

任 平,阮祥稳,赵文娟,等. 产酶益生芽孢杆菌的筛选[J]. 江苏农业科学,2014,42(10):362-365.

# 产酶益生芽孢杆菌的筛选

任 平<sup>1</sup>,阮祥稳<sup>2</sup>,赵文娟<sup>1</sup>,张新博<sup>3</sup>

(1. 陕西省科学院酶工程研究所,陕西西安 710600; 2. 陕西省酶工程技术中心,陕西西安 710600;

3. 陕西省冷冻厂,陕西西安 710600)

**摘要:**从畜禽动物胃肠道分离具有产酶能力及抑菌活性的芽孢杆菌,对其进行耐酸、耐胆盐、产酶能力及抑菌试验,并结合其形态特征进行生理生化试验鉴定。结果表明,J2、J3 和 J14 具有较强的产淀粉酶和蛋白酶的特性,N7 和 N10 产纤维素酶能力较强,5 株芽孢杆菌均有较强的抑菌活性并且能抵抗高浓度胃酸、胆盐的不良环境,具有较高的存活数。初步鉴定 J3 为地衣芽孢杆菌,J14、J2 为蜡样芽孢杆菌,N7、N10 枯草芽孢杆菌。

**关键词:**产酶;益生芽孢杆菌;形态特征;抑菌;生理生化;产酶能力;低 pH 值耐受性;高胆盐耐受性;饲用益生菌

**中图分类号:** Q93-331 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)10-0362-03

芽孢杆菌(*Bacillus*)是一类重要的微生物资源,因其具有强抗逆性、抗胃酸、抗干燥、耐高温高压、易贮存等生物特性而成为近 20 年发展起来的新型活菌绿色饲料添加剂,在畜牧业和饲料行业中得到了广泛的应用。当微生态制剂所用的芽孢杆菌进入动物消化道后,能分泌活性很强的胞外酶(蛋白酶、纤维素酶、脂肪酶、淀粉酶),仅降解饲料中相应的营养成分,提高消化率,降低料肉比<sup>[1]</sup>,可刺激机体本身酶的活性,提高动物的生产性能<sup>[2]</sup>;并且可拮抗病原微生物,维持和调整肠道微生态平衡,减少腹泻,预防疾病。它具有抗生素和酶的双重功效,在替代抗生素、防治畜禽疾病和改善环境等方面的积极作用已经得到了公认,在绿色畜牧业生产中具有广泛的开发前景<sup>[3]</sup>。

微生态制剂的生命力全赖于其所选菌种及菌种间相互配合是否严格,按微生物学规律精心筛选和制备。由于宿主的正常菌对本宿主(包括人或动物)有其特异性,因此选择微生态制剂的菌种要求利用本动物体内所分离的菌种,因为本动物的菌种对其宿主肠道有较强的黏附性,对其他宿主则表现出低黏附性或不黏附。益生菌菌株定植的宿主特异性直接影响益生菌制剂的应用效果,因而菌种的分离选择必须注意到宿主特异性问题<sup>[4]</sup>,从动物胃肠道分离的菌株,由于该菌株经过长期的历史进化过程与宿主形成了供体和受体的共生关系,一定程度上保证了菌株对动物的安全性,而且畜禽解剖构造和生理体温与其他动物不同,从其他(包括人、动物、植物、土壤)处分离的菌种,很难在畜禽体内存活,更谈不上较强的黏附力,与致病菌争夺附着点。因此,菌种的选择对畜禽微生态制剂的应用效果至关重要,理想的益生菌菌种最好来自同源动物的胃肠道。本研究从牛瘤胃及鸡盲肠中筛选出对低 pH 值和高胆盐有较好的耐受性、产酶能力及抑菌活性较强的芽孢杆菌菌株,为饲用益生菌产品的开发和应用打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 样品来源 鸡盲肠内容物、牛新鲜的瘤胃内容物。

1.1.2 指示菌 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、肠炎沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*),从北微生物研究所购买。

