序结果在 GenBank 中用 BLAST 进行同源比对。结果显示 20 株菌分属于明串珠菌属(*Leuconostoc*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、魏斯氏菌属(*Weissella*)和链球菌属(*Streptococcus*)这 4 个属,其中明串珠菌属(*Leuconostoc*)与肠球菌属(*Enterococcus*)为大熊猫肠道乳酸菌的优势菌属,分别占代表菌株的 30%和 35%。结果

表明大熊猫肠道具有较为丰富的乳酸菌群落结构。

2.3 大熊猫肠道乳酸菌多样性分析结果

从乳酸菌菌株的分离来源结果可以看出,明串珠菌属(*Leuconostoc*)在除 YY 以外的其他 6 只大熊猫肠道内均有分布且占比较大;肠球菌属(*Enterococcus*)除 MQ 外的大熊猫肠道中均有检出,并且除 SS 样品外其他大熊猫肠道均检出希氏肠球菌(*E. hirae*),而粪肠球菌(*E. faecalis*)仅在 SS 及 SW 样品中检出;魏斯氏菌属(*Weissella*)在 YY、ZX、TS、MQ 和 SW 样品中均有检出,其中,食窦魏斯氏菌(*W. cibaria*)在 YY 和 ZX 样品检出,融合魏斯氏菌(*W. confusa*)仅在 TS 和 SW 样品检出,在 MQ 样品中两种魏斯氏菌均有检出,SW 样品中所含乳酸菌种类最

表 2 圈养大熊猫肠道乳酸菌代表菌株的鉴定

Table 2 Identification results of intestinal LAB of giant pandas in captivity

Genus	rDNA type (strain number)	Representative strain	16S rRNA gene BLAST analysis	
			Nearest type strain (accession No.)	Similarity (%)
<i>Enterococcus</i>	1 (17)	YY-1	<i>E. hirae</i> (CP003504)	99.5
		ZX-10	<i>E. hirae</i> (CP003504)	99.5
		MX-21	<i>E. hirae</i> (CP003504)	99.5
		TS-25	<i>E. hirae</i> (CP003504)	99.5
		SW-51	<i>E. hirae</i> (CP003504)	99.5
	3 (2)	SS-44	<i>E. faecalis</i> (ASDA01000001)	99.3
		SW-48	<i>E. faecalis</i> (ASDA01000001)	99.3
<i>Streptococcus</i>	2 (2)	YY-5	<i>S. lutetiensis</i> (DQ232532)	99.2
<i>Weissella</i>	4 (4)	ZX-20	<i>W. cibaria</i> (AEKT01000037)	99.5
		YY-6	<i>W. cibaria</i> (AEKT01000037)	99.5
		MQ-41	<i>W. cibaria</i> (AEKT01000037)	99.5
	5 (5)	TS-30	<i>W. confusa</i> (AB023241)	99.3
		MQ-43	<i>W. confusa</i> (AB023241)	99.3
		SW-58	<i>W. confusa</i> (AB023241)	99.3
<i>Leuconostoc</i>	6 (28)	MQ-39	<i>L. lactis</i> (AB023968)	99.0
		ZX-18	<i>L. lactis</i> (AB023968)	100.0
		MX-23	<i>L. lactis</i> (AB023968)	99.7
		TS-27	<i>L. lactis</i> (AB023968)	100.0
		SS-46	<i>L. lactis</i> (AB023968)	99.7
		SW-56	<i>L. lactis</i> (AB023968)	99.0

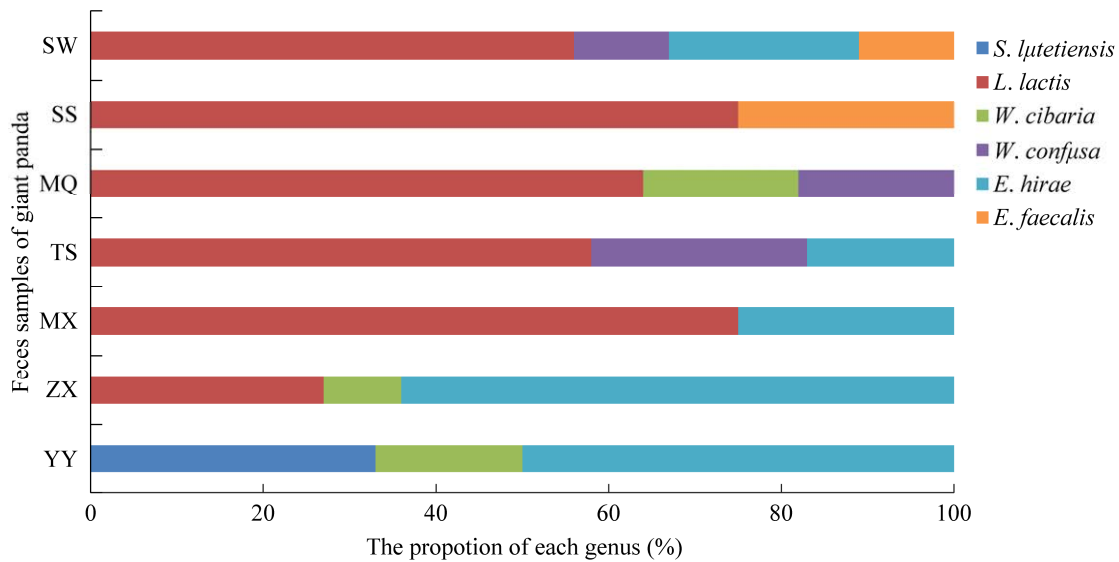


图2 大熊猫肠道乳酸菌种群分布情况 YY: 遥远; ZX: 紫霞; MX: 美欣; TS: 泰山; MQ: 美茜; SS: 苏珊; SW: 瞬武

Figure 2 The distribution of intestinal LAB of giant pandas. YY: Yaoyuan; ZX: Zixia; MX: Meixin; TS: Taishan; MQ: Meiqian; SS: Susan; SW: Shunwu.

