

# 羊源芽孢益生菌的筛选与 Y5-39 菌株的鉴定 及其耐受性试验

郭云霞,郝庆红,朱宝成

(河北农业大学 生命科学院,河北 保定 071001)

**摘要:** 为了筛选对羔羊腹泻有治疗作用的益生菌。采用琼脂平板扩散法,以大肠杆菌(*Eacterium coli*)菌株为病源指示菌,从健康小尾寒羊的新鲜粪便中分离得到一株具有较强抑菌活性的拮抗细菌 Y5-39 菌株。对该菌株进行形态特征的观察和生理生化试验,结合 16 S rDNA 序列分析,并与相应种、属的菌株进行对比,表明 Y5-39 与芽孢杆菌 *Bacillus* 相应性状相近。用 BLAST 软件在 Genbank 数据库中对 Y5-39 菌株的序列进行比对,经分析 Y5-39 菌株与地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)的相似性水平达到 99.92%,且二者在所构建的系统发育树上处于同一个分支。最终鉴定 Y5-39 菌株为地衣芽孢杆菌。通过测定菌株 Y5-39 在人工胃液、不同 pH 值和不同浓度胆盐环境中的存活率,结果表明,此菌株对酸性环境、人工胃液和胆盐有很强的耐受力。

**关键词:** 羊; 益生菌; 鉴定; 耐受

中图分类号: S646 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2010)05-0206-05

## Screening and Identification of the Probiotics Strain Y5-39 Showing Antidysenteriae Effects from Sheep

GUO Yun-xia, HAO Qing-hong, ZHU Bao-cheng

(College of Life Science, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

**Abstract:** The research was to screening the probiotics curing diarrhea of lamb. A strain Y5-39 which had strong inhibition capability against *Eacterium coli* was obtained with the agar plate diffusion method from dung of healthy Han Sheep. Then the strain Y5-39 was characterized by morphological and culture features observation, physiological and biochemical experiments and 16 S rDNA sequence analysis. As the morphology characteristics and physiological and biochemical characteristics of the stain was similar to *Bacillus* and the similarity of the 16S rDNA sequences between strain Y5-39 and the type strain was up to 99.92%. According to the results, strain Y5-39 was finally identified as *Bacillus licheniformis*. The survival rates of bacteria after being inoculated in artificial gastric juice, acid and bile salt environment for different time was determined. The test results showed that Y5-39 showed stronger tolerance in bile salt, artificial gastric juice and acid environment.

**Key words:** Sheep; Probiotics; Identification; Tolerance

由肠道致病菌引起的腹泻类疾病,每年在全球导致约两百多万人死亡。而在动物生产中,肠道感染也是危害家畜健康的最常见疾病之一。临床治疗上通常使用抗生素类药物对这类疾病进行控制,由于会增加致病菌的耐药性而使腹泻症状更加严重。寻找对人畜有益无害的抗生素替代品已成为推动人畜健康向前发展的根本所在。益生菌能有序的定殖

于动物的粘膜、皮肤等表面或细胞之间,形成生物屏障,减少病原微生物的侵染、定殖<sup>[1]</sup>。其主要用于维持动物体内生态系统的平衡,即在幼龄家畜尚未建立起良好的肠道微生物区系的情况下,使用益生菌减少动物生产损失,益生菌还能够部分替代抗菌药物,通过帮助恢复动物体内生态系统的平衡,达到治疗动物疾病的目的<sup>[2]</sup>,具有使用安全、无残

收稿日期: 2010-08-01

基金项目: 石家庄市科学研究与发展计划项目(08150142A)

作者简介: 郭云霞(1978-),女,河北新乐人,实验师,硕士,主要从事农业微生物学研究。

通讯作者: 朱宝成(1962-),男,河北献县人,教授,博士生导师,主要从事农业微生物学研究。

留、不产生抗药性的优点。另外在饲料中添加能分泌纤维素酶、淀粉酶、葡聚糖酶等多种消化酶的益生菌,进而补充畜禽自身酶系不全或酶量的不足,提高畜禽对饲料的利用率。

目前,反刍动物在养殖业中所占的比例越来越大,益生菌是一种很好的饲用微生态制剂,研究其在反刍动物日粮中的应用,对畜牧业的发展及提高畜禽养殖的经济效益,具有极为重要的现实意义。本研究旨在能筛选出在羔羊体内能定殖,并对羔羊腹泻有明显治疗效果的益生菌,为益生菌在羔羊上的应用奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种与材料

