doi:10.11751/ISSN.1002 -1280.2020.09.02

一株羊源性枯草芽孢杆菌的筛选鉴定及安全性评价

白 海[1,2,3,5],刘丽敏[2],安志鹏[2],张永芳[2],袁文燕[2],马 毅[4*]

(1. 天津大学化工学院,天津 300072;2. 山西大同大学生命科学学院,山西大同 037009;
3. 天津通和饲料有限公司博士后科研工作站,天津 301700;4. 天津畜牧兽医研究所,天津 300112;
5. 山西大同大学神经炎症及变性疾病基础与应用研究山西省重点实验室,山西大同 037009)

[**收稿日期**] 2020 -04 -01 [**文献标识码**]A [**文章编号**]1002 -1280 (2020) 09 -0010 -05 [**中图分类号**]S852.616

[**摘 要**] 为了进一步鉴定、分析和评价从绵羊粪便中分离的一株芽孢杆菌,通过形态学观察、16S rDNA 测序分析、耐酸性实验,以及小鼠灌胃和腹腔注射两种方式进行安全性评价。结果发现该菌株为枯草芽孢杆菌;在适宜条件下,培养 8 h 可达到最大生长速度;在 pH 值为 3.0 时,长势良好;在 15 d 饲喂期间,小鼠生理活动正常,无死亡;各组小鼠主要脏器均未发现明显的病变,脏器系数也无显著差异。由此可知,该枯草芽孢杆菌具有良好的生物学特点,具有用于促进羊群生产的应用潜力。

[**关键词**] 羊;枯草芽孢杆菌;鉴定;小鼠;安全性评价

Screening and Identification of a Sheep-Derived *Bacillus subtilis* and Assessment of Its Safety in Mice

BAI Hai[1,2,3,5], LIU Li -min[2], AN Zhi -peng[2], ZHANG Yong -fang[2], YUAN Wen -yan[2], MA Yi[4*]

(1. *School of Chemical Engineering and Technology*, *Tianjin University*, *Tianjin* 300072, *China*; 2. *School of Life Science*, *Shanxi Datong University*, *Datong Shanxi* 037009, *China*; 3. *Postdoctoral Workstation*, *Tianjintonghesiliao Co.*, *Ltd. Tianjin* 301700, *China*; 4. *Tianjin Institute of Animal Husbandry and Veterinary Science*, *Tianjin* 300112, *China*; 5. *Institute of Brain Science*, *Shanxi Key Laboratory of Inflammatory Neurodegenerative Diseases*, *Shanxi Datong University*, *Datong* 037009, *China*)

Corresponding author: *MA Yi*, *E -mail*: *tjnnyz@126.com*

Abstract: In order to identify, analyze and evaluate a *Bacillus* strain isolated from sheep feces, morphological observation and 16S rDNA sequencing analysis, acid -bearing experiment were carried out. The animal security was tested by oral administration or by intraperitoneal injection in mice. The results showed that the isolated strain was *Bacillus subtilis*. Under suitable conditions, the maximum growth rate can be achieved after 8 hours. The strains had better performance on acid -bearing even pH = 3.0. During the 15 -day feeding experiment, the

---

基金项目: 大同市科技攻关项目(2016047);山西大同大学博士科研启动经费资助项目(2015 -B -04)

作者简介: 白 海,博士,从事动物微生物方向研究。

通讯作者: 马 毅。E -mail:tjnnyz@126.com

physiological activities of the mice were normal, and there was no death. There was no significant difference in the organ coefficients and no significant pathological changes were found in main organs between the experimental and control groups. Results from this analysis showed that this strain of *Bacillus subtilis* showed good biological properties, and has the potential to applying in sheep production.

Key words: sheep; *Bacillus subtilis*; identification; mice; safety assessment

近年来随着规模化养殖业的发展,我国养殖业抗生素的使用存在着滥用和乱用等问题[1],农业农村部实施《全国遏制动物源细菌耐药行动计划(2017－2020 年)》,在 2019 年 7 月 9 日,农业农村部第 194 号公告正式发布,标志着所有促生长类药物饲料添加剂将逐步退出,饲料中“减抗/替抗”已成定局。而“益生菌”(Probiotics)被认为是饲料“减抗/替抗”的主力军之一。

“益生菌”最早是由 Liny 和 Stillwell 在 1965 年提出的,被定义为“对饲养动物肠道菌群平衡有益的促进物或微生物”[2],是一种“活的微生物,适当补充时有利于宿主身体健康”[3]。我国农业农村部 2013 年公布了饲料中允许添加的 34 种微生物种类,主要是:乳酸菌、芽孢杆菌和真菌。芽孢杆菌因其可以耐酸耐高温,因此经常添加到饲料中,其主要功能是:提高饲料消化率,改善肠道健康,调节免疫力,促进生长生产性能[4]。

