

产酸芽孢杆菌的筛选与生物学特性研究

张建新,李梦,郭祥瑞,黄梦媛,陈永艳,冯军厂,常绪路

(河南师范大学 水产学院,河南 新乡 453007)

摘要:使用改良 MRS 培养基从养殖池塘底泥中分离得到一株具有产酸能力的芽孢杆菌,命名为 DN-5.通过形态观察,生理生化指标测定,扫描电镜观察,16S rDNA 同源序列比对和 *gyrB* 基因及系统发育树分析,确定该菌株为副地衣芽孢杆菌(*Bacillus paralichiformis*).对该菌株发酵液中的代谢产物进行气相-质谱分析,发现 DN-5 可产生丁酸、丙酸和乙酸等短链脂肪酸.生物学特性研究表明, DN-5 对嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)均有良好的抑制作用,抑菌圈直径分别达 17.40 mm、9.77 mm 和 21.03 mm.同时,对菌株 DN-5 进行耐热、耐酸和耐胆盐处理,发现 DN-5 具有较强的耐热性能和良好的耐酸、耐胆盐能力.对庆大霉素、链霉素、氨苄青霉素等抗生素均表现为敏感(S).DN-5 既具有乳酸菌产酸的特性,又具有芽孢杆菌的优势,且具有很好的安全性,在水产养殖中具有广阔的应用前景.

关键词:产酸;副地衣芽孢杆菌;菌株筛选;抗逆性

中图分类号:S96

文献标志码:A

中国作为世界上最主要的水产养殖国家之一,由传统粗放型养殖方式转入集约式养殖,间接导致水产动物各种疾病的暴发,给水产养殖业带来严重的经济损失^[1-2].为解决这一问题,人们使用抗生素、化学消毒剂等药物.抗生素导致病原菌产生耐药性,造成环境污染和食品安全等问题^[3].目前,益生菌作为抗生素的替代品越来越多地应用于水产养殖,对控制水产动物疾病和改善水质起到重要作用.在水产养殖中常用的益生菌有芽孢杆菌,乳酸菌,光合细菌和酵母菌等,其中,芽孢杆菌具有产抗菌物质的能力,抗逆性强,且具有环境友好性^[4].此外,产酸芽孢杆菌具有很强的产孢能力,具有耐高温和稳定的储存特性,还具有产乙酸、丙酸、丁酸等短链脂肪酸的益生特性.这类芽孢杆菌还具有降低肠道中的 pH 值,抑制肠道中有害细菌的生长,维持肠道功能^[5]等作用.本研究从养殖池塘底泥中分离得到 1 株产酸芽孢杆菌,对其进行了鉴定和生物学特性研究,为其以后在水产养殖中的应用提供科学数据.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集

分离菌种的样品采集于河南省新乡市河南师范大学的养殖池塘底泥.

1.1.2 培养基

改良 MRS 培养基^[6]:胰蛋白胨 1.00 g,葡萄糖 2.00 g,牛肉膏 1.00 g,酵母膏 0.50 g,0.10 mL 吐温 80, K₂HPO₄ 0.20 g,乙酸钠 0.50 g,柠檬酸二铵 0.20 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.058 g, MnSO₄ · 4H₂O 0.025 g, α-甲基葡萄糖苷 1.00 g,山梨酸钾 0.10g,生物素 0.01 g,天门冬氨酸 0.01 g,蒸馏水 100 mL,调 pH 值 6.2~6.6, 115℃ 灭菌 20 min. YPD 培养基:胰蛋白胨 1.00 g,酵母粉 0.50 g,葡萄糖 1.00 g,蒸馏水 100 mL, pH 7.2~7.4.

收稿日期:2019-04-25;修回日期:2021-06-30.

基金项目:河南省重点科技攻关(212102110106;202102110106;182102110011);河南省自然科学基金(182300410098).

作者简介:张建新(1974-),男,山东德州人,河南师范大学副教授,博士,研究方向为水产微生物, E-mail:041070@htu.edu.cn.

通信作者:常绪路, E-mail:changxulu@163.com.

1.2 仪器和试剂

DK-8D 电热恒温水槽(江苏恒实科技有限公司),ZDP-2270 灭菌锅(上海智成分析仪器有限公司),MJ-160 恒温培养箱(上海习仁科学仪器有限公司),胰蛋白胨(北京奥博星生物技术有限责任公司),葡萄糖(上海展云化工有限公司),酵母粉(天津市德恩化学试剂有限公司).气相色谱与质谱联用仪(GC-MS);安捷伦科技公司,型号 6890-5973N,配备 DB-FFAP 毛细管色谱柱(10122-3232JW).