为丰富;此外,链球菌属(*Streptococcus*)仅在YY样品中检出。其中老年大熊猫ZX和YY与亚成年、成年大熊猫肠道乳酸菌相比,肠球菌属(*Enterococcus*)占比较大,而明串珠菌属(*Leuconostoc*)占比较小,可能由于年龄差异导致其肠道乳酸菌种群结构发生变化(图2)。

进一步采用CANOCO软件对大熊猫的肠道乳酸菌种类进行主成分分析(principal component analysis, PCA),提取2个主成分因子作载荷图,成分1和成分2分别解释了75.69%和16.04%的变量(图3)。由PCA分析图可知,各年龄段样品明显分散在不同区域,成年样品聚合程度较高,但不同成年大熊猫肠道乳酸菌种群结构相似性也存在差异,如MX和MQ年龄相当性别相同但二者距离却较远;老年样品比较分散且与成年样品距离较远,说明大熊猫肠道乳酸菌群落结构随着年龄增长发生了明显的改变,导致老年大熊猫所含肠道乳酸菌差异较大。

PCA分析结果表明,年龄因素对大熊猫肠道乳酸菌种群结构影响较大。

2.4 乳酸菌安全性评价结果

2.4.1 溶血试验

根据菌株在血平板上是否形成透明溶血圈来判断其溶血特性,其中产生草绿色溶血环的为

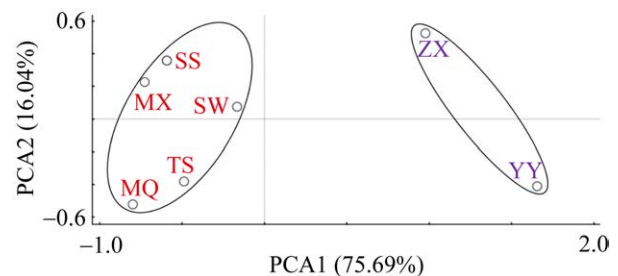


图3 大熊猫肠道乳酸菌群落结构主成分(PCA)分析 YY: 遥远; ZX: 紫霞; MX: 美欣; TS: 泰山; MQ: 美茜; SS: 苏珊; SW: 瞬武

Figure 3 Principal components analysis for intestinal LAB of giant pandas. YY: Yaoyuan; ZX: Zixia; MX: Meixin; TS: Taishan; MQ: Meiqian; SS: Susan; SW: Shunwu.

α -溶血(部分溶血)、产生完全透明溶血环的为 β -溶血(完全溶血),菌落周围无溶血环的为 γ -溶血(不溶血)^[12],供试的20株乳酸菌在血平板上均不产生溶血环,判定为不溶血。

2.4.2 抗生素敏感性试验

根据美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)标准2012对敏感或耐药的判断标准,菌株YY-1对万古霉素、环丙沙星、四环素、利福平和红霉素中度敏感并对复方新诺明、链霉素和青霉素耐药,菌株YY-6对链霉素、青霉素和红霉素中度敏感,菌株ZX-18对复方新诺明、利福平和青霉素耐

药,其余17株乳酸菌对11种抗生素均敏感,可进一步用于益生功能筛选(表3)。

2.5 乳酸菌益生特性

2.5.1 乳酸菌的耐受性

17株乳酸菌的耐酸试验结果表明,各菌株的耐酸和耐胆盐能力存在明显的差异(表4)。供试菌株中6株菌不能在pH值2.0的酸性条件下生长,3株菌不能在pH值3.0的酸性条件下生长,其余菌株均有较好的耐酸能力,其中菌株SW-51、SW-48、MQ-41、MQ-39和MX-23在pH值3.0的酸性条件下存活率均高于100%,说明菌株具有较好的耐酸性;在0.3%胆盐条件下

表3 乳酸菌菌株的抗生素敏感性

Table 3 Antibiotic susceptibility of LAB

Strain No.	GM	CFZ	VA	CIP	SXT	TE	SM	RD	C	P	E
	10 μ g	30 μ g	30 μ g	5 μ g	25 μ g	30 μ g	10 μ g	5 μ g	30 μ g	10 μ g	15 μ g
YY-1	S	S	I	I	R	I	R	I	S	R	I
ZX-10	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
MX-21	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TS-25	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SW-51	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SS-44	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SW-48	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
YY-5	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ZX-20	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
YY-6	S	S	S	S	S	S	I	S	S	I	I
MQ-41	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TS-30	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
MQ-43	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SW-58	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
MQ-39	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ZX-18	S	S	S	S	R	S	S	R	S	R	S
MX-23	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TS-27	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SS-46	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SW-56	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

GM: 庆大霉素; CFZ: 头孢唑林; VA: 万古霉素; GIP: 环丙沙星; SXT: 复方新诺明; TE: 四环素; SM: 链霉素; RD: 利福平; C: 氯霉素; P: 青霉素; E: 红霉素. S: 敏感; I: 中度敏感; R: 耐药

GM: Gentamicin; CFZ: Cefzoloin; VA: Vancomycin; GIP: Ciprofloxacin; SXT: Cotrimoxazole; TE: Tetracycline; SM: Streptomycin; RD: Rifampicin; C: Chloramphenicol; P: Penicillin; E: Erythromycin. S: Sensitivity; I: Morderate sensitivity; R: Resistance.

