



羊芽孢杆菌的分离鉴定及体外益生特性分析

高士孔¹, 杜向鹏¹, 项艳龙¹, 王占刚¹, 温志医¹, 汪顺珊^{2*}, 马文涛^{2**}

(1. 神木市畜牧业发展中心, 陕西神木 719300; 2. 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西杨凌 712100)

摘要:本研究旨在分离筛选具有优良益生特性的枯草芽孢杆菌, 为奶山羊养殖业生态制剂的开发和利用提供理论基础。从陕西省神木市健康且泌乳性能优良的奶山羊粪便样本中分离出3株芽孢杆菌, 结合菌株形态学和分子生物学进行鉴定, 均为枯草芽孢杆菌。并对菌株的体外安全性、有效性及可行性等特性进行分析, 主要包括溶血试验、药敏试验、体外抑菌试验以及模拟胃肠道耐受试验。结果表明: (1) 三株菌种均未出现溶血现象, 显示出良好的药物敏感性; (2) 均表现出对金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌和大肠杆菌等常见乳房炎病原菌的有效抑制; (3) 这些菌株还展现出良好的耐酸性和对胃蛋白酶和胰蛋白酶的耐受能力。综上所述, 本研究成功分离到的三株具有良好体外益生特性的枯草芽孢杆菌菌株 L1-1、L3-1、L3-2, 具有成为奶山羊养殖业生态制剂候选菌株的潜力, 为提升奶山羊养殖业的健康养殖和经济效益提供了新的可能性。

关键词: 奶山羊; 芽孢杆菌; 分离鉴定; 益生特性

[中图分类号] S816.7

[文献标志码] A

[文章编号] 1004-6704(2025)-02-0056-06

Isolation, Identification, and Analysis of Probiotic Properties of *Bacillus* spp. from Sheep

GAO Shikong¹, DU Xiangpeng¹, XIANG Yanlong¹, WANG Zhangang¹,
WEN Zhiyi¹, WANG Shunshan^{2*}, MA Wentao^{2**}

(1. Shenmu Animal Husbandry Development Center, Shenmu, Shaanxi 719300, China;

2. College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: This study aimed to isolate and screen *Bacillus subtilis* strains with exceptional probiotic properties, thereby providing a theoretical foundation for the development and application of microbial ecological agents in dairy goat farming. The research team successfully isolated three *Bacillus* strains from fecal samples of healthy, high-yielding dairy goats in Shenmu city, Shaanxi province, identifying them as *Bacillus subtilis* through both morphological and molecular biological techniques. Subsequently, the in vitro safety, efficacy, and feasibility of these strains were analyzed, including hemolysis assays, antibiotic susceptibility tests, antibacterial activity assessments, and simulated gastrointestinal tolerance experiments. The results are summarized as follows: (1) The results indicated that none of the strains exhibited hemolytic activity while demonstrating favorable drug sensitivity profiles. (2) They effectively inhibited common mastitis pathogens such as *Staphylococcus aureus*, *Bacillus coagulans* and *Escherichia coli*. (3) These strains displayed robust acid resistance along with significant tolerance to gastric protease

and trypsin. In conclusion, the three isolated *Bacillus subtilis* strains (L1-1, L3-1, and L3-2) exhibit promising in vitro probiotic characteristics that position them as potential candidates for microbial probiotics in goat dairy farming; this offers new opportunities for enhancing both health outcomes and economic benefits within this sector.

[收稿日期] 2024-10-11

[基金项目] 中央高校基本科研业务费专项资金(2452023072)

[第一作者] 高士孔(1988年-), 男, 助理兽医师, 主要从事畜牧兽医工作。E-mail: gsk20131001@163.com

* [通信作者] 汪顺珊, E-mail: wanshunshan@nwafu.edu.cn

** [共同通信作者] 马文涛, E-mail: mawentao@nwafu.edu.cn

Key words: dairy goat; *Bacillus*; isolation and identification; probiotic properties

近年来,羊奶的营养价值认可度日益提升,促进了中国羊奶消费的快速增长,进而推动了奶山羊养殖业的蓬勃发展。然而,在“全面禁抗”的大环境下,疫病防治成为制约其进一步发展的关键难题^[1]。因此,研发和推广抗生素替代品显得尤为紧迫。

