

侧孢短芽孢杆菌 S62-9 的生物学特性研究

王志新¹, 张丹², 李兴峰¹, 宁亚维¹, 张凤娇¹, 贾英民¹

(1. 河北科技大学生物科学与工程学院, 河北石家庄 050018)

(2. 河北农业大学食品科技学院, 河北保定 071001)

摘要: 以实验室选育的一株侧孢短芽孢杆菌 *Brevibacillus laterosporus* S62-9 为对象, 体外研究其耐热性、耐酸性、耐胆盐性、黏附性以及药敏性等生物学特性。结果表明, *B. laterosporus* S62-9 耐热性较好, 85 °C 水浴 5 min, 存活率达 86.20%; 人工胃液中作用 4 h, pH 2.0 下的存活率最低, 为 85.70%, pH 3.0 和 pH 4.0 下的存活率均高于 95.00%; 人工肠液中作用 4 h, 胆盐浓度为 0.1%、0.2% 和 0.3% 时的存活率分别为 93.30%, 91.70% 和 88.30%; 对模拟胃肠道消化过程的耐受性高, pH 2.0 胃液处理 2 h 后又经 0.3% 胆盐处理 3 h, 存活率达 96.00%; 营养体状态的 *B. laterosporus* S62-9 对 Caco-2 细胞体外的粘附率为 20.70 CFU/cells, 黏附能力高于对照组枯草芽孢杆菌 K1; 对养殖中常用的 10 种抗生素均未产生耐药性, 是安全菌株。*B. laterosporus* S62-9 优良的体外益生菌特性符合微生态制剂菌株的选育标准和要求, 为其微生态制剂的开发与应用奠定了理论基础。

关键词: 侧孢短芽孢杆菌; 耐受性; 黏附性; 药敏性; 微生态制剂

文章编号: 1673-9078(2016)5-52-58

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.5.09

A Study on the Biological Characteristics of *Brevibacillus laterosporus* S62-9

WANG Zhi-xin¹, ZHANG Dan², LI Xing-feng¹, NING Ya-wei¹, ZHANG Feng-jiao¹, JIA Ying-min¹

(1. College of Bioscience and Bioengineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China)

(2. College of Food Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract: The thermal resistance, acid resistance, bile salt resistance, adhesion ability, antibiotic susceptibility, and other biological characteristics of *Brevibacillus laterosporus* strain S62-9 were studied *in vitro*. Strain S62-9 exhibited good thermal tolerance, with a survival rate of 86.20% after incubation in an 85 °C water bath for 5 min. It had the lowest survival rate (85.70%) after exposure to simulated gastric juices at pH 2.0 for 4 h, whereas the survival rates at pH 3.0 and 4.0 were both higher than 95.00%. The survival rates after 4-h treatments in 0.1%, 0.2%, and 0.3% bile-salt-stimulated intestinal fluids were 93.30%, 91.70%, and 88.30%, respectively. Strain S62-9 showed high tolerance to simulated gastrointestinal transit, where its survival rate was 96.00% after being treated with gastric juice at pH 2.0 for two hours followed by a three-hour treatment in intestinal fluid containing 0.3% bile salt. The bacterium in the trophozoite stage showed an adhesion ability of 20.70 CFU per Caco-2 cell, which was higher than that of the control strain (*Bacillus subtilis* K1). Strain S62-9 had no observable resistance to 10 types of antibiotics tested and was thus considered to be a biosafe strain. These excellent probiotic characteristics of *B. laterosporus* S62-9 meet the standards and requirements of a good probiotic, laying a theoretical basis for its development and application as a probiotic strain.

Key words: *Brevibacillus laterosporus*; tolerance; adhesion; antibiotic susceptibility; probiotics

当前, 在动物养殖中抗生素被大量使用, 一方面易使动物产生耐药性, 造成胃肠道正常菌群失调和机体免疫力下降; 另一方面抗生素残留引发的食品安全问题日益增多, 因此, 健康养殖已成为保障动物性食品安全的关键^[1]。目前在抗生素替代品方面研究较多,

收稿日期: 2015-07-21

基金项目: 国家科技支撑计划 (2013BAD10B03); 国家农业科技成果转化项目 (2013GB2A200032); 河北省自然科学基金 (G2014208137)

作者简介: 王志新 (1980-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 发酵工程

通讯作者: 贾英民 (1961-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品安全

主要集中在微生态制剂、酶制剂、寡聚糖、生物抑菌剂, 其中, 微生态制剂作为一类绿色环保的饲料添加剂, 具有无残留、无耐药性、成本低、效果显著等优点, 在动物养殖中被广泛使用^[2]。

