

吴非凡, 王晶, 常伟辰, 等. 一株羊源高产纤维素酶枯草芽胞杆菌的分离鉴定及生物学特性研究 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (6): 38-43.

WU F F, WANG J, CHANG W C, et al. Isolation, identification and biological characteristics of a high-yield cellulase *Bacillus subtilis* [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (6): 38-43.

# 一株羊源高产纤维素酶枯草芽胞杆菌的分离鉴定及生物学特性研究

吴非凡<sup>1</sup>, 王晶<sup>1</sup>, 常伟辰<sup>1</sup>, 孔亮<sup>1</sup>, 黎露露<sup>1</sup>, 徐曾浩<sup>1</sup>,  
毛赛<sup>1</sup>, 张红英<sup>1</sup>, 袁淑萍<sup>2\*</sup>, 杨明凡<sup>1\*</sup>

(1. 河南农业大学动物医学院, 河南 郑州 450046;

2. 河南省动物疫病预防控制中心, 河南 郑州 451460)

**摘要:** 旨在筛选潜在高产纤维素酶的益生菌并探究其益生作用以期用于生产实践。从绵羊肠道内容物中, 利用羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 平板筛选产纤维素酶菌株, 测定其纤维素酶活性, 筛选出目标菌株; 采用形态学分析、生化试验和 16S rDNA 序列分析对目标菌株进行鉴定; 进一步探究其生长曲线、产蛋白酶及  $\alpha$ -淀粉酶能力、抑制病原菌能力、耐酸耐胆盐能力、药物敏感性和宿主安全性。结果: 从样品中筛选获得 8 株产纤维素酶菌株, 根据透明圈和