致病性大肠杆菌( *Eacterium coli* ),由河北农业大学生命科学院制药工程系实验室保存。

### 1.2 样品的采集

从河北农业大学动物标本园采集健康小尾寒羊的新鲜粪便,装入塑料袋中,冷藏备用。

### 1.3 培养基

细菌用培养基: NA 培养基、NB 培养基。

生理生化鉴定用培养基: 其培养基依据鉴定手册中的方法进行配制<sup>[3]</sup>。

### 1.4 试验方法

1.4.1 羊源益生菌的分离 从冰箱中取出羊粪样,烘干,称取约 2 g 干燥羊粪样品,溶于 10 mL 无菌水中,捣碎,80℃ 水浴灭菌 20 min。用无菌水 10 倍梯度稀释,取适当稀释梯度的悬液在平板上涂布,每个稀释度涂布 3 个平板,37℃ 培养 30 h 左右获得单菌落。挑取形态不同的菌落分别在 NA 琼脂培养基上划线接种做纯培养,每个平板划 4 个菌,做好标记。

1.4.2 羊源益生菌的初筛和复筛 挑取不同形态的单菌落分别转接到大肠杆菌病原菌平板上与大肠杆菌进行生长对峙试验,观察是否有抑菌圈出现,进而筛选出产生抑菌圈的菌株。

从初筛 56 株拮抗细菌中选出抑菌活性较高的 31 株菌进行复筛。将挑选出来的菌株,以 NA 培养基活化后接种于 NB 培养基中,37℃,180 r/min 摇床培养 48 h 后,在混有大肠杆菌的病原菌平板上选择合适的间距打孔,取用 0.2  $\mu$ m 微孔滤膜过滤除菌的拮抗细菌发酵液约 15  $\mu$ L,37℃ 培养 24 h 后测量抑菌圈直径。

1.4.3 芽孢杆菌 Y5-39 菌株的种属鉴定 根据菌株的菌落形态特征、菌体形态特征、革兰氏染色性状、芽孢染色性状,有关生理生化鉴别试验,参照

《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[3]</sup>、《伯杰氏细菌鉴定手册》<sup>[4]</sup> 进行属和种的鉴定。

1.4.4 芽孢杆菌 Y5-39 菌株的生理生化鉴定 按照相应的属、种鉴定的有关内容进行的生理生化鉴定。试验要求分别进行了糖、醇类发酵、甲基红( M. R )、V-P、淀粉水解、硝酸盐还原、亚硝酸盐还原、产氨、脲酶、吡啶试验、苯丙氨酸脱氨酶、明胶液化、脂酶( Tween80 ) 等试验。

### 1.4.5 芽孢杆菌 Y5-39 菌株的 16 S rDNA 的鉴定

1.4.5.1 芽孢杆菌 Y5-39 菌株基因组 DNA 的提取及其 PCR 扩增和序列测定 取对数生长期菌株的发酵液( 培养 4 ~ 12 h ) 750  $\mu$ L 至 EP 管中,4℃ 下 10 000 r/min 离心 10 min。重复 3 次。用无菌水震荡洗沉淀 2 次( 洗残留的发酵液 ),4℃ 下 10 000 r/min 离心 10 min。加 400  $\mu$ L TE( Tris-HCl 和 EDTA 混合液 ) 溶解沉淀。液面下加入 20  $\mu$ L 溶菌酶( 50 mg/mL ),轻轻摇匀混合,置于 37℃ 温育过夜,间歇摇动 EP 管。加 400  $\mu$ L CTAB,65℃ 水浴 40 min。冷却至室温,加入 400  $\mu$ L 酚 - 氯仿( 1:1 ),轻轻混匀,4℃。移取上清,加入 350  $\mu$ L 氯仿,轻轻混匀,4℃ 下 12 000 r/min 离心 10 min。取上清,加入等体积冰冻异丙醇,轻轻摇匀,置于 -20℃ 冰箱 1 ~ 4 h,沉淀 DNA。取出后,12 000 r/min 离心 10 min。沉淀以 75% 乙醇洗 2 次,风干( 至完全去除乙醇气味 )。得到 DNA 粗品。

