

陈永亮,高 尚,王彦红. 2 株鸡源芽孢杆菌的分离鉴定与药敏试验[J]. 江苏农业科学,2018,46(19):176-178.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.19.047

## 2 株鸡源芽孢杆菌的分离鉴定与药敏试验

陈永亮<sup>1</sup>, 高 尚<sup>2,3</sup>, 王彦红<sup>2,3</sup>

(1. 徐州生物工程职业技术学院,江苏徐州 221006; 2. 扬州大学兽医学院,江苏扬州 225009;

3. 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心,江苏扬州 225009)

**摘要:**从散养草鸡的脾、肝组织中分别分离出 1 株革兰氏阳性杆菌,经 MALDI biotyper 分析仪鉴定,分别为短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)和巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)。对 2 株分离菌进行生化特性和药物敏感性鉴定,并对其 16S rRNA 进行 PCR 扩增。药敏试验显示,2 株分离菌对临床常用药氟苯尼考、诺氟沙星、强力霉素等敏感。

**关键词:**散养草鸡;脾组织;肝组织;短小芽孢杆菌;巨大芽孢杆菌;分离鉴定;微生态制剂;药敏试验

**中图分类号:** S852.61<sup>+</sup>6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)19-0176-03

由于耐药菌的持续出现与存在,研究者希望能获得生物的抑菌方法,近年来芽孢杆菌发展为益生菌,被广泛应用于猪饲养、禽业及水产等养殖业<sup>[1]</sup>。候选益生菌菌株主要有蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus lincheniformis*)、短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)等<sup>[2-3]</sup>。2017 年 6 月从江苏省扬州市高邮

市某养殖场饲养的散养草鸡中分离出 2 株芽孢杆菌,经鉴定 1 株为短小芽孢杆菌(*B. pumilus*),另 1 株为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)。对 2 株细菌的生化特点、耐药性及其对其他细菌的抑制作用等生物学特性作初步研究。

### 1 材料与方法

#### 1.1 主要试剂

将牛肉膏蛋白胨琼脂培养基溶化,待凉至 50 ℃ 左右时按 5% 的比例加入无菌绵羊血配成血琼脂培养基,倒入培养皿中,4 ℃ 保存备用。牛肉膏蛋白胨琼脂培养基、麦康凯培养基购自上海中科昆虫生物技术开发有限公司,肠杆菌科细菌生化鉴定管和药敏试纸购自杭州微生物试剂有限公司。

#### 1.2 细菌分离培养

2017 年 6 月从江苏省扬州市高邮市某养殖场饲养的 600 只 110 日龄散养草鸡中取 2 只消瘦的病鸡剖杀,主要病变为

分析[J]. 食品研究与开发,2011,32(7):106-109.

[10] 俞乃胜. 兔腹泻病因的研究现状及防制对策[J]. 中国养兔杂志,2002(2):31-35.

[11] Squibb R L, Guzmán M, Scrimshaw N S. Dehydrated desmodium, kikuyu grass, ramie, and banana leaf forages as supplements of protein riboflavin and carotenoids in chick rations[J]. Poultry Science, 1953, 32(6):1078-1083.

[12] Squibb R L, Rivera C, Jarquin R. Comparison of chromogenic method with standard digestion trial for determination of the digestible nutrient content of kikuyu grass and ramie forages with sheep[J]. Journal of Animal Science, 1958, 17(2):318-321.

[13] 孙晋超. 造成兔腹泻的四大因素及预防[J]. 中国养兔杂志, 2008(10):11.

[14] 区炳庆,景栋林,张 莹,等. 江村黄鸡肌肉肌苷酸和脂肪酸含量的测定[J]. 湖北农业科学,2012,51(6):1198-1199,1206.

[15] 马鸿胜,牛庆恕,杨笃宝,等. 鸡肉品质及其相关因素的研究[J]. 山东农业大学学报(自然科学版),1997,28(1):13-20.

[16] Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor super family by peroxisome proliferators[J]. Nature, 1990, 347(6294):645-650.