处理 4 h 后仍有 14 株菌能够生长, 而且部分菌株的存活率>200%, 表明这些菌株在 0.3%胆盐条件生长良好, 具有很好的耐胆盐特性; 菌株 MX-23 的耐酸能力和耐胆盐能力均显著高于其他供试菌株。

2.5.2 乳酸菌的抑菌能力

14 株乳酸菌对 3 种指示菌的抑菌结果表明: 有 2 株菌 ZX-10 和 MQ-43 对 3 株指示菌均无抑菌效果, 11 株菌对金黄色葡萄球菌有抑菌效果, 9 株菌对肠道致病性大肠杆菌有抑菌效果, 8 株对肠炎沙门氏菌有抑菌效果, 5 株菌 SW-51、SW-48、MQ-41、SW-58 和 MX-23 对 3 种指示菌均具有抑菌效果, 其中 SW-48、MQ-41 和 MX-23 对 3 种指示菌的抑菌直径均>10 mm, 抑菌能力明显高于其他供试菌株, 表现出较强的抑菌能力(表 5)。

2.5.3 乳酸菌的自凝聚和共凝聚能力

14 株乳酸菌有 10 株菌具有自聚集能力, 范

围在 13%–45%之间, 其中菌株 SW-48、MQ-41、MX-23 具有较高的自凝聚率, 分别为 45.22%、33.82%和 36.85%; 乳酸菌对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和沙门氏菌的共凝聚结果表明, 除 ZX-20、MQ-43 和 SW-56 这 3 株菌未检测到共凝聚能力, 其余 11 株菌对 3 株指示菌均表现出不同程度的共凝聚作用, 其范围分别为 2%–16%、9%–28%和 2%–15%, 菌株 SW-48、MQ-41、MQ-39 和 MX-23 与大肠杆菌的共凝聚相对较高, 分别为 26.73%、28.36%、24.44%和 24.74%, 其中菌株 SW-48 具有较好的自聚集和共聚集能力(表 6)。

2.6 乳酸菌的生长曲线和产酸曲线

选取在安全性和益生功能特性都表现出较好应用前景的 3 株菌 SW-48、MX-23 和 MQ-41 进一步研究其生长及产酸特性(图 4)。结果表明, 各株菌的生长曲线和产酸水平存在相关性, 均在培养 4 h 后进入对数生长期, 随着生长速率

表 4 乳酸菌菌株的耐受特性

Table 4 Tolerance characteristics of LAB

Strain No.	pH 2.0 acid resistance			pH 3.0 acid resistance			0.3% bile salt resistance		
	0 h	24 h	Survival rate (%)	0 h	24 h	Survival rate (%)	0 h	4 h	Survival rate (%)
ZX-10	2.32×10 ⁸	–	–	8.76×10 ⁸	3.16×10 ⁸	36.07±1.65j	1.77×10 ¹⁰	1.34×10 ¹⁰	75.71±2.57k
MX-21	1.35×10 ⁸	4.06×10 ⁷	29.85±0.65h	1.44×10 ⁹	8.31×10 ⁸	57.71±1.24h	3.82×10 ¹⁰	5.67×10 ¹⁰	148.43±0.95g
TS-25	7.98×10 ⁷	–	–	3.62×10 ⁹	–	–	2.68×10 ¹⁰	–	–
SW-51	1.12×10 ⁸	9.84×10 ⁷	81.64±5.73d	5.69×10 ⁹	5.75×10 ⁹	101.05±2.94d	4.13×10 ¹⁰	8.59×10 ¹⁰	207.99±3.87d
SS-44	6.32×10 ⁷	–	–	3.31×10 ⁸	–	–	7.72×10 ¹⁰	–	–
SW-48	8.75×10 ⁷	9.13×10 ⁷	111.35±7.42b	6.67×10 ⁸	8.82×10 ⁸	132.23±4.30b	9.36×10 ⁹	2.55×10 ¹⁰	272.44±5.21b
YY-5	7.74×10 ⁶	–	–	4.59×10 ⁷	8.63×10 ⁶	18.80±0.99k	9.47×10 ⁹	5.97×10 ⁹	63.04±1.17i
ZX-20	2.33×10 ⁷	8.38×10 ⁶	39.73±3.36g	9.45×10 ⁷	4.84×10 ⁷	51.22±1.62h	6.11×10 ⁸	4.56×10 ⁸	74.63±1.78k
MQ-41	4.38×10 ⁸	3.98×10 ⁸	95.44±4.73c	6.68×10 ⁹	7.97×10 ⁹	119.31±4.15c	7.51×10 ¹⁰	1.47×10 ¹¹	195.73±5.44e
TS-30	6.89×10 ⁸	4.51×10 ⁸	62.79±2.57e	1.30×10 ⁹	9.66×10 ⁸	74.31±1.85f	3.32×10 ¹⁰	3.62×10 ¹⁰	109.04±2.57i
MQ-43	7.34×10 ⁷	3.54×10 ⁷	49.38±1.07f	4.34×10 ⁸	3.18×10 ⁸	73.27±2.57f	2.17×10 ⁹	2.54×10 ¹⁰	117.05±6.70h
SW-58	1.05×10 ⁶	7.47×10 ⁵	68.02±2.30e	6.19×10 ⁸	5.83×10 ⁸	94.18±2.95e	4.38×10 ¹⁰	7.16×10 ¹⁰	163.47±3.43f
MQ-39	5.56×10 ⁸	6.16×10 ⁸	111.05±5.41b	3.93×10 ⁹	5.12×10 ⁹	130.28±3.18b	3.48×10 ¹⁰	9.01×10 ¹⁰	258.91±5.70c
MX-23	1.69×10 ⁸	2.13×10 ⁸	131.49±4.93a	5.78×10 ⁹	9.21×10 ⁹	159.34±2.52a	7.84×10 ¹⁰	2.44×10 ¹¹	311.22±4.42a
TS-27	2.08×10 ⁸	8.63×10 ⁷	43.39±1.84g	9.29×10 ⁸	5.66×10 ⁸	60.93±2.21g	2.08×10 ⁹	1.91×10 ⁹	91.83±0.94j
SS-46	4.91×10 ⁶	–	–	4.47×10 ⁷	–	–	3.02×10 ⁸	–	–
SW-56	4.63×10 ⁸	–	–	5.47×10 ⁷	1.34×10 ⁷	23.93±0.49j	5.56×10 ⁹	6.03×10 ⁹	108.45±3.91i

