

云南猪源乳酸杆菌的筛选及应用

郑锦玲¹ 黄翠琴² 陈媛³ 李云蓉⁴ 李石友¹ 李文贵⁵ 张以芳⁵ 柴俊^{5*}

1. 云南农业职业技术学院, 昆明 650212; 2. 福建省家畜传染病防治与生物技术重点实验室, 福建龙岩 360012;
3. 昆明医科大学海源学院, 昆明 650106; 4. 云南省昆明市五华区黑林铺农业综合服务站, 昆明 650106;
5. 云南农业大学动物科学技术学院, 昆明 650201

摘要 为进一步开发猪源益生菌资源, 从昆明屠宰场猪小肠样品中分离纯化出 25 株乳酸菌, 经过表型鉴定和 16S-rRNA 鉴定均为乳酸杆菌, 包括 6 个菌种。经过抗逆性环境分析筛选获得一株敏捷乳杆菌, 其生长性能好、耐酸耐胆盐能力强、肠黏附效果好, 适合作为益生菌制剂的候选菌种。将该菌种应用于仔猪生产, 能促进仔猪生长、提高饲料利用率、减少腹泻发生, 对仔猪生产性能上产生有益影响; 能提高仔猪血清中免疫球蛋白含量、细胞因子水平和淋巴细胞的增殖指数。

关键词 猪; 乳酸菌; 分离鉴定; 益生特性; 动物试验

抗生素作为饲料添加剂, 在减少动物细菌病、促进动物生长的同时, 带来诸如耐药性、药物残留、畜产品安全隐患和环境污染等问题。因此, 随着微生物学的发展, 益生菌制剂进入一个蓬勃发展时期。

乳酸菌是益生菌主要的菌种来源, 在益生菌制剂的开发利用中占据了主导地位。乳酸菌在动物肠道中定植生长能够分泌抗菌代谢产物, 抑制有害细菌生长繁殖, 维持肠道微生态平衡^[1]; 具有促进钙磷铁吸收、合成多种维生素、改善蛋白质代谢等营养作用^[2]; 可刺激肠道局部免疫反应, 提高动物体液和细胞免疫水平^[3], 增强机体抵抗力, 对人和畜禽的健康生长起着有益作用。

分离并筛选耐受性和抑菌效果良好的乳酸菌菌株是产品开发的前提, 尤其要筛选出同源性强且抗逆性强的菌株。本研究从屠宰场猪小肠分离鉴定乳杆菌, 筛选获得优良菌种, 通过仔猪饲喂试验测定其对仔猪生长性能和免疫力的影响, 为丰富猪源益生菌资源, 进一步开发益生菌制剂产品奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验动物及样品采集

1) 样品采集。采取昆明某屠宰场猪小肠全套样品, 无菌采集于无菌容器内, 带回实验室进行乳杆菌分离、鉴定。

2) 试验动物。初生仔猪由云南农业职业技术学院生猪综合实验站提供。传染病防控按猪场制定的免疫程序实施, 试验期间的饲养管理按常规方法进行。试验猪在出生时进行称重、编号, 猪舍为全封闭猪舍, 饲喂颗粒料, 每天喂 4 次(7:00、11:00、15:00 和 19:00), 自由采食, 自由饮水, 试验组和对照组饲养方式及饲养环境相同, 饲料配方相同, 所使用的饲料配方为该场实用配方。乳猪饲料均由云岭广大种畜禽饲料公司提供。

1.2 乳酸菌分离培养及鉴定

1) 分离培养。将小肠样品去除粪便, 无菌剪开用生理盐水冲洗, 再用生理盐水将样品依次进行 10、10²、10³、10⁴、10⁵、10⁶ 稀释, 取 1 mL 稀释液倾注培养于加碳酸钙 MRS 培养基内, 各稀释度倾注 2 个