1.3 方法

1.3.1 菌株的分离

称取底泥样品 1.00 g,放到盛有玻璃珠的 250 mL 锥形瓶中,加入 99 mL 无菌水,封口,放置摇床培养箱中震荡培养 20~30 min,静置,将上清液转移至 37 °C 恒温培养箱中,培养 5~7 d,期间不断摇晃;取 4 mL 的样品于试管中,80 °C 水浴 20 min,静置 2~3 min,进行 10,100,1 000 倍浓度梯度稀释,静置后分别吸取 0.2 mL 上清液均匀涂布分离固体平板,37 °C 培养 24 h,每个稀释梯度做 3 个重复.挑取单个菌落,进行革兰氏染色,并在显微镜下观察菌落的形态,将革兰氏阳性、杆状的菌株筛选出来,在 YPD 固体培养基上纯化 3 次,斜面保存^[6].

1.3.2 菌株的鉴定

(1)生理生化鉴定:对筛选得到的菌株进行生理生化鉴定,参照《常见细菌系统鉴定手册》^[6]和《伯杰细菌鉴定手册》^[7].包括革兰氏染色试验、接触酶试验、吲哚试验、甲基红试验、柠檬酸利用试验、淀粉水解试验等^[8-10].

(2)16S rDNA 鉴定:对 DN-5 菌株进行 16S rDNA 扩增,所用引物为 16S rDNA 通用引物 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3').用试剂盒提取细菌总 DNA,PCR 反应体系(25 μ L):12.5 μ L Premix Taq,模板 1 μ L,上下游引物 27F 和 1492R 各 1 μ L,最后用 ddH₂O 补足至 25 μ L.PCR 扩增的程序为 94 °C,预变性 10 min;94 °C 变性 1 min,55 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1 min,循环 33 次,72 °C 延伸 10 min,12 °C 保存.扩增后的 PCR 产物,经琼脂糖凝胶电泳后,将目的条带送南京金斯瑞公司测序,所测得的序列登录 GenBank 进行 16S rDNA Blast 序列比对.

(3)*gyrB* 基因鉴定:引物设计,参考文献[11]研究设计特异性引物 F1(5'-TGGAGATACGGAAGT-GACGGGA-3')和 R1(5'-AGAGCCACCTCGACTGTAATGC-3'),引物的扩增长度为 303 bp,由南京金斯瑞有限公司合成.根据合成的引物,设置 PCR 反应体系(50 μ L):25 μ L Premix Taq,模板 1 μ L,上下游引物 F1 和 R1 各 1 μ L,最后用 ddH₂O 补足至 50 μ L.反应条件:94 °C 预变性 4 min,94 °C 变性 1 min,60 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 2 min,30 个循环后,72 °C 延伸 10 min.

1.3.3 产酸能力鉴定

菌株发酵产物(短链脂肪酸)分析:首先将过夜培养的菌液涂布于溴甲酚紫培养基,菌落边缘变黄,初步鉴定菌株产酸.其次将产酸菌株接入液体培养基,37 °C 培养 24 h,8 000 r·min⁻¹离心 10 min,用乙酸乙酯溶剂萃取离心后的上清液,再进行蒸发,0.22 μ m 的膜过滤后,用气相色谱与质谱联用仪(GC-MS)测定含量.

GC-MS 参数为:分流进样,分流比 50:1;进样口温度 250 °C;柱温箱升温程序:初始温度为 60 °C,以 5 °C·min⁻¹的速度升温至 220 °C,保留 2 min.载气:高纯 He;流速:恒流,1 mL·min⁻¹;四级杆温度:150 °C;离子源:EI 源;离子源温度:230 °C;接口温度:280 °C;MS 质量扫描范围(m/z):30~550.

1.3.4 抑菌试验

配置 200 mL 的 YPD 固体培养基,待冷却至 45 °C 时,按体积分数 1% 的接种量分别加入过夜培养的致病菌大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和嗜水气单胞菌,混匀,倒入无菌培养皿,每个平板倒 15~20 mL.待平板凝固后,在平板中加入 10 μ L 的地衣芽孢杆菌,分别设置 3 个重复,37 °C 培养 24 h,测量抑菌圈直径.

1.3.5 耐受胆盐能力

在 YPD 液体培养基中加入质量分数为 0.03%、0.05%、0.1%、0.2%、0.3% 的胆盐,以不加胆盐的培养基作为对照,按照体积分数 10% 的接种量接入副地衣芽孢杆菌悬液,37 °C 摇床培养 24 h,计算成活率.