益生菌,尤其是芽孢杆菌属(*Bacillus*),能有效预防病原菌感染、提升动物生产性能和有益于疾病治疗,被视为抗生素的理想替代品^[2]。它们耐热、耐干燥、耐紫外线,易于大规模生产和长期保持活性^[3]。同时,芽孢的形成使它们能在胃肠道的低pH、消化酶和胆盐环境中存活,进入小肠发挥作用^[4]。此外,芽孢杆菌通过生物夺氧抑制需氧有害菌^[5],促进乳酸菌和双歧杆菌等厌氧益生菌生长,维持肠道生态平衡^[6]。而相较于异源性益生菌,同源益生菌更能适应动物肠道环境,易于定植,可能降低潜在的免疫风险^[7]。

为了满足奶山羊养殖业的需求,本研究旨在从健康奶山羊的粪便样本中分离出芽孢杆菌,并通过形态观察、16S rRNA 分子生物学技术、溶血性测试、药敏分析、体外抑菌能力评估和模拟胃肠道耐受性试验,筛选出安全、有效、适应性强且无毒性的芽孢杆菌益生菌菌株。这些菌株将为奶山羊养殖业的微生态制剂开发提供理论支持。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样本来源 采集陕西省宝鸡市千阳县某羊场的健康、泌乳能力优良的奶山羊粪便样品以供本试验后续研究。

1.1.2 指示菌种 本研究中体外抑菌试验所用的金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)3种引起临床乳房炎的致病菌指示菌株均由西北农林科技大学动物医学院兽医免疫学实验室提供。

1.1.3 主要培养基及试剂 MRS 固体培养基、MRS 肉汤培养基、MH 琼脂培养基、大豆酪蛋白琼脂(TSA)培养基、LB 培养基均购自青岛高科技工业园海博生物技术有限公司。0.5 麦氏浊度标准管、HCL、胃蛋白酶、胰蛋白酶、革兰氏染色液均购自安徽雷根生物技术有限公司,细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司,药物敏感

纸片、pH 试纸均购自杭州微生物试剂有限公司。

1.2 芽孢杆菌的分离培养

采集健康奶山羊的粪便,10 倍比稀释后选取 10⁻⁷、10⁻⁸、10⁻⁹ 3 个稀释度,各取 100 μ L 菌液,均匀涂布于 MRS 固体培养基。于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱倒置培养 12 h 后,选取接触酶试验阳性(在含有接触酶的培养基中接种,能形成透明圈的分离株)、体型较大的芽孢杆菌可疑单菌落进行纯化及冷冻保存,另一部分用于菌株鉴定。

1.3 菌种鉴定

1.3.1 形态学鉴定 采用革兰氏染色法,取待检的单克隆纯培养物,经涂片、干燥、固定、初染、媒染、脱色、复染等一系列操作后于油镜下进行镜检,菌体呈蓝紫色的判定为阳性、呈红色的判定为阴性,并观察细菌个体形态特征。

1.3.2 16S rRNA 分子生物学鉴定 依照细菌基因组 DNA 提取试剂盒(TIANGEN, DP190814)方法提取菌体总 DNA。以提取的分离株总 DNA 为模板,利用通用引物 27F (AGAGTTTGATCMTGGCT-CAG)和 1492R (GGTTACCTTGTACGACTT)进行 16S rRNA 基因的 PCR 扩增。反应体系为 25 μ L: 2 \times Taq Master Mix 12 μ L, 27F-primer 1 μ L, 1492R-primer 1 μ L, dd H₂O 9 μ L, 模板 DNA 2 μ L。扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 终止反应。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,选择单一、明亮的条带,将其剩余 PCR 产物送至测序公司进行测序。通过 BLAST 与 GenBank 数据库的已知序列进行序列相似性比对,再利用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树,比较菌株同源性^[8]。

1.4 分离株体外益生特性分析

1.4.1 溶血试验 挑取纯化的单菌落于 MRS 肉汤培养基, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 24 h, 制备分离株纯培养物, 吸取 100 μ L 均匀涂布于血平板上, 于恒温培养箱 37 $^{\circ}$ C 倒置培养 12 h 后, 观察是否有溶血现象。

