

源自豬隻糞便與牛瘤胃液凝結芽孢桿菌的篩選、 鑑定與性狀分析⁽¹⁾

劉芳爵⁽²⁾⁽³⁾ 林幼君⁽²⁾

收件日期：110 年 6 月 2 日；接受日期：110 年 9 月 24 日

摘 要

芽孢桿菌屬 (*Bacillus*) 屬於革蘭氏陽性菌，具有產生細胞外酵素與形成孢子進入休眠狀態，且較不受外界環境的影響，適合作為畜禽飼料添加物。本試驗目的由豬隻糞便與牛瘤胃液中，篩選與鑑定具耐熱、耐酸、耐膽鹽，且會形成孢子之凝結芽孢桿菌 (*Bacillus coagulans*)，供作為畜禽飼料添加物用。試驗分別由豬隻糞便與牛瘤胃液中篩選出各 10 株候選菌株，經加溫誘發形成孢子與 90℃ 高溫加熱 30 分鐘殺死不形成孢子菌株，接續比對菌株 16S rDNA 核苷酸序列的相似度，挑選出 6 株近似於凝結芽孢桿菌候選菌株及基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀 (MALDI-TOF MS) 進行菌種鑑別，再測試 pH 2 與 2% 膽鹽之耐受性。結果顯示 5 株 (編號 R6、R8、R9、S7 與 S10) 為蠟樣芽孢桿菌 (*Bacillus cereus*)，僅有源自瘤胃液編號 R3 屬於凝結芽孢桿菌，且對 pH 2 與 2% 膽鹽之耐受性均高於 70%。凝結芽孢桿菌 R3 形成孢子能力經培養後每 1 mL 有 1×10^8 cfu 以上。綜上而言，篩選自瘤胃液之凝結芽孢桿菌 R3 有耐酸、耐膽鹽與形成孢子等特性，具有作為畜禽飼料益生菌使用之潛力。

關鍵詞：凝結芽孢桿菌、瘤胃液、形成孢子能力。

關鍵詞：凝結芽孢桿菌、瘤胃液、形成孢子能力。

緒 言

豬隻腸道微生物菌相對提升仔豬免疫力扮演非常重要的角色，同時腸道內微生物產生之短鏈揮發性有機酸 (如醋酸、乳酸與酪酸)，降低腸道 pH 值抑制有害菌的數量。具有保護結腸與直腸等部位，抑制有害微生物的數量 (Hillman *et al.*, 1994; Blottiere *et al.*, 2003; Biagiet *et al.*, 2006)。乳酸產品已廣泛使用於食品、飼料、化妝品、紡織工業與用於製造具有生物分解性塑膠製品之聚乳酸 (poly lactic acid, PLA)，國內目前上市的左旋乳酸產品中，大多利用澱粉類物質經微生物發酵產生 (Hofvendahl and Hahn-Hagerdal, 2000; John *et al.*, 2007)，但是運用澱粉生產之乳酸產品，不僅成本較高，同時也會發生與畜禽或人類競爭澱粉類食物的問題。因此，近年來已轉向利用木質纖維素生物質量 (lignocellulose biomass) 作為生產乳酸的原料。木質纖維素生物質量組成有纖維素 (35 – 50%)、半纖維素 (20 – 40%) 與木質素 (10 – 30%) (Saha, 2003)。一般微生物發酵木質纖維素生物質量生產乳酸，通常無法將半纖維素分解，其原因為微生物無法有效率分解五碳醣如木糖 (xylose) (Mussatto and Teixeira, 2010)。當微生物利用磷酸酮醇酶 (phosphoketolase) 代謝路徑發酵水解木糖，產生等當量之醋酸與左旋乳酸，其產生效率大約 60% (Patel *et al.*, 2006)。文獻指出，凝結芽孢桿菌可經由磷酸戊糖 (pentose phosphate) 代謝路徑，將六碳醣與五碳醣水解產生左旋乳酸與醋酸，其效率則接近 100% (Patel *et al.*, 2006; Abdel-Banat *et al.*, 2010; Lidan *et al.*, 2013)。另外在 Don *et al.* (1986) 與王等 (2020) 報告指出，凝結芽孢桿菌屬格蘭氏陽性菌可以抑制格蘭氏陰性菌，同時產生乳酸與溶菌酵素，可改善畜禽腸道菌相與降低發生下痢以及提升生長性狀等作用。因此，藉由篩選凝結芽孢桿菌作為畜禽飼料添加物使用，促進畜禽腸道健康，降低病原菌影響與發生下痢等現象。