收稿日期:2017-11-27

基金项目:江苏省高校自然科学基金项目(编号:16KJB230006);徐州市推动科技创新专项资金(编号:KC16NG066);江苏高校优势学科建设工程资助项目。

作者简介:陈永亮(1981—),男,江苏阜宁人,副教授,主要从事家禽生产与疾病防治研究。Tel:(0516)83628049;E-mail:chyola888@163.com。

通信作者:王彦红,博士,讲师,主要从事家禽疾病临床诊断与防治研究。Tel:(0514)87979036;E-mail:wyl7405@163.com。

### 参考文献:

[1] 朱涛涛,朱爱国,余永廷,等. 苕麻饲料化的研究[J]. 草业科学, 2016,33(2):338-347.

[2] 熊和平. 苕麻多功能开发潜力及利用途径[J]. 中国麻业,2001, 23(1):22-25.

[3] 贺 瑶,崔慧慧,田 雯,等. 苕麻作为草食动物饲草资源的潜力及其饲用价值研究进展[J]. 饲料工业,2016,37(21):26-30.

[4] 姜 涛,熊和平,喻春明,等. 苕麻在饲料中的研究及开发应用[J]. 饲料工业,2008,29(3):53-55.

[5] 罗正玮,兰丙基,陈孝嫻,等. 苕麻叶饲用效果及苕麻叶配制浓缩饲料的研究[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版),1989,15(增刊1):137-143.

[6] 牟 琼,吴佳海,陈瑞祥. 苕麻嫩茎叶粉饲喂肉鸡试验[J]. 兽药与饲料添加剂,2000(2):27-28.

[7] 张 彬,李丽立. 苕麻叶粉对生长肥育猪饲用效果研究[J]. 饲料研究,1999(5):31-32.

[8] 李 闯,林 谦,蒋桂韬,等. 日粮不同精料与苕麻配比对湘白鹅生长性能的影响研究[J]. 中国饲料,2015(17):13-16.

[9] 王 瑞,刘海学,马俪珍,等. 几种食用油中脂肪酸含量的测定与

肝肿大且有白色斑点,脾肿大,腺胃肿大。取肝、脾、肺等组织器官,按常规无菌操作接种于血琼脂平板上,并于 37 °C 条件下培养 24 h,挑取单菌落分别在麦康凯培养基与血琼脂培养基上进行纯化培养,观察分离菌的生长状况和菌落形态特征。再挑选单个菌落用革兰氏染色,并于显微镜下观察细菌形态。

### 1.3 MALDI biotyper 分析

参照 MALDI biotyper 分析仪的操作标准进行单个菌落点样、晾干,然后加 1  $\mu$ L 甲酸混匀、再晾干后进机器 MBT(购自德国 Bruker 公司,型号 microflex)检测,采用 flex control 程序进行检测<sup>[4]</sup>。

### 1.4 16S rRNA 基因测序

挑取单个菌落加入 20  $\mu$ L 的 16S-free H<sub>2</sub>O 水中,煮沸,裂解,制备其 DNA 模板,按照宝生物工程(大连)有限公司的 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit 方法进行 PCR 扩增,取 5  $\mu$ L 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,出现大小为 500 bp 的目的片段,然后将剩余的 PCR 扩增产物送至金斯瑞生物科技有限公司进行测序。

### 1.5 生化试验

用接种针挑取纯化后细菌的单个菌落,按常规方法分别进行葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露糖、蔗糖、木糖、棉子糖、甘露醇、鼠李糖、果糖、卫茅醇、阿拉伯糖等糖或醇类生化发酵试验,以及甲基红(MR)、二乙酰(VP)、硫化氢、淀粉水解、硝酸盐还原、明胶液化、蛋白胨水(吡啶)等试验。另外进行耐盐(7% NaCl)试验检测,置 37 °C 条件下培养 24 h 后观察结果。

### 1.6 药敏试验

采用 Kirby-Bauer 药敏纸片法进行药敏试验,所用药敏纸片包括头孢三嗪(菌必治)、氟苯尼考、美洛西林、多粘菌素 B、多西环素、新霉素、丁胺卡那霉素、卡那霉素、庆大霉素、复方新诺明、链霉素、诺氟沙星、左旋氧氟沙星、环丙沙星和妥布霉素等 15 种,具体操作步骤为在无菌条件下,挑取纯化后的单个菌落均匀涂布于血琼脂平板上,取 6 mm 药敏纸片贴于平板琼脂面上,37 °C 条件下培养 24 h 后观察结果,测量各抗生素纸片的抑菌圈直径。