微生态制剂是从天然环境分离的有益微生物, 经过一系列特殊加工工艺制成, 用于调整机体生态平衡的活的生物制剂。目前在日本、西欧等发达国家发展较快, 我国起步较晚, 从上个世纪 80 年代起, 我国微生态制剂的菌种类型和种类也在不断增加, 从最初的乳酸菌, 现已扩展到芽孢杆菌、酵母菌等多种属,

微生态制剂组成也从单一菌种向复合菌种发展^[3]。农业部 2014 年（农业部公告第 2045 号《饲料添加剂品种目录（2013）》）公布了 30 余种用于饲料添加剂的微生物，其中侧孢短芽孢杆菌（原名侧孢芽孢杆菌）被列入目录，可用于肉鸡、肉鸭、猪和虾的养殖。

随着欧盟 2006 年 1 月起全面禁止食品动物使用抗生素生长促进剂禁令的实施，微生态制剂的研究与应用在全世界已形成热潮。然而，在实际生产和应用中仍存在诸多问题，如加工、使用、保存过程中易失活，菌株不能有效抵抗酸、胆盐等，不能到达肠道发挥作用，且市面上的产品鱼龙混杂，良莠不齐，因此有必要建立一套标准的评价体系来规范市场。在饲用益生菌方面，目前国内外尚无完备的评价标准，但可以借鉴 2001 年制定的《食品益生菌评价指南》，将其中的益生菌特性指标作为饲用益生菌产品评价的标准，用于筛选和评价优良的微生态制剂生产菌株^[4]。本文前期研究发现，选育到的一株侧孢短芽孢杆菌 *Brevibacillus laterosporus* S62-9 具有广谱、高效的抑菌性，对常见动物病原菌（金黄色葡萄球菌、猪链球菌、大肠杆菌、沙门氏菌、小肠结肠炎耶氏菌等）抑菌效果显著，在抵抗或预防病原菌感染方面表现一定作用，在功能性方面符合益生菌筛选的抗菌性标准。本文参照《食品益生菌评价指南》中益生菌的特性指标，进一步评价 *B. laterosporus* S62-9 的耐热性、耐酸性、耐胆盐性、黏附性和药敏性等生物学特性，为其微生态制剂的开发及应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验菌种

试验菌：侧孢短芽孢杆菌 *Brevibacillus laterosporus* S62-9，本实验室保存。

对照菌：枯草芽孢杆菌 K1、植物乳杆菌 C₃ 和大肠杆菌 CMCC44752，本实验室保存。

1.1.2 试验细胞

Caco-2 细胞（人克隆结肠腺癌细胞），购自中国科学院细胞库。

1.1.3 试验试剂

L-谷氨酰胺、青霉素和链霉素混合液、胰蛋白酶-EDTA 消化液（Solarbio 公司），DMEM 基本培养基（Gibco 公司），胎牛血清（Thermo 公司），二甲基亚砜（Gibco 公司）、胃蛋白酶（Sigma 公司），猪胆盐（北京奥博星生物科技有限公司）。

抗生素标准品：多肽类（黏杆菌素）、大环内脂类

（泰乐菌素及红霉素）、四环素类（金霉素及土霉素）、氨基糖苷类（新霉素）、聚醚类（盐霉素及莫能霉素）、林可胺类（林可霉素）和 β -内酰胺类（阿莫西林），河北省科星药业有限公司提供，将上述 10 种动物养殖中常用的抗生素配成 1280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 无菌母液，备用。

1.1.4 培养基

营养肉汤培养基（NB，g/L）：蛋白胨 10，牛肉膏 3，氯化钠 5，pH 值调至 7.2 \pm 0.2，121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min。

乳酸菌培养基（MRS，g/L）：葡萄糖 20，蛋白胨 10，牛肉膏 10，酵母膏 5，乙酸钠 5，磷酸氢二钾 2，柠檬酸铵 2，硫酸镁 0.58，硫酸锰 0.25，吐温-80 1，琼脂 20，pH 值调至 6.2 \pm 0.2，121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min。

细胞培养基：DMEM 基础培养基、10%（m/V）热灭活的胎牛血清（FBS；HyClone）、L-谷氨酰胺（2 mmol/L）、青霉素（100 U/mL）、链霉素（100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）。

细胞消化液：0.25%（m/V）Trypsin-0.53 mmol/L EDTA。

1.2 主要仪器设备

CO₂ 细胞培养箱（SANYO 公司），倒置显微镜（奥林巴斯有限公司），酶标仪（Molecular Devices 公司），pH 计（梅特勒-托利多仪器有限公司）。