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2679 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所營養組。

(3) 通訊作者，E-mail: fcliu@mail.tlri.gov.tw。

材料與方法

本試驗於行政院農業委員會畜產試驗所營養組試驗豬舍與開窗牛試驗舍進行，試驗動物之使用、飼養管理及試驗內容經畜產試驗所實驗動物管理小組以畜試動字 104-26 號申請核准在案。

I. 凝結芽孢桿菌菌株的分離

採用 10 頭體重約 80 kg 藍瑞斯與杜洛克二品種雜交肉豬 (LD) 糞便 (S) 以及 2 頭瘤胃開窗牛 (R) 瘤胃液，並參考 Don *et al.* (1986) 與 Ye *et al.* (2013) 方法進行凝結芽孢桿菌菌株分離。試驗先自收集豬隻糞便 10 組樣品與 2 頭瘤胃開窗牛瘤胃液各 5 組樣品，分別各取 1 g 糞便或 1 mL 瘤胃液加入 9 mL 之 0.85% 滅菌之生理食鹽水，震盪與充分混勻；各取 1 mL 接種於 9 mL 液態培養液 (配方組成，含 10 g glucose + 5 g peptone + 3 g maltose extract + 3 g yeast extract，加蒸餾水至 1,000 mL，調整 pH = 6.8)，放置於 37°C 培養箱 24 小時，取 100 μ L 塗抹於固態培養基 (配方組成，含 1 g glucose + 3 g yeast extract + 0.04 g bromocresol purple + 0.2 g L-cystein + 5 g peptone + 15 g agar + 1 mL Tween80，加入蒸餾水至 1,000 mL，調整 pH = 7.0)，放置於 37°C 培養箱 24 小時後觀察菌落外貌，各選取 10 株 (依序編號為 R1 – R10 與 S1 – S10) 具有黃色環帶之菌株 (因芽孢桿菌在固態培養基呈現黃色環帶，如圖 1 所示)，供作為選留凝結芽孢桿菌之候選菌株。

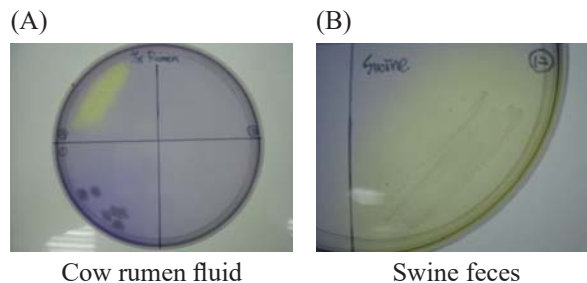


圖 1. 源自牛瘤胃液與豬隻糞便之凝結芽孢桿菌候選菌株。

Fig. 1. The candidate strains from cow rumen fluid and swine feces.

II. 具形成孢子能力之凝結芽孢桿菌候選菌株篩選

將選留各 10 個菌株接種於前述液態培養液，放置於 37°C 培養箱 24 小時，再利用 45°C 培養箱經 48 小時培養，誘發菌株形成孢子，再以 90°C 30 分鐘加熱殺死不能形成孢子的菌株，並將其塗抹於先前固態培養基並放置於 37°C 培養箱經 24 小時後，選留呈現黃色環帶菌株，作為具有形成孢子能力的選留菌株。