1.3.6 热稳定研究

在已灭菌的 6 支试管中分别加入 5 mL 活化的菌液,将试管分别置于 37 °C、50 °C、60 °C、70 °C、80 °C 和

90 °C 的恒温水浴锅中水浴 2 h, 以 37 °C 的作为对照, 2 h 后取出菌液, 采用平板稀释计数法计数, 并计算成活率。

1.3.7 耐酸试验

配置 YPD 液体培养基, 分别调 pH 值为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0, 将过夜培养的菌液加入到不同 pH 值的液体培养基中, 37 °C, 170 r · min⁻¹, 24 h, 采用平板菌落计数法计数, 并计算存活率,

$$\text{活菌数} = \text{平均菌落数} \times \text{稀释倍数} \times 10.$$

1.3.8 抗生素敏感性

菌种活化后, 用灭菌的生理盐水将菌液稀释为 1.0×10^6 CFU/mL 的菌悬液, 然后吸取 100 μ L 涂布于 YPD 平板上, 待表面稍干后, 放入抗生素药敏纸片, 每种抗生素都需做 3 个重复, 37 °C 培养 24 h, 测定 3 个抑菌圈直径的平均值。

2 结果与分析

2.1 分离菌株的鉴定

2.1.1 形态学鉴定

菌株 DN-5 在 YPD 培养基上的菌落直径 3~4 mm (图 1), 菌落扁平, 边缘整齐, 呈土黄色, 中间发白, 不透明, 表面湿润。

2.1.2 菌株的生理生化鉴定

将菌株 DN-5 鉴定结果 (见表 1) 与《伯杰细菌鉴定手册》和《常见细菌系统鉴定手册》对照, 发现 DN-5 菌株为革兰氏阳性菌, 在 37 °C 和 50 °C 生长良好, 兼性厌氧菌, 在电镜下观察呈杆状 (如图 2), 初步确定为芽孢杆菌属。



图1 DN-5菌落形态

Fig. 1 Colony morphology of DN-5

表 1 菌株 DN-5 的生理生化特征

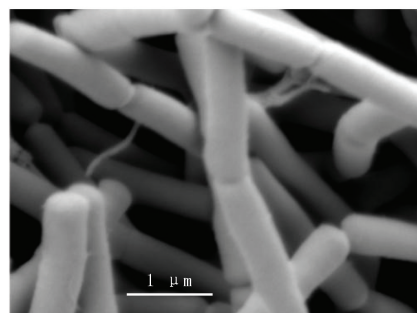
Tab. 1 The physiological and biochemical characteristics of the strain DN-5

项目	结果	项目	结果	项目	结果	项目	结果
革兰氏染色	+	柠檬酸盐利用	+	15 °C	-	10% NaCl	+
厌氧生长	+	卵黄卵磷脂酶	+	37 °C	+	木糖	+
甲基红	+	硫化氢	+	50 °C	+	甘露醇	+
吲哚	+	水解: 淀粉	+	pH 值 5.7 生长	+	葡糖糖	+
V-P 测定	+	纤维素	+	pH 值 6.8 生长	+	阿拉伯糖	+
接触酶	-	酪蛋白	+	7% NaCl	+		

注: “+”表示阳性; “-”表示阴性。



(a) 菌株DN-5的革兰氏染色(100×)



(b) 菌株DN-5的扫描电镜(10 000×)

图2 菌株DN-5的光学显微镜和扫描电镜观察

Fig. 2 Observation of strain DN-5 under microscope and scanning electron microscope

2.1.3 分子鉴定

2.1.3.1 16S rDNA 鉴定结果

以菌株 DN-5 的 DNA 为模板,进行 PCR 扩增,扩增后的 PCR 产物,经琼脂糖凝胶电泳,大约在 1 500 bp 左右出现明亮的条带,与预期的结果一致;将目的条带送去南京金斯瑞公司测序,对菌株 DN-5 进行 16S rDNA 序列分析比对,并用 Mega 6.0 软件构建系统发育树(图 3)。菌株 DN-5 与 *B. paralichiformis* G-1 和 *B. sonorensis* KCTC 13918 聚在一支,初步确定该菌株为副地衣芽孢杆菌(*B. paralichiformis*), GenBank 序列号为 MW819909。

2.1.3.2 *gyrB* 鉴定结果

以菌株 DN-5 的 DNA 为模板,使用特异性引物进行 PCR 扩增,扩增后的 PCR 产物,经琼脂糖凝胶电泳,大约在 300 bp 左右出现明亮的条带(如图 4),与预期的结果一致;将目的条带送去南京金斯瑞公司测序,对菌株 DN-5 进行 16S rDNA 序列分析比对,从 GenBank 中挑选与菌株 DN-5 相似度高的几株芽孢杆菌属的菌株,使用 MEGA 6.1 软件,构建菌株的系统发育树(如图 4),分离的菌株 DN-5 与副地衣芽孢杆菌(*B. paralichiformis* FA)聚在一起,GenBank 序列号为 MW857083。结合形态特征、生理生化试验和 16S rDNA 分析,确定菌株为副地衣芽孢杆菌(*B. paralichiformis*)。

2.2 菌株 DN-5 的产酸分析

对菌株 DN-5 的产酸进行分析,因为溴甲酚紫遇酸变黄,可以看到在平板菌落的周围产生了明显的黄色晕圈(图 5),证明该菌株具备一定的产酸能力。

对菌株 DN-5 的发酵产物利用气相-质谱联用仪进一步检测,根据出峰的先后顺序和保留时间,可以判断发酵产物含有乙酸、丙酸、丁酸、戊酸和己酸等短链脂肪酸,其中乙酸、丙酸和丁酸含量较高(图 6)。