1.1.3 培养基 (1)肉汤培养基:牛肉膏 5.0 g,蛋白胨 3 g, NaCl 5 g,水 1 L, pH 值 7.2。(2)分离纯化培养基:牛肉膏 5.0 g,蛋白胨 10 g, NaCl 5 g,琼脂 15 g,水 1 L, pH 值 7.2。(3)CMC-Na(羧甲基纤维素钠)培养基:CMC-Na 1%,大豆蛋白胨 0.5%,酵母粉 0.05%, $K_2HPO_4$  0.15%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.02%, NaCl 0.5%,琼脂粉 0.8%, pH 值为 7.0。

### 1.2 试验方法

1.2.1 芽孢杆菌的预筛选和增殖培养 活鸡剖杀,无菌操作刮取盲肠内容物约 5 g,置于盛有 95 mL 无菌生理盐水的带有玻璃珠的三角瓶中,充分振荡摇匀;将三角瓶于 80 ℃水浴中处理 15 min,挑取水浴后的菌液于菌种纯化培养基平板上划线培养,置于 37 ℃下培养 48 h,挑取单个菌落革兰氏染色镜检,取  $G^+$  芽孢杆菌继续纯化培养。取新鲜牛瘤胃内容物 5 g 于 95 mL 灭菌生理盐水中,振荡摇匀,置于 80 ℃水浴中 15 min;挑取水浴后的菌液于菌种纯化培养基平板上划线培养,置于培养箱中 37 ℃培养 48 h,挑取单个菌落革兰氏染色镜检,取  $G^+$  芽孢杆菌继续纯化培养。

1.2.2 芽孢杆菌的筛选 挑取少量纯培养的单菌落均匀涂布于玻片上,进行结晶紫简单染色并镜检,将产生芽孢且形态为杆状的单菌落转入斜面保存。

1.2.3 pH 值耐受性 取 1 环斜面菌株接种到营养肉汤培养基中,于 37 ℃、180 r/min 下培养 36 h;再以 5% 的接种量接种于 pH 值为 3.0 的肉汤培养液中,于 37 ℃、180 r/min 下培养 2 h;分别于 0、2 h 取样,用无菌移液管取出 1 mL 进行梯度稀释  $10^{-1} \sim 10^{-7}$ ;取  $10^{-4} \sim 10^{-7}$  梯度 0.2 mL 涂于平板上进行菌落计数,并计算存活率。

1.2.4 猪胆盐耐受性 以 5% 的接种量将种子液接入含

收稿日期:2013-12-27

基金项目:陕西省西安市科技计划(编号:NC10013)。

作者简介:任 平(1972—),女,陕西临潼人,副研究员,主要从事微生物资源的应用开发。E-mail:mysrenping@163.com。

3 mg/mL 猪胆盐的营养肉汤培养基中,于 37 ℃、180 r/min 下摇瓶培养 2 h;分别于 0、2 h 取样,用无菌移液管取出 1 mL 进行梯度稀释  $10^{-1} \sim 10^{-7}$ ;取  $10^{-4} \sim 10^{-7}$  梯度 0.2 mL 涂于平板上进行菌落计数,并计算存活率。

1.2.5 产酶特性

1.2.5.1 鸡源微生物产淀粉酶和蛋白酶特性 挑选对低 pH 值和猪胆盐耐受性较好的芽孢杆菌菌株,并用无菌牙签将这些菌株分别点种于淀粉培养基和酪蛋白培养基中(以点种在营养琼脂平板作为生长对照),37 ℃ 培养 24 h 后取出平板观察透明圈大小(淀粉平板放入冰箱 4 ℃ 冷却 12 h,再取出观察透明圈大小)。

1.2.5.2 牛源微生物产纤维素酶特性 挑选对低 pH 值和猪胆盐耐受性较好的芽孢杆菌菌株,在 CMC-Na 平板上以 3 点种植方法培养 48 h,再采用刚果红染色 30 min,依次用蒸馏水和 1 mol/L NaCl 彻底洗去染液,再用 5% 醋酸固定颜色,在菌落周围形成透明的菌落证明芽孢杆菌能产纤维素酶。分别测量透明圈直径(*D*)和菌落直径(*d*),选择两者比值。