III. 比對凝結芽孢桿菌候選菌株之 16S rDNA 核苷酸序列相似度

取前述選留菌株之菌液 1 mL 加入 9 mL 液態培養液，放置於 37°C 培養箱經 48 小時培養後，採用 FastPure Bacteria DNA Isolation Mini Kit (DC102-01, Vazyme Biotech Comp., China) 萃取各菌株 DNA，並設計 PCR 引子對，前置引子 (forward primer: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 與反置引子 (reverse primer: 5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3') 進行 PCR 反應增幅 DNA 片段。PCR 反應條件為變性 (denaturation) 於 95°C 反應 30 秒、黏合配對 (annealing) 於 42°C 反應 30 秒及延長 (extension) 於 72°C 反應 90 秒，共進行 30 次循環，各菌株產生約 1.5 kb 16S rDNA 增幅產物 (Ye *et al.*, 2013)。接續進行 16S rDNA 核苷酸序列分析，分別先將各菌株 16S rDNA 增幅產物黏接於 pGEM® - T Easy Vector Systems II (A1380, Promega Corp., USA) 載體中，再以 42°C 熱誘導作用，將黏接載體轉形至勝任細胞 (JM109 Competent Cells, Promega Corp., USA) 中，經 37°C 培養箱培養 16 小時後，選取外貌呈現灰色菌落之菌株，接種於 LB 培養液 (244620, Thermo Fisher Scientific Comp., Canada) 中，接續設定培養條件為 37°C，培養液 140 rpm/min 震盪，過夜培養後利用 Plasmid DNA 萃取套組 PureLink™ HiPure Plasmid Miniprep Kit (K210002 Thermo Fisher Scientific Inc., Canada) 抽取質體 DNA，並由基龍米克斯生物科技公司 (新北市，臺灣) 協助進行選留菌株 16S rDNA 核苷酸序列的定序，再將定序後各菌株核苷酸序列資料利用美國 NCBI 網站提供之生物資訊，進行選留菌株 16S rDNA 核苷酸序列近似度的比對分析，鑑定各菌株的相似菌種種類。

IV. 凝結芽孢桿菌候選菌株之耐酸及耐膽鹽特性篩選

參考 Cebeci and Gurakan (2003) 與 De Angeli *et al.* (2006) 文獻方法，進行菌株耐酸與耐膽鹽篩選，接種各選留菌株於含 pH 2 與 2% 膽鹽之培養液中，再將各培養液放置於 37°C 培養箱經 90 分鐘後，塗抹於培養基上，放

置於 37°C 培養箱中培養 48 小時，計算各選留菌株的菌落數與各菌株的存活率。

V. 以基質輔助雷射脫附游離飛行時間式質譜儀 (MALDI-TOF MS, matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometer) 進行凝結芽孢桿菌候選菌株菌種鑑定

菌種鑑定除應用 16S rDNA 核苷酸序列相似度分析外，另一項方法可採用 MALDI-TOF MS (MALDI Biotyper® CA System, Bruker Corp., USA) 進行，MALDI-TOF MS 系統可分析微生物細胞蛋白質的分子量，在 2,000 – 20,000 Da 之間，此區間的蛋白質以核糖體蛋白為主。核糖體蛋白在不同菌種不易受到外在培養條件影響，因此質譜訊號良好且高重複性與再現性，可作為菌種鑑別之依據 (Dieckmann *et al.*, 2008)。

候選菌株菌種的鑑定 (委由財團法人食品工業發展研究所分析)，首先將濃度約 1 µM 分析樣品直接塗抹於樣本盤中，覆以特定有機酸基質在真空中揮發後，樣品先經鐳射光激發氣化游離後，移動 (飛行) 至 TOF 偵測器，將氣化游離樣品之蛋白質、肽與代謝物等，依物質質量大小以圖譜呈現。接續利用相同物種具有一致指紋圖譜 (fingerprint) 的特性，將微生物樣本圖譜與已知圖譜比對，快速完成微生物身分鑑定 (Dieckmann *et al.*, 2008; Wieser *et al.*, 2012)。

結果與討論

I. 選留有形成孢子能力之凝結芽孢桿菌候選菌株

由豬隻糞便與瘤胃液樣品，各選取 10 株具有黃色環帶之菌株 (R1 – R10 與 S1 – S10)，經誘發產生孢子與高溫處理殺死不能產生孢子之菌株。結果顯示，源自牛瘤胃液與豬隻糞便各有 5 株具形成孢子的能力，分別為 R3、R5、R6、R8、R9 與 S1、S6、S7、S8、S10 等。依據 Don *et al.* (1986) 文獻指出，凝結芽孢桿菌在塗抹於固態培養基，培養溫度為 30 – 55°C，菌落呈黃色、周圍有黃色環與中心色深不透明等特性。因此，源自牛瘤胃液與豬隻糞便各有 5 株凝結芽孢桿菌候選菌株，具有形成孢子能力。