纯化 DNA。加入 200  $\mu$ L TE 溶解沉淀,液面下加入 RNA 酶( 20 mg/mL ),37℃ 保温 30 min。加入 400  $\mu$ L 酚 - 氯仿( 1:1 ),轻轻混匀,4℃。移取上清,加入 350  $\mu$ L 氯仿,轻轻混匀,4℃ 下 12 000 r/min 离心 10 min。取上清,加入 1/10 体积 2 mol/L 的 KAc 溶液和 2 倍体积的无水乙醇。置于 -20℃ 保藏 1 ~ 12 h。取出,4℃ 下 10 000 r/min 离心 10 min。用 75% 乙醇洗 2 次,风干。加 20 ~ 30  $\mu$ L TE 溶解沉淀,于 -20℃ 保藏。

凡是离心后吸取上清液的步骤,必须使用处理过的枪头。剪去枪尖 2 mm 左右,目的是减少对 DNA 片段的剪切力,提高收率。

Y5-39 的基因组 DNA 扩增引物为细菌的 16SrDNA 通用引物,即正引物 Primer A: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3',反向引物 PrimerB: 5'-CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA-3'。PCR 扩增的条件为:94℃ 预变性 5 min,然后 94℃ 变性 30 s,57℃ 退火 40 s,72℃ 延伸 90 s,共 32 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。得到的 PCR 产物经试剂盒纯化后,送上海生物工程技术服务有限公司测序。

### 1.4.5.2 芽孢杆菌 Y5-39 菌株 16 S rDNA 序列分

析及系统发育树绘制 利用 BLAST 方式将测定的供试菌株的 16 S rDNA 序列与 GenBank 中所有已测定的芽孢杆菌属 16 S rDNA 基因序列进行同源序列分析比对, 选取序列相似性高的菌株用 ClustalX (1.8) 软件对比序列的相似性进行分析, 并利用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树。

#### 1.4.6 芽孢杆菌 Y5-39 菌株的耐受试验

1.4.6.1 pH 耐受试验 用磷酸氢二钠 - 柠檬酸缓冲液调节 NB 液体培养基至所要求的 pH, 分别向 150 mL NB 液体培养基中接入 2 mL 菌液, 37℃, 培养 12 h, 分别以对应自然 pH 的空培养基为空白, 测定培养物的 OD<sub>600</sub>。以 600 nm 下的吸光值代表样品中的相对菌体量。

1.4.6.2 芽孢杆菌 Y5-39 菌株胆盐耐受试验 将益生菌 Y5-39 分别接种到胆盐浓度分别为 0, 0.1%, 0.2%, 0.3% 的 NB 培养基中, 37℃ 培养 24 h, 然后梯度稀释, 取 10<sup>-4</sup> 梯度刮板计数。

1.4.6.3 芽孢杆菌 Y5-39 菌株人工胃液耐受试验 将益生菌 Y5-39 按照 1% 的接种量分别接种到 pH 为 2.0, 3.0 和 4.0 的人工胃液中, 37℃, 180 r/min 培养, 分别于 0.0, 0.5, 1.5, 2.5, 3.5 h 取相同 pH 的培养液进行菌体计数。以相同 pH、未接种的人工胃液为空白, 以 620 nm 下的吸光值代表样品中的相对菌体量。

## 2 结果与分析

### 2.1 拮抗细菌的初筛

将分离到的不同特征的耐胆酸盐单菌落, 经纯化后分别与大肠杆菌进行生长对峙试验, 从中分离到 56 株具有拮抗作用的芽孢细菌。

### 2.2 拮抗细菌的复筛

从 56 株初筛菌株中选取 31 株不同形态的活性较高的菌株进行复筛, 共分离到具有较高拮抗作用的菌株 8 株, 其抑菌圈直径均大于 11 mm, 见表 1。其中菌株 Y5-39 抑菌圈直径在 20 mm 左右, 能有效的抑制大肠杆菌的生长。

表 1 复筛抑菌试验结果

Tab.1 The results of antagonistic activity from secondary screening

菌株 Strains	抑菌圈平均 直径/mm Antagonistic average diameters	菌株 Strains	抑菌圈平均 直径/mm Antagonistic average diameters
Y6-2	11.5	Y5-39	20.0
Y5-3	19.0	Y5-25	11.5
Y5-22	16.5	Y5-59	13.0
Y5-36	12.0	Y4-73	18.0

### 2.3 拮抗细菌 Y5-39 菌株的种属鉴定

Y5-39 菌株菌落特征为淡黄色大菌落, 圆形, 不透明, 边缘波状, 表面无皱褶, 湿润, 无隆起度。在显微镜下观察 Y5-39 菌株呈杆状, 单生, 革兰氏染色呈阳性, 菌体长约 1.5 μm 宽约 0.5 μm, 散在或成对, 芽孢间生, 呈椭圆形, 稍膨大长约 0.7 μm, 宽约 0.3 μm。