1.2.6 抑菌试验 将 3 种指示菌分别接种于肉汤液体培养基中,于 37 ℃、180 r/min 下摇床培养 24 h,活菌计数,将菌液浓度调为 1 亿 CFU/mL 待用。采用琼脂打孔扩散法测定抑菌效果,过程为:在灭菌平皿中加入 100 μL 的 1 亿 CFU/mL 指示菌菌液,然后注入温热的肉汤固体培养基,混匀,培养基厚度约为 5 mm;待培养基冷却后,用打孔器在培养基上打 3~4 个直径为 5 mm 的孔,将待检测的芽孢杆菌接种于普通营养肉汤培养基上,于 37 ℃ 下培养 36 h;将菌液加满于打好的孔中,于 37 ℃ 培养 24 h,测定抑菌圈直径,重复 3 次。

1.2.7 纤维素酶活性的测定 采用 DNS 法。

2 结果与分析

2.1 芽孢杆菌的筛选

利用芽孢的耐热特性,对样品进行水浴,达到筛选的目的。通过水浴处理和增殖培养,试验共分离耐热菌株 40 株,经革兰氏染色镜检,从中筛选出 21 株芽孢杆菌。

2.2 耐受低 pH 值芽孢杆菌株的筛选

耐酸性是益生芽孢杆菌的基础特性,保障菌株通过胃后有足够数量的存活。食物通过动物胃的排空时间一般为 2 h,而动物胃中的 pH 值范围常在 2.0~7.0 之间,一般为 3.0,因此考察各芽孢杆菌菌株在 pH 值为 3.0 条件下 2 h 内的耐受性。表 1 列出了 21 株菌在 0、2 h 的存活数及其存活率,经 pH 值为 3.0 的培养液处理 2 h 后的活菌数从多到少依次为 N9>J3>J2>N8>N26>J21>J13>J1>J27>J10>N10>N7>N17>J14>N11>J33>J16>N3>N29>J8>J19,存活率从高到低依次为 J14>N9>J1>J10>J2>J3>N8>N7>J21>N17>J27>N26>J13>N10>N11>J33>J8>J16>N3>N29>J19,其中菌株 J1、J2、J3、J10、J13、J14、J21、J27、N7、N8、N9、N10、N17、N26 在 pH 值为 3.0 的环境中有较高的存活数和存活率,具有较强的耐酸性。

2.3 耐受高胆盐芽孢杆菌的筛选

益生菌要到达并定植于动物肠道,对肠道内质量分数约为 3 mg/mL 胆盐环境的耐受能力也是一个重要的筛选指标<sup>[5]</sup>。由表 2 可知,经 3 mg/mL 猪胆盐的培养液处理 2 h 后

表 1 21 株芽孢杆菌在 pH 值 3.0 条件下的存活情况

| 菌株  | 活菌数(亿 CFU/mL) |       | 存活率(%) |
|-----|---------------|-------|--------|
|     | 0 h           | 2 h   |        |
| J1  | 3.59          | 2.880 | 80.2   |
| J2  | 4.72          | 3.540 | 75.0   |
| J3  | 6.32          | 4.690 | 74.2   |
| J8  | 1.35          | 0.412 | 30.5   |
| J10 | 3.42          | 2.720 | 79.5   |
| J13 | 7.03          | 3.100 | 44.1   |
| J14 | 2.52          | 2.070 | 82.1   |
| J16 | 3.89          | 0.887 | 22.8   |
| J19 | 4.12          | 0.309 | 7.5    |
| J21 | 5.02          | 3.310 | 65.9   |
| J27 | 5.42          | 2.730 | 50.4   |
| J33 | 3.60          | 1.190 | 33.1   |
| N3  | 4.02          | 0.840 | 20.9   |
| N7  | 3.66          | 2.550 | 69.7   |
| N8  | 4.85          | 3.450 | 71.1   |
| N9  | 7.23          | 5.900 | 81.6   |
| N10 | 6.23          | 2.590 | 41.6   |
| N11 | 5.20          | 2.000 | 38.5   |
| N17 | 3.98          | 2.490 | 62.6   |
| N26 | 7.01          | 3.390 | 48.4   |
| N29 | 5.42          | 0.439 | 8.1    |