收稿日期: 2017-03-20

基金项目: 云南农业职业技术学院重点科研项目; 云南省生猪综合实验站项目; 福建省家畜传染病防治与生物技术重点实验室开放基金课题(2016KL05)

* 通讯作者

郑锦玲, 女, 1967 年生, 博士, 副教授, 国家执业兽医师。

瓶皿, 分别在 37 °C 的恒温培养箱中厌氧培养 48 h。挑取单个有典型溶钙圈的菌落, MRS 平板划线传代, 纯培养^[4]。

2) 初步筛选鉴定。对分离菌株进行革兰氏染色、形态大小检查、运动力检查、过氧化氢酶试验, 淘汰革兰氏阴性、非杆状、有运动性、过氧化氢酶阳性的非乳杆菌菌株。

3) 分类鉴定。根据分离菌株的表型特性(培养特性、形态特征、运动性、生理学特性及各种糖发酵性能等), 参照《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》^[5]及《伯杰氏细菌鉴定手册》^[6]乳酸杆菌种属特性鉴定到种或亚种。

4) 乳酸菌 16S-rRNA 鉴定。根据 GenBank 上乳酸菌的 16S-rRNA 基因参考系列, 使用 Primer 5.0 软件设计扩增 16S-rRNA 的 2 条通用引物, 引物由大连宝生物(TaKaRa)公司合成。通过 MRS 液体培养基 37 °C 厌氧培养至对数生长期, 按照 BIOTEKE 公司细菌 DNA 提取试剂盒(DP2001)说明, 提取乳酸菌的总 DNA。以提取的细菌全基因组 DNA 为模版, 用合成的特异性引物 PCR 扩增各菌株 16S-rRNA 基因。PCR 产物送至华大基因公司进行测序。利用 Blast、Clustal、DNAMAN、MEGA 等生物软件将测序结果与 GenBank 下载的菌株 16S-rRNA 序列进行同源性比较, 并构建进化树。以同源性大于或等于 97.5% 为种的分界阈值从而将待测菌株鉴定到种^[7]。

1.3 乳酸菌生物学特性筛选

1) 乳酸菌生长曲线制定。以 6% 的接种量分别将 25 株乳酸杆菌接种于 MRS 液体培养基中, 放入培养箱, 37 °C 静置培养。分别在 0、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22 和 24 h 取样, 测定 15 株乳酸杆菌生长光密度值(OD₆₀₀ 值)并绘制生长曲线。

2) 培养温度对乳酸菌生长的影响。将 25 株乳酸杆菌分别接种于 MRS 液体培养基中, 置于不同温度(37、45、65、80 °C)水浴培养 24 h 后, 取出观察液体培养基的变化。

3) 乳酸菌耐酸试验。25 株乳酸杆菌分别以 6% 的接种量接种到不同 pH 值(6.5、4.5、3.5、2.5、1.5)的 MRS 液体培养基, 并在 2 h 和 4 h 取样, 在不同稀释倍数下, 倾注 MRS 琼脂培养基, 37 °C 培养 24 ~ 48 h, 计数活菌落数。

4) 乳酸菌耐胆盐试验。25 株乳酸杆菌分别以 6%

的接种量接种到不同胆盐浓度(0%、0.1%、0.2%、0.3%)的 MRS 液体培养基, 并在 2 h 和 4 h 取样, 在不同稀释倍数下, 倾注 MRS 琼脂培养基, 37 °C 培养 24 ~ 48 h, 计数活菌落数。

5) 体外肠道黏附试验。肠黏液的制备^[8]。解剖取猪小肠, 无菌生理盐水冲洗 3 次, 剪开肠壁, 钝塑料片轻轻刮取肠黏液, 无菌 PBS 混匀, 4 °C、12 000 r/min 离心 2 次, 每次 15 min。取上清液, 用 Bradford 法测定蛋白含量, 用 PBS(pH 7.4)将蛋白浓度调整为 1 mg/mL, -20 °C 保存备用。