### 1.7 分离菌对其他细菌的抑菌性试验

参照文献[5-6]采用琼脂扩散法进行抑菌性试验,把临床分离的鸡源大肠杆菌、鸡源金黄色葡萄球菌和鸡白痢沙门菌分别接种于牛肉膏蛋白胨液体培养基中,于 37 °C、150 r/min 条件下培养 72 h,取 100 mL 菌液以 6 000 r/min 的转速离心 5 min,弃去上清液,将下部沉淀用生理盐水稀释成  $1 \times 10^8$  CFU/mL 的菌悬液,其中鸡源大肠杆菌和鸡源金黄色葡萄球菌悬液均匀涂布在厚度约为 4 mm 的营养琼脂平板上,鸡白痢沙门菌悬液均匀涂布在厚度约为 4 mm 的血平板上,然后在平板上打直径约为 4 mm 的孔,封底。用相同方法制备的芽孢杆菌菌悬液加满孔,每个菌株加样 3 个孔,置于适宜温度下培养 24 h,测量抑菌圈直径( $\varphi$ ),取平均值。判断标准<sup>[6]</sup>: $\varphi \leq 5$  mm,不敏感; $5 \text{ mm} < \varphi \leq 10$  mm,低度敏感; $10 \text{ mm} < \varphi < 15$  mm,中度敏感; $\varphi \geq 15$  mm,高度敏感。

## 2 结果

### 2.1 细菌分离

将病原菌材料接种于血琼脂平板上,于 37 °C 条件下培养

24 h 后,观察发现,在接种脾脏组织的血琼脂平板上出现完全溶血的菌落,命名为 201706JS,血琼脂平板镜检结果见图 1;在接种肝脏组织的血琼脂平板上出现不溶血的较大不光滑菌落,命名为 201706JL,血琼脂平板镜检结果见图 2,2 株分离菌在麦康凯琼脂培养基上均不生长。其他组织接种后放置 48 h 仍无可疑菌落出现。

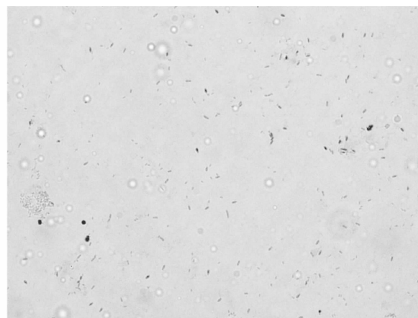


图1 201706JS 芽孢杆菌镜检结果(G.S.10×100)

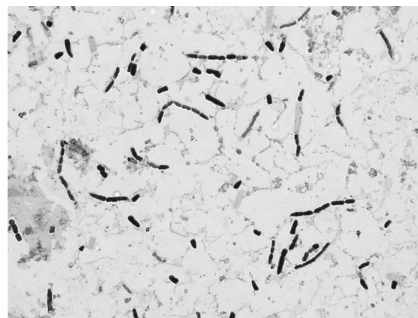


图2 201706JL 芽孢杆菌镜检结果(G.S.10×100)

### 2.2 MALDI biotyper 分析结果

MALDI biotyper 分析发现,2 株分离菌中的 201706JS 为短小芽孢杆菌(*B. pumilus*),201706JL 为巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*)。