### 2.4 拮抗细菌 Y5-39 菌株的生理生化鉴定试验结果

记录的结果以该试验现象终点现象为准 (表 2)。糖、醇发酵试验和氨基酸脱羧酶试验涉及到不同的培养基, 单列表记录结果。通过对照相关文献, 菌株的菌体、菌落形态及生理生化结果, 初步判断 Y5-39 菌株为芽孢杆菌属的地衣芽孢杆菌。

表 2 拮抗细菌 Y5-39 菌株生理生化特征

Tab.2 The results of physiological and biochemical experiments of antagonistic strain Y5-39

项目 Items	结果 Results	项目 Items	结果 Results
接触酶试验	+	V-P 试验	+
荧光色素试验	淡黄色荧光, +	吡啶试验	+
淀粉水解试验	+	明胶液化试验	部分液化, +
脂酶 (Tween80) 试验	+	脲酶试验	-
苯丙氨酸脱氨酶	-	蔗糖发酵试验	+
产氨试验	+	葡萄糖发酵试验	+
硝酸盐还原试验	橙色, +	麦芽糖发酵试验	+
亚硝酸盐还原试验	-	乳糖发酵试验	+
甲基红 (M, R) 试验	+	甘露醇发酵试验	+

注: +, 表示阳性; -, 表示阴性。

Note: +, Positive; -, Negative.

### 2.5 拮抗细菌 Y5-39 菌株 16 S rDNA 序列的同源性鉴定

对提取的 Y5-39 菌株基因组 DNA 扩增测序其 16 S rDNA 序列。将测定的 Y5-39 菌株的 16 S rDNA 与 GenBank 中所有已测定的原核生物的 16 S rDNA 序列进行比对, 使用 PHVLI program package 软件处理所得到的数据, 得到该菌株与相关菌株的进化距离, 并构建了系统发育树。构建系统发育树所用的相关菌株 16 S rDNA 序列的登陆号及与该菌株的相似性见表 3, 系统发育树见图 1。

由于菌株 Y5-39 的 16 S rDNA 序列与芽孢杆菌属的相应标准菌株同源性大部分在 98% 左右, 结合该菌株的形态、生理生化特征, 对照《伯杰氏系统细菌学手册》上相应种、属特征, 初步判断供试菌株属芽孢杆菌属 (*Bacillus*)。同时, 由于菌株 Y5-39 与地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 的标准菌株 ATCC 14580 的同源相似性最高, 达到 99.92%, 鉴定菌株 Y5-39 为地衣芽孢杆菌。

表 3 菌株 Y5-39 与参比菌株的 16 S rDNA 序列相似性  
Tab.3 Similarity of the sequences of 16 S rDNA  
between strain Y5-39 and reference strains

序列号 Sequence number	种名 Species name	菌株号 Strain number	相似性/% Similarity
BFAF004589	Anoxybacillus flavithermus	DSM 2641	94.61
EF433406	Bacillus amyloliquefaciens	NBRC 15535	98.32
AB363731	Bacillus atrophaeus	NBRC 15539	98.06
DQ993671	Bacillus axarquiensis	LMG 22476	98.23
EF433410	Bacillus licheniformis	ATCC 14580	99.92
DQ993672	Bacillus malacitensis	CECT 5687	98.23
AB363735	Bacillus mojavensis	NBRC 15718	98.32
AB271744	Bacillus subtilis	NBRC 13719	98.49
AB021198	Bacillus vallismortis	DSM 11031	97.98

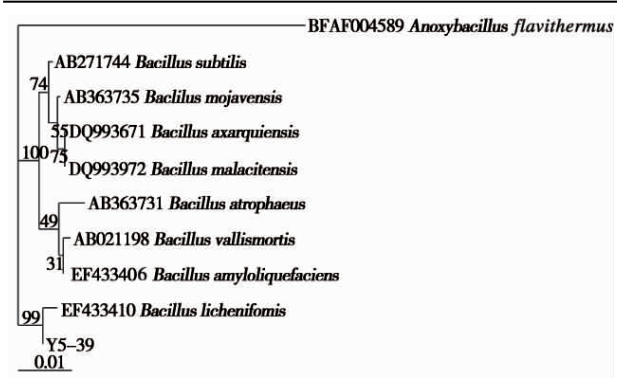


图 1 依据 16 S rDNA 序列构建的拮抗细菌 Y5-39 菌株及相关菌株的系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree based on 16 S rDNA sequences showing relationship between antagonistic strain Y5-39 and related strains