2.3 抑菌试验

副地衣芽孢杆菌可以抑制病原菌嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*)、大肠杆菌(*E. coli*)和金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)的生长,根据抑菌圈的大小判断抑菌作用的强弱,抑菌试验结果为:嗜水气单胞菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径分别是(17.4±1.44) mm, (9.77±0.49) mm, (21.03±0.95) mm。副地衣芽孢杆菌对金黄色葡萄球菌的抑制作用最强,对大肠杆菌的抑

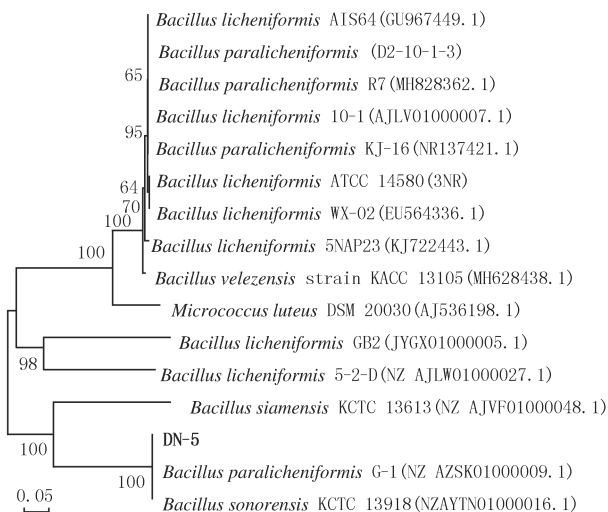


图3 基于分离菌株DN-5 16S rDNA序列构建系统发育进化树
Fig. 3 The developmental gene phylogenetic tree of DN-5 based on 16S rDNA

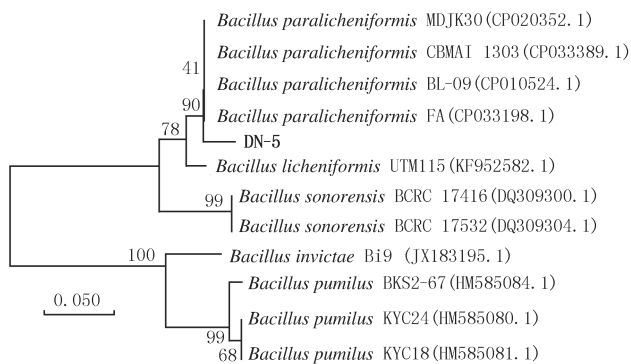


图4 基于gyrB构建菌株DN-5的系统发育进化树
Fig. 4 The developmental gene phylogenetic tree of DN-5 based on gyrB

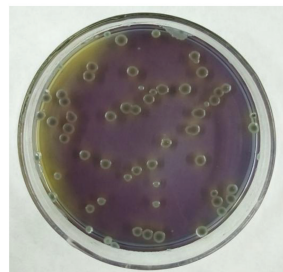


图5 菌株DN-5产酸平板

Fig. 5 Acid production plate of strain DN-5

制作用相对较弱。

2.4 耐胆盐试验结果

动物的肠道可以适应质量分数为 0.03% ~ 0.3% 的胆盐环境^[12], 因此, 菌株对胆盐浓度的耐受能力是一个重要的检测指标, 以不添加胆盐的作为对照, 胆盐浓度对菌株的存活率影响(见表 2), 该菌株在含有质量分数为 0.1% 的胆盐液体培养基中培养 24 h, 存活率

为 79.4%; 胆盐质量分数为 0.3% 时, 活菌数依然达到 10^8 CFU/mL, 存活率为 52.4%, 说明菌株具有良好的耐胆盐性能, 可以适应动物肠道内的生存环境。

