

③  
11-14

# 益生菌生产菌的生物学特性研究\*

## Studies on Biological Characteristics of the Strains of Bacillus, Probiotic Producer

王士长  
Wang Shichang

徐菊芬  
Xu Jufen

张梅芳 ✓  
Zhang Meifang

S816.7  
Q939.124

(广西大学动物科技学院 南宁 530005)  
(College of Animal Science, Guangxi University, Nanning, 530005)

(广西大学农学院 南宁 530005)  
(Agricultural College, Guangxi University, Nanning, 530005)

**摘要** 从土壤中分离到三株杆菌,经鉴定为蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)。杆菌有水解淀粉的能力,并能利用葡萄糖产酸;在 pH 值 2.2~7.0 范围内有较高的存活率,能抵抗多种抗生素,是较为优良的益生菌生产菌。

**关键词** 益生菌 地衣芽孢杆菌 蜡样芽孢杆菌 抗菌素  
中国法分类号 Q 93: S 816.7

饲料

**Abstract** Three strains Bacillus of probiotic producer were isolated from soil and identified as *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*. Studies on biological characteristics are showed that these bacteria are able to hydrolyse amyllum, resistant to many antibiotics, utilize glucose and turn it to acid. They are suitable on the pH 2.2~7.0 and are good probiotics producer.

**Key words** probiotics, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, antibiotics,

益生菌 (Probiotics) 是一种能直接饲喂的微生物饲料添加剂,用以改善动物肠道微生态平衡,抑制病原菌生长,提高动物非特异性免疫机能,减少疾病发生,最大限度地发挥动物生产潜力。同时,又没有类似抗生素产生的副作用。生产益生菌使用的菌种主要有两类:一类是产酸的乳酸菌。它可以在动物肠道内将单糖,特别是乳糖转化成乳酸,抑制大肠杆菌等病原微生物生长,但缺点是耐热性差,条件恶劣时易死亡,在饲料颗粒化过程中的瞬间高温即被杀死。因此人们将注意力转到另一类,即芽胞杆菌。这类细菌培养容易,营养条件要求不高,属兼性厌氧菌,有氧无氧均能存活,这有利于它们适应胃肠道的环境,在条件不利的情况下形成芽胞,将自己保护起来,而且复活率高。在进入肠道后能利用淀粉,在肠道与乳酸菌形成新的生物链:淀粉 $\xrightarrow{\text{芽胞杆菌作用}}$ 单糖 $\xrightarrow{\text{乳酸菌作用}}$ 乳酸同样达到降低肠道 pH 值,抑制病原微生物的作用。

我们利用从土壤中分离到的芽胞杆菌,制成益生菌,在动物试验中获得较好的效果。本

1998-07-31 收稿。

\* 广西自然科学基金资助项目。

文对其生物学特性作了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种鉴定

1.1.1 菌种来源: 菌种 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>——牧场旱作土壤分离纯化菌株; B<sub>3</sub>——农场旱作土壤分离纯化菌株。

1.1.2 鉴定方法: 参照参考文献 [1, 2, 3] 中有关内容与方法进行。

### 1.2 pH 值耐受性试验

1.2.1 培养方法: 分别从试管斜面菌种取一环菌泥接种到 100 mL 肉汤培养液中, 摇床 37℃ 培养 3 d, 使其充分形成芽孢。取 1 mL 菌液于 99 mL 无菌水三角瓶内, 充分摇荡 10 min, 备用。培养基配方: 每 1 000 mL (蒸馏水加入 5 g 牛肉膏, 10 g 蛋白胨和 5 g NaCl。调 pH 值至 7.2, 常规灭菌。若配固体培养基需加入 12 g 琼脂粉。

1.2.2 处理方法: 取稀释菌液 1 mL 加入 9 mL 无菌缓冲液中, 稀释得 pH 值分别为 2.2、3.0、3.8、4.6、5.2、6.0、7.0, 空白对照用 0.1 mol/L 无菌 NaCl 溶液, 置 37℃ 培养箱 60 min, 用平皿稀释涂布法计算其活菌数。

缓冲液的配制方法如表 1。甲液: 2.1% 的柠檬酸溶液; 乙液: 7.16% 的 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 水溶液。按比例配制后, 分装, 常规灭菌。