1.4.2 抗生素敏感性试验 采用纸片扩散法^[9], 取于 MRS 肉汤中 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 24 h 后的分离株纯培养物, 离心收集菌体(3 000 rpm, 10 min), 用无菌生理盐水洗涤 2 次, 调整菌液浓度至 0.5 麦氏浊度(1.5 \times 10⁸ CFU/mL)。使用无菌棉签蘸取菌液, 均匀涂布于 MH 琼脂培养基, 将药敏纸片放入平板内并压实, 置于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱倒置培养 12 h。观察并用游标卡尺测量抑菌圈直径, 每组试验重复 3 次。根据药物敏感纸片说明书判定结果。

1.4.3 菌株体外抑菌试验 初筛纯化的分离株接种至 LB 液体培养基中,于 37 °C 下振荡培养,分别持续 12、24、36 和 48 h。采用琼脂平板扩散法^[10],先取于 LB 液体培养基 37 °C 振荡培养 12 h 的指示菌株(金黄色葡萄球菌、蜡芽孢杆菌和大肠杆菌),利用无菌生理盐水调整菌液浓度为 0.5 麦氏浊度(1.5×10^8 CFU/mL)。接着使用无菌棉签将指示菌株均匀涂布于 LB 琼脂培养基上,形成单层菌膜,并在周围均匀打孔,以便接种。最后分别向试验孔内加入 200 μ L 不同培养时间的分离株纯培养物,对照孔内加入等量 MRS 肉汤培养基。所有平板于 37 °C 下倒置培养 12 h,通过测量抑菌圈大小来评估抗菌能力,每组试验重复 3 次。

1.4.4 酸性耐受性试验 使用 1 mol/L 盐酸调整 MRS 肉汤培养基 pH 为 1.0 和 3.0,以模拟胃酸环境。收集初筛纯化的菌体沉淀,分别用 pH 为 1.0 和 3.0 的酸性 MRS 肉汤培养基重悬接种,常规 MRS 肉汤培养基作为对照。所有样品在 37 °C 恒温振荡培养器中培养 3 h,模拟胃肠道蠕动。培养后离心收集菌体,用无菌生理盐水洗涤后以 10 倍比稀释,并涂布在 MRS 固体培养基上,37 °C 恒温培养箱倒置培养 12 h 后,观察并计数菌落数,每组试验重复 3 次。存活率计算公式为:

$$\text{存活率} = \frac{\text{试验组菌落数}}{\text{对照组菌落数}} \times 100\%$$

1.4.5 胃蛋白酶和胰蛋白酶耐受性试验 收集振荡培养 24 h 的分离株菌体沉淀,试验组分别用含胃蛋白酶(3 mg/mL)和胰蛋白酶(1 mg/mL)的 MRS 肉汤培养基重悬,对照组则用常规 MRS 肉汤培养基。具体操作及计算公式同 1.4.4。

1.4.6 数据统计分析 试验数据于 Excel 2016 中整理,使用 SPSS 26.0 进行独立样本 t 检验,分析组间差异情况。* 表示差异显著($P < 0.05$); ** 表示差异极显著($P < 0.01$); ns 表示差异不显著。

2 结果与分析

2.1 芽孢杆菌的分离培养

在健康奶山羊粪便中分离出 16 株接触酶阳性的芽孢杆菌,编号为 L1-1、L1-2、L1-3、L1-4、L1-5、L1-6; L2-1、L2-2、L2-3、L2-4、L2-5、L2-6、L2-7; L3-1、L3-2、L3-3。每个菌株在 MRS 固体培养基 37 °C 下培养 12 h 后,形成乳白色、不透明、表面粗糙且边缘不规则的中等大小菌落。L1-1 的菌落形态如图 1 所示。

2.2 菌种鉴定

2.2.1 形态学鉴定结果 分离株纯培养物经革兰氏染色后,镜检观察到革兰氏阳性的杆状细菌。代表性分离株 L1-1、L3-1 和 L3-2 的革兰氏染色结果如图 2 所示。