肠黏液(1 mg/mL)100 μL 加入 96 孔培养板, 4 °C 包被过夜。用 PBS 洗涤除去未黏附黏液, 加 100 μL 益生菌悬液(10⁸ cfu/mL), 脱脂奶粉作阴性对照, 30 °C 孵育 2 h。用 PBS 洗涤除去未黏附的益生菌, 加 50 μL PBS 及 20 μL MTT(5 mg/mL), 30 °C 孵育 1 h 后, 加裂解液(20% SDS-50% DMSO)振荡 30 min, 用酶标仪测定各孔吸光度值(OD₅₇₀)^[8], 重复 3 次取平均值。乳酸菌肠黏附效果用黏附率评估, 益生菌黏附率(%)=(A₁-A₀)/(A₂-A₀)×100, A₁、A₂、A₀ 分别是试验组、阴性对照组、空白对照组吸光度值。

6) 体外抑菌试验。本试验采用牛津杯法^[9]在体外进行抑菌试验, 并测量抑菌圈直径, 来测定菌株抑菌能力。

1.4 动物试验

选择体重、窝仔数、母猪胎次、出生日期相近的长×大二元杂交仔猪 10 窝(10±2 头/窝), 随机分为 2 个处理, 即对照组(饲喂基础日粮)和试验组(饲喂基础日粮+敏捷乳杆菌)。将筛选出的敏捷乳杆菌菌种以无菌操作方式接入 MRS 液体培养基, 在恒温生化培养箱中 37 °C 厌氧培养至菌体含量达 10¹⁰ cfu/mL, 4 °C 保存。试验组在基础日粮中添加敏捷乳杆菌的量为 2×10¹⁰ cfu/kg。试验分 2 个阶段: 第 1 阶段, 仔猪从 7 日龄开始诱食教槽料, 28 日龄断奶; 第 2 个阶段, 29 ~ 60 日龄仔猪饲喂保育料, 共计 54 d。分别在 7、28、60 日龄各称重 1 次, 每天准确记录仔猪的采食、腹泻等情况。

免疫指标测定: 饲喂结束后, 无菌抗凝管采集猪前腔静脉血液, 4 000 r/min 离心收集血清, -20 °C 保存, 用于 ELISA 检测免疫球蛋白(IgA、IgM、IgG)和细胞因子(IL-2、IL-4), 试验步骤按试剂盒说明书; 用猪外周血淋巴细胞分离液从离心得到的血

浆中分离淋巴细胞,常规 MTT 法检测外周血淋巴细胞增殖能力,用刺激指数 SI 表示。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌分离培养及鉴定

1)分离乳酸杆菌的菌落形态特征。从样品中分离到的 25 株纯乳酸杆菌,分别命名为 LabP1 ~ LabP25,菌株在含 CaCO₃ 的 MRS 固体琼脂平板上,均形成有溶钙圈的圆形、隆起、乳白色、边缘整齐的菌落。

2)革兰氏染色镜检结果。镜检观察到 25 株乳酸菌均为无鞭毛,无荚膜,无芽孢,无运动性,菌体单个或成双或呈短链状,菌体平直或稍弯,两端钝圆的蓝紫色 G⁺ 杆菌。

3)菌株的生理生化鉴定。参考有关乳酸杆菌分类鉴定试验方法^[5-6],属的生化试验初步判断 25 株菌均为乳酸杆菌属。根据糖发酵试验结果,基本推断菌株 LabP3、LabP5 ~ LabP7、LabP9 ~ LabP10、LabP15、LabP19、LabP21 ~ LabP22、LabP24 ~ LabP25 可能是一个种,即约氏乳酸杆菌;LabP12、LabP14、LabP17 ~ LabP18、LabP20 可能是一个种,即罗伊氏乳酸杆菌;LabP8、LabP11、LabP13 可能是一个种,即嗜酸乳杆菌;LabP1、LabP23 可能是一个种,即食淀粉乳杆菌;LabP2、LabP4 可能是一个种,即鼠乳杆菌;LabP16 可能是敏捷乳杆菌。