表 2 三株芽孢杆菌的形态学特征

	特 征	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>
菌 体	宽 (μm)*	1.05	0.83	0.79
	长 (μm)*	4.1	3	2.8
	革兰氏染色反应	+	—	—
	排列	短链为主, 偶而较长	短链但较长	单个存在为主、有短链
芽 孢	原生质中不着色颗粒	+	+	—
	形状	椭圆	椭圆	椭圆
	在菌体中的位置	中生	中生或近中生	中生
琼脂平板上的菌落特征	孢囊膨大	下膨大	稍膨大	下膨大
	形状	近圆形	近圆形	不规则形
	大小	较大	中等	较小
	边缘	锯齿状	波状	叶裂状
	表面质地	粗糙较干燥	较光滑、湿润	粗糙有皱褶
	光学特性	不透明	不透明	不透明
	颜色	蜡白色	蜡白色	暗蜡色
	隆起程度	下隆起	下隆起	稍隆起
	生长速度	快	快	慢
	试管液体中的培养特征	菌膜	有	有
混浊		有片状物悬浮	均匀混浊	较混浊 (轻度)
沉淀		片状沉淀	无	无

\* 平均值

### 1.3 对抗生素的敏感性

用市场上常售畜禽用抗生素: 氯霉素 7.0‰、痢特灵 0.67‰、土霉素 2.71‰、红霉素 1.11‰、氟哌酸 0.025‰、金霉素 2.71‰、杆菌肽锌 0.30‰、抗敌素 .01‰、唑乙醇 30 × 10<sup>-6</sup>、

霉敌 1%、黄霉素 2.0%，按推荐用量配成溶液，将直径 0.6 cm 圆形滤纸浸入药液，摇荡 1 h，取出，阴干后备用。将肉汤汁固体培养基 100 mL 煮融冷却到 50℃，与 1 mL 试验菌液混合后，倒平皿，待凝固后用镊子摄取各种抗生素纸片紧贴于培养基表面，每皿贴三张不同的抗生素纸片，每个处理三个重复，然后置 37℃ 培养箱内 1 d~2 d，观察结果。

根据抗生素纸片周围抑菌圈直径的大小作敏感性判别。高敏：抑菌圈直径 15 mm~20 mm；中敏：抑菌圈直径 10 mm~15 mm；低敏：抑菌圈直径 10 mm 以下；不敏或无效：无抑菌圈。

## 2 结果

### 2.1 菌种鉴定

实验结果见表 2、表 3。表 2、表 3 借助有关分类检索表<sup>[1-3]</sup>进行比较，B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 除在柠檬酸盐利用与资料描述有出入外，其他主要的形态学及生理生化特征是一致的，文献[4]有蜡样芽孢杆菌不利用柠檬酸盐的报道，因此，可初步定为芽孢杆菌科 (Bacillaceae) 中芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 的蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)。但 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 在形态学上有较明显的差别，主要表现在菌体大小，链的长短及某些培养特征上，可认为是两种明显不同的菌株。B<sub>3</sub> 除在抗溶菌酶及丙酸盐利用与记载的不符外，其他特征均符合，可初步定为芽孢杆菌科中芽孢杆菌属的地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)。

### 2.2 对 pH 值的耐受性

从表 4 结果可看出，在 pH 值 2.2~7.0 范围内，各种菌都没有大的损失，各处理的活菌数与对照基本保持在一个数量级的水平上，pH 值 6.0~7.0 段出现高于 100% 的存活率，是因为此 pH 值范围是三株芽孢杆菌生长适宜 pH 值，因此出现了增殖现象。一般动物肠道 pH 值 2~3，而小肠段 pH 值为 5~7，这样的 pH 值范围对 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub> 芽孢杆菌的影响不大。

### 2.3 对抗生素的敏感性

从表 5 结果可以看出，氟霉素、痢特灵、红霉素、金霉素、黄霉素对三株芽孢杆菌均有很强的抑菌作用；氟派酸、杆菌肽锌次之；抗敌素、唑乙醇霉敌对三株芽孢杆菌的抑菌作用很小或不起作用。

表 3 芽孢杆菌的生理生化特征

特征	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>
运动性	+	-	+
过氧化氢酶	-	-	+
厌氧生长	-	-	+
V、P 反应	+	+	+
VP 培养液生长后的 pH 值	4.6	4.6	5.1
pH 值 6.8 肉汤	+	+	+
pH 值 5.7	+	+	-
NaCl 2%	+	+	+
5%	+	+	+
7%	+	+	+
10%	-	-	-
温度 10℃	-	-	-
30℃	+	+	+
40℃	+	+	+
45℃	+	+	+
50℃	-	-	+
55℃	-	-	-
抗溶菌酶 (0.001%)	+	+	+
产酸 D-葡萄糖	+	+	+
L-阿拉伯糖	-	-	+
D-木糖	-	-	+
D-甘露醇	-	-	+
利用物 柠檬酸盐	-	-	+
丙酸盐	-	-	-
水解物 淀粉	+	+	+
酪素	+	+	+
明胶	+	+	+
形成物 吲哚	-	-	-
二羟基丙酮	-	-	-
酪氨酸水解	+	+	-
苯丙氨酸脱氨	-	-	-
卵磷脂酶	+	+	-
还原 NO <sub>3</sub> →NO <sub>2</sub>	+	+	+
石蕊牛奶	液化	液化	液化