2.2.2 16S rRNA 分子生物学鉴定 使用 PCR 技术扩增分离株的 16S rRNA 基因,观察到如图 3 所示,特异性的 16S rRNA 片段大小约 1 450 bp。对 PCR 扩增产物进行 16S rRNA 基因测序,将测序结果进行 BLAST 比对。分析结果显示,仅 L1-1、L3-1 和 L3-2 三个分离株鉴定为芽孢杆菌菌株,具体为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。



图 1 分离株 L1-1 菌落形态

Fig. 1 Colony morphology of the isolate L1-1

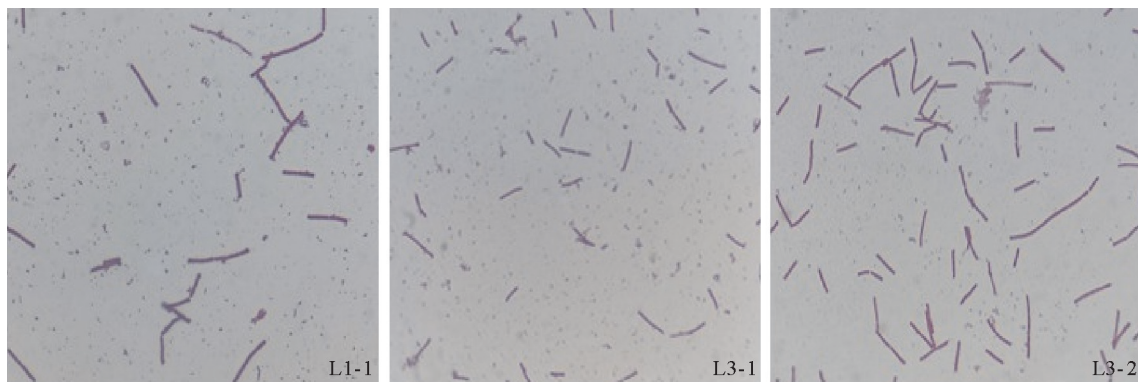
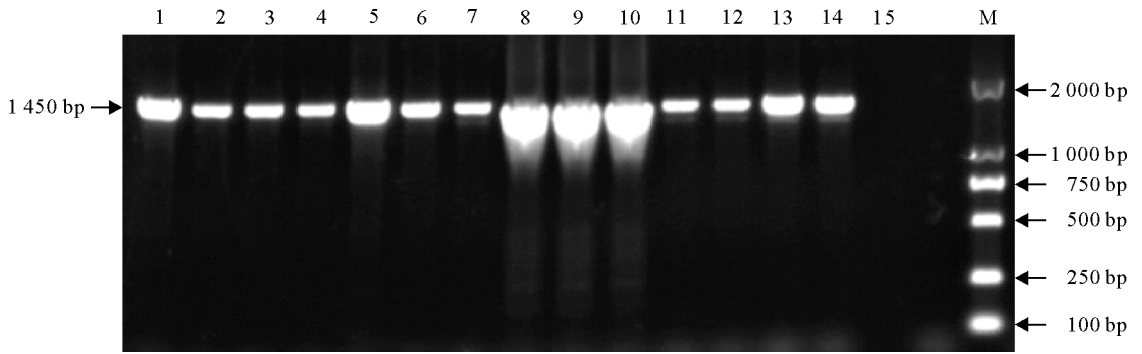


图 2 分离株 L1-1、L3-1 和 L3-2 革兰氏染色镜检结果($\times 1000$)

Fig. 2 Gram staining results of the isolate L1-1, L3-1 and L3-2($\times 1000$)



