

猪肠源性枯草芽孢杆菌耐逆性研究

周 明, 王 欢, 李泽阳

(安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036)

摘 要: 研究了猪肠源性枯草芽孢杆菌对逆性因子的耐受性。将猪肠源性枯草芽孢杆菌作如下试验处理, 在 pH 为 2.0、3.0 和 4.0 的营养液中培养 3、6 和 9 h, 在含 0.1%、0.3% 和 0.5% 胆盐营养液中培养 4 和 8 h, 在 70、80、90 和 100℃ 的营养液中处理 10 和 20 min, 在 Cu 和 Zn 离子浓度分别为 0、100、200、300、400 和 500 mg·L⁻¹ 的营养液中培养 24 h, 测定细菌存活率; 在常规营养液中和 37℃ 条件下培养 24 和 48 h, 测定培养液中细菌分泌的蛋白酶和淀粉酶活性。试验结果显示, 猪肠源性枯草芽孢杆菌对酸和胆盐有较强的耐受性, 对 70~90℃ 的高温也有不同程度的耐受性; 微量元素铜离子对枯草芽孢杆菌的增殖有促进作用, 但锌离子对其有抑制作用; 枯草芽孢杆菌有较强的产蛋白酶能力, 但产淀粉酶性能较弱。基于试验结果推断, 猪肠源性枯草芽孢杆菌对酸、胆盐、高温和铜离子的耐受性较强。

关键词: 猪肠源性枯草芽孢杆菌; 逆性因子; 耐受性

中图分类号: S816.7

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2013)04-0519-04

Study on resistance to stress factors of *Bacillus subtilis* from swine intestinal juice

ZHOU Ming, WANG Huan, LI Ze-yang

(School of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: The resistance to stress factors of *bacillus subtilis* from swine intestinal juice was studied. This strain was respectively inoculated in nutrition broth at pH 2.0, 3.0 and 4.0 for 3, 6 and 9 h, in 0.1%, 0.3% and 0.5% bile salt nutrition broth for 4 and 8 h, in nutrition broth at 70, 80, 90 and 100 °C water bath for 10 and 20 min, and in nutrition broth containing 0, 100, 200, 300, 400 and 500 mg·L⁻¹ of Cu and Zn ions for 24 h. The survival rate of *bacillus subtilis* was measured. Protease and amylase activities were determined after the bacteria was cultured at normal broth for 24 and 48 h, The results showed that *Bacillus subtilis* from swine intestinal juice had strong resistance to acid and bile salt, 71.8%-91.5% of the bacteria survived at temperature of 70-90°C. Cu ions could promote propagation of *bacillus subtilis*, but Zn ions could inhibit propagation of *bacillus subtilis*. *Bacillus subtilis* was able to produce high activity of protease, but low amylase. It is concluded that this bacteria has relatively strong resistance to acid, bile salt, high temperature and Cu ions.

Key words: *bacillus subtilis* from swine intestinal juice; stress factors; resistance

枯草芽孢杆菌为益生菌, 作为饲用菌较广泛地被用作饲料添加剂, 并取得了较好的实际应用效果^[1]。然而, 枯草芽孢杆菌的应用效果受到日粮营养水平、菌剂添加量、动物生长阶段和饲养环境等多种因子的影响^[2]。目前, 微量元素铜和锌在猪饲料中添加量很大^[3], 如铜在仔猪饲料中添加量达 200 mg·kg⁻¹ 以上, 锌在仔猪饲料中添加量达 2 250 mg·kg⁻¹ 以上。另外, 动物的胃中含有较多的胃酸(盐

酸), 小肠中又含有较多的胆盐。再者, 饲料在加工(如制粒等)要经受较高的温度^[3]。上述因素对益生菌饲料添加剂的活性影响如何, 少有研究。因此, 本试验拟研究常用益生菌枯草芽孢杆菌对酸、胆盐、铜离子、锌离子、温度的耐受能力, 为更合理地利用该益生菌提供技术参数。