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),是芽孢杆菌属中最常见的一种,属于好氧细菌,在生长过程中可产生枯草菌素、多粘菌素、制霉菌素等活性物质[5],可明显抑制致病菌生长,进而调节胃肠道的菌群平衡。本研究通过对羊源枯草芽孢杆菌进行分离鉴定和活性分析,为微生态制剂的研发奠定基础。

1　材料与方法

1.1　主要试剂和动物　LB 固体和液体培养基;革兰氏染色按实验室常规方法配制;8～10 周龄雄性 BALB/c 小鼠 24 只,体重 20～25 g,购于北京维通利华公司,饲养于山西大同大学医学院脑研究所动物房。

1.2　主要仪器　超净工作台 SW－CF(上海博速实业有限公司医疗设备厂);立式压力蒸汽灭菌器 LS－35LJ(江阴滨江医疗设备有限公司);电子天平 JH1102(上海精科天美科学仪器有限公司);生化培养箱 SPX－100B－Z(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);恒温摇床 GW－D(北京市六一仪器厂),显微镜 UB102i(重庆澳浦光电技术有限公司),血球计数板 QIUJING(上海市求精生化试剂仪器有限公司);5 mL 和 1 mL 无菌注射器(江西红新医疗器械有限公司);台式高速离心机 HC－2062(安徽中科中佳科学仪器有限公司);微波炉 G70F20 N2L－DG(广东格兰仕微波炉电器制造有限公司);移液枪(北京大龙兴创实验仪器);小鼠灌胃针(8 号)。

1.3　菌株的分离及染色　健康绵羊的新鲜粪便取自山西省大同市阳高县罗文皂镇十九墩村。称取 1 g新鲜羊粪,用研钵迅速研碎,装在盛有 99 mL 的无菌水的锥形瓶中,振荡 5 min,制成悬浮液,在水浴锅中 100 ℃水浴加热 10 min。取 10 mL 悬液加入到无菌试管中,之后每次取 1 mL 菌液进行 10 倍倍比稀释,配制成 10^{-2}～10^{-6}的浓度梯度溶液。将配制好的梯度溶液在超净台中分别进行平板划线,在 37 ℃恒温培养箱中倒置培养 24～36 h,挑取乳白色、薄膜状带有褶皱的疑似菌落,接种到新的培养基上继续培养,直至培养基上只生长出单一菌落。

取一滴纯培养的菌液,用适量的生理盐水稀释后涂片并经革兰氏染色,通过光学显微镜观察细菌形态。染色方法参考试剂说明书。

1.4　16S rRNA 的测序和序列比对分析　16S rRNA 序列采用通用的特异性引物来扩增:正向引物 27F:5′－AGAGTTTGATCCTGGCTCAG－3′,反向

引物 1492R：5′ - AAGGAGGTGATCCAGCCGCA - 3′，由上海生工生物工程有限公司合成。使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组，以此为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(50 μL)：TaKaRa *La Taq* 0.5 μL，DNA 模板 2 μL，10 × PCR Buffer 5 μL，dNTP Mix 8 μL，上、下游引物各 2 μL，双蒸水 30.5 μL。扩增程序：94 ℃ 预变性 5 min，94 ℃ 30 s，54 ℃ 30 s，72 ℃ 1 min，30 个循环；72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物纯化后交由北京三博远志生物技术责任有限公司进行测序。测序结果通过 NCBI 数据库进行 Blast 比对分析，通过 MEGA 7.0 构建系统发育树。

1.5　生长曲线　将菌株接种至已灭菌的 LB 液体培养基中进行预培养(37 ℃，180 rpm 条件下过夜培养)。预先准备已灭菌的锥形瓶 3 个，并配置新的液体培养基，灭菌后分装至锥形瓶中，每个锥形瓶中各 100 mL。之后，向各锥形瓶中分别加入 100 μL预先培养的菌液，37 ℃恒温摇床进行振荡培养，4 h 后吸取少量菌液进行 OD 600 测定，之后每隔 2 h 进行 OD 600 测定，绘制细菌生长曲线。

1.6　耐酸试验　参考冼琼珍等的方法[6]，将芽孢杆菌悬液分别接种到 pH 值为 2.0 和 3.0 的液体 LB 培养基中，芽孢杆菌的初始浓度为 1×10^6 CFU · mL^{-1}，37 ℃条件下 120 rpm 条件下培养，分别在 1.5 h 和 2.5 h 后取 1 mL 菌液进行平板涂布培养 24 h，进行平板活菌计数，每次实验重复 3 次。