1.3 试验方法

1.3.1 *B. laterosporus* S62-9 耐热性研究

采用 NB 培养基，37 $^{\circ}\text{C}$ ，240 r/min 振荡培养 48 h，此时芽孢形成量最大，将获得的 *B. laterosporus* S62-9 培养液置于 85 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中 5 min，立即用冷水降至室温，平板稀释涂布法检测活菌数，以不经水浴处理的样品为对照，计算其存活率：

存活率（%）=试验组活菌数（CFU/mL）/对照组活菌数（CFU/mL） \times 100%

1.3.2 *B. laterosporus* S62-9 耐酸性研究

分别制备 pH 值为 2.0、3.0、4.0 的盐酸溶液，添加 1.0%（m/V）的胃蛋白酶（sigma，1200~2400 U/mg），充分溶解后用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤除菌，模拟人工胃液。将培养至 48 h 的 *B. laterosporus* S62-9 培养液分别接种于上述人工模拟胃液中，3 $^{\circ}\text{C}$ ，240 r/min 培养，分别于 2 h 和 4 h 测定其活菌数，以无菌生理盐水替代人工胃液，在同样的条件下培养，以此菌体样品为对照，计算其存活率（计算公式同 1.3.1）。

1.3.3 *B. laterosporus* S62-9 耐胆盐性研究

人工肠液的制备：称量 KH₂PO₄ 6.8 g，加 500 mL 无菌水溶解，用 NaOH 溶液调 pH 至 6.8，定容至 1000 mL，加入猪胆盐，使其终浓度为 0.1%，0.2% 和 0.3%

(m/V), 充分溶解后用 $0.22 \mu\text{m}$ 的微孔滤膜过滤除菌。将 *B. laterosporus* S62-9 培养 48 h 的发酵液分别接种于上述人工肠液, 37°C , 240 r/min 培养, 分别于 2 h 和 4 h 测定其活菌数, 以无菌生理盐水替代人工肠液, 以在同样的条件下培养的菌体样品为对照, 计算其存活率 (计算公式同 1.3.1)。

1.3.4 *B. laterosporus* S62-9 模拟食物在动物胃肠道消化过程的耐受性研究

吸取 1 mL *B. laterosporus* S62-9 发酵液于 9 mL pH 2.0 的人工胃液中, 37°C 振荡培养 2 h, 取人工胃液作用过的消化液 1 mL 于 9 mL 含 0.3% 猪胆盐的人工肠液中, 37°C 摇床培养 3 h 后进行活菌计数, 以无菌生理盐水替代上述模拟液处理的菌体样品为对照, 计算其存活率 (计算公式同 1.3.1)。

1.3.5 *B. laterosporus* S62-9 体外黏附性研究

菌悬液的制备: 种子液的制备, 将 *B. laterosporus* S62-9 接种于 NB, 37°C 、240 r/min 培养至数生长末期 (营养体) 以及稳定期 (芽胞体), 枯草芽孢杆菌 K1 (NB 培养基) 和植物乳杆菌 C_3 (MRS 培养基) 则培养至对数生长末期 (营养体), 8000 r/min 离心 15 min, 收集菌体, PBS 洗涤 2 次, 重悬于无血清无双抗的 DMEM 培养液中, 菌液均调整为 1×10^9 CFU/mL, 备用。

Caco-2 细胞的培养: 将 Caco-2 细胞培养在 25cm^2 的细胞培养瓶中, 加入含 10% 灭活的胎牛血清和 100 U/mL 青霉素+100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素、1% L-谷氨酰胺的 DMEM 培养液, 37°C , 5% CO_2 培养箱中培养, 每隔一天更换一次培养液, 直到 Caco-2 细胞贴壁生长为单层细胞, 用胰蛋白酶-EDTA 消化液进行消化传代, 然后用 DMEM 培养液调整细胞数为 5×10^5 个/mL, 接种到 24 孔细胞培养板中, 每孔 1 mL, 置 37°C , 5% 的 CO_2 培养箱中培养, 待 Caco-2 细胞在培养板底部形成完整的类似上皮样的膜状结构时, 弃掉 DMEM 培养液, PBS 洗涤 2 次, 除去未黏附于 24 孔底的 Caco-2 细胞, 备用。