的活菌数从多到少依次为 N26>N10>J2>J3>J1>N7>J21>N9>J13>N17>N17>J14>N8>J10>J27,存活率 J2>N7>N10>N26>J1>J3>J21>J14>J10>N17>N8>N9>J13>J27,其中菌株 J1、J2、J3、J14、J21、N7、N10、N26 在 3 mg/mL 胆盐环境中具有较高的存活数和存活率,作为下一步筛选的菌株。

表 2 14 株芽孢杆菌在高胆盐条件下的存活情况

| 菌株  | 活菌数(亿 CFU/mL) |       | 存活率(%) |
|-----|---------------|-------|--------|
|     | 0 h           | 2 h   |        |
| J1  | 4.78          | 2.010 | 42.1   |
| J2  | 4.56          | 2.440 | 53.5   |
| J3  | 6.10          | 2.360 | 38.7   |
| J10 | 3.01          | 0.774 | 25.7   |
| J13 | 7.13          | 1.120 | 15.7   |
| J14 | 2.97          | 1.000 | 33.7   |
| J21 | 4.78          | 1.810 | 37.9   |
| J27 | 5.52          | 0.684 | 12.4   |
| N7  | 3.96          | 1.990 | 50.3   |
| N8  | 4.56          | 0.976 | 21.4   |
| N9  | 7.06          | 1.260 | 17.8   |
| N10 | 5.89          | 2.730 | 46.3   |
| N17 | 4.22          | 1.010 | 23.9   |
| N26 | 6.75          | 2.980 | 44.1   |

2.4 鸡源微生物产淀粉酶和蛋白酶特性

由表 3 可知,5 株菌株均具有产蛋白酶的特性,产蛋白酶能力较强的有 J2、J3、J14、J21。具有产淀粉酶能力的菌株有 4 株,其中以 J2、J3、J14 产淀粉酶能力较强。结合菌株的产淀粉酶和蛋白酶的特性,选择 J2、J3、J14 作为目标菌株。

表 3 鸡源 5 株芽孢杆菌的产酶特性

| 菌株  | 透明圈直径(mm)  |           |
|-----|------------|-----------|
|     | 淀粉平板       | 酪蛋白平板     |
| J1  | 6.3 ± 0.4  | 3.1 ± 0.2 |
| J2  | 8.1 ± 0.3  | 9.8 ± 0.6 |
| J3  | 10.0 ± 0.1 | 7.8 ± 0.5 |
| J14 | 9.4 ± 0.2  | 7.5 ± 0.1 |
| J21 | 0.0 ± 0.0  | 7.2 ± 0.2 |

2.5 牛源芽孢杆菌的产纤维素酶酶特性

从表 4 可知,3 株菌株均具有产纤维素酶的特性,产纤维素酶能力较强的有 2 株芽孢杆菌,分别为 N7 和 N10,纤维素酶活性分别为 122.84、170.56 U/mL。

表 4 牛源 3 株芽孢杆菌的产酶特性

| 菌株编号 | 菌株直径 d (mm) | 透明圈直径 D (mm) | D/d        | 酶活性 (U/mL) |
|------|-------------|--------------|------------|------------|
| N7   | 5.3 ± 0.5   | 21.5 ± 0.2   | 4.05 ± 0.2 | 122.84     |
| N10  | 4.6 ± 0.5   | 22.8 ± 0.3   | 4.95 ± 0.4 | 170.56     |
| N26  | 10.4 ± 0.2  | 14.8 ± 0.5   | 1.42 ± 0.3 | 54.77      |

2.6 芽孢杆菌发酵液抑菌作用

由表 5 可知,对大肠杆菌的抑菌直径从大到小依次为 N10 > J3 > N7 > J14 > J2,对肠炎沙门氏菌的抑菌直径从大到

小依次为 N7 > J3 > N10 > J14 > J2,对金黄色葡萄球菌的抑菌直径从大到小依次为 J2 > J14 > N10 > N7 > J3。J2、J14 对大肠杆菌、肠炎沙门氏菌的抑制活性较弱,但对金黄色葡萄球菌却有较强的抑制活性。