### 2.3 16S rRNA 基因的 PCR 扩增及序列分析

2 株分离菌的 16S rRNA 基因经 PCR 扩增后<sup>[7]</sup>,出现大小为 500 bp 左右的目的条带,将所测得的序列结果(图 3、图 4)在 NCBI 网站上进行 BLAST 搜索比对,结果表明,所获得的序列 201706JS 与短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)(序列号:KU928365.1)的同源性为 100%,201706JL 与巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*)(序列号:KY417160.1)的同源性为 100%。

```
CGCTGGCGGGCTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGAGGGAGCTTGCTC
CCGGATGTTAGCGCGGACGGGTGAGTAACAGTGGGTAACCTGCCTGTAAGAC
TGGGATAACTCCGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATG
GTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGCGCA
TTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGCGCAGCATGCGTAGCCGACCTG
AGAGGGTGATCGGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGT
GAGTGATGAAGGTTTTTCGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGC
AAGAGTAACTGCTTGCACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAACTA
CGTGCCAGCCGCCGCGGTAATTCGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGA
```

图3 201706JS 测序结果

### 2.4 生化特性

由表 1 可知,2 株分离菌均能发酵葡萄糖、果糖,并能够水解淀粉,但不能水解乳糖、蔗糖等糖类,耐盐试验呈阳性,MR、VP 试验为阴性。

CGCTGGCGCGCTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGCAACTGATTAGAAGCTTGCT  
TCTATGACGTTAGCGGGACGCGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAG  
ACTGGGATAACTTCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTTCA  
TGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGTG  
CATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGCAACGATGCATAGCCGACC  
TGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGA  
GGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGC  
GTGAGTGATGAAGGCTTCGGGTGCTAAACCTCTGTTTAGGGAAGAACAGT  
ACGAGAGTAACCTGCTCGTACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAAC  
TACGTGCCAGACGGCGGTAAATACGTCGTGACTGGGAAAACCCCTGGCGA

图4 201706JL 测序结果

表 1 2 株分离菌生化试验结果

生化管	201706JS	201706JL	生化管	201706JS	201706JL
葡萄糖	+	+	甲基红 (MR)	-	-
乳糖	-	-	二乙酰试验 (VP)	-	-
麦芽糖	+	+	硫化氢	-	-
甘露糖	-	-	果糖	+	+
蔗糖	-	-	卫茅醇	-	-
木糖	-	-	阿拉伯糖	-	-
淀粉	+	+	硝酸盐还原	-	-
棉子糖	-	-	明胶液化	+	+
甘露醇	-	-	蛋白胨水 (吡啶)	-	-
鼠李糖	-	-	耐盐试验 (7% NaCl)	+	+

注：“-”表示阴性；“+”表示阳性。

2.5 药敏试验结果

药敏试验结果 (表 2) 显示,2 株分离菌对常用抗生素强力霉素、诺氟沙星、氟苯尼考、复方新诺明、环丙沙星、卡那霉素、丁胺卡那霉素、妥布霉素、庆大霉素、链霉素、左旋氧氟沙星等均敏感。

表 2 2 株分离菌药敏试验结果

抗生素	规格 (μg/片)	抑菌环直径(mm) 耐药 中介 敏感	201706JS	201706JL
复方新诺明	125/75	≤12 13~16 ≥17	44	27
环丙沙星	5	≤15 16~20 ≥21	36	26
美洛西林	75	≤17 18~20 ≥21	28	20
头孢三嗪 (菌必治)	30	≤13 14~20 ≥21	15	24
妥布霉素	10	≤12 13~14 ≥15	26	22
庆大霉素	10	≤12 13~14 ≥15	25	20
链霉素	10	≤11 12~14 ≥15	18	16
卡那霉素	30	≤13 14~17 ≥18	26	22
丁胺卡那霉素 (阿米卡星)	30	≤14 15~16 ≥17	23	24
新霉素	30	≤12 13~16 ≥17	16	19
多粘菌素 B	300	≤8 8~11 ≥12	11	13
强力霉素 (多西环素)	30	≤12 13~15 ≥16	19	23
诺氟沙星 (氟哌酸)	10	≤12 13~16 ≥17	20	19
氟苯尼考	30	≤12 13~17 ≥18	32	25
左旋氧氟沙星	5	≤13 14~16 ≥17	37	26

2.6 分离菌对其他细菌的抑菌性试验

由表 3 可知,鸡源大肠杆菌对分离的短小芽孢杆菌 (201706JS) 和巨大芽孢杆菌 (201706JL) 都低度敏感,鸡源金黄色葡萄球菌对短小芽孢杆菌 (201706JS) 低度敏感,但是鸡白痢沙门菌对 2 株细菌均不敏感。