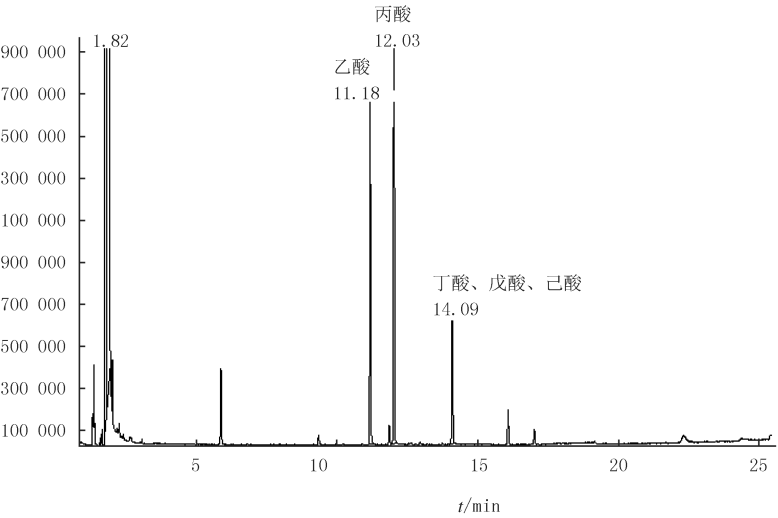


图6 菌株DN-5发酵产物的质谱图

Fig.6 Mass spectrum of fermentation product of strain DN-5

表 2 菌株 DN-5 在不同胆盐浓度中的存活情况

Tab. 2 Survival of strain DN-5 in different bile salt concentrations

胆盐质量 浓度/%	活菌数 (10^8 CFU/mL)	存活率/%	胆盐质量 浓度/%	活菌数 (10^8 CFU/mL)	存活率/%	胆盐质量 浓度/%	活菌数 (10^8 CFU/mL)	存活率/%
0	7.40 ± 0.75^a	100	0.05	4.96 ± 0.14^{bc}	67.0	0.20	4.11 ± 0.37^{cd}	55.6
0.03	5.88 ± 0.58^b	79.4	0.10	4.84 ± 0.12^{bc}	65.4	0.30	3.88 ± 0.27^d	52.4

注: 相同字母代表没有显著差异, 不同的字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

2.5 耐热试验结果

饲料的制作通常要求在 90 °C 高温环境下, 因此, 菌株能够在高温条件下存活, 对菌株进行热处理之后的存活率(见表 3), 该菌株在 70 °C 的条件下水浴 20 min 和 30 min, 其存活率分别达到 85.48% 和 75.15%; 80 °C 处理之后, 菌株的成活率均在

表 3 菌株 DN-5 耐热试验

Tab. 3 Heat resistance test of strain DN-5

组 别	处理时间 20 min		处理时间 30 min	
	存活率/%	活菌数(10^8 CFU/mL)	存活率/%	活菌数(10^8 CFU/mL)
37 °C	100	6.96 ± 0.15^a	100	6.48 ± 0.46^a
70 °C	85.48	5.95 ± 0.17^b	75.15	4.87 ± 0.33^b
80 °C	68.24	4.75 ± 0.21^c	68.67	4.45 ± 0.21^{bc}
90 °C	63.51	4.42 ± 0.36^c	60.49	3.92 ± 0.32^c

注: 相同字母代表没有显著差异, 不同的字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

68% 以上; 90 °C 高温处理之后, 菌株成活率分别为 63.51% 和 60.49%。因此, 该菌株在高温环境下, 仍具有很好的耐热性, 可以应用于饲料的加工。

2.6 耐酸试验结果

副地衣芽孢杆菌耐酸试验结果见表 4, 该菌株经 pH 6.0 处理 24 h 后, 存活率为 97.67%, 经 pH 5.0 处理 24 h 后, 存活率为 83.72%; 经 pH 4.0 处理 24 h 后, 存活率为 50.78%; 经 pH 3.0 处理 24 h 后, 存活率为 39.92%; 此时活菌数为 10^8 CFU/mL 数量级, 经 pH 6.0 处理 24 h 后, 活菌数下降了一个数量级。

2.7 抗生素敏感试验结果

本试验选择庆大霉素、链霉素、红霉素、利福平、万古霉素、卡那霉素、克林霉素、阿莫西林、四环素、氨苄青霉素 10 种抗生素,抗菌药物敏感试验结果显示(如表 5),除对利福平、红霉素、万古霉素表现为不敏感(R),对庆大霉素、链霉素、卡那霉素、克林霉素、阿莫西林、四环素、氨苄青霉素均表现为敏感(S),均不产生耐药性,可认为是安全性菌株。

表 4 菌株 DN-5 耐酸试验结果

Tab. 4 Acid resistance test results of strain DN-5

pH	活菌数(10^8 CFU/mL)	存活率/%	pH	活菌数(10^8 CFU/mL)	存活率/%	pH	活菌数(10^8 CFU/mL)	存活率/%
7.0	5.16 ± 0.16^b	100	3.0	2.06 ± 0.43^d	39.92	5.0	4.32 ± 0.41^c	83.72
2.0	0.57 ± 0.35^a	11.05	4.0	2.62 ± 0.24^d	50.78	6.0	5.04 ± 0.10^b	97.67

注:相同字母代表没有显著差异,不同的字母表示差异显著($P < 0.05$)。

表 5 菌株 DN-5 的抗生素敏感性

Tab. 5 Antibiotic sensitivity of strain DN-5

抗生素名称	抑菌圈直径/mm	敏感度	抗生素名称	抑菌圈直径/mm	敏感度	抗生素名称	抑菌圈直径/mm	敏感度
庆大霉素	30.8 ± 1.3	S	卡那霉素	32.4 ± 1.2	S	万古霉素	1.3 ± 0.2	R
链霉素	18.9 ± 1.2	S	阿莫西林	25.2 ± 0.8	S	克林霉素	20.0 ± 0.8	S
利福平	2.6 ± 0.8	R	四环素	26.5 ± 0.4	S			
红霉素	10.2 ± 1.4	R	氨苄青霉素	25.1 ± 1.0	S			