表 5 5 株芽孢杆菌发酵液抑菌圈

| 菌株  | 抑菌圈直径(mm)    |              |              |
|-----|--------------|--------------|--------------|
|     | 大肠杆菌         | 肠炎沙门氏菌       | 金黄色葡萄球菌      |
| J2  | 8.42 ± 1.28  | 9.54 ± 1.06  | 15.35 ± 0.56 |
| J3  | 12.01 ± 1.32 | 13.35 ± 1.50 | 11.73 ± 1.23 |
| J14 | 9.67 ± 1.54  | 10.71 ± 1.37 | 14.92 ± 0.34 |
| N7  | 10.31 ± 1.26 | 13.76 ± 1.51 | 12.33 ± 1.22 |
| N10 | 13.44 ± 1.41 | 11.42 ± 1.44 | 13.88 ± 1.33 |

2.7 芽孢和菌落形态试验

在纯化平板上培养 48 h 后,观察细菌菌落的生长特征,结果见表 6 及图 1。

表 6 5 株芽孢杆菌菌落生长特征

| 菌株编号 | 形状 | 表面特征   | 光学特征 | 边缘  | 颜色  |
|------|----|--------|------|-----|-----|
| J2   | 椭圆 | 较平,有皱摺 | 不透明  | 整齐  | 白色  |
| J3   | 椭圆 | 皱摺状凸起  | 不透明  | 不整齐 | 乳白色 |
| J14  | 椭圆 | 较平,有皱摺 | 不透明  | 整齐  | 乳白色 |
| N7   | 椭圆 | 纹状皱摺凸起 | 不透明  | 不整齐 | 乳白色 |
| N10  | 椭圆 | 中部稍凸   | 不透明  | 整齐  | 粉白色 |

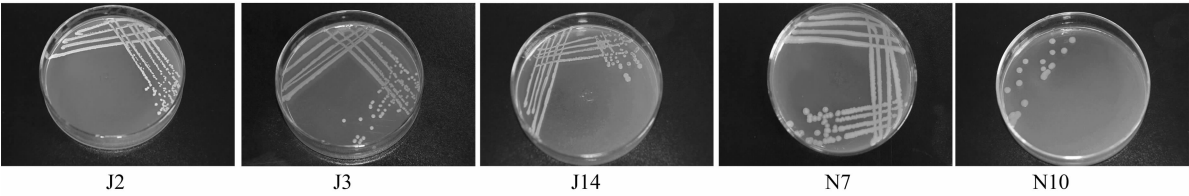


图1 5 株芽孢杆菌的菌落形态

2.8 生理生化反应结果

将细菌接种于菌种纯化板培养 24 h 后,采用生理生化试验进行种属间和属内鉴定(表 7)。参照《伯杰氏细菌鉴定手册》和《微生物试验手册》,结合形态学观察结果判定 J3 为地衣芽孢杆菌, J14、J2 为蜡样芽孢杆菌, N7、N10 枯草芽孢杆菌。

3 结论

胃中的酸性环境和十二指肠中的胆汁对微生物有一定杀灭作用,益生菌要想进入肠道并定植需耐受这样的不利环境;另外,优良的益生菌还需要具有抑制病原菌生长的能力,具有较好的产酶能力以提高动物的消化功能。芽孢杆菌是益生菌的一种,与其他益生菌相比,芽孢杆菌具有它独特的优势,形成的内生孢子能耐受自然界及加工过程中的高温、干燥和紫外线等不利因素,而且它在动物体内通过产生拮抗物质和促进形成厌氧环境从而抑制病原菌的生长,是益生菌菌种开发的重要来源。

本试验利用芽孢的耐热特性,通过水浴处理和分离纯化培养,经革兰氏染色镜检,从中筛选出 21 株芽孢杆菌。通过对 21 株芽孢杆菌经 pH 值为 3.0 的培养液处理 2 h,14 株菌株(J1、J2、J3、J10、J13、J14、J21、J27、N7、N8、N9、N10、N17、N26)在