–: 不耐受。表中数字为平均值±标准误, 数字后不同小写字母表示同一指标在不同处理间差异显著($P<0.05$)

–: Intolerance. The numbers in the table represent mean±standard error, and different lowercase letters after the numbers indicate significant differences in the same indicator between different treatments ($P<0.05$).

表5 乳酸菌菌株的抑菌活性

Table 5 Antibacterial activity of LAB

Strain No.	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27217	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Salmonella enterica</i> ATCC 13076
ZX-10	—	—	—
MX-21	5.10±0.19f	—	7.54±0.06d
SW-51	8.57±0.32e	8.52±0.19e	11.44±0.13b
SW-48	10.99±0.42b	11.51±0.23c	12.31±0.10a
YY-5	—	8.09±0.07f	9.39±0.07c
ZX-20	10.53±0.66bc	—	—
MQ-41	10.71±0.42bc	15.79±0.14a	12.23±0.10a
TS-30	10.37±0.16c	10.18±0.08d	—
MQ-43	—	—	—
SW-58	9.43±0.19d	7.47±0.25g	11.52±0.32b
MQ-39	10.58±0.21bc	7.18±0.03h	—
MX-23	10.31±0.18c	15.12±0.11b	12.42±0.40a
TS-27	9.14±0.10d	—	6.63±0.17e
SW-56	11.54±0.05a	8.18±0.03f	—

—: 无抑菌效果. 表中数字为抑菌圈直径平均值±标准误(mm), 数字后不同小写字母表示同一指标在不同处理间差异显著($P<0.05$)

—: Non-antibacterial activity. The numbers in the table represent inhibitory zone diameter mean±standard error (mm), and different lowercase letters after the numbers indicate significant differences in the same indicator between different treatments ($P<0.05$).

表6 乳酸菌菌株的自凝聚和共凝聚能力

Table 6 Auto-aggregation and co-aggregation ability of LAB

Strain No.	Auto-aggregation (%)	Co-aggregation (%)		
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27217	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Salmonella enterica</i> ATCC 13076
ZX-10	—	7.29±0.04f	13.58±0.46g	11.38±0.14g
MX-21	31.15±0.47d	2.27±0.09j	11.30±0.21h	13.46±0.22c
SW-51	28.15±0.18e	3.48±0.04i	19.55±0.15e	10.50±0.14i
SW-48	45.22±0.51a	12.58±0.51b	26.73±0.18b	15.35±0.12a
YY-5	13.52±0.43i	5.98±0.13g	20.83±0.31d	12.20±0.07f
ZX-20	17.49±0.59g	—	—	—
MQ-41	33.82±0.33c	16.07±0.39a	28.36±0.26a	14.63±0.08b
TS-30	15.97±0.16d	10.73±0.29c	18.23±0.10f	2.65±0.14k
MQ-43	—	—	—	—
SW-58	—	7.69±0.17e	19.32±0.11e	11.14±0.08h
MQ-39	24.62±0.32f	2.16±0.16j	24.44±0.23c	8.69±0.13j
MX-23	36.85±0.35b	9.60±0.13d	24.74±0.18c	13.17±0.06d
TS-27	13.31±0.22i	5.32±0.07h	9.38±0.15i	12.69±0.05e
SW-56	—	—	—	—

—: 无效果. 表中数字为平均值±标准误, 数字后不同小写字母表示同一指标在不同处理间差异显著($P<0.05$)

—: No activity. The numbers in the table represent mean±standard error, and different lowercase letters after the numbers indicate significant differences in the same indicator between different treatments ($P<0.05$).