菌悬液与 Caco-2 细胞的黏附性: 向培养好 Caco-2 细胞的板孔中加入 1 mL 制备的菌悬液 (1×10^9 CFU/孔), 以添加等量 DMEM 溶液作为对照, 37°C , 5% CO_2 培养箱内孵育 2 h, 孵育完毕后, 将对照孔的细胞进行消化、细胞收集、吹打、悬浮等步骤, 获得单个悬浮的 Caco-2 细胞液, 然后采用血球计数板法计数, 计算出每孔中的细胞数, 而试验孔用 PBS 漂洗 3 次, 除去未黏附的细菌, 之后向孔中加入无菌蒸馏水作用 30 min, 裂解细胞, 将混合物转移到试管中, 经系列稀释后, 平板菌落计数, 计算黏附率:

黏附率 (CFU/cells) = 黏附细菌数 (CFU/mL) / Caco-2 细胞数 (cells/mL)

其中, Caco-2 细胞数由对照组的细胞经血球计数板计数获得。

1.3.6 *B. laterosporus* S62-9 药敏性研究

菌悬液的制备: 将 *B. laterosporus* S62-9、枯草芽孢杆菌 K1 和大肠杆菌 CMCC44752 分别接种于 NB, 植物乳杆菌 C_3 接种于 MRS, 培养至对数生长末期, 分别调整菌数为 1×10^6 CFU/mL, 备用。

抗生素的 MIC 值: 将 1.1.3 中的 7 大类 10 种抗生素, 在 96 孔板上采用微量肉汤稀释法进行 2 倍连续倍比稀释, 然后每孔再添加等体积的菌悬液, 最后 1 列用无菌培养基作对照, 将 96 孔板置于 37°C 培养箱中培养 18~24 h, 观察结果, 出现澄清的第一组孔对应的抗生素浓度即为该抗生素对相应菌的 MIC 值。

1.3.7 数据统计分析

采用 SPSS 19.0 软件进行数据分析, 采用 Origin 8.5 软件绘图。

2 结果与讨论

2.1 *B. laterosporus* S62-9 耐热性研究

制粒是饲料加工中重要的工序之一, 一般在高温高湿的环境中操作, 乳猪料制粒温度一般为 $60\sim 80^\circ\text{C}$, 肉鸡料制粒温度为 $75\sim 90^\circ\text{C}$, 制粒时间一般为 2~5 min^[5], 此过程会造成饲用微生态制剂产品的灭活, 导致实际应用中效果不佳或不稳定, 因此, 有必要将其耐热性作为微生态制剂评价的指标之一, 以评判制粒过程中菌体的损失程度。一般可通过水浴模拟制粒过程, 评价其耐热性。本文将 *B. laterosporus* S62-9 菌悬液置于 85°C 水浴 5 min, 之后立即用冷水降至室温, 其存活率见表 1。

表 1 *B. laterosporus* S62-9 的耐热性

Table 1 Thermal resistance of *B. laterosporus* S62-9

菌落数/(CFU/mL)		存活率
对照	85°C 水浴	%
$(5.80 \pm 0.03) \times 10^6$	$(5.00 \pm 0.70) \times 10^6$	86.20 \pm 12.10

由表 1 可知, 与对照组相比, *B. laterosporus* S62-9 菌落数由 5.80×10^6 CFU/mL 降至 5.00×10^6 CFU/mL, 存活率为 86.20%, 可见, *B. laterosporus* S62-9 的耐热性较强, 在制粒过程中不会造成过多的损失。杨锋^[6]研究发现随着处理温度的升高, 枯草芽孢杆菌的存活率急剧下降, 70°C 水浴 10 min, 芽孢存活率接近 90%, 而 90°C 时只剩 80% 的存活率。

2.2 *B. laterosporus* S62-9 对人工胃液耐受性研究

微生物制剂在被人或动物食用后,必须经过胃部,在这一过程中,胃液的低 pH 值、胃蛋白酶等都成为其阻碍顺利抵达特定部位的天然屏障。胃液 pH 通常为 3.0 左右,具有较强的杀菌作用,是外源微生物进入动物体内的第一道屏障,要保证在消化道中能够发挥益生作用,微生物必须具有良好的耐酸及胃蛋白酶的能力^[7]。本文研究了 *B. laterosporus* S62-9 在不同 pH 值人工胃液中,作用不同时间后的活菌数,结果见图 1。