注:S为敏感;R为耐药。

3 讨论

芽孢杆菌作为常见的益生菌广泛分布在动物肠道、土壤和江河湖海中^[13]。本研究从池塘底泥中分离得到 1 株产酸芽孢杆菌,结合显微镜形态观察、生理生化指标测定、电镜观察、16S rDNA 同源序列比较和 *gyrB* 基因及系统发育树鉴定,确定该芽孢杆菌为副地衣芽孢杆菌(*B. paralichiformis*)。

菌株 DN-5 经形态学观察和分子鉴定结果显示:生理生化特性分析, DN-5 是革兰氏阳性兼性厌氧菌,在 37 °C 和 50 °C 生长良好,属于芽孢杆菌属的特征,16S rDNA 序列分析及系统发育树鉴定,芽孢杆菌 DN-5 与 *B. paralichiformis* G-1 和 *B. sonorensis* KCTC 13918 的亲缘关系最近,初步确定为副地衣芽孢杆菌,基于亚单位的 *gyrB* 基因鉴定及系统发育树分析,进一步确定为副地衣芽孢杆菌。对副地衣芽孢杆菌的代谢产物进行气相-质谱分析和生物特性的研究显示:*B. paralichiformis* DN-5 可代谢产生丁酸、丙酸和乙酸等短链脂肪酸;对嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、大肠杆菌(*E. coli*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)等均有较强的抑制作用,对高温、酸性和胆盐环境有一定的耐受性,菌株 DN-5 在 70 °C、80 °C 和 90 °C 水浴条件下分别处理 20 min 和 30 min,70 °C 高温条件下存活率分别达 85.48% 和 75.15%;80 °C 和 90 °C 水浴之后存活率依然达到 60% 以上;把菌株 DN-5 分别置于 pH 6.0、5.0、4.0、3.0 的酸性条件下处理 24 h 后,存活率分别为 97.67%、83.72%、50.78% 和 39.92%;以不添加胆盐的作为对照,该菌株在含有 0.1% 的胆盐液体培养基中培养 24 h,存活率为 79.4%;胆盐浓度为 0.3% 时,活菌数依然达到 10^8 CFU/mL,存活率为 52.4%;并且菌株 DN-5 对庆大霉素、链霉素、卡那霉素、克林霉素、阿莫西林、四环素、氨苄青霉素均表现为敏感(S),均不产生耐药性,可认为是安全性菌株。

副地衣芽孢杆菌(*B. paralichiformis*)是芽孢杆菌属的非致病性细菌,革兰氏阳性菌、氧化酶阳性和过氧化氢阳性,有内生孢子形成^[14-15],还可以产生多种消化酶^[16]。它可以产生多种抗菌物质和短链脂肪酸。类似的芽孢杆菌也有产酸的功能,如孟长纪等^[17]从鸭肠道黏液中分离得到一株高产 L-乳酸的芽孢菌 BC07,经鉴定为凝结芽孢杆菌(*B. coagulans*),该菌株有较强的耐酸、耐胆盐和耐高温性能;张建梅等^[18]从牛粪中分离得到产酸能力菌株 GF1,鉴定为蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*),代谢产物生成乳酸、乙酸和丙酸等短链脂肪酸;赵蕊蕊等^[19]筛选出 1 株谷草青贮产乳酸芽孢杆菌 F-1,对该菌株发酵产物进行气象色谱分析,F-1 也产

乙酸和丙酸.本试验菌株 DN-5 可产乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、己酸等短链脂肪酸,有利于动物肠道对营养物质的消化吸收,促进动物的生长.

检测菌株的耐热性是制备饲料的重要前提,益生菌作为饲料添加剂要经过高温处理,才能应用到实际生产中,由于芽孢杆菌可以形成孢子,所以具有很强耐热性能.而且动物小肠内的胆盐浓度为 0.03% 到 0.3%^[12],所以,耐热性、耐酸和耐胆盐是评价菌株益生性的重要指标.在体外对其耐受性进行检测,发现菌株经高温处理之后,依然有良好的耐受性,存活率均在 60% 以上.相较于刘秀侠等^[20]试验中,菌株在 80 °C 下处理 10 min,6 株菌株存活率在 60% 以下,其余 4 个菌株存活率均在 60% 以上,仍保持良好的耐热性能;在 pH 为 4.0 处理 24 h 后,存活率为 50.78%,与王美秀等^[21]和 CENCI 等^[22]的研究结果一致,菌株表现出较高的耐酸能力;胆盐质量浓度为 0.3%,活菌数依然达到 10⁸ CFU/mL,存活率为 52.4%;此外,菌株 DN-5 对抗生素庆大霉素、链霉素、卡那霉素、克林霉素、阿莫西林、四环素、氨苄青霉素均表现为敏感(S),具有一定的安全性,可作为饲料添加剂使用.与窦茂鑫等^[23]关于国内 6 种地衣芽孢杆菌饲料添加剂进行比较, DN-5 对不利的条件具有较强的耐受力, DN-5 具有较强的产酸能力,相比商业地衣芽孢杆菌具有一定的优势.