1 材料与方法

1.1 试验菌株

试验用枯草芽孢杆菌由仔猪肠道分离获得, 种子菌液中细菌含量为 5×10^8 个·mL⁻¹。

1.2 主要试剂

营养琼脂培养基、MRS 营养液(由蛋白胨、肉膏、葡萄糖、磷酸氢二钾、柠檬酸氢二铵、乙酸钠、硫酸镁、硫酸锰、半胱氨酸等组成, pH 值 6.2~6.4)、猪胆盐(购于杭州微生物试剂公司); Folin 试剂、三氯乙酸溶液、3, 5-二硝基水杨酸等。

1.3 枯草芽孢杆菌耐酸性测定

取 MRS 营养液, 分成 3 组, 用乙酸溶液分别调节其 pH 为 2.0、3.0 和 4.0, 灭菌冷却后, 按 2% 的量接种种子液, 于 37℃, 160 r·min⁻¹ 摇床内培养, 分别于 3、6 和 9 h 取出相应的培养基, 进行平板计数, 以 0 h 为对照, 计算枯草芽孢杆菌的存活率。

1.4 枯草芽孢杆菌耐胆盐性测定

配制含 0.1%、0.3% 和 0.5% 胆盐的培养基, 接种菌种, 于 37℃, 160 r·min⁻¹ 摇床内培养, 分别于 4 和 8 h 取出相应的培养基, 进行平板计数, 以 0 h 为对照, 计算存活率。

1.5 枯草芽孢杆菌耐热性测定

将稀释 10 倍的菌液分别孵育在 70、80、90 和 100℃ 的水浴中, 每个温度梯度处理时间分别为 10 和 20 min, 处理后平板计数, 以未热处理的菌液作对照, 计算存活率。

1.6 枯草芽孢杆菌对 Cu²⁺、Zn²⁺ 抗性的测定

取 MRS 营养液, 分别配制含 Cu (CuSO₄)、Zn

(ZnSO₄) 离子浓度为 0、100、200、300、400 和 500 mg·L⁻¹ 的营养液, 接种活化后的枯草芽孢杆菌, 每组设置 3 个重复, 于 37℃ 摇床培养 24 h 后, 用酶标仪测量培养菌液的 OD₆₀₀ 值。

1.7 枯草芽孢杆菌产酶力测定

将枯草芽孢杆菌接种到 MRS 营养液中, 37℃, 160 r·min⁻¹ 摇床分别培养 24 和 48 h, 尔后将培养的菌液 6 000 r·min⁻¹ 冷冻离心 10 min, 取上清液测定酶活。用 Folin-酚法^[4] 测定蛋白酶活性。蛋白酶酶活定义: 1 mL 上清液在 pH7.2 和温度 40℃ 条件下, 1 分钟水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸的酶量为 1 个酶活力单位(u)。用 3, 5-二硝基水杨酸显色法^[5] 测定淀粉酶活性。淀粉酶活定义: 1 mL 上清液在 pH 5.6 和温度 40℃ 条件下, 1 min 水解淀粉产生 1 mg 麦芽糖的酶量为 1 个酶活力单位(u)。

1.8 统计分析

用 SAS6.12 统计软件对试验数据进行统计分析, 用 Duncan 新复极差法对各处理组数据进行多重比较分析。

2 结果与分析

2.1 枯草芽孢杆菌耐酸性测定结果

由表 1 可见, 在 pH 值不同的营养液中, 枯草芽孢杆菌的存活率随着 pH 值的降低或培养时间的延长均显著下降 ($P < 0.05$); 并且, pH 值和培养时间互作地影响枯草芽孢杆菌的存活率 ($P < 0.05$)。表 1 显示, 枯草芽孢杆菌在 pH3.0 营养液中培养 3 h, 存活率为 58.6%; 培养时间延长至 6 h, 其存活率仍能达到 47.5%。