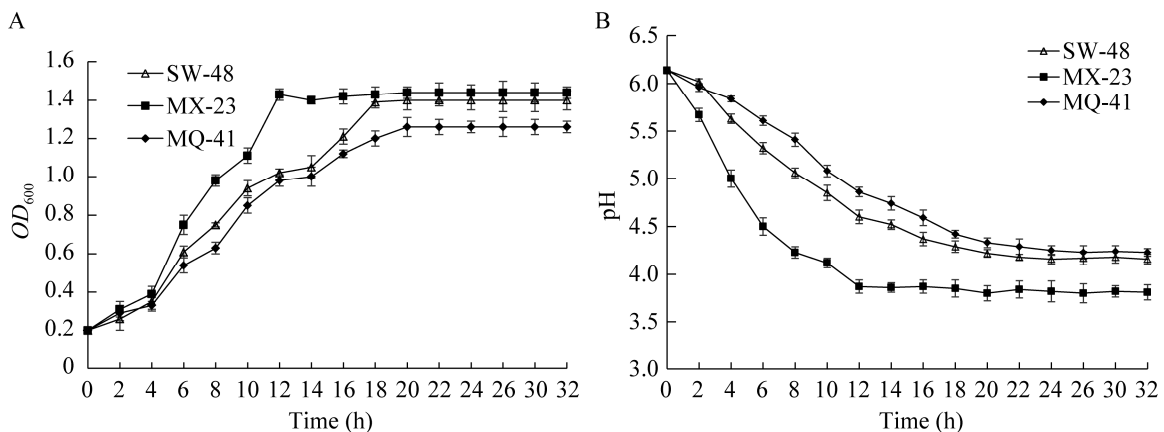


图 4 三株乳酸菌生长及产酸曲线 A: 乳酸菌生长曲线. B: 乳酸菌产酸曲线

Figure 4 The growth and acid production curves of three LAB. A: The growth curve of LAB. B: The acid production curve of LAB.

的增加, 培养液 pH 随之降低; 当菌株达到稳定生长期时, 3 株菌的 pH 变化不明显, 产酸速率与生长曲线表现出一致性, 但 3 株菌的生长速率和产酸能力存在较明显的差异, 菌株 MX-23 在培养 12 h 后达到稳定生长期, 发酵液最终 pH 值为 3.81, 而菌株 SW-48 和 MQ-41 分别在培养 18 h 和 20 h 后达到稳定生长期(图 4A), 发酵液最终 pH 值分别为 4.16 和 4.23 (图 4B)。HPLC 检测结果表明, 3 株菌 SW-48、MX-23 和 MQ-41 都产生乳酸, 根据建立的乳酸标准曲线 $y=41.478x-4.9764$ ($R^2=0.9996$) 计算出各菌株发酵液中乳酸的含量分别是 3.93、4.65 和 3.88 g/L, 表明菌株 MX-23 的产乳酸能力与性能比其他两株菌强。

3 讨论与结论

目前对于肠道微生物的工作多以粪便为对象进行, 这是因为粪便样品的采集是一种非侵入性的方便方法, 而且基本上包括了肠道中所有的微生物类群^[13-14], 所以本研究以大熊猫粪便为研究对象对其肠道内可培养乳酸菌进行研究。现有的大熊猫肠道菌群研究表明, 通过可培养、16S

rRNA-RFLP 等方法发现大熊猫肠道内含有丰富的乳酸菌资源, 乳杆菌属(*Lactobacillus*)、魏斯氏菌属(*Weissella*)、链球菌属(*Streptococcus*)和肠球菌属(*Enterococcus*)较常检出^[15-17], 但上述结果均是在对大熊猫肠道菌群结构的研究中分离得出, 而专门针对大熊猫肠道乳酸菌的研究还较少。本研究采用可培养方法对不同年龄大熊猫粪便样品中所含乳酸菌进行分离, BOXA1R-PCR 多样性分析及测序结果表明 7 个熊猫粪便样品共分离出 4 个属的乳酸菌, 分别为明串珠菌属(*Leuconostoc*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、链球菌属(*Streptococcus*)和魏斯氏菌属(*Weissella*), 其中乳明串珠菌(*L. lactis*)首次在大熊猫肠道样品中检出, 在多个样品中均有分布且占比较大。通过主成分分析发现, 老年大熊猫与亚成年、成年大熊猫相比, 肠道乳酸菌种群结构差异较大, 表现为老年大熊猫肠道乳酸菌多样性较低, 随着年龄的增长, 其肠道内肠球菌属(*Enterococcus*)占比增大, 而明串珠菌属(*Leuconostoc*)占比减小。这种由年龄差异引起肠道微生物菌群结构差异较大的现象较为普遍, 如简平等^[18]对不同年龄段川金丝猴肠道菌群结构差异进行分析, 发现老年

川金丝猴肠道菌群结构明显与幼年和成年 2 个年龄段川金丝猴存在差别；郭壮^[19]对不同人群肠道微生物群落结构的研究发现，年龄对健康居民肠道菌群群落结构具有显著影响作用，婴儿肠道菌群丰度和多样性显著低于中青年人；Claesson 等^[20]通过对比 65 岁以上老人和年轻人的肠道菌群也发现，肠道菌群的结构随着年龄老化发生了显著变化，研究结果表明年龄是影响肠道微生物结构和组成的一个非常重要的因素^[21]。本研究结果与已有研究成果相似，同样呈现出年龄因素对样品种群结构影响较大的现象，表现为老年大熊猫与亚成年、成年大熊猫肠道乳酸菌菌群结构差异较大。