本试验分离的副地衣芽孢杆菌,具有一定的产酸性能,可以产生丙酸、丁酸和乙酸等多种短链脂肪酸,该菌株可以形成芽孢,对高温、酸性和胆盐有较强的耐受性,并且对多种抗生素表现敏感,安全性高,可以作为饲料添加剂应用到生产中.

参 考 文 献

- [1] 周元,朱建强,李谷,等.稻田对池塘养殖肥水的吸收利用效果研究[J].灌溉排水学报,2011,30(5):78-81.
ZHOU Y,ZHU J Q,LI G,et al.The nutrients in the fertile water from fish pond assimilated and utilized by paddy field[J].Journal of Irrigation and Drainage,2011,30(5):78-81.
- [2] KUEBUTORNYE F K A,ABARIKE E D,LU Y.A review on the application of Bacillus as probiotics in aquaculture[J].Fish & Shellfish Immunology,2019,87:820-828.
- [3] CHAMBERS E S,MORRISON D J,FROST G.Control of appetite and energy intake by SCFA:what are the potential underlying mechanisms? [J].The Proceedings of the Nutrition Society,2015,74(3):328-336.
- [4] 张忠良,刘东平,潘培培,等.多粘类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*)K18-5 不同悬浮液处理对黄瓜枯萎病抑制作用的影响[J].河南农业大学学报,2019,53(5):724-730.
ZHANG Z L,LIU D P,PAN P P,et al.Influence of inhibition effects of different suspensions treatments of *Paenibacillus polymyxa* (K18-5) against Fusarium wilt of cucumber[J].Journal of Henan Agricultural University,2019,53(5):724-730.
- [5] 汪攀,易敢峰,孙自博,等.一株凝结芽孢杆菌的分离鉴定及益生性研究[J].中国畜牧兽医,2017,44(4):1195-1202.
WANG P,YI G F,SUN Z B,et al.Study on the isolation,identification and probiotic characteristic of a Bacillus coagulans[J].China Animal Husbandry & Veterinary Medicine,2017,44(4):1195-1202.
- [6] 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.
- [7] 步坎南,吉本斯.伯杰细菌鉴定手册[M].北京:科学出版社,1984.
- [8] GUO X,CHEN D D,PENG K S,et al.Identification and characterization of *Bacillus subtilis* from grass carp(*Ctenopharyngodon idellus*) for use as probiotic additives in aquatic feed[J].Fish & Shellfish Immunology,2016,52:74-84.
- [9] 李宏,吴海武,孟凡同,等.基于 *gyrB* 基因的地衣芽孢杆菌 PCR 快速检测方法的建立[J].海南大学学报(自然科学版),2013,31(3):230-233.
LI H,WU H W,MENG F T,et al.Development of a PCR method for rapid detection of Bacillus licheniformis based on *gyrB* gene[J].Natural Sciences Journal of Hainan University,2013,31(3):230-233.
- [10] 阮靖华,王武军,白泉阳,等.基于 *gyrB* 基因建立快速检测沙雷菌的 PCR 方法[J].畜牧与兽医,2017,49(7):103-108.
RUAN J H,WANG W J,BAI Q Y,et al.Rapid detection of serratia spp.by PCR using the primers targeting the *gyrB* gene[J].Animal Husbandry & Veterinary Medicine,2017,49(7):103-108.
- [11] 李天芝,于新友,李书光,等.基于 *gyrB* 基因的地衣芽孢杆菌 PCR 快速检测方法的建立[J].饲料博览,2015(3):29-31.
LI T Z,YU X Y,LI S G,et al.Development of a PCR method for rapid detection of Bacillus Licheniformis based on *gyrB* gene[J].Feed Review,2015(3):29-31.
- [12] 陈晓春.产乳酸芽孢杆菌分离以及生物学特性研究[J].中国畜牧业通讯,2006(3):67-68.
CHEN X C.Isolation and biological characteristics of *Lactobacillus*[J].China animal husbandry communication,2006(3):67-68.
- [13] 李明振,廖学文,屈汶辉,等.一株抑菌型地衣芽孢杆菌的快速分离与鉴定及其对 4 株耐药致病菌的抑制作用[J].南京农业大学学报,2017,40(2):325-331.
LI M Z,LIAO X W,QU W H,et al.Rapid isolation and identification of Bacillus licheniformis with bacteriostatic ability and its antibacte-