2.6 芽孢杆菌 Y5-39 菌株的耐受试验

2.6.1 芽孢杆菌 Y5-39 菌株 pH 值耐受试验 羊肠道益生菌 Y5-39 在 pH 2.0,3.0 和 4.0 的 NB 液体培养基中培养 12 h,它们都有很高 OD<sub>600</sub> 值(图 2),即它们有很高的菌体数,表明它们在酸性条件下可以很好的生长,对酸性环境有较强的耐受性。

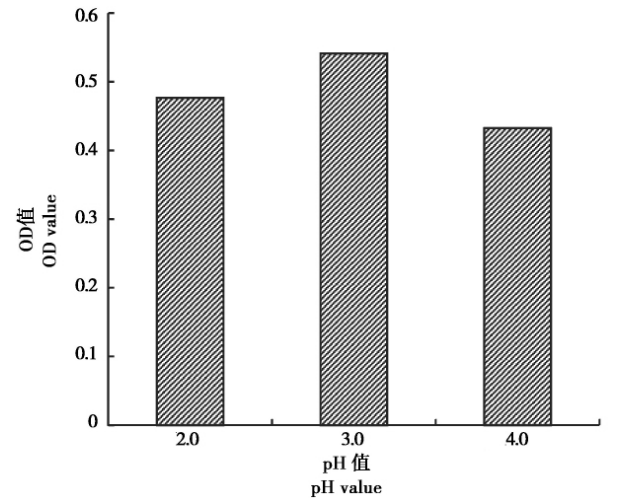


图 2 不同 pH 对菌株 Y5-39 生长的影响  
Fig.2 The growth of strain Y5-39 in different pH

2.6.2 芽孢杆菌 Y5-39 菌株胆盐耐受试验 由图 3 可知,Y5-39 在 0.1% 胆盐浓度下 10<sup>-4</sup> 梯度有 150 个菌落,在 0.2% 胆盐浓度下有 52 个菌落,0.3% 的胆盐浓度下,有 146 个菌落。益生菌的菌落数虽与对照相比减少很多,但随着胆盐浓度的增加,菌落数没有减少,反而波动性的增加,这表明 Y5-39 能耐胆盐,能在一定浓度的胆盐环境中生长。

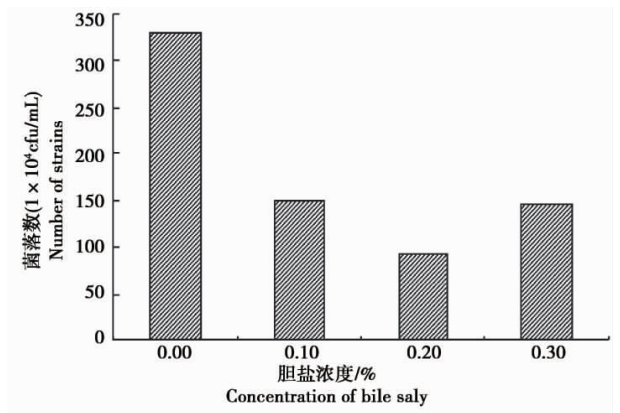


图 3 胆盐浓度对菌株 Y5-39 生长的影响  
Fig.3 The growth of strain Y5-39 in different concentrations of bile salt

2.6.3 芽孢杆菌 Y5-39 菌株人工胃液耐受试验 益生菌以口服经过胃肠环境,益生菌面临首要障碍是低 pH 胃液内容物。通常胃酸的 pH 值在 3.0 左右,由图 4 可知,益生菌的菌落数均不为零,说明它们均能耐受 pH2.0 和 pH3.0 的胃液环境。益生菌通过胃肠的过程中,食糜作为一种保护剂使得益生菌受到伤害的程度减小,一旦这些菌在穿越胃和十二指肠的过程中能存活下来,随同食糜进入回肠和盲肠的细菌会急剧增加。因此,此株益生菌通过胃存活的可能性较大。