肠道疾病被认为是造成大熊猫死亡的重要原因，尤其针对圈养大熊猫，肠道疾病的发病率明显高于其他疾病，乳酸菌作为最常见的一类益生菌，具有改善肠道内微生物菌群失调、促进营养吸收保持肠道健康等作用，对维护大熊猫肠道健康具有重要意义。乳酸具有广泛应用的悠久历史且被认为是安全的^[22]，但已有的研究表明乳酸菌不仅是耐药基因的载体，而且能向食源性或肠道致病菌传播耐药基因^[23-24]，还可能具有潜在的溶血活性^[25]，对菌株进行安全性评价是应用的必要前提。本研究中所有菌株均无溶血活性，除菌株 YY-1 对氨基糖苷类、青霉素类和磺胺类抗生素耐药，供试的大部分乳酸菌对多种抗生素具有敏感性，与已有研究报道^[26]一致，初步证明这些乳酸菌是安全的，可用于后续益生功能筛选。乳酸菌要发挥益生作用，通过胃酸环境是必要前提，一般胃液的 pH 值为 2.0–3.0，食物在胃中停留 2 h 左右后，具有耐酸能力的乳酸菌才能到达肠道，而进入小肠后还会面临高胆盐 (0.03%–0.3%) 的环境，因此乳酸菌要在体内发挥益生作用，不仅要耐酸，还需具备耐受胆盐的能力^[27]。本研究通过安全性筛选的乳酸菌株，

有 64.71% 和 82.35% 的菌分别能在 pH 值 2.0 和 pH 值 3.0 的条件下生长，23.53% 的菌能在 0.3% 胆盐条件下生长良好，表明大熊猫肠道乳酸菌具有良好的耐受特性。

自聚集能力有利于益生菌在小肠内定殖，保证达到高密度的益生菌浓度，同时也有利于细胞与小肠上皮细胞互作，而共聚集能力使乳酸菌对致病菌形成屏障，防止致病菌在小肠内定殖，有利于致病菌被清除^[28]。研究结果表明 70% 以上的供试菌株具有自凝聚和共凝聚能力，其中粪肠球菌 (*E. faecalis*) SW-48、食窦魏斯氏菌 (*W. confusa*) MQ-41 和乳酸明串珠菌 (*L. lactis*) MX-23 均表现出较高的自凝聚和共凝聚性，其自凝聚范围为 33%–45%，并与肠道致病性大肠杆菌的共凝聚范围为 24%–28%，说明这 3 株菌在肠道内具有较好的定殖能力。乳酸菌代谢过程产生有机酸、细菌素、过氧化氢等抑菌活性物质，均能单独或共同抑制致病菌生长^[29]，在肠道乳酸菌对致病细菌的拮抗研究中，万荣峰等^[30]研究表明在鸡肠道中分离出的乳酸菌对大肠杆菌有明显的拮抗效果，周罗雄^[31]研究表明乳酸菌对于沙门氏菌有一定的抑菌活性，崔美岩等^[32]对青海湖裸鲤肠道乳酸菌进行分离，并对其抑菌活性进行了探究，结果表明其分离乳酸菌对多种病原菌都具有抑制作用。本研究结果表明有 5 株乳酸菌 SW-51、SW-48、MQ-41、SW-58 和 MX-23 对 3 种指示菌均具有抑菌效果，其中 SW-48、MQ-41 和 MX-23 产生的抑菌圈为 10–15 mm，表现出较强的抑菌能力，对这 3 株菌产酸特性的分析结果表明，各株生长、产酸速率以及产乳酸量均存在差异，菌株 MX-23 具有生长速率快、产酸能力强和产乳酸量高的特征，表现出较好的应用潜力。

本研究针对大熊猫粪便中乳酸菌群及益生特性进行了探究，在大熊猫肠道中检出丰富的乳

酸菌资源,其中部分菌株对肠道致病菌具有一定抑菌效果。研究结果表明年龄因素对样品种群结构及其抑菌活性影响都较大。为预防老年大熊猫感染消化系统疾病,可在今后的工作中对肠道乳酸菌进行更深入的研究,更好地为大熊猫肠道保护提供理论依据和参考。