4)16S-rRNA 鉴定。结果表明,分离菌株 LabP3、LabP5 ~ LabP7、LabP9 ~ LabP10、LabP15、LabP19、LabP21 ~ LabP22、LabP24 ~ LabP25 与 *L. johnsonii* 的同源性分别为 98.1%、98.7%、98.1%、98.5%、97.8%、98.2%、97.9%、98.3%、99.1%、97.8%、98.6%、

98.4%,12 株乳杆菌均属于约氏乳杆菌;LabP12、LabP14、LabP17 ~ LabP18、LabP20 与 *L.reuteri* 的同源性分别为 98.2%、98.9%、98.4%、98.3%、98.5%,5 株乳杆菌均属于罗伊氏乳杆菌;LabP8、LabP11、LabP13 与 *L. acidophilus* 的同源性分别为 97.4%、97.5%、98.1%,3 株乳杆菌均属于嗜酸乳杆菌;LabP1、LabP23 与 *L. amylovorus* 的同源性为 100% 和 99.6%,2 株均属于食淀粉乳杆菌;LabP2、LabP4 与 *L. murinus* 的同源性为 97.8%和 98.0%,2 株均属于鼠乳杆菌;LabP16 与 *L. agilis* 的同源性为 98.1%,属于敏捷乳杆菌。

2.2 乳酸菌的生物学特性筛选结果

1)乳酸菌生长曲线制定。由图 1 可见,菌体密度在培养开始没有明显地改变,8 h 后细菌开始大量生长,进入对数生长期,20 ~ 24 h 菌体生长从对数期进入稳定期。其中,LP16 的生长性能最好。

2)培养温度对乳酸菌生长的影响。25 株乳杆菌均不能在 65 °C 及 80 °C 的温度下生长,可在 37 °C 和 45 °C 条件下生长。

3)乳酸菌耐酸试验结果。菌株在 pH 2.5 时随时间的延长,活菌数呈下降趋势,但数量级不变,说明菌株能耐受 pH 2.5 的酸性;菌株在 pH 1.5 时,随时间的延长,活菌数呈数量级下降,4 h 后 LabP8、LabP11、LabP13 和 LabP16 仍能保持 10⁶ cfu/mL,该现象说明这 4 株乳杆菌能耐 pH 1.5。

4)乳酸菌耐胆盐试验结果。菌株的生长受胆盐含量的抑制,同一浓度随培养时间的延长,活菌数呈下降趋势;同一时间,随着胆盐浓度的增加,活菌数也呈下降趋势,但 LabP8、LabP11、LabP13 和 LabP16 在 0.3%的胆盐浓度下,4 h 后,仍能保持 10⁶