表 3 2 株分离菌对其他细菌的抑菌结果

指示菌	抑菌环直径 (mm)	
	201706JS	201706JL
鸡源大肠杆菌	6.0	10
鸡白痢沙门菌	4.0	4
鸡源金黄色葡萄球菌	5.5	4

3 讨论

本研究从散养草鸡的脾和肝中分别分离出短小芽孢杆菌和巨大芽孢杆菌各 1 株,通过生理生化鉴定和分子生物学鉴定,分别为短小芽孢杆菌 (*B. pumilus*) 和巨大芽孢杆菌 (*B. megaterium*)。这 2 株芽孢杆菌对强力霉素、诺氧沙星、氟苯尼考、复方新诺明、环丙沙星、卡那霉素、丁胺卡那霉素、妥布霉素、庆大霉素、链霉素、左旋氧氟沙星常用抗生素均敏感,由此可知,在临床上使用抗生素不仅容易造成致病菌的耐药性,更会杀灭益生菌,引起家禽体内菌群失调,因此在家禽生产中不能一味使用抗生素,须全面考虑用药的正面和负面影响。2 株芽孢杆菌对常见病原菌尤其是对鸡源大肠杆菌均有一定抑制性,初步具备了优良的益生菌株条件,加上芽孢杆菌自有的较强可逆性和益生性,适合作生产家禽微生态制剂<sup>[8-9]</sup>。但从已知的文献可以看出,益生菌在体外试验中由于受各种因素以及细菌本身特性的影响,对致病菌的抑制性差异比较大,张红英等在抑菌试验中将芽孢杆菌菌液浓缩 10 倍,获得了较好的抑菌效果<sup>[10]</sup>,因此运用此类芽孢杆菌生产微生态制剂用于抗菌抑菌时应该注意加工和使用方法,这也是笔者所承担 2 个基金项目研究中草药配伍芽孢杆菌来替代抗生素的一个初衷。

参考文献:

[1] 张新雄,彭 锋,毛光平,等. 饲用芽孢杆菌研究与应用进展[J]. 应用与环境生物学报,2013,19(5):891-897.  
[2] 李雅丽,秦 艳,周绪霞,等. 6 株芽孢杆菌的生物学特性比较研究[J]. 中国畜牧兽医,2011,38(4):62-66.  
[3] 韦 露,陈 恺,龙云映,等. 一株短小芽孢杆菌 B1 的筛选鉴定及其抗菌特性研究[J]. 水产科学,2015,34(3):161-168.  
[4] Kostrzwa M,Daltonics B. Rapid Detection of Salmonella by Selective Enrichment and Mass Spectrometry - Based MALDI Biotyper[C]// 中华医学会第九次全国检验医学学术会议暨中国医院协会临床检验管理专业委员会第六届全国临床检验实验室管理学术会议论文汇编. 北京:2011.  
[5] 蒋建军,肖红冉,张 杰,等. 仔猪胃肠道优良性状乳酸杆菌的分离和鉴定[J]. 石河子大学学报(自然科学版),2012,30(1):43-46.  
[6] 张文鑫,龚 伟. 四种活菌剂对仔猪黄痢病原菌的体外抑菌试验[J]. 云南农业大学学报,1997,12(2):62-65.  
[7] 秦翠丽,杨若岚,李松彪,等. 基于 16S rDNA 序列 4 株鸡源芽孢杆菌的分子鉴定[J]. 广东农业科学,2014,41(22):130-134.  
[8] 杨若岚. 乌鸡源芽孢杆菌与中草药配伍对乌鸡生长性能与免疫性能的影响[D]. 洛阳:河南科技大学,2015.  
[9] 王永芬,席 磊,边传周. 鸡源芽孢杆菌的分离鉴定与益生菌株筛选[J]. 中国家禽,2010,32(12):64-66.  
[10] 张红英,杨 霞,金 钺,等. 鸡肠源芽孢杆菌的分离、鉴定和抗菌活性[J]. 中国微生态学杂志,2007,19(6):504-506.