II. 凝結芽孢桿菌候選菌株之 16S rDNA 核苷酸序列相似度分析

將前述源自豬隻糞便與牛瘤胃液各 5 株菌，分別將 PCR 增幅 1.5 kb 之 16S rDNA PCR 產物轉形至勝任細胞中，抽取質體 DNA 分析各株 16S rDNA 核苷酸序列，並以美國 NCBI 網站進行各株核苷酸序列相似度比對。結果顯示源自豬隻與牛瘤胃液之凝結芽孢桿菌候選菌株，編號為 R3、R6、R8、R9、S7 與 S10 共 6 株，其與凝結芽孢桿菌之相似度分別達 98.84%、97.74%、98.64%、97.88%、99.10% 與 98.45% (表 1)。而與 *Bacillus badius*、*Bacillus shackletonii* 與 *Bacillus camelliae* 等菌種之相似度介於 84 – 91%。依據 Carlos *et al.* (2010) 文獻指出，以 16S rDNA 核苷酸序列進行微生物鑑定，以「屬 (genus)」的分類層級，核苷酸序列片段 200 bps 分類準確度達到 81.7%，隨片段長度到 400 bps 則提升至 90%，其後精準度會漸趨於飽和。因此，前述選留 6 株候選菌株僅能確認同為桿菌屬 (*Bacillus*)。

III. 選留具耐酸與耐膽鹽之凝結芽孢桿菌候選菌株

將前述源自牛瘤胃液 4 株與源自豬隻糞便 2 株之候選菌株，分別培養於 pH 2 與 2% 膽鹽之液態培養液，經培養 9 小時後塗抹於培養基，計算菌落數與存活菌數，結果如表 2 所示。源自豬隻糞便之 S7 與 S10，其耐酸能力佳，存活率均高於 80%，而源自瘤胃液菌株 R3、R6、R8 與 R9 耐酸能力中等，存活率為 56.7 – 74.0%，其中 R3 與 R9 等 2 株存活率高於 70% 以上。耐膽鹽部分，源自牛瘤胃液之 R3 與 R8 菌株與豬隻糞便之 S10，存活率均高於 80%。Liong and Shah (2005) 文獻指出，微生物 (如乳酸桿菌) 於 pH 2 培養 90 分鐘後存活率約為 60%；於含 0.3% 膽鹽培養液培養 7 – 8 小時後，存活率有 57%。因此，選留凝結芽孢桿菌之候選菌株，源自豬隻糞便之菌株於 pH 2 與 2% 膽鹽培養液經培養 9 小時後，其存活率均高於 80% 的僅有 S10 菌株，而源自牛瘤胃液者耐 pH 2 與 2% 膽鹽之存活率高於 70% 的僅有 R3 菌株。因此，此 2 株 (S10 與 R3) 屬於耐酸與耐膽鹽較佳的凝結芽孢桿菌候選菌株。

IV. 以 MALDI-TOF MS 分析凝結芽孢桿菌候選菌株的菌種類別

源自牛瘤胃液 4 株 (R3、R6、R8 與 R9) 與豬隻糞便 2 株 (S7 與 S10)，經 NCBI 核苷酸 BLAST 比對為桿菌屬。接續以 MALDI-TOF MS 進一步分析菌株種類，分析結果僅有 R3 屬於凝結芽孢桿菌 (表 3)，而 R6、R8、R9、S7 與 S10 等菌株為蠟樣芽孢桿菌 (*Bacillus cereus*)，此類微生物容易造成動物腹瀉，不宜作為畜禽飼料添加物使用 (Stenfors-Arnese *et al.*, 2008)。依據 van Veen *et al.* (2010) 研究指出，MALDI-TOF 質譜儀用於鑑定臨床微生物或常見的細菌種類，其準確率可達到 95.1 – 96.4%，R3 菌株應為凝結芽孢桿菌，其他 5 株選留菌株則應均

為蠟樣芽孢桿菌。依照前述形成孢子方法之結果，顯示凝結芽孢桿菌 R3 形成孢子能力有 1×10^8 cfu/mL 以上，添加於畜禽飼料時較不受外界環境條件的影響，具有供作為飼料添加物使用的潛力。