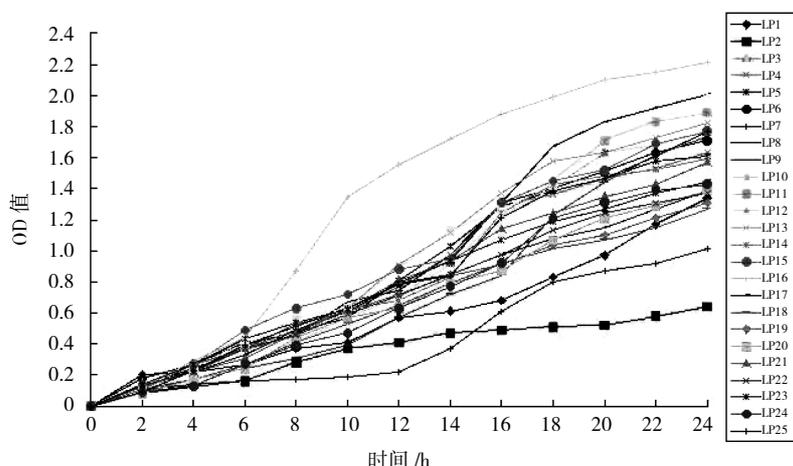


图 1 LP1-LP25 生长曲线图

cfu/mL, 该现象说明它们对 0.3% 的胆盐有一定的耐受能力。

根据以上 25 株乳杆菌的生物学特性部分研究结果表明, LabP8、LabP11、LabP13 和 LabP16 的生长性能、产酸值、耐酸耐胆盐能力较好, 选择这 4 株乳杆菌做后期试验。

5) 乳酸杆菌肠道黏附能力测定结果。4 株乳杆菌对猪肠道都有一定的黏附能力, 黏附率分别为 4.01%、2.86%、3.21%、4.31%, 其中 LabP16 对猪小肠黏附率相对较高。

6) 体外抑菌试验结果。4 株乳杆菌对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均有一定的抑菌效果, 抑菌圈分别达 7~17 mm 和 8~15 mm, 且 LabP16 抑菌圈分别为 17 mm 和 15 mm, 抑菌能力相对较好。

2.3 动物试验结果

上述生物学特性研究结果说明, LabP16 的生长性能、耐酸耐胆盐能力及肠道黏附效果最好, 选择 LLabP16 敏捷乳杆菌作为优良菌种应用于仔猪生产中进一步评价其益生性能。

饲喂乳酸杆菌结果表明, 哺乳仔猪的平均日增重、饲料转化率略有改善, 差异不显著, 腹泻率由 10.53% 降为 3.57%, 效果明显(表 1)。对断奶仔猪生产性能的影响比较明显, 平均日增重提高 81.25 g, 饲料转化率降低 0.32, 腹泻率降低了 3.47%(表 2)。提高了仔猪血清中免疫球蛋白(IgA、IgM、IgG)、细胞因子(IL-2、IL-4)和外周淋巴细胞指数 SI 等水平, 试验组的各项免疫指标都优于对照组, 差异显著(表 3)。

表 1 乳酸菌对哺乳仔猪生产性能的影响

组别	7 日龄平均 体重/kg	28 日龄平 均体重/kg	平均日 增重/g	平均日 采食量/g	饲料转 化率/%	腹泻 率/%
对照组	2.37	7.16	217.73	56.24	0.258	10.53
试验组	2.43	7.84	245.91	58.17	0.237	3.57

表 2 乳酸菌对 29~60 日龄仔猪生产性能的影响

组别	28 日龄平 均体重/kg	60 日龄平 均体重/kg	平均日 增重/g	平均日 采食量/g	饲料转 化率/%	腹泻 率/%
对照组	7.16	15.01	245.31	516.83	2.107	5.26
试验组	7.84	18.29	326.56	583.71	1.787	1.79

表 3 乳酸菌对仔猪免疫功能的影响

组别	IgA/ ($\mu\text{g/mL}$)	IgM/ ($\mu\text{g/mL}$)	IgG/ ($\mu\text{g/mL}$)	IL-2/ (pg/mL)	IL-4/ (pg/mL)	SI
对照组	36.13	15.27	150.81	141.75	85.18	1.274
试验组	43.62	17.85	182.06	183.43	139.69	1.735