- rial activity against four resistant pathogens[J].Journal of Nanjing Agriculture University,2017,40(2):325-331.
- [14] BOER A S,PRIEST F,DIDERICHSEN B.On the industrial use of *Bacillus licheniformis*: a review[J].Applied Microbiology and Biotechnology,1994,40(5):595-598.
- [15] HAN B, LONG W Q, HE J Y, et al.Effects of dietary *Bacillus licheniformis* on growth performance, immunological parameters, intestinal morphology and resistance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections[J].Fish & Shellfish Immunology, 2015,46(2):225-231.
- [16] 赵帝,吴山功,丰文雯.副地衣芽孢杆菌 FA6 全基因组测序及比较基因组学分析[J].水生生物学报,2020,44(2):27-33.
ZHAO D,WU S G,FENG W W.Whole Genome Sequencing and comparative analysis of *Bacillus paralicheniformis* FA6 strain[J].Acta Hydrobiologica Sinica,2020,44(2):27-33.
- [17] 孟长纪,丁軻,李旺,等.鸭源高产 L-乳酸凝结芽孢杆菌的分离与鉴定[J].河南科技大学学报(自然科学版),2015(6):67-70.
MENG C J,DING K,LI W, et al.Isolation and identification of *Bacillus coagulans* with high yield of L lactic acid from duck[J].Journal of Henan University of Science & Technology(Natural Science),2015(6):67-70.
- [18] 张建梅,胡顺珍,穆熙军,等.一株具有产酸能力的芽孢杆菌的筛选及性能检测[J].家畜生态学报,2012,33(1):66-72.
ZHANG J M,HU S Z,MU X J, et al.Screening and performance testing of an acid producing *Bacillus* strain[J].Acta Ecologiae Animalis Domastici,2012,33(1):66-72.
- [19] 赵蕊蕊,郭晓军,张舒月,等.谷草青贮存耐低温产乳酸芽孢杆菌的筛选、鉴定及性质研究[J].中国饲料,2018(12):41-45.
ZHAO R R, GUO X J, ZHANG S Y, et al.Screening, identification and characterization of *Bacillus* producing lactic acid at low temperature for millet straw silage[J].China Feed,2018(12):41-45.
- [20] 刘秀侠,徐海燕,辛国芹,等.11 株枯草芽孢杆菌益生特性研究[J].中国畜牧兽医,2017,44(8):2333-2341.
LIU X X,XU H Y,XIN G Q, et al.Study on probiotic characteristics of eleven *Bacillus subtilis* strains[J].China Animal Husbandry & Veterinary Medicine,2017,44(8):2333-2341.
- [21] 王美秀,张爱荣,郝永清.奶牛微生态制剂中几种益生菌生物学特性的研究[J].畜牧与饲料科学,2006(5):1-5.
WANG M X,ZHANG A R,HAO Y Q.Study on biological characteristics of probiotics in dairy microecological preparation[J].Animal Husbandry and Feed Science,2006(5):1-5.
- [22] Cenci G,Trotta F,Caldini G.Tolerance to challenges miming gastrointestinal transit by spores and vegetative cells of *Bacillus clausii*[J].Journal of Applied Microbiology,2010,101(6):1208-1215.
- [23] 窦茂鑫,赵迪,王蕾,等.国内 6 种地衣芽孢杆菌饲料添加剂比较试验[J].饲料研究,2012(9):26-28.
DOU M X,ZHAO D,WANG L, et al.Comparative test of six kinds of *Bacillus licheniformis* feed additives in China[J].Feed Research,2012(9):26-28.
- [22] CENCI G,TROTTA F,CALDINI G.Tolerance to challenges miming gastrointestinal transit by spores and vegetative cells of *Bacillus clausii*[J].Journal of Applied Microbiology,2006,101(6):1208-1215.

Screening and biological characteristics of an Acid Producing *Bacillus* strain

Zhang Jianxin, Li Meng, Guo Xiangrui, Huang Mengyuan, Chen Yongyan, Feng Junchang, Chang Xulu

(College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: A strain of bacillus capable of acid-producing, named DN-5, was isolated from the pond sediment using MRS medium. Combining microscopic morphology observation, physiological and biochemical index determination, scanning electron microscopic observation, homologous sequence comparison of 16S rDNA gene, *gyrB* gene and phylogenetic tree analysis, the strain was identified *Bacillus paralichiformis*. The metabolites of the strain of DN-5 were analyzed by the GC-MS and the assay showed that the strain can produce short chain fatty acids such as butyric acid, propionic acid and acetic acid. The study of biological characteristics showed that DN-5 was resistant to *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* have inhibitory effects, and its inhibition zone diameters are 17.4 mm, 9.77 mm and 21.03 mm, respectively. At the same time, the strain DN-5 was treated with heat, acid and bile salt resistance and showed well performance; Moreover, it was sensitive to gentamicin, streptavidin and ampicillin and other antibiotics, so it has good safety and can be used as probiotics. DN-5 not only has the characteristics of lactic acid bacteria producing acid, but also has the advantage of *Bacillus* sp., and has broad application prospects in aquaculture.

Keywords: acid-producing; *Bacillus paralichiformis*; bacteria screening; stress resistance