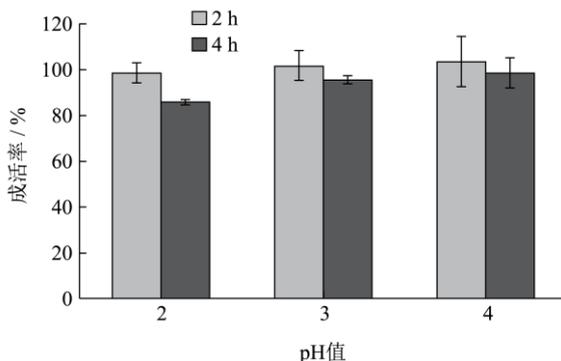


图 1 *B. laterosporus* S62-9 对人工胃液的耐受性

Fig.1 Acid tolerance of *B. laterosporus* S62-9 in gastric juice

由图 1 可知,经人工胃液作用 2 h 后,不同 pH 值下 *B. laterosporus* S62-9 活菌数均未明显降低;作用 4 h 后, pH 2.0 下的耐受性最低,活菌数由 6.30×10^6 CFU/mL 下降至 5.40×10^6 CFU/mL,存活率为 85.70%, pH 3.0 和 pH 4.0 下,存活率均高于 95.00%,可见, *B. laterosporus* S62-9 对人工胃液具有良好的耐受性。这与张璐^[5]、杨锋^[6]和王井亮^[8]等人的研究结果类似,低酸环境下芽孢杆菌的耐受性低,随着 pH 值的增加,其耐受性明显提高。张璐的研究结果显示,在 pH 2.0 的人工胃液中,饲用枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌的芽孢存活率均高于 80%,而蜡样芽孢杆菌存活率只有 46%;而 pH 4.0 时,3 株芽孢菌的存活率均高于 90%。杨锋发现,枯草芽孢杆菌在 pH 值为 2.0 的人工胃液中处理 6 h 后存活率超过 76%,而 pH 4.0 时存活率超过 90%。王井亮报道枯草芽孢杆菌在 pH 2.0 营养肉汤中培养 3 h,存活率为 41%,pH 4.0 时培养 9 h,存活率仍能达到 49%。

2.3 *B. laterosporus* S62-9 对肠道胆盐耐受性研究

渗透压对微生物影响极大,微生物在高渗环境下会发生质壁分离而导致死亡,而胆盐是影响肠液渗透压的因素之一,因此,微生物对胆盐的耐受性是其能够在肠道内存活并发挥功效的先决条件之一,也是微生物进入动物体的第二道屏障^[7]。本文研究了在不同胆盐浓度下的人工肠液,作用不同时间后 *B. laterosporus* S62-9 的活菌数,结果见图 2。

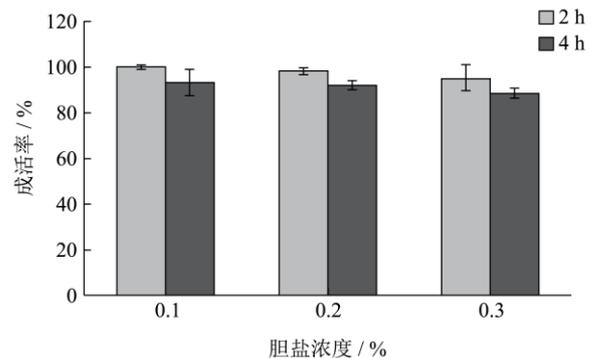


图 2 *B. laterosporus* S62-9 对胆盐的耐受性

Fig.2 Tolerance of *B. laterosporus* S62-9 to bile salt in the intestinal juice

图 2 显示,经人工肠液作用 2 h 后,胆盐浓度为 0.1% 时, *B. laterosporus* S62-9 的活菌数没有降低,而胆盐浓度为 0.2% 和 0.3% 时,活菌数均有所下降,但存活率仍可达 98.30% 和 94.80%;作用 4 h 后, *B. laterosporus* S62-9 的活菌数较 2 h 时均有所下降,胆盐浓度为 0.1% 和 0.2% 时存活率分别为 93.30% 和 91.70%,以 0.3% 浓度下活菌数最低,但其存活率仍可维持 88.30%,可见, *B. laterosporus* S62-9 对人工肠液中的胆盐具有良好的耐受性。王井亮^[8]在 0.3% 胆盐下培养 4 h,枯草芽孢杆菌存活率为 65.5%。杨锋^[6]在同样条件下,研究了 1 株枯草芽孢杆菌的抗逆特性后发现,在 0.03%~0.3% 猪胆盐溶液中其存活率均超过 90%。

2.4 *B. laterosporus* S62-9 模拟食物在动物胃肠道消化过程的耐受性研究

按照食物在动物胃肠道中的消化停留时间,对 *B. laterosporus* S62-9 发酵液进行模拟整个消化过程试验,结果见表 2。

由表 2 可知, *B. laterosporus* S62-9 经过 pH 2.0 的人工胃液处理 2 h,再经过胆盐浓度为 0.3% 的人工肠液处理 3 h 后,与对照组相比,活菌数稍有降低,由此可见, *B. laterosporus* S62-9 对整个消化过程具有较好的耐受性,能够耐受一定的高酸和高渗透压作用,为其在肠道内生长并发挥功效提供了良好的先决条