REFERENCES

- [1] 郭本恒. 益生菌[M]. 北京: 化学工业出版社, 2015: 37-157.
GUO BH. Probiotics[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2015: 37-157 (in Chinese).
- [2] 华鹤良. 乳酸菌的分离鉴定及其抗菌肽与发酵性能研究[D]. 扬州: 扬州大学博士学位论文, 2013.
HUA HL. Isolation, identification, antibacterial peptide activities and fermentation performance of lactic acid bacteria[D]. Yangzhou: Doctoral Dissertation of Yangzhou University, 2013 (in Chinese).
- [3] 杨洁彬. 乳酸菌: 生物学基础及应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1996.
YANG JB. Lactic Acid Bacteria: Biological Basis and Application[M]. Beijing: China Light Industry Press, 1996 (in Chinese).
- [4] 侯成立. 罗伊氏乳杆菌全基因组序列分析及其调节仔猪肠黏膜免疫功能的研究[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2015.
HOU CL. Whole genome sequence analysis of *Lactobacillus reuteri* and its regulation in intestinal mucosal immune of piglets[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of China Agricultural University, 2015 (in Chinese).
- [5] 崔明全, 何廷美, 钟志军, 王承东, 张婷婷, 周潇潇, 周紫峒, 李德生, 张和民, 李才武, 何永果, 彭广能. 大熊猫粪便菌群 ERIC-PCR 指纹图谱的分析及优势菌群的鉴定[J]. 畜牧与兽医, 2013, 45(9): 6-11.
CUI MQ, HE TM, ZHONG ZJ, WANG CD, ZHANG TT, ZHOU XX, ZHOU ZY, LI DS, ZHANG HM, LI CW, HE YG, PENG GN. Analysis of characteristics of faecal flora pandas by ERIC-PCR fingerprinting and identification of the dominant flora[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2013, 45(9): 6-11 (in Chinese).
- [6] 凌代文, 东秀珠. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 85-124.
LIN DW, DONG XZ. Classification and Identification of Lactic Acid Bacteria and Experimental Methods[M]. Beijing: China Light Industry Press, 1999: 85-124 (in Chinese).
- [7] 夏雪娟, 陈芝兰, 陈宗道, 阚建全, 杨吉霞. 16S rDNA 序列分析法快速鉴定西藏地区传统乳制品中的乳酸菌[J]. 食品科学, 2013, 34(14): 245-249.
XIA XJ, CHEN ZL, CHEN ZD, KAN JQ, YANG JX. Rapid identification of lactic acid bacteria from traditional dairy products in Tibet area by 16S rDNA sequence analysis[J]. Food Science, 2013, 34(14): 245-249 (in Chinese).
- [8] WAITZ JA. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition[M]. Pennsylvania: Clinical & Laboratory Standards Institute, 2012.
- [9] 何杉杉, 王晓蕊, 彭禹熙, 马立娟, 杜丽平. 雪莲菌中乳酸菌的益生特性[J]. 食品科学, 2022, 43(2): 210-216.
HE SS, WANG XR, PENG YX, MA LJ, DU LP. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Tibetan kefir grain[J]. Food Science, 2022, 43(2): 210-216 (in Chinese).
- [10] ZHANG Y, WU YT, ZHENG W, HAN XX, JIANG YH, HU PL, TANG ZX, SHI LE. The antibacterial activity and antibacterial mechanism of a polysaccharide from *Cordyceps cicadae*[J]. Journal of Functional Foods, 2017, 38: 273-279.
- [11] WANG J, PU Y, ZENG Y, CHEN YY, ZHAO W, NIU LL, CHEN BH, YANG ZH, WU LQ, PAN KC, JING B, ZENG D, NI XQ. Multi-functional potential of five lactic acid bacteria strains derived from giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*)[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2022: 1-14.
- [12] 纪绍梅. 微生物培养基质控与图解[M]. 北京: 北京科学技术出版社, 2006.
JI SM. Quality Control and Illustration of Microbiological Medium[M]. Beijing: Beijing Science & Technology Press, 2006 (in Chinese).
- [13] LEE J, MO JH, KATAKURA K, ALKALAY I, RUCKER AN, LIU YT, LEE HK, SHEN C, COJOCARU G, SHENOUDA S, KAGNOFF M, ECKMANN L, BEN-NERIAH Y, RAZ E. Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells[J]. Nature Cell