表 1 枯草芽孢杆菌的耐酸性

Table 1 The resistance to acid of *Bacillus subtilis*

时间/h Time	酸度 Acid degree (pH)			显著性 Significant difference		
	2.0	3.0	4.0	时间 Time	酸度 Acid	时间×酸度 Time×Acid
活菌数/ $\times 10^5$ cfu·mL ⁻¹ Number of live bacteria						
3	10.5±0.4	15.5±0.4	18.6±0.5	*	*	*
6	7.7±0.5	12.6±0.4	16.2±0.6			
9	5.6±0.8	8.5±0.4	13.8±0.3			
存活率/% Survival rate						
3	41.0±1.6	58.6±1.5	65.9±1.6	*	*	*
6	30.1±1.8	47.5±1.5	57.4±2.0			
9	21.9±3.0	32.0±1.3	49.0±0.9			

注: 成活率=处理后的活菌数/对照组的活菌数; “*”表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

Note: Survival rate=number of live bacteria in the treatment group/number of live bacteria in the control group; “*” refers to significant difference ($P < 0.05$). The same below.

2.2 枯草芽孢杆菌耐胆盐性测定结果

由表 2 可看出, 随着营养液中胆盐浓度的提高

或培养时间的延长, 枯草芽孢杆菌的存活率显著下降 ($P < 0.05$), 且胆盐和培养时间互作地影响枯草

芽孢杆菌的存活率 ($P<0.05$)。枯草芽孢杆菌在胆盐浓度为 0.3% 的营养液中培养 4 h 后存活率为 65.5%, 8 h 后其存活率仍能达到 40.4%。

2.3 枯草芽孢杆菌耐热性测定结果

如表 3 所示, 随着温度的提高或时间的延长, 枯草芽孢杆菌存活率显著下降 ($P<0.05$), 且温度和培养时间交互地影响枯草芽孢杆菌的存活率

($P<0.05$)。在 70℃ 下处理 10 和 20 min 后, 枯草芽孢杆菌的存活率分别为 91.5% 和 74.5%。在 90℃ 下, 处理 10 min, 其存活率为 61.8%; 处理 20 min 后, 其存活率仍能达到 33.3%; 但在 100℃ 下处理 10 min 后, 枯草芽孢杆菌的存活率降到 0.4%, 说明在 90℃ 下处理 10 min, 枯草芽孢杆菌仍能保持较高的存活率。

表 2 枯草芽孢杆菌的耐胆盐性

Table 2 The resistance to bile salt of *bacillus subtilis*

时间/h Time	胆盐浓度/% Bile concentration			显著性 Significant difference		
	0.1	0.3	0.5	时间 Time	胆盐 Bile	时间×胆盐 Time×Bile
活菌数/ $\times 10^5$ cfu·mL ⁻¹ Number of live bacteria						
4	19.2±0.6	15.1±0.3	11.9±0.3	*	*	*
8	17.0±0.4	9.3±0.5	6.7±0.7			
存活率/% Survival rate						
4	79.5±2.3	65.5±1.4	53.2±1.2	*	*	*
8	70.3±1.5	40.4±2.0	29.9±3.0			

表 3 枯草芽孢杆菌的耐热性

Table 3 Heat resistance of *bacillus subtilis*

时间/min Time	温度/℃ Temperature				显著性 Significant difference		
	70	80	90	100	时间 Time	温度 Temperature	时间×温度 Time×Temperature
活菌数/ $\times 10^5$ cfu·mL ⁻¹ Number of live bacteria							
10	64.7±0.4	55.7±0.3	43.7±0.3	0.3±0.0	*	*	*
20	52.7±0.3	35.3±0.2	23.5±0.1	0.1±0.0			
存活率/% Survival rate							
10	91.5±5.7	78.8±3.6	61.8±4.5	0.4±0.0	*	*	*
20	74.5±3.6	50.0±2.2	33.3±1.4	0.1±0.0			