表 1. 以 Basic Local Alignment Search Tool 比對源自豬糞便與牛瘤胃液菌株 16S rDNA 核苷酸序列相似度

Table 1. Similarity analysis among 16S rDNA nucleotide sequences of bacteria strains from swine manure and rumen fluid using Basic Local Alignment Search Tool

Sample no.	Scientific name of similar strains*	Max score	Total score	Query cover	Expect value	Percent identity	Accession length
R3	<i>Bacillus coagulans</i>	2,767	2,767	91%	0	98.84%	1,549
	<i>Bacillus badius</i>	2,440	2,440	84%	0	97.22%	1,435
	<i>Bacillus shackletonii</i>	2,416	2,416	88%	0	95.56%	1,503
R6	<i>Bacillus coagulans</i>	2,704	2,704	91%	0	97.74%	1,549
	<i>Bacillus badius</i>	2,379	2,379	84%	0	96.04%	1,435
	<i>Bacillus shackletonii</i>	2,361	2,361	88%	0	94.50%	1,503
R8	<i>Bacillus coagulans</i>	2,758	2,758	90%	0	98.64%	1,549
	<i>Bacillus badius</i>	2,433	2,433	84%	0	97.01%	1,435
	<i>Bacillus shackletonii</i>	2,420	2,420	88%	0	95.50%	1,503
R9	<i>Bacillus coagulans</i>	2,693	2,693	91%	0	97.88%	1,549
	<i>Bacillus badius</i>	2,394	2,394	84%	0	96.55%	1,435
	<i>Bacillus shackletonii</i>	2,385	2,385	91%	0	94.38%	1,549
S7	<i>Bacillus coagulans</i>	2,785	2,785	91%	0	99.10%	1,549
	<i>Bacillus badius</i>	2,459	2,459	85%	0	97.50%	1,435
	<i>Bacillus shackletonii</i>	2,435	2,435	89%	0	95.83%	1,503
S10	<i>Bacillus coagulans</i>	2,756	2,756	91%	0	98.45%	1,549
	<i>Bacillus badius</i>	2,425	2,425	84%	0	96.73%	1,435
	<i>Bacillus shackletonii</i>	2,372	2,372	88%	0	94.77%	1,503

* The three similar strains depended on meeting the highest levels of query cover, expect value (The lower the E-value, or the closer it is to zero, the more "significant" the match is.) and percent identity.

表 2. 源自牛瘤胃液與豬隻糞便之凝結芽孢桿菌候選菌株之耐酸與耐膽鹽存活率測定

Table 2. Analysis of survival rate in acid and bile salt tolerance of *bacillus coagulans* candidate strains from cattle rumen fluid and swine feces

Bacterial strain no.	pH 2.0		2% Bile salt	
	0 min	90 min	0 min	90 min
Total bacterial count cfu/mL				
R3 $\times 10^3$ cfu/mL	264.2 \pm 20.5*	192.5 \pm 6.4 (72.9%) ^A	142.5 \pm 10.6	123.5 \pm 4.9 (86.7%)
R6 $\times 10^3$ cfu/mL	156.0 \pm 8.5	88.5 \pm 12.0 (56.7%)	400.5 \pm 68.4	252.5 \pm 35.2 (63.0%)
R8 $\times 10^3$ cfu/mL	484.0 \pm 60.8	313.5 \pm 16.3 (64.8%)	368.0 \pm 18.4	298.5 \pm 21.6 (81.1%)
R9 $\times 10^3$ cfu/mL	132.5 \pm 12.6	98.0 \pm 22.5 (74.0%)	49.5 \pm 12.3	32.5 \pm 6.9 (65.7%)
S7 $\times 10^3$ cfu/mL	573.0 \pm 22.9	461.0 \pm 52.3 (80.4%)	341.5 \pm 47.8	268.0 \pm 29.6 (78.5%)
S10 $\times 10^3$ cfu/ml	92.0 \pm 14.5	77.5 \pm 17.9 (84.2%)	303.0 \pm 45.7	251.5 \pm 26.2 (83.0%)

* Mean \pm SD.