件。张媛媛^[9]对一种由枯草芽孢杆菌 BS 和凝结芽孢杆菌 BC 制成的复合芽孢杆菌制剂的肠道消化过程的耐受性进行了研究,发现复合芽孢杆菌发酵液经过 pH 2.0 的人工胃液作用 2 h 后进入 0.3%猪胆盐的高渗透压人工肠液中消化 3 h 后,其活菌数有明显的下降,由初始 5.81×10^8 CFU/mL 下降到 3.74×10^7 CFU/mL。

表 2 *B. laterosporus* S62-9 消化道耐受性

Table 2 Tolerance of *B. laterosporus* S62-9 to the digestive tract

时间	菌落数/(CFU/mL)		存活率 /%
	对照	pH 2.0/2 h 0.3%胆盐/3 h	
5 h	$(5.00 \pm 0.70) \times 10^5$	$(4.80 \pm 0.30) \times 10^5$	96.00 ± 5.60

2.5 *B. laterosporus* S62-9 体外黏附性研究

黏附是微生物与宿主肠道相互作用的第一步,也是进入肠道的微生物发挥作用的前提。目前普遍把微生物黏附性作为评价其能否成为益生菌的重要标准,菌株必须对上皮细胞组织具有黏附性才能长期在肠道中存活并发挥其作用。体外研究益生菌与肠道黏附的过程中,通常采用某种与肠道细胞形态与功能接近的细胞系进行体外黏附研究,其中 Caco-2 细胞是人结肠腺癌上皮细胞,形态和功能与正常的小肠上皮细胞非

常接近,因此,Caco-2 细胞被广泛地用作模型进行包括黏附性实验、免疫调节实验以及药物和营养素在小肠的吸收等方面的研究^[10]。图 3 为 Caco-2 细胞在培养过程中刚接入 25 cm² 培养瓶和 24 孔板时的细胞形态显微镜照片。

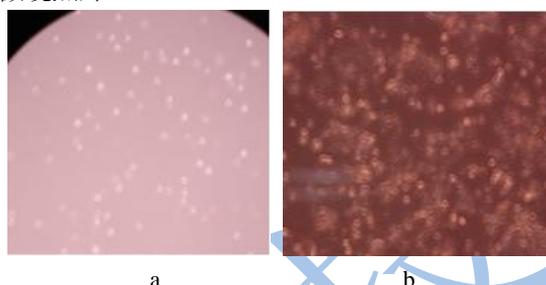


图 3 Caco-2 的细胞培养形态

Fig.3 Cell morphology of Caco-2

注: a. Caco-2 在培养瓶中细胞形态, b. Caco-2 在 24 孔板中细胞形态。

本文将营养体和芽孢体状态的 *B. laterosporus* S62-9 分别与 Caco-2 细胞共同孵育一定时间后,通过平板菌落计数法计算其黏附率,并选取 2 株微生态制剂常用菌种(枯草芽孢杆菌 K1 和植物乳杆菌 C₃)作为对照,以此来评价 *B. laterosporus* S62-9 体外黏附性(表 3)。

表 3 三株菌的体外黏附性

Table 3 Adhesion ability of three bacterial strains to Caco-2 cells *in vitro*

菌株	菌体黏附数/(CFU/mL)	细胞数/(cells/mL)	黏附率/(CFU/cells)
<i>B. laterosporus</i> S62-9 营养体	$(1.20 \pm 0.02) \times 10^7$	5.80×10^5	20.70 ± 3.00
<i>B. laterosporus</i> S62-9 芽孢体	$(1.30 \pm 0.10) \times 10^6$		2.20 ± 0.20
枯草芽孢杆菌 K1 营养体	$(4.70 \pm 2.00) \times 10^5$		0.81 ± 0.40
植物乳杆菌 C ₃	$(4.00 \pm 0.80) \times 10^7$		69.00 ± 13.40