3 讨论

益生菌菌种的选择必须注意到宿主特异性的问题^[10]。很多学者认为, 动物用益生菌最好分离自动物自身消化道^[11], 猪源乳杆菌的分离来源主要包括动物肠道、新鲜粪便和乳汁^[12-13]。本研究从昆明健康屠宰猪胃肠道分离纯化出 25 株乳酸菌, 根据传统的分类鉴定和 16S-rRNA 同源性分析表明: 上述 25 株菌均为乳酸杆菌, 被分为约氏乳杆菌、罗伊氏乳杆菌、嗜酸乳杆菌、食淀粉乳杆菌、鼠乳杆菌和敏捷乳杆菌 6 个菌种。以上分离鉴定菌株与比对菌株的同源性均大于 97.5%, 则可以认为它们属于同一个种^[7]。很多学者都已从各种动物中分离出多种乳杆菌, 例如张杨^[12]从仔猪大肠内容物分离到约氏乳杆菌; 郑锦玲等^[13]从猪胃肠道分离到敏捷乳杆菌; 杨霞等^[14]从猪胃肠道分离到嗜酸乳杆菌。

乳酸菌进入肠道发挥益生作用的基础是必须能耐受胃肠道的强酸和高胆盐环境^[15], 并具有良好的黏附性能及定植抗性^[16]。对于益生菌筛选的酸性条件选择, 一般是 pH 为 2.0、2.5 或 3.0^[17]; 有研究报道显示, 从猪肠道中分离到的乳杆菌对 0.03%~0.5% 胆盐有一定的耐受能力^[18]; 一般认为益生菌产品发挥功能特性的活菌数临界值 10^6 cfu/mL^[19], 所以进行乳杆菌耐受性试验的前提是始终将该浓度作为最低点加以控制。通过模拟动物胃肠道进行耐受性试验, 从分离鉴定的 25 株乳杆菌筛选得到一株生物学特性最佳的菌种, 即敏捷乳杆菌 LabP16 菌株。其最佳性能主要体现在: 生长性能相对较好, 对数生长期长; 耐酸耐胆盐能力强: 能耐受 pH 为 1.5 的强酸环境, 菌株在其中生存 4 h 后仍能保持 10^6 cfu/mL; 对 0.3% 的胆盐浓度也有相对较高的耐受能力; 肠道黏附率相对较高, 体外抑菌试验效果比较明显。本试验结果符合预期, 可望作为乳酸菌制剂的候选菌种, 进行产品的后期开发和应用于仔猪生产。

动物在新生期, 正常菌群还处于连续变化的阶段, 在这个期间使用益生菌要比在已建立起相对稳定菌群的生长后期应用更易影响菌群。乳酸菌在发酵或代谢过程中可以产生各种酶类, 有助于食物的消化吸收, 促进动物生长发育^[20-21]。乳杆菌对某些条件性病原微生物, 如大肠杆菌、沙门氏菌等能直接发挥良好的抑制作用^[22], 也能协助机体抵御消化道

病毒和寄生虫的感染^[23],从而发挥出全面的消化道调节作用。在仔猪日粮中添加敏捷乳杆菌,在第 1 阶段(1~28 日龄)相对对照组、饲喂试验组平均日增重、饲料转化率略有改善,但腹泻率明显降低;在第 2 阶段(28~60 日龄)乳杆菌组与对照组相比,平均日增重提高,饲料转化率降低,腹泻率降低,试验组的各项生产指标都优于对照组。经抗体检测,试验组血清中免疫球蛋白含量、细胞因子水平和淋巴细胞的增殖指数高于对照组。结果说明,在仔猪日粮中添加敏捷乳杆菌能促进仔猪生长、提高饲料利用率、减少腹泻发生,对仔猪生产性能上产生有益影响。不仅可以刺激局部肠道黏膜产生免疫应答,同时诱导产生了体液免疫和细胞免疫应答,抑制致病菌的生长繁殖,有效地增强了仔猪的免疫功能和抗病力。刘宇等^[24]研究表明复合乳酸菌制剂能提高断奶仔猪生长性能。张常明等^[25]研究表明,通过饲喂仔猪乳酸菌,能够显著提高仔猪 T 淋巴细胞转化率和血清中 IgG 水平。

综上所述,本研究从猪肠道正常菌群中分离筛选获得抗逆性强、性能稳定、易于生产贮存、益生作用效果好的优良猪源益生菌菌种,应用到实际生产中也产生了较为理想的益生作用,为下一步开发适合大规模生产的高质量益生菌制剂,对提高养猪效率、发展健康养殖具有重要的现实意义。