^A Survival rate, %.

表 3. 以 MALDI-TOF MS 鑑定源自牛瘤胃液與豬隻糞便之凝結芽孢桿菌候選菌株的種類

Table 3. Identification of selected strains by MALDI-TOF mass spectrometry of *Bacillus coagulans* candidate strains from cattle rumen fluid and swine feces

Analyte ID	Organism (best match)	Score* Value	Organism (second best match)	Score Value
R3	<i>Bacillus coagulans</i>	1.830	<i>Bacillus coagulans</i>	1.726
R6	<i>Bacillus cereus</i>	2.142	<i>Bacillus cereus</i>	2.141
R8	<i>Bacillus cereus</i>	1.844	<i>Bacillus weihen-stephanensis</i>	1.763
R9	<i>Bacillus cereus</i>	2.038	<i>Bacillus cereus</i>	1.973
S7	<i>Bacillus cereus</i>	2.029	<i>Bacillus cereus</i>	1.935
S10	<i>Bacillus cereus</i>	2.080	<i>Bacillus cereus</i>	1.995

* Meaning of Score Values is more than or equal (\geq) to 2.3 highly probable species identification, is less than ($<$) 2.3 and is more than or equal (\geq) to 2.0 secure genus identification, probable species identification, is less than ($<$) 2.0 and is more than or equal (\geq) to 1.7 probable genus identification, and is less than ($<$) 1.7 not reliable identification.

結 論

篩選自豬隻糞便與牛瘤胃液之芽孢桿菌候選菌株，分別經培養基篩選、形成孢子、菌株 16S rDNA 核苷酸序列相似度比對、耐酸度 pH 2 與耐膽鹽 2% 與 MALDI-TOF MS 菌種鑑定等分析後，顯示源自牛瘤胃液之 R3 菌株為凝結芽孢桿菌 R3，且具有耐酸、耐膽鹽與形成孢子能力，具有進一步運用於畜禽飼料添加物使用之潛力。

誌 謝

試驗期間感謝畜產試驗所營養組同仁嚴世俊先生與蕭合芬小姐，協助試驗動物之照顧與採樣分析，讓試驗順利完成。

參考文獻

- 王錦盟、林幼君、陳致吟、劉芳爵。2020。飼糧中添加凝結芽孢桿菌對離乳仔豬生長性能、血液生化值及糞便微生物的影響。畜產研究 53：91-98。
- Abdel-Banat, B. M. A., H. Hoshida, A. Ano, S. Nonklang, and R. Akada. 2010. High temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast. Appl. Microbiol. Biotechnol. 85: 861-867.
- Biagi, G., A. Piva, M. Moschini, E. Vezzali, and F. X. Roth. 2006. Effect of gluconic acid on piglet growth performance, intestinal microflora, and intestinal wall morphology. J. Anim. Sci. 84: 370-378.
- Blottiere, H. M., B. Buecher, J. P. Galmiche, and C. Cherbut. 2003. Molecular analysis of the effect of short-chain fatty acids on intestinal cell proliferation. Proc. Nutr. Soc. 62: 101-106.
- Carlos, W. N., W. E. Oberdorf, L. Yang, J. A. Aas, B. J. Paster, T. Z. DeSantis, E. L. Brodie, D. Malamud, M. A. Poles, and P. Zhiheng. 2010. Design of 16S rRNA gene primers for 454 pyrosequencing of the human foregut microbiome. World J. Gastro. 16: 4135-4144.
- Cebeci, A. and C. Gurakan. 2003. Properties of potential probiotic Lactobacillus plantarum strains. Food Micro. 20: 511-518.
- De Angelis, M., S. Siragusa, M. Berloco, L. Caputo, L. Settanni, G. Alfonsi, M. Amerio, A. Grandi, A. Ragni, and M. Gobbetti. 2006. Selection of potential probiotic lactobacilli from pig feces to be used as additives in pelleted feeding. Res. Microbiol. 157: 792-801.
- Dieckmann, R., R. Helmuth, M. Erhard, and B. Malorny, 2008. Rapid classification and identification of salmonellae at the