1.7　菌株的安全性评价　采用腹腔注射和口腔灌胃两种方法对小鼠实行实验，24 只小鼠随机分成 A1、A2、B1、B2 四组，每组 6 只。A1 组腹腔注射 0.1 mL 0.9% 生理盐水，A2 组腹腔注射 0.1 mL 枯草芽孢杆菌菌液(活菌数量为 5.0×10^9 CFU/mL)，B1 组口服灌胃 0.1 mL 0.9 % 生理盐水；B2 组口服灌胃 0.1 mL 枯草芽孢杆菌菌液(活菌数量为 5.0×10^9 CFU/mL)。每日 14:30 对小鼠进行实验，持续 15 d。第 15 d 小鼠禁食 6 h 后称量体重，并处死小鼠，取出心、肝、脾、肺、肾、睾丸等脏器，并称量，计算脏器系数，肉眼观察各脏器病理变化。

脏器系数 = 实验动物某脏器的重量/动物体重。

1.8　数据处理与统计　系数用平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，用 SPSS 17.0 软件进行数据分析。

2　结果与分析

2.1　形态学鉴定　从绵羊粪便中分离出疑似菌株，并对菌株进行纯化，纯化后的菌落形态如图 1A 所示，菌落呈现乳白色薄膜状，有褶皱，菌体呈长杆状，染色为红色，为革兰氏阳性菌(图 1B)。

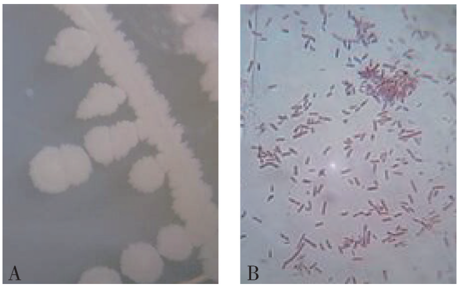

图 1　A 疑似菌株的菌落(100 ×)；
B 杆菌革兰氏染色呈阳性(1000 ×)

Fig 1　A Colonies of suspected strains(100 ×)；
B Gram - positive of the bacilli(1000 ×)

2.2　系统进化树的构建　将所测序列在 NCBI 中经 Blast 初步比对后发现，其与 *Bacillus subtilis* ZY - 05 的同源性达到 99.52%，与 *Bacillus subtilis* strain IAM_12118 同源性达到 99.10%。通过 MEGA 7.0 软件构建系统进化树，结果显示菌株 Isolated strain 与枯草芽孢杆菌亲缘关系最近，聚类为一支，而与 *Bacillus thuringiensis* strain 距离较远(图 2)。

2.3　菌株生长曲线的绘制　这株枯草芽孢杆菌在 4 h 到 8 h 之间生长速度最快，迅速到达生长速度的峰值。在此之后枯草芽孢杆菌的生长速度逐渐减慢，从稳定期开始慢慢进入衰亡期，且在 26 h 后其浓度再次上升。

2.4　耐酸性试验　由表 1 可知，枯草芽孢杆菌在 pH = 2.0 和 pH = 3.0 条件下，处理 1.5 h 后，其存活率都在 80% 以上；而在 pH 为 2.0 处理 2.5 h 以后，细菌的存活率会下降至 43.9%，存活率下降明显，而在 pH 为 3.0 处理 2.5 h 以后，细菌的存活率会下降至 60.7%，存活率明显提高。说明该菌株具有较好的酸性耐受能力。