表 3 显示,营养体状态的 *B. laterosporus* S62-9 黏附能力远高于芽孢体,与对照菌株相比, *B. laterosporus* S62-9 黏附率明显高于枯草芽孢杆菌 K1,但低于植物乳杆菌 C₃,推测可能由于 *B. laterosporus* S62-9 分离自土壤中,而植物乳杆菌 C₃ 来源于动物,故前者黏附性要低于后者。Matijasic 等^[11]运用同样的方法研究一株乳酸菌 GG 的黏附能力,结果表明其平均黏附率为 16.93 CFU/cell,该结果同 *B. laterosporus* S62-9 黏附率相近。据报道,不同来源的微生物黏附性能不同。宿主肠道中消化道环境远比体外模拟的环境复杂的多,因此,体外研究仅作为一个参考, *B. laterosporus* S62-9 能否成功在体内黏附和定植还须进一步的体内试验验证。

2.6 *B. laterosporus* S62-9 药敏性研究

安全性是微生态制剂菌种选择中最为关键的因

素,因此,作为微生态制剂生产用菌株有必要了解其对常用抗生素的耐药性。益生菌在进行安全性评价时,其重要的一个条件是不能携带可以转移的抗抗生素基因,因此为确保所使用菌株的安全性,需要进行耐药性评价^[12]。对微生态制剂药敏性的研究可以反映两方面的问题,一方面,如果微生物对抗生素具有一定的抗性,则可以缓解动物服用抗生素后,由于肠道中菌群失衡造成的腹泻现象,并帮助宿主重新恢复肠道菌群平衡;另一方面,如果微生物对多种抗生素均产生耐药性,并且携带有耐药基因片段的质粒或者转座子,那么很有可能将耐药基因转移给肠道中的有害菌,使有害菌获得耐药性,引起不良作用^[13]。本文研究了 *B. laterosporus* S62-9 以及 3 株对照菌株(枯草芽孢杆菌 K1、植物乳杆菌 C₃ 和大肠杆菌 CMCC44752)对动物养殖中常用的 7 大类 10 种抗生素的耐药性,结果见表 4。

表4 四株菌的药敏性

Table 4 Antibiotic susceptibility of four bacterial strains

抗生素		MIC/($\mu\text{g/mL}$)			
分类	名称	<i>B. laterosporus</i> S62-9	枯草芽孢杆菌 K1	植物乳杆菌 C ₃	大肠杆菌 CMCC44752
多肽类	黏杆菌素	16.00	8.00	320.00	2.00
大环内酯类	泰乐菌素	0.50	1.00	4.00	320.00
	红霉素	0.0625	0.125	1.00	40.00
四环素类	金霉素	2.00	0.125	2.00	4.00
	土霉素	8.00	1.00	8.00	4.00
氨基糖苷类	新霉素	2.00	0.25	160.00	2.00
聚醚类	盐霉素	2.00	2.00	1.00	80.00
	莫能霉素	20.00	4.00	8.00	-
林可胺类	林可霉素	16.00	16.00	8.00	-
β -内酰胺类	阿莫西林	0.125	0.125	0.125	8.00

由表4可知, *B. laterosporus* S62-9对常用的10种抗生素均未产生耐药性,尤其对大环内脂和 β -内酰胺类较敏感, MIC值均小于1.00 $\mu\text{g/mL}$,对四环素类和氨基糖苷类中度敏感,对多肽类、林可胺类以及聚醚类的莫能霉素的敏感性较低,该结果与于雅琼^[14]的研究类似,于雅琼对分离自土壤、饲料和肥料中的6株芽孢杆菌进行药敏性研究,发现这6株菌对氨基糖苷类和大环内酯类抗生素敏感,同时对喹诺酮类和糖肽类抗菌素同样表现出敏感性。与对照组的枯草芽孢杆菌K1相比, *B. laterosporus* S62-9的MIC值与之相近,但*B. laterosporus* S62-9对多肽类、四环素类、氨基糖苷类及聚醚类抗生素的抗性略高于枯草芽孢杆菌K1。而对照组的植物乳杆菌C₃对黏杆菌素和新霉素的MIC值均高于最高的允许使用剂量,其对多肽类和氨基糖苷类抗生素表现出了耐药性;大肠杆菌CMCC44752也对泰乐菌素、盐霉素产生了一定的抗性,而莫能霉素和林可霉素由于对G无效,因此检测不到其对大肠杆菌CMCC44752的MIC值(表4中用“-”表示),可知这两株对照菌对大部分抗生素的抗性均强于*B. laterosporus* S62-9。由此可以判断, *B. laterosporus* S62-9和枯草芽孢杆菌K1对常见的抗生素大多不易产生耐药性,在生物安全性方面, *B. laterosporus* S62-9可被认为不存在可转移的抗生素耐药性,具备优良微生态制剂的基本条件,具有较好的开发和应用价值。