1~14. 分离株;15. 阴性对照;M. DL2000 DNA 标记

图 3 16S rRNA 基因扩增结果

Fig. 3 Results of 16S rRNA gene amplification

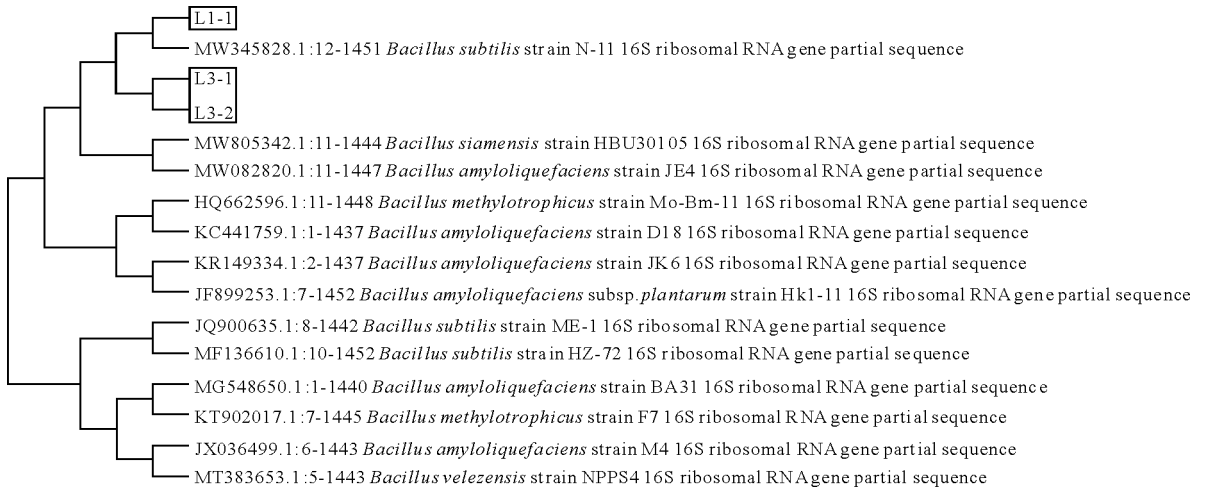


图 4 芽孢杆菌分离株 L1-1、L3-1 和 L3-2 的系统发育树

Fig. 4 The phylogenetic tree of *Bacillus* isolates L1-1, L3-1 and L3-2

它们的基因序列与 GenBank 数据库中的已知枯草芽孢杆菌序列高度匹配,相似性均超过 99.9%。通过 MEGA 7.0 软件构建的系统发育树(图 4)进一步证实,L1-1、L3-1 和 L3-2 与枯草芽孢杆菌的亲缘关系最为紧密,聚类一支。

2.3 分离株体外益生特性分析

2.3.1 安全性评价 在 37 °C 血平板上培养 12 h 后,芽孢杆菌分离菌株 L1-1、L3-1 和 L3-2 均未显示出溶血迹象,如图 5 所示,L1-1 的溶血试验结果未见异常。表明 3 株枯草芽孢杆菌均具有一定的安全性。

分离菌株对 18 种临床常用抗生素的敏感性试验结果如表 1 所示,L1-1 和 L3-1 对氨苄西林、四环素、青霉素 G 和多粘菌素 B 表现出中等敏感性,而对其他 14 种常用抗生素高度敏感,表明在耐药性方面较为安全。相比之下,L3-2 菌株仅对四环素显示出耐药性,而对其他 17 种常用抗生素高度敏感。

2.3.2 有效性评价 体外抑菌试验结果如表 2 所示。分离的芽孢杆菌菌株 L1-1、L3-1 和 L3-2 对临床乳房炎的三种主要病原体——金黄色葡萄球菌、

蜡样芽孢杆菌和大肠杆菌表现出抑制作用。L1-1 株的最大抑菌圈直径分别为 18.5、15.0 和 24.4 mm;L3-1 株的最大抑菌圈直径分别为 19.0、12.8 和 26.1 mm;L3-2 株的最大抑菌圈直径分别为 20.9、14.2 和 23.1 mm。此外,三株分离株均对大肠杆菌的抑制效果最强,对蜡样芽孢杆菌的抑制最弱。值得注意的是,这些菌株的高效抑制作用普遍出现在体外培养 12 至 24 h 期间。