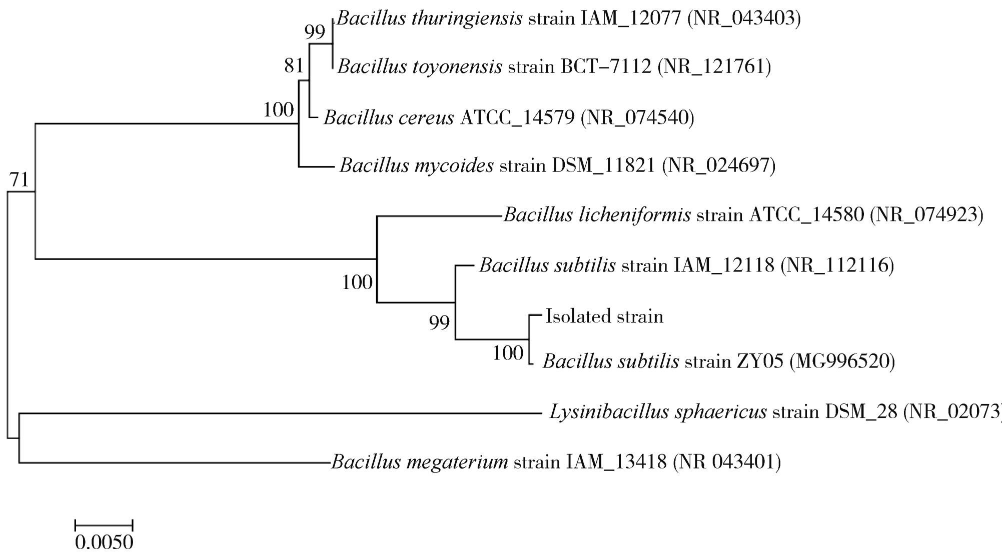

图 2　菌株 16S rRNA 系统发育分析

Fig 2　16S rRNA phylogenetic analysis of the strain

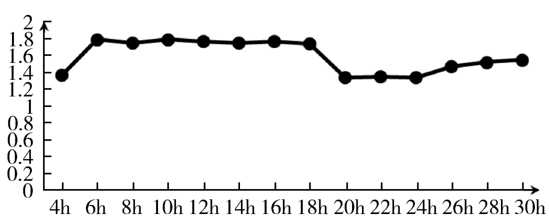

图 3　细菌的生长曲线

Fig 3　Growth curve of the strain

表 1　不同 pH 环境下枯草芽孢杆菌的存活率

Tab 1　The livability of *Bacillus subtilis* strain under different pH

时间	pH 2	pH 3
0 h	100%	100%
1.5 h	80.0 ±5.0%	85.2 ±5.0%
2.5 h	43.9 ±2.8%	60.7 ±4.5%

2.5　菌株安全性评价　由表 2 可知，在 15 d 试验期间，各组小鼠均存活且小鼠体征均未见明显变化，剖解小鼠，检测心、肝、脾、肺、肾、睾丸等脏器，肉眼观察未发现明显异常，同时 A1 与 A2、B1 与 B2 的脏器系数相比较均无明显差异（$P>0.05$）。

表 2　小鼠脏器系数

Tab 2　Organ coefficients of the mice

脏器系数	A1	A2	B1	B2
心脏系数	0.006 ± 0.002^{A}	0.006 ± 0.001^{A}	0.005 ± 0.001^{a}	0.005 ± 0.001^{a}
肝系数	0.048 ± 0.003^{B}	0.047 ± 0.003^{B}	0.045 ± 0.005^{b}	0.047 ± 0.004^{b}
脾系数	0.005 ± 0.002^{C}	0.006 ± 0.001^{C}	0.004 ± 0.001^{c}	0.004 ± 0.001^{c}
肺系数	0.006 ± 0.002^{D}	0.007 ± 0.001^{D}	0.007 ± 0.001^{d}	0.007 ± 0.001^{d}
肾系数	0.016 ± 0.002^{E}	0.017 ± 0.001^{E}	0.017 ± 0.001^{e}	0.017 ± 0.003^{e}
睾丸系数	0.010 ± 0.002^{F}	0.010 ± 0.002^{F}	0.010 ± 0.002^{f}	0.009 ± 0.001^{f}

注：在同字母组别的环境下，同行数字右上标字母不同表示差别显著（$P<0.05$），字母相同表示差别不明显（$P>0.05$）。

3　讨论与结论

早在 1941 年，第二次世界大战非洲军团的德国士兵常因感染痢疾而丧命，后经科学家从新鲜骆驼粪便中分离出枯草芽孢杆菌，制成抗痢疾药从而

阻止疫情蔓延[7]。此外枯草芽孢杆菌还在畜牧业中广泛使用[8],可提高畜禽的生产性能,是替代抗生素的有效途径[9]。

本研究从绵羊粪便中分离并经形态学观察和革兰氏染色镜检,以及 16S rRNA 测序分析,发现其与 *Bacillus subtilis* ZY-05 的相似度达到 99.52%,确定该菌株为枯草芽孢杆菌。通过测定该菌株的生长曲线,发现在适宜生长条件下,该菌株生长速度较快,在 4 h 后就进入对数生长期,8 h 达到峰值。因此,其最适宜的培养时间为 8 h。