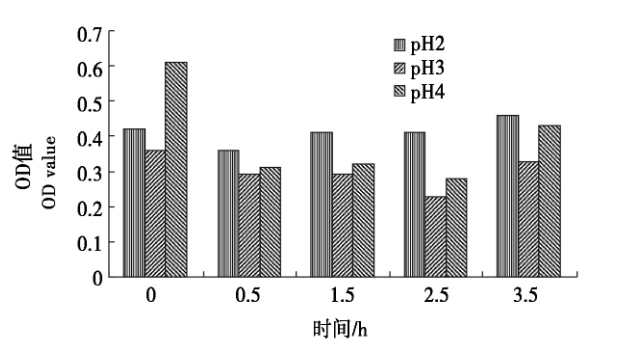


图 4 菌株 Y5-39 在不同 pH 值的人工胃液中存活情况  
Fig.4 The growth of strain Y5-39 in different pH of gastric juice

3 讨论

益生菌作为天然饲料添加剂对动物饲养和环境改善所起的显著作用,已经越来越引起人们的重视。拮抗作用是筛选益生菌等微生物制剂的有效途径,

拮抗菌等微生物制剂不仅可以大量减少抗生素的使用,还可改善养殖环境,提高动物的非特异性免疫能力,促进动物生长。本研究从羊粪中筛选出有抑菌活性的 Y5-39 菌株,经复筛可以看出,此菌生长的代谢产物类细菌素中含有抑菌活性物质,能发挥更好的抑菌作用。益生菌在生产和应用之前必须进行可靠的菌种鉴定,给出确切的分类定位。经形态学、生理生化、16 S rDNA 序列分析,得出拮抗细菌 Y5-39 为地衣芽孢杆菌。

芽孢杆菌是肠道内普遍存在的一类好氧性细菌,它们能在肠道定殖,能分泌活性很强的蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶<sup>[5]</sup>,有助于降解植物性饲料中某些复杂的碳水化合物,使动物空肠内容物乳酸、丙酸和乙酸等含量增加,降低 pH 值,消耗肠道内的氧气,造成厌氧环境。为了保证所分离菌株的安全性、定殖性和可靠性,故选用从健康小尾寒羊的新鲜粪便中分离菌株。大量试验证明,添加益生菌可以缓解采食后瘤胃内 pH 值降低,24 h 内可使瘤胃内环境稳定。这对羊瘤胃内纤维素分解菌有非常重要的意义<sup>[6]</sup>。

胃肠道作为动物的一个消化吸收的重要器官,其微生物区系的平衡对维持动物机体的健康起着重要的作用。益生菌经口服进入动物机体,必须先经过胃然后到小肠定殖,因此,益生菌只有能够抵抗较强的酸性环境和较高浓度的胆盐才能使益生菌能在肠道中存活和正常发挥作用。羊小肠内胆盐的浓度在 0.03% ~ 0.3% 范围内波动<sup>[7]</sup>。体外试验表明,Y5-39 能通过胃肠道,并能在 0.3% 胆盐、pH2.0 人工胃液环境中成活。

羔羊的瘤胃还未发育完全,未有微生物定殖,或

定植其中的微生物区系不稳定。在该阶段羔羊的饲料中添加益生菌,有利于提高其生长速度,增强机体的抵抗力<sup>[8-10]</sup>。针对反刍家畜益生菌的应用菌种类别以及应用效果方面的研究还不完善,在动物营养物质代谢及微生物代谢关系机理方面的研究还很缺乏,尤其是羊的应用效果报道更少,因此,羊源益生菌 Y5-39 菌株的筛选,为今后益生菌在羊上的应用奠定良好的基础。

#### 参考文献:

- [1] 袁秀丽,吕嘉彬,韩迪,等. 益生菌制品的研究进展[J]. 中国乳品工业,2010,38(4): 46-49.
- [2] 孙笑非,温俊. 益生菌调节肠道菌群的作用机制及研究进展[J]. 饲料研究,2010(4): 56-58.
- [3] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社,2001.
- [4] Buchanan R E, Gibbons N E. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology [M]. 北京: 科学出版社,1984.
- [5] 周映华,李秋云,陈娟,等. 不同芽孢杆菌生理功能比较[J]. 饲料博览,2007(19): 47-49.
- [6] 任文军. 益生菌饲料添加剂在牛羊饲养上的应用[J]. 畜禽业,2004(2): 22-23.
- [7] Ewing W N. The living gut [M]. Nottingham: University of Nottingham,1994.
- [8] 钞海峰. 添加益生菌对羔羊增重效果的影响[J]. 畜禽业,2004(5): 8-9.
- [9] 王海霞. 饲料中添加益生菌和 NSP 酶对羔羊增重效果的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医,2005(9): 56-57.
- [10] 王红,姚学军,张震东. 浅谈国内外益生菌在畜禽养殖中的应用[J]. 畜牧兽医,2010(1): 32-33.