- Biology, 2006, 8(12): 1327-1336.
- [14] 李永儒, 丁晓贝, 左浩江, 王崑, 黄玮, 裴晓方. 肠道菌群与粪便性状关系初探[J]. 现代预防医学, 2010, 37(9): 1623-1625.
LI YR, DING XB, ZUO HJ, WANG W, HUANG W, PEI XF. Preliminary Investigation of the Relationship between enteric bacteria and character of feces[J]. Modern Preventive Medicine, 2010, 37(9): 1623-1625 (in Chinese).
- [15] 张志和, 何光昕, 王行亮, 钟顺隆, 张安居, 李光汉. 大熊猫肠道正常菌群的研究[J]. 兽类学报, 1995, 15(3): 170-175.
ZHANG ZH, HE GT, ZHANG AJ, WANG HL, ZHONG SL, ZHANG AJ, LI GH. Study on the normal flora of the giant panda's intestines[J]. Acta Theriologica Sinica, 1995, 15(3): 170-175 (in Chinese).
- [16] HIRAYAMA K, KAWAMURA S, MITSUOKA T, TASHIRO K. The faecal flora of the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*)[J]. The Journal of Applied Bacteriology, 1989, 67(4): 411-415.
- [17] 王晓艳. 成年与老年大熊猫肠道菌群 16S rDNA-RFLP 技术分析[D]. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 2013.
WANG XY. Analyze the intestinal flora of adult and elderly pandas by 16S rDNA-RFLP technology[D]. Yaan: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2013 (in Chinese).
- [18] 简平, 王强, 王剑, 牛李丽, 祝辉, 曾燕, 倪学勤, 曾东. 不同年龄段川金丝猴肠道菌群结构差异分析[J]. 动物营养学报, 2015, 27(4): 1302-1309.
JIAN P, WANG Q, WANG J, NIU LL, ZHU H, ZENG Y, NI XQ, ZENG D. Difference analysis of gut microbiome of *Rhinopithecus roxellana* in different ages[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2015, 27(4): 1302-1309 (in Chinese).
- [19] 郭壮. 应用焦磷酸测序技术对不同人群肠道微生物群落结构的研究[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2013.
GUO Z. Study on intestinal microbial community structure of different populations by pyrophosphate sequencing technology[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2013 (in Chinese).
- [20] CLAESSON MJ, CUSACK S, OSULLIVAN O, GREENE-DINIZ R, WEERD H, FLANNERY, E, MARCHESI, JR, FALUSH D, DINAN T, FITZGERALD G, STANTON C, SINDEREN D, O'CONNOR M, HARNEDY N, O'CONNOR K, HENRY C, O'MAHONY D, FITZGERALD AP, SHANAHAN F, TWOMEY C, HILL C, ROSS RP, O'TOOLE PW. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011, 108(supplement_1): 4586-4591.
- [21] 郭飞翔. 广西巴马长寿地区不同年龄人群肠道菌群分析[D]. 扬州: 扬州大学硕士学位论文, 2015.
GUO FX. Analysis of intestinal flora of people of different ages in Changshou area of Bama, Guangxi[D]. Yangzhou: Master's Thesis of Yangzhou University, 2015 (in Chinese).
- [22] IBRAHIM SA, AYIVI RD, ZIMMERMAN T, SIDDIQUI SA, ALTEMIMI AB, FIDAN H, ESATBEYOGLU T, BAKHSHAYESH RV. Lactic acid bacteria as antimicrobial agents: food safety and microbial food spoilage prevention[J]. Foods (Basel, Switzerland), 2021, 10(12): 3131.
- [23] TEUBER M, MEILE L, SCHWARZ F. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 1999, 76(1-4): 115-137.
- [24] GEVERS D, HUYS G, SWINGS J. In vitro conjugal transfer of tetracycline resistance from *Lactobacillus* isolates to other Gram-positive bacteria[J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 225(1): 125-130.
- [25] ARGYRI AA, ZOUMPOPOULOU G, KARATZAS KA G, TSAKALIDOU E, NYCHAS GJ E, PANAGOUE EZ, TASSOU CC. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests[J]. Food Microbiology, 2013, 33(2): 282-291.
- [26] 聂紫玉, 吴艳阳, 王增光, 李子晗, 康文丽, 潘丽娜, 汪家琦, 戴智勇, 赵玲艳, 邓放明. 植物源益生乳酸菌的筛选及其特性[J]. 食品科学, 2022, 43(18): 143-151.
NIE ZY, WU YY, WANG ZG, LI ZH, KANG WL, PAN LN, WANG JQ, DAI ZY, ZHAO LY, DENG FM. Screening and characterization of plant-derived probiotic lactic acid bacteria[J]. Food Science, 2022, 43(18): 143-151 (in Chinese).
- [27] 胡爱华, 敖晓琳, 陈岑, 蒲彪, 陈安均, 姜欢笑. 乳酸菌耐酸耐胆盐机制的研究进展[J]. 食品工业科技, 2015, 36(8): 380-383, 389.
HU AH, AO XL, CHEN C, PU B, CHEN AJ, JIANG HX. Research progress on mechanism of lactic acid bacteria

- acid and bile salt resistance[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2015, 36(8): 380-383, 389 (in Chinese).
- [28] GRIGORYAN S, BAZUKYAN I, TRCHOUNIAN A. Aggregation and adhesion activity of lactobacilli isolated from fermented products *in vitro* and *in vivo*: a potential probiotic strain[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2018, 10(2): 269-276.
- [29] 麦热姆妮萨·艾麦尔, 乌斯满·依米提, 阿迪拉·多力坤, 多力坤·麦麦提优素甫. 具有高效抑菌活性的肠道乳酸菌的筛选[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(24): 210-214.
- AMAR M, YIMIT W, DOLKUN A, MAMATYUSUF D. Selection of high-efficient antibacterial intestinal lactic acid bacteria[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 33(24): 210-214 (in Chinese).
- [30] 万荣峰, 江善祥. 3株乳酸菌体外拮抗致病性大肠杆菌试验[J]. *畜牧与兽医*, 2007, 39(3): 50-52.
- WAN RF, JIANG SX. Antagonism of three lactic acid bacteria against pathogenic *Escherichia coli in vitro*[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2007, 39(3): 50-52 (in Chinese).
- [31] 周罗雄. 乳酸菌对肉鸡肠道中肠炎沙门氏菌的抑菌作用研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2014.
- ZHOU LX. Study on bacteriostasis of lactic acid bacteria against *Salmonella enteritidis* in broiler intestine[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2014 (in Chinese).
- [32] 崔美岩, 吕好新, 张志霞, 张森, 张蓓, 陈骏, 谈重芳. 青海湖裸鲤肠道乳酸菌多样性与抑菌活性[J]. *微生物学通报*, 2016, 43(9): 2028-2039.
- ZHANG ZX, ZHANG M, ZHANG B, CHEN J, TAN ZF. Diversity and antimicrobial activity of intestinal lactic acid bacteria isolated from *Gymnocypris przewalskii*[J]. *Microbiology China*, 2016, 43(9): 2028-2039 (in Chinese).