表 7 5 株芽孢杆菌生理生化反应结果

| 试验名称         | 反应 |    |     |    |     |
|--------------|----|----|-----|----|-----|
|              | J2 | J3 | J14 | N7 | N10 |
| 接触酶          | +  | +  | +   | +  | +   |
| 厌氧生长         | +  | +  | +   | -  | -   |
| 产酸: D - 葡萄糖  | +  | +  | +   | +  | +   |
| L - 阿拉伯糖     | -  | +  | -   | +  | +   |
| D - 木糖       | -  | +  | -   | +  | +   |
| D - 甘露醇      | -  | +  | -   | +  | +   |
| 淀粉水解         | +  | +  | +   | +  | +   |
| M. R. 试验     | -  | -  | -   | -  | -   |
| V. P. 酶测定    | -  | +  | -   | +  | +   |
| 柠檬酸盐         | +  | -  | +   | +  | +   |
| 明胶液化         | +  | -  | +   | +  | +   |
| 硝酸盐还原        | +  | +  | +   | +  | +   |
| 吲哚试验         | +  | -  | +   | -  | -   |
| 0.001% 溶菌酶生长 | +  | -  | +   | +  | -   |
| 卵黄反应         | +  | -  | +   | -  | -   |
| 7% NaCl 耐受   | +  | +  | +   | +  | +   |
| 酪素水解         | +  | +  | +   | +  | +   |
| 酪氨酸水解        | +  | -  | +   | -  | -   |
| 产生硫化氢        | -  | +  | -   | -  | -   |

注:“+”表示阳性反应,“-”表示阴性反应。

常慧萍, 杨雪, 王 丁, 等. 高效石油降解菌 BS-8 产生物表面活性剂的性能[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(10): 365-367.

# 高效石油降解菌 BS-8 产生物表面活性剂的性能

常慧萍<sup>1</sup>, 杨 雪<sup>1</sup>, 王 丁<sup>1</sup>, 邢文会<sup>1</sup>, 夏铁骑<sup>2</sup>, 张 红<sup>1</sup>

(1. 河南教育学院生命科学系, 河南郑州 450046; 2. 濮阳职业技术学院, 河南濮阳 457000)

**摘要:**培养 6~30 h, 随着菌体数量的迅速增加, 菌株 BS-8 表面张力从 63.2 mN/m 快速下降为 39.4 mN/m, 其表面活性剂产生方式为生长相关型; 以葡萄糖为碳源, 对菌株 BS-8 的培养液经离心、沉淀、显色, 显示其表面活性剂为脂肽类物质, 从培养液中分离纯化得到表面活性剂的产量为 0.58 g/L, 其临界胶束浓度(CMC)为 90 mg/L; 在 pH 值 4~9、温度 20~70 ℃、NaCl 浓度 1%~6% 的条件下, 菌株 BS-8 产生物表面活性剂的稳定性较强。

**关键词:**石油; 降解菌 BS-8; 生物表面活性剂; 脂肽类物质; 稳定性

**中图分类号:**Q939.9 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)10-0365-03

生物表面活性剂是利用酶或微生物等, 通过生物催化和生物合成等技术, 从微生物、植物或动物上得到的具有表面活性的物质, 按化学结构不同分为糖脂类、脂肽和脂蛋白类、磷脂和脂肪酸类、聚合表面活性剂类和微粒表面活性剂等五大类<sup>[1]</sup>, 其类型既与菌株有关, 也与作为底物的碳源有关。有研究表明, 碳源对微生物表面活性剂的产量和结构具有决定性作用, 烃类物质的存在尤其是烃链长度对培养液中表面活性剂的浓度也会有显著的影响<sup>[2]</sup>。不同的生物表面活性剂具有不同的分离、提取和浓缩方法, 有的生物表面活性剂用乙酸乙酯提取, 有的用二氯甲烷或甲醇与三氯甲烷按 1:2 的比例提取。生物表面活性剂有较强的理化稳定性, 可被应用于极端环境下, 如地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)产生的脂肽可以在 75 ℃ 条件下耐热 140 h, 铜绿假单胞菌(*Pseudo-*