表 4 枯草芽孢杆菌对 Cu²⁺、Zn²⁺ 的抗性

Table 4 The resistance to Cu²⁺ and Zn²⁺ of *bacillus subtilis*

Cu ²⁺ /mg·L ⁻¹	0	100	200	300	400	500
OD ₆₀₀ value	2.51±0.06 ^c	2.56±0.03 ^{bc}	2.62±0.09 ^{ab}	2.63±0.04 ^{ab}	2.68±0.02 ^a	2.70±0.03 ^a
Relative value	100	102.0	104.4	104.8	106.8	107.6
Zn ²⁺ /mg·L ⁻¹	0	100	200	300	400	500
OD ₆₀₀ value	2.63±0.04 ^a	2.49±0.02 ^b	2.36±0.02 ^c	2.34±0.02 ^{cd}	2.31±0.04 ^{cd}	2.28±0.05 ^d
Relative value	100	94.7	89.7	89.0	87.8	86.7

注: 同一列数据后标注不同的字母差异显著 ($P<0.05$)。下同。

Note: the values in the same line without the same small letters differ significantly ($P<0.05$). The same below.

表 5 枯草芽孢杆菌产酶力

Table 5 The enzyme production of *bacillus subtilis*

项目 Item	培养时间/h Culture time	
	24	48
淀粉酶活性/ U·mL ⁻¹ Amylase activity	1.7±0.1 ^b	1.9±0.1 ^a
蛋白酶活性/ U·mL ⁻¹ Protease activity	565.6±135.6 ^a	655.2±86.8 ^a

2.4 枯草芽孢杆菌对 Cu、Zn 抗性的测定结果

表 4 显示, 营养液中 Cu 离子浓度的提高, 枯

草芽孢杆菌增殖加快 ($P<0.05$)。Cu 离子浓度为 500 mg·L⁻¹ 时, 菌液的 OD₆₀₀ 值为 2.70, 显著地高于无

Cu 的对照组 (2.51), 相对提高 107.6%。然而, Zn 离子浓度的提高, 对枯草芽孢杆菌的增殖有抑制作用 ($P < 0.05$)。当 Zn 离子浓度为 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 菌液 OD 值由无 Zn 对照组的 2.63 下降到 2.28。

2.5 枯草芽孢杆菌产酶力测定结果

由表 5 可看出, 枯草芽孢杆菌培养 24 和 48 h 后, 其淀粉酶活分别为 1.7 和 $1.9 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$; 培养 48 h 的酶活显著地高于培养 24 h 的酶活 ($P < 0.05$)。枯草芽孢杆菌培养 24 和 48 h 后, 其蛋白酶活分别为 565.6 和 $655.2 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$; 培养时间对蛋白酶活无显著的影响 ($P > 0.05$)。

3 讨论

3.1 枯草芽孢杆菌的耐逆性

孙笑非等^[6]报道, 在 pH3~7 的条件下, 枯草芽孢杆菌存活率均超过 90%。本试验所用的猪肠源性枯草芽孢杆菌在 pH 3.0 的营养液中培养 3 h, 存活率为 58.6%; 培养 6 h 后, 存活率为 47.5%; 培养 9 h 后, 其存活率仍保持 32%。这些结果表明: 本试验所用的猪肠源性枯草芽孢杆菌菌株与其他菌株相似, 也具有较强的耐酸性。猪胃内的 pH 值一般为 3 左右, 饲料在猪胃内停留时间为 4 h 左右, 枯草芽孢杆菌一般能耐受胃内的酸性, 因此枯草芽孢杆菌多数菌株能活着通过胃, 进入后段消化道而发挥作用。

猪十二指肠内食糜中胆盐浓度为 0.03%~0.3%^[7]。饲用益生菌在消化道内要发挥作用, 应对胆盐有耐受能力。本试验所用的猪肠源性枯草芽孢杆菌菌株在胆盐浓度为 0.3% 的营养液中培养 4 h, 其存活率为 65.5%, 培养 8 h 其存活率仍能达到 40.4%, 表明该菌株能耐受体内胆盐, 从而可发挥正常作用。