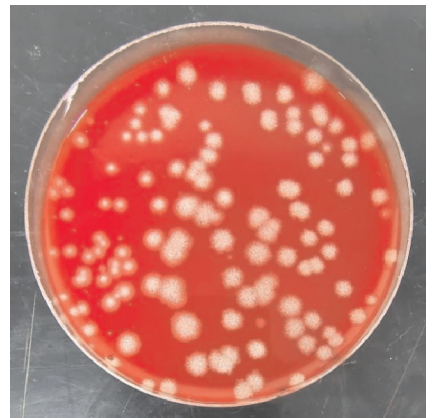


图 5 分离株 L1-1 溶血试验结果

Fig. 5 Hemolysis test of the isolate L1-1

表 1 药物敏感性判定结果
Table 1 Results of drug sensitivity determination

抗生素种类及含量	判定标准抑菌圈直径/mm			判定结果		
	R	MS	S	L1-1	L3-1	L3-2
庆大霉素 10 μg/片	≤12	13~14	≥15	S	S	S
新霉素 30 μg/片	≤12	13~16	≥17	S	S	S
链霉素 10 μg/片	≤11	12~14	≥15	S	S	S
头孢氨苄 30 μg/片	≤14	15~17	≥18	S	S	S
复方新诺明 1.25 μg/片	≤12	13~16	≥17	S	S	S
氨苄西林 10 μg/片	≤13	14~21	≥22	MS	MS	S
克拉霉素 15 μg/片	≤13	14~17	≥18	S	S	S
头孢唑林 30 μg/片	≤14	15~17	≥18	S	S	S
多西环素 30 μg/片	≤12	13~15	≥16	S	S	S
丁胺卡那 30 μg/片	≤15	16~17	≥18	S	S	S
红霉素 15 μg/片	≤13	14~22	≥23	S	S	S
四环素 30 μg/片	≤14	15~22	≥23	MS	MS	R
阿莫西林 20 μg/片	≤13	14~17	≥18	S	S	S
青霉素 G 10 μg/片	≤19	20~27	≥28	MS	MS	S
林可霉素 2 μg/片	≤8	9~11	≥12	S	S	S
阿奇霉素 15 μg/片	≤13	14~17	≥18	S	S	S
卡那霉素 30 μg/片	≤13	14~17	≥18	S	S	S
多粘菌素 B 300 IU/片	≤10	11~13	≥14	MS	MS	S

注:R. 耐药;MS. 中等敏感;S. 敏感。

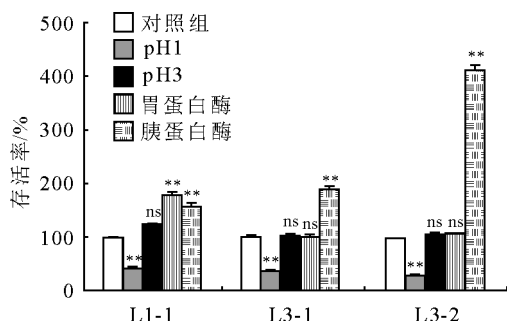
表 2 分离株体外抑菌试验结果
Table 2 *In vitro* antibacterial tests of the isolated strains

指示菌株	抑菌圈直径/mm				
	12 h	24 h	36 h	48 h	
空白对照	金黄葡萄球菌	—	—	—	
	蜡样芽孢杆菌	—	—	—	
	大肠杆菌	—	—	—	
L1-1	金黄葡萄球菌	18.5	17.1	13.0	17.2
	蜡样芽孢杆菌	15.0	11.7	11.2	13.0
	大肠杆菌	19.5	24.4	16.7	16.9
L3-1	金黄葡萄球菌	18.0	19.0	14.0	11.3
	蜡样芽孢杆菌	12.8	12.1	11.8	11.9
	大肠杆菌	22.4	26.1	17.4	18.9
L3-2	金黄葡萄球菌	20.5	20.9	17.5	13.1
	蜡样芽孢杆菌	14.2	12.5	12.5	11.0
	大肠杆菌	20.3	23.1	16.3	18.7

注:—. 未形成抑菌圈。

2.3.3 可行性评价 益生菌在体内发挥其益生作用的前提,是必须能抵抗胃酸的低 pH 值和胃蛋白酶,以及小肠中胰蛋白酶的分解作用,从而在胃肠环境中稳定生存并增殖。耐受性试验结果如图 6 所示,芽孢杆菌分离株 L1-1、L3-1 和 L3-2 在不同条件下处理 3 h,在 pH 为 3.0 条件下,L3-1 和 L3-2 的存活率与对照组无显著差异,而 L1-1 甚至显著高于对照组,且三者均达到 100% 以上,表明它们具有较好的胃酸耐受性。然而,在 pH 为 1.0 的极酸性环境中,它们的存活率均显著下降,L3-2 菌株表现最为明显。