参 考 文 献

- [1] CLAESSON M J, VAN SINDEREN D, O'TOOLE P W. The genus *Lactobacillus*—a genomic basis for understanding its diversity[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2007, 269(1): 22–28.
- [2] 帅丽芳, 段铭, 张光圣, 等. 微生态制剂对反刍动物消化系统的调控作用[J]. *中国饲料*, 2002(9): 16–18.
- [3] 易力, 倪学勤, 汪洋, 等. 乳酸菌制剂对鸡免疫应用效果的研究[J]. *养禽与禽病防治*, 2007, (5): 2–3.
- [4] 张以芳, 王生奎. 肉鸡嗉囊内容物中乳杆菌的鉴定[J]. *中国家禽*, 2000, 22(3): 11–12.
- [5] 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, 1998.
- [6] R.E 布欣南, N.E 吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984: 797–821.
- [7] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, et al. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[M]. *Mol Biol Evol*, 2007: 1596–1599.
- [8] PEREZ, MINNAARD Y, DISALVO E, et al. Surface properties of bifidobacterial strains of human origin [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(1): 21–26.
- [9] 廖延雄. 兽医微生物实验诊断手册[M]. 北京: 中国农业出版社, 1991.
- [10] BLOMBERG L, HENRIKSSON A, CONWAY P L. Inhibition of adhesion of *Escherichia coli* K88 to piglet ileal mucus by *Lactobacillus* spp[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 159(1): 34–39.
- [11] 陆克文, 姜平. 猪源乳酸菌对致病性大肠杆菌的体外抑制作用[J]. *畜牧与兽医*, 2012, 43(11): 51–53.
- [12] 张杨. 两种来源乳杆菌的分离鉴定及遗传多态性研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2008.
- [13] 郑锦玲, 廖启顺, 张云娟, 等. 云南猪源乳酸杆菌的分离鉴定[J]. *畜牧与兽医*, 2015(12): 97–102.
- [14] 杨霞, 陈陆. 猪源肠道乳酸菌的分离与生物学特性研究[J]. *中国微生态学杂志*, 2010, 22(5): 393–397.
- [15] 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.
- [16] 譙仕彦, 侯成立, 曾祥芳. 乳酸菌对猪肠道屏障功能的调节作用及其机制[J]. *动物营养学报*, 2014, 26(10): 3059–3070.
- [17] 钟登科, 牛明福, 魏建超, 等. 猪肠道乳杆菌的筛选及其生物学特性研究[J]. *中国微生态学杂志*, 2009, 21(6): 505–508.
- [18] 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(2): 92–96, 99.
- [19] CHANAN R C. Enhancing market value of milk by adding cultures[J]. *Dairy Science*, 1999(82): 2245–2256.
- [20] CHOU L S, WEIMER B. Isolation and characterization of acid- and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus* [J]. *Journal of Dairy Science*, 1999, 82(1): 23–31.
- [21] 张勇, 朱宇旌. 动物微生态营养及其调控[J]. *畜禽业*, 1999(9): 26–28.
- [22] 饶明荣. 仔猪腹泻病的诊断与防治[J]. *畜牧兽医科技信息*, 2016(3): 81–82.
- [23] 赵明娟. 仔猪腹泻的病因及防治[J]. *畜禽业*, 2016(3): 66–67.
- [24] 刘宇, 朱站波, 孙秀军, 等. 复合活菌剂对断奶仔猪生长及血清溶菌酶含量的影响[J]. *中国微生态学杂志*, 2010, 22(9): 81–84.
- [25] 张常明, 李路胜, 王修启, 等. 乳酸菌对断奶仔猪生产性能及免疫力的影响[J]. *饲料博览*, 2007(5): 61.