饲料制粒的温度一般为 $70 \sim 90^\circ\text{C}$ ^[3]。耐热性是选择饲用益生菌菌株的一个重要指标^[8]。闫国宏等^[9]从新疆番茄酱中分离了 1 株枯草芽孢杆菌, 并测定了其耐热性。结果发现: 108°C 处理 20 min 后, 活菌数减少了 3 个数量级; 但 93°C 处理 20 min, 仅减少了一个数量级。本试验所用的猪肠源性枯草芽孢杆菌在 90°C 下处理 10 min, 其存活率为 61.8%; 90°C 下处理 20 min 后, 存活率仍能达到 33.3%。这表明: 该菌株有较强的耐热性, 能耐受体饲料制粒等加工过程中的较高温度。

现今, 微量元素铜和锌在猪特别是仔猪饲料中添加量很大, 如铜在仔猪饲料中添加量为 200

$\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以上, 锌在断奶仔猪饲料中添加量达 $2\ 250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以上。因此, 考察饲用益生菌对铜和锌的耐受性可为合理应用益生菌提供依据。本试验研究发现, 培养液中添加 Cu 离子 ($100 \sim 500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 对枯草芽孢杆菌的增殖有促进作用, 且 Cu 离子添加量增多, 对枯草芽孢杆菌的增殖作用有增大的趋势 (见表 4)。但在培养液中添加 Zn 离子, 对枯草芽孢杆菌的增殖有抑制作用 (见表 4)。在生产上, 断奶仔猪腹泻率较高。饲料厂或养猪场常采取的措施之一是在仔猪饲料中加氧化锌, 加锌水平达 $2\ 000 \sim 2\ 500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。氧化锌在肠道内能抑制大肠杆菌的增殖活动, 因而使粪中大肠杆菌数量极显著地减少。氧化锌可能主要通过这一机制或作为主要机制之一来预防仔猪腹泻症^[3]。

3.2 枯草芽孢杆菌的产酶力

产酶力是衡量益生菌作用的一个重要指标。王朋朋等^[10]从牛瘤胃中分离出 1 株枯草芽孢杆菌, 并对其产酶力进行了测定。结果是该菌株培养液的上清液中蛋白酶和淀粉酶的活性分别为 221.6 和 $54.1 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。本试验所用的枯草芽孢杆菌经 24 h 的培养后, 蛋白酶活性为 $565.6 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、淀粉酶活力为 $1.7 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$; 培养 48 h 后, 蛋白酶活性为 $655.2 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、淀粉酶活性为 $1.9 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。试验结果表明: 本试验所用的猪肠源性枯草芽孢杆菌菌株有较强的产蛋白酶能力, 但产淀粉酶的性能有限。

参考文献:

- [1] 陈代文, 王恬. 动物营养与饲养学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2011: 168-180.
- [2] Verstegen M W, Williams B A. Alternatives to the use of antibiotics as growth promoters for monogastric animals[J]. Anim Biotechnol, 2002(13): 113-127.
- [3] 周明. 饲料学[M]. 2版. 合肥: 安徽科学技术出版社, 2010.
- [4] 吴国峰. 工业发酵分析[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006.
- [5] 杨慧, 王振华, 潘康成, 等. 芽孢杆菌产淀粉酶活性的研究[J]. 现代农业科技, 2007(2): 90-93.
- [6] 孙笑非, 温俊. 枯草芽孢杆菌对温度、pH 及抗生素耐受性的研究[J]. 饲料研究, 2009(8): 66-67.
- [7] Wasson K, Criley J M, Clabaugh M B, et al. Therapeutic efficacy of oral lactobacillus preparation for antibiotic-associated enteritis in guinea pigs[J]. Contemp Top LAB Anim Sci, 2000, 39(1): 32-38.
- [8] Chen C C. Coupled lactic acid fermentation and adsorption[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 59: 170-174.
- [9] 闫国宏, 傅力, 肖春芳, 等. 新疆番茄酱中枯草芽孢杆菌耐热性的研究[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(11): 88-90.
- [10] 王朋朋, 常娟, 王平, 等. 蛋白酶和淀粉酶产生菌的筛选及酶学性质分析研究[J]. 动物生产, 2009, 45(21): 48-51.