在胃蛋白酶作用下,L3-1 和 L3-2 仍能保持稳定,L1-1 株的存活率甚至显著增加。而当暴露于胰蛋白酶时,所有分离株的存活率均显著提高,其中 L3-2 株的表现最为显著,达到 418.92%。



*. 差异显著($P < 0.05$); *. 差异极显著($P < 0.01$); ns. 差异不显著

图 6 分离株模拟胃肠道耐受试验结果

Fig. 6 Simulated gastrointestinal tolerance test results of the isolated strains

3 讨论

近年来,天然益生菌疗法在“全面禁抗”背景下备受关注。枯草芽孢杆菌因其对宿主肠道菌群和免疫调节的影响,以及能产生内生孢子的特性,成为微生态制剂的优选菌株。菌株类型和来源对其功效有直接影响,研究表明,同源性益生菌在动物胃肠道中的作用效果更佳^[11]。因此,益生菌菌种的分离、筛选、安全性评估和功效验证是长期战略任务。本研究从健康奶山羊粪便中分离出的三株枯草芽孢杆菌展现出卓越的体外益生特性。

在临床实践中,益生菌株可能通过食品或肠道环境传递抗生素耐药基因给致病菌,并与抗生素抗性相关^[12]。值得注意的是,分离株 L3-2 对四环素耐药,且 L1-1 和 L3-1 也仅表现为中度敏感。这可能与大多数贝莱森芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌携带编码假定四环素外排泵的基因有关,该基因与四环素耐药基因 Tet(L)类高度同源^[13],已证明会降低对

四环素的易感性^[14]。因此,需要进一步检测这些菌株的抗性基因来全面评估。

枯草芽孢杆菌可通过产生脂肽化合物如丰原素和伊枯草菌素干扰病原菌细胞膜的结构和通透性,甚至破坏其代谢途径,实现抗菌作用^[15]。在本研究中,L1-1、L3-1 和 L3-2 对金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌和大肠杆菌的抑制作用在菌株生长的 12~24 h 阶段最为显著,暗示生长阶段可能影响抑菌效果。然而,试验中使用的是纯培养后的全菌液,难以区分不同生长阶段的菌株对三种指示菌株的具体影响^[16],这为深入研究其抗菌机制留下了空间。

本研究为微生态制剂开发打下基础,未来需深入研究其生物学特性和代谢途径,了解它们在不同环境下的生存策略,优化其在实际养殖条件下的稳定性,并通过基因组学和蛋白质组学等手段,揭示这些菌株对宿主的益生作用机制,以开发出更有效、安全的益生菌产品,支持奶山羊健康养殖和农业可持续发展。

参考文献:

- [1] 陈红英,王月颖,傅思武. 抗生素在养殖业中的应用现状[J]. 现代畜牧科技,2019(5):1-3.
CHEN H Y, WANG Y Y, FU S W. Application status of antibiotics in aquaculture[J]. Modern Animal Husbandry Science & Technology, 2019(5):1-3.
- [2] 郭烁媛,邝圆融,伍翠莹,等. 微生态制剂在羊生产中的应用研究进展[J]. 饲料研究,2024,47(5):145-149.
GUO L Y, KUANG Y R, WU C Y, et al. Research progress in application of microecological preparation in sheep production[J]. Feed Research, 2024, 47(5): 145-149.
- [3] CUTTING S M. Bacillus probiotics[J]. Food Microbiology, 2011, 28(2): 214-220.
- [4] CASULA G, CUTTING S M. Bacillus probiotics: spore germination in the gastrointestinal tract[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(5): 2344-2352.
- [5] 祁占胜,石福岳. 微生态制剂对畜禽胃肠道功能调控作用研究进展[J]. 畜牧兽医杂志,2019,38(05):29-33.
- [6] 刘阳. 益生芽孢杆菌机理探究及应用研究进展[J]. 四川农业科技,2020(3):64-67.
- [7] 张如春,崔焕忠,蔡熙姮,等. 狐源罗伊氏乳杆菌 ZJF036 益生特性研究[J]. 动物营养学报,2020,32(8):3819-3829.
ZHANG R CH, CUI H ZH, CAI X H, et al. Probiotic characteristics of *Lactobacillus reuteri* ZJF036 isolated from fox[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2020, 32(8): 3819-3829.