3 结论

3.1 微生态制剂的耐热性、耐酸性、耐胆盐性、黏附性、药敏性等特性作为其功能学筛选的试验指标,既能反映出其对宿主产生的益生作用,也是微生态制剂产品质量控制的目标。本文通过研究获得以下结论:

3.2 体外水浴模拟制粒表明, *B. laterosporus* S62-9具有良好的耐热性,可减少制粒过程中的损失。

3.3 人工模拟宿主消化道环境发现, *B. laterosporus* S62-9具有良好的耐胃酸、耐胆盐特性,为其在肠道内生长并发挥功效提供了良好的先决条件。

3.4 对Caco-2细胞的黏附特性指出, *B. laterosporus* S62-9具有良好的黏附特性,黏附能力远高于对照组枯草芽孢杆菌K1,但低于植物乳杆菌C₃,为其在肠道内定植和发挥作用提供了理论依据。

3.5 微量肉汤稀释法阐明, *B. laterosporus* S62-9对7大类常用抗生素表现出不同程度的敏感性,但均未产生耐药性,因此在耐药性方面属于安全菌株。

参考文献

- [1] Chen C Y, Yan X H, Jackson C R. Antimicrobial resistance and food safety (methods and techniques) [M]. New York: Elsevier, 2015.
- [2] Newaj-Fyzul A, Al-Harbi A H, Austin B. Review: Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture [J]. Aquaculture, 2014, 431(20): 1-11
- [3] Fuller R. Probiotics: the scientific basis [M]. Berlin: Springer Netherlands, 1992
- [4] Tuomola E, Crittenden R, Playne M, et al. Quality assurance criteria for probiotic bacteria [J]. American Journal of Clinical Nutrition, 2001, 73(2): 386S-392S
- [5] 张璐. 饲用芽孢杆菌产品益生特性的体外评价研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2008
ZHANG Lu. *In vitro* study of probiotic characteristics evaluation of feed *Bacillus* product [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2008
- [6] 杨锋. 枯草芽孢杆菌的抗逆特性及其对仔猪生化指标和氨

- 气排放的影响[D].杭州:浙江工商大学,2011
- YANG Feng. The adverse-resistant characteristics of *Bacillus subtilis* and its influence on biochemical indexes of piglet and the ammonia emission [D]. Hangzhou: Zhejiang GongShang University, 2011
- [7] Oh Y J, Jung D S. Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus* and *Pediococcus* strains isolated from *Omegisool*, a traditionally fermented millet alcoholic beverage in Korea [J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 63: 437-444
- [8] 王井亮.乳酸杆菌与枯草芽孢杆菌抗逆性及其对猪和小鼠益生作用的研究[D].合肥:安徽农业大学,2012
- WANG Jing-liang. The study on resistant characteristics of *Lactobacillus* and *Bacillus subtilis* and their prebiotic effects on piglets and mice [D]. Hefei: Anhui agricultural university, 2012
- [9] 张媛媛.复合芽孢杆菌制剂发酵工艺及其耐受性研究[D].哈尔滨:东北林业大学,2012
- ZHANG Yuan-yuan. Studies on fermentation technology and intestinal tolerance of compound probiotics [D]. Haerbin: Northeast forestry university, 2012
- [10] Ren D, Li C, Qin Y, et al. Inhibition of *Staphylococcus aureus* adherence to Caco-2 cells by lactobacilli and cell surface properties that influence attachment [J]. Anaerobe, 2012, 18(5): 508-515
- [11] Matijasic B B, Narat M, Zoric M. Adhesion of two *Lactobacillus gasseri* probiotic strains on Caco-2 Cells [J]. Food Technology and Biotechnology, 2003, 41(1): 83-88
- [12] 贡汉生,孟祥晨.益生菌的安全性评价[J].现代食品科技,2005,21(4):76-79
- GONG Han-sheng, MENG Xiang-chen. Safety evaluation of probiotics [J]. Modern Food Science and Technology, 2005, 21(4): 76-79
- [13] Hempel S, Newberry S J, Maher A R, et al. Probiotics for the prevention and treatment of antibiotic-associated diarrhoea: a systematic review and meta-analysis [J]. Journal of the American Medical Association, 2012, 307(18): 1959-1969
- [14] 于雅琼,陈红艳,李平兰,等.不同生境中芽孢杆菌的分离鉴定及药敏性检测[J].食品科学,2007,28(7):324-330
- YU Ya-qiong, Chen Hong-yan, Li Ping-lan, et al. Isolation, identification and antibiotic susceptibility of *Bacillus* from different stuffs [J]. Food Science, 2007, 28(7): 324-330