*monas aeruginosa*)产生的类蛋白表面活性剂在 pH 值为 1.7~11.4 范围内均非常稳定<sup>[3]</sup>。生物修复被烃类和原油污染的土壤是生物表面活性剂的一个重要应用, 同时还可用于受铀、铬和铅等毒性重金属污染地区的生物修复<sup>[4]</sup>。笔者所在课题组从长期受石油污染的土壤中筛选到 1 组产生物表面活性剂的菌株, 对具有较高表面活性剂产量及活性的菌株 BS-8 (*Bacillus* sp.) 产生物表面活性剂进行提取、纯化, 并对影响表面活性剂稳定性的因素进行探讨, 为生物表面活性剂及其产生菌在石油污染土壤的生物修复中提供一些理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

降解菌 BS-8 从长期受石油污染的土壤中筛选到<sup>[5]</sup>。

### 1.2 培养基

LB 培养基: 胰蛋白胨 10 g/L、酵母提取物 5 g/L、NaCl 10 g/L、琼脂 20 g/L, pH 值 7.0; 发酵培养基: 葡萄糖 20.0 g/L、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.0 g/L、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.0 g/L、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.0 g/L、CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O 0.005 g/L, pH 值 7.0~7.2。

### 1.3 表面张力的测定<sup>[6]</sup>

采用圆环法测定表面张力。室温下, 用 JYW-200A 自动表面张力测定仪测定上清液的表面张力, 3 次重复。

收稿日期: 2014-01-18

基金项目: 河南省科技攻关重点项目(编号: 142102110123、122102310350); 河南省教育厅自然科学研究计划(编号: 12A180008); 河南教育学院青年课题(编号: 20090105)。

作者简介: 常慧萍(1970—), 女, 河南新乡人, 博士, 副教授, 主要从事微生物资源开发与应用研究。Tel: (0371) 69303781; E-mail: shengwuchp@126.com。

通信作者: 张 红, 博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事分子生物学与免疫学研究。Tel: (0371) 69303663; E-mail: angela9922@sina.com。

pH 值为 3.0 的环境中有较高的存活数(>2.07 亿 CFU/mL)和存活率(>41.6%), 具有较强的耐酸性。对这 14 株芽孢杆菌进行 3 mg/mL 猪胆盐的培养液处理 2 h, 结果发现, 8 株菌株(J1、J2、J3、J14、J21、N7、N10、N26)在 3 mg/mL 胆盐环境中具有较高的存活数(>1.00 亿 CFU/mL)和存活率(>33.7%), 其中 5 株菌株来源于鸡盲肠内容物, 3 株菌株来源于牛新鲜的瘤胃内容物。

根据菌体产酶特性和对病原菌的抑菌效果, J2、J3、J14 具有较强的淀粉酶和蛋白酶的特性, N7 和 N10 产纤维素酶能力较强, 5 株芽孢杆菌均有抑菌作用。经其形态特征、菌落特征、生理生化特征分析, 初步鉴定 J3 为地衣芽孢杆菌, J14、J2 为蜡样芽孢杆菌, N7、N10 枯草芽孢杆菌。

## 参考文献:

- [1] 秦玉昌, 潘宝海, 于 荣, 等. 芽孢杆菌对畜禽生产性能的影响[J]. 中国饲料, 2004(16): 8-10.
- [2] 高汉桥, 陈昌福. 水库爆发性色病及其防治技术研究[J]. 水利渔业, 1997(2): 11-13.
- [3] 王振华. 高产酶活枯草芽孢杆菌制剂在奶牛生产上的应用研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(27): 11771-11773, 11776.
- [4] 赵瑞香, 李元端, 孙俊良, 等. 嗜酸乳杆菌在模拟胃肠环境中抗性的研究[J]. 微生物学通报, 2002, 29(2): 35-38.
- [5] Chou L S, Weimer B. Isolation and characterization of acid- and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus* [J]. Journal of Dairy Science, 1999, 82(1): 23-31.