\* 观察半固体穿刺培养的结果；\*\* 生长比对照差

### 3 结语

这3个菌的培养温度范围大, 30℃~45℃均可很好地生长, pH值适应范围也大, 从pH值2.2~7.0均可生长, 并能适应厌氧条件, 这有利于它们的培养和在动物胃肠道中存活。三个菌种都能有效地利用淀粉, 并有利用葡萄糖产酸的能力, 这一点对于动物宿主是至关重要的。由此表明, 这3个菌是较为优良的益生菌生产菌。

一般情况下, 益生菌可代替某些抗生素单独使用于畜禽生产。但若要与抗生素同时使用, 应选择那些可相容的抗菌素, 如抗敌素、唑乙醇、霉敌等对芽胞杆菌没有抑菌作用, 对于氟哌酸、杆菌肽锌也可考虑同时使用; 而痢特灵、氯霉素、土霉素、红霉素、金霉素、黄霉素对芽胞杆菌有很强的抑菌作用, 若同时使用, 会大大削弱甚至完全抑制益生菌的作用。驯化出更多种耐抗生素的菌株将是我们今后的努力方向。

表4 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub>芽胞杆菌对pH值的耐受性

pH值	B <sub>1</sub>		B <sub>2</sub>		B <sub>3</sub>	
	活菌数	存活率(%)	活菌数	存活率(%)	活菌数	存活率(%)
2.2	1.2×10 <sup>8</sup>	60%	5.6×10 <sup>7</sup>	51%	4.0×10 <sup>7</sup>	63
3.0	1.5×10 <sup>8</sup>	75%	8.1×10 <sup>7</sup>	74%	4.9×10 <sup>7</sup>	77
3.8	1.5×10 <sup>8</sup>	75%	8.3×10 <sup>7</sup>	75%	5.2×10 <sup>7</sup>	81
4.6	1.5×10 <sup>8</sup>	75%	9.3×10 <sup>7</sup>	85%	6.0×10 <sup>7</sup>	94
5.2	1.7×10 <sup>8</sup>	85%	9.7×10 <sup>7</sup>	88%	6.1×10 <sup>7</sup>	95
6.0	2.0×10 <sup>8</sup>	100%	1.4×10 <sup>7</sup>	127%	7.5×10 <sup>7</sup>	117
7.0	2.2×10 <sup>8</sup>	110%	1.5×10 <sup>7</sup>	136%	8.0×10 <sup>7</sup>	125
对照	2.0×10 <sup>8</sup>	/	1.1×10 <sup>7</sup>	/	6.4×10 <sup>7</sup>	/

表5 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub>芽胞杆菌对抗生素的敏感性

抗生素	B <sub>1</sub>		B <sub>2</sub>		B <sub>3</sub>	
	抑菌圈直径(cm)	敏感性	抑菌圈直径(cm)	敏感性	抑菌圈直径(cm)	敏感性
氯霉素	2.6	高	2.8	高	2.6	高
痢特灵	1.7	高	2.1	高	2.3	高
土霉素	2.4	高	2.7	高	2.8	高
红霉素	2.5	高	2.5	高	2.7	高
氟哌酸	1.4	中	1.1	中	1.3	中
金霉素	2.2	高	2.1	高	2.1	高
杆菌肽锌	1.2	中	1.4	中	1.5	高
抗敌素	0.7	低	0.0	不	0.8	低
唑乙醇	0.7	低	0.0	不	0.0	不
霉敌	0.0	不	0.0	不	0.0	不
黄霉素	4.2	高	2.5	高	4.2	高

### 参考文献

- 1 张纪忠主编. 微生物分类学. 上海: 复旦大学出版社, 1990.
- 2 周德庆主编. 微生物学实验手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1986.
- 3 宋大新, 范长胜, 徐德强等主编. 微生物学实验技术教程. 上海: 复旦大学出版社.
- 4 戈登 KE, 海恩斯 WC, 帕格 CHN 著. 芽胞杆菌属. 蔡妙英, 刘聿太, 战立克译. 北京: 农业出版社, 1983.
- 5 布坎南 RE, 吉本斯 ME 等. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌学鉴定手册》编译组译, 伯杰细菌学鉴定手册, 北京: 科学出版社, 1984.
- 6 周东明, 程林春. 益生菌中菌株对pH值及抗生素的耐受性试验. 第四届全国饲料添加剂学术交流会论文集. 1995. 43~46.
- 7 何若钢, 徐菊芬, 王士长. 益生菌防治仔猪下痢及对增重的影响. 广西畜牧兽医, 1996(3): 9~11.

(责任编辑: 邓大玉 蒋汉明)