- species and subspecies levels by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 7767-7778.
- Don, J., B. Mauvin, and P. Bryant. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 3 the Firmicutes in Georgia Athens, USA. pp. 1105-1135.
- Hillman, K., T. A. Murdoch, R. J. Spencer, and C. S. Stewart. 1994. Inhibition of enterotoxigenic *Escherichia coli* by the microflora of the porcine ileum, in an in vitro semicontinuous culture system. *Appl. Bacteriol.* 76: 294-300.
- Hofvendahl, K. and B. Hahn-Hagerdal. 2000. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme Microb. Technol.* 26: 87-107.
- John, R. P., K. M. Nampoothiri, and A. Pandey. 2007. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74: 524-534.
- Liong, M. T. and N. P. Shah. 2005. Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of *Lactobacilli* strains. *J. Dairy Sci.* 88: 55-66.
- Mussatto, S. I. and J. A. Teixeira. 2010. Lignocellulose as raw material in fermentation processes. In: Mendez-Vilas, A.(Ed.), current research, technology and education, Topics in applied microbiology and microbial biotechnology, Volumn 2 the Formatex Research Center, Badajoz. pp. 897-907.
- National center for biotechnology information (NCBI), U. S. national library of medicine. 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
- Patel, M. A., M. S. Ou, R. Harbrucker, H. C. Aldrich, M. L. Buszko, L. O. Ingram, and K. T. Shanmugam. 2006. Isolation and characterization of acid-tolerant, thermophilic bacteria for effective fermentation of biomass-derived sugars to lactic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 3228-3235.
- Saha, B. C. 2003. Hemicellulose bioconversion. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30: 279-291.
- van Veen, S. Q., E. C. J. Claas, and E. J. Kuijper. 2010. Highthroughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J. Clin. Microbiol.* 48: 900-907.
- Stenfors-Arnesen, L. P., A. Fagerlund, and P. E. Granum. 2008. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Rev.* 32: 579 -606.
- Wieser, A., L. Schneider, and J. Jung. 2012. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics- identification of microorganisms and beyond (mini review). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93: 965-974.
- Ye, L., X. Zhou, M. S. B. Hudari, Z. Li, and J. C. Wu. 2013. Highly efficient production of L-lactic acid from xylose by newly isolated *Bacillus coagulans* C106. *Bioresour. Technol.* 132: 38-44.

Selection and identification and characterization of *Bacillus coagulans* from pig excrement and cattle rumen fluid ⁽¹⁾

Fang-Chueh Liu ⁽²⁾⁽³⁾ and Yu-Chun Lin ⁽²⁾

Received: Jun. 2, 2021; Accepted: Sep. 24, 2021

Abstract

Bacillus belongs to gram-positive bacteria that can secrete extracellular enzymes, form of spores to progress into dormancy and less likely to receive impact from the external environment, which is also suitable a feed additive for livestock and poultry. The objective of the study is to select and identify *Bacillus coagulans* with acid and bile salt-resistant and sporulation ability from pig feces and cattle rumen fluid. The 10 candidate strains of *Bacillus coagulans* were selected by screen culture agar and medium from pig feces and cattle rumen fluid, respectively. The strains were heated to 45°C for 24 hours to induce sporulation, and further heated up to 90°C for 30 minutes to kill non-sporulation of strains and 16S rDNA nucleotides BLAST, in order to identify the DNA similar to *Bacillus coagulans*. Subsequently, 6 candidate strains of bacillus coagulan were selected. Then treatment with pH 2 and 2% bile salt culture medium for confirming the acid and bile salt-tolerance ability and use of MALDI-TOF MS were applied to identify microbial species. The results showed that 5 candidate strains (R6, R8, R9, S7S and S10) belonged to *Bacillus cereus* and only R3 strain belonged to *B. coagulans*. In addition, the *B. coagulans* sporulation ability of R3 exceeded 1×10^8 cfu/mL. In conclusion, the *B. coagulans* R3 isolated and identified from cattle rumen fluid possessed the characteristics of acid and bile salt-resistant and sporulation ability, which had the potential to be used as a feed additive in livestock ration.

Key words: *Bacillus coagulans*, Rumen fluid, Sporulation ability.

(1) Contribution No. 2679 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Nutrition Division, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(3) Corresponding author, E-mail: fcliu@mail.tlri.gov.tw.