枯草芽孢杆菌可在恶劣的外部环境下形成内生的孢子,对干热、湿热、高温、高压、紫外线、强酸、强碱等不良条件具有很强的抗逆性。钟罗华等对 6 株猪源芽孢杆菌进行分离鉴定和耐酸性研究,发现其中 4 株芽孢杆菌可以耐高温、耐酸,特别是枯草芽孢杆菌耐受能力最强,在 pH=2 的条件下,存活率可达 60%[10];艾文豪对不同菌株的枯草芽孢杆菌进行耐酸检测,发现 B5 株耐酸效果最好,在 pH=1.5 的条件下,存活率仍可达 70% 以上[11]。本研究是从 100 ℃沸水中加热 10 min 后筛选得到的枯草芽孢杆菌,筛选出的菌株具有很强的耐高温能力;在耐酸能力的检测中,在 pH 值为 3.0 时,经过 1.5 h 后,其存活率为 85.2%,经过 2.5 h 后,其存活率为 60.7%,显示出该菌株良好的抗逆性。

菌株安全性是益生菌关注的焦点,其中相关的副作用主要是全身感染、代谢物、佐剂和免疫调节以及基因漂流的风险。其中最常见的不良反应包括胃肠道疾病,如腹泻、恶心、肠胃气胀、消化不良和腹痛;其他副作用包括呼吸道感染、脓肿、过敏反应和严重的医疗状况,如败血症、菌血症和心内膜炎等等[12]。本研究经过 15 d 小鼠饲喂的安全性评价,发现小鼠的饮水、采食、粪便及活动均正常,无死亡小鼠出现;实验结束后,实验组小鼠与对照组相比,心、肝、脾、肺、肾、睾丸等器官均未发现明显的病理改变,各组的小鼠的脏器系数没有显著差异($P>0.05$)。因此,该菌株对小鼠无毒副作用,作为益生菌来使用是安全的,以后可作为潜在的养羊生产中应用的益生菌菌株。

参考文献:

[1] Zhang Q Q, Ying G, Pan C G, *et al*. Comprehensive evaluation of antibiotics emission and fate in the river basins of china: source analysis, multimedia modeling, and linkage to bacterial resistance [J]. Environmental Science & Technology, 2015, 49(11):6772-6782.

[2] Lilly D M, Stillwell R H. Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms[J]. Science, 1965, 147(3659): 747-748.

[3] Gasbarrini G, Bonvicini F, Gramenzi A. Probiotics history[J]. Journal of Clinical Gastroenterology, 2016, 50:S116-S119.

[4] Bernardeau M, Lehtinen M, Forssten S, *et al*. Importance of the gastrointestinal life cycle of *Bacillus* for probiotic functionality [J]. Journal of Food Science and Technology, 2017, 54(8): 2570-2584.

[5] Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions[J]. Molecular Microbiology, 2005, 56(4): 845-857.

[6] 冼琼珍, 马春全, 梁丽敏, 等. 猪源益生菌的分离筛选及部分生物学特性研究[J]. 动物医学进展, 2006(02):86-89.
XIAN Q Z, MA C Q, LIANG L M, *et al*. Solation and selection of probiotics from swine and Study on part of its biological characteristics[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2006(02):86-89.

[7] De Groot P, Frissen M, De Clercq N, *et al*. Fecal microbiota transplantation in metabolic syndrome: history, present and future [J]. Gut microbes, 2017, 8(3):253-267.

[8] 周晓辉, 李 威, 刘 浩. 枯草芽孢杆菌微生态制剂在禽畜养殖中的作用[J]. 河北科技大学学报, 2016, 37(05):503-508.
Zhou X H, Li W, Liu H. Effect of *Bacillus subtilis* microecological probiotics on livestock breeding[J]. Journal of Hebei University of Science and Technology, 2016, 37(05):503-508.

[9] Mingmongkolchai S, Panbangred W. *Bacillus* probiotics: an alternative to antibiotics for livestock production[J]. Journal of Applied Microbiology, 2018, 124(6):1334-1346.

[10] 钟罗华, 邓舜洲, 张文波, 等. 6 株猪源芽孢杆菌的分离鉴定及其益生性研究[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(2):521-529.
Zhong L H, Deng S Z, Zhang W B, *et al*. Isolation and identification of six strains of swine *Bacillus* and their probiotic research [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2017, 44(2):521-529.

[11] 艾文豪. 枯草芽孢杆菌的筛选和益生菌潜力评价[D]. 山东农业大学, 2015.
Ai W H. Screening of *Bacillus Subtilis* and probiotic potential evaluation[D]. Shandong Agricultural University. 2015.

[12] Zielińska D, Sionek B, Kołozyn-Krajewska D. Safety of probiotics[M]. Diet, Microbiome and Health. Academic Press, 2018: 131-161.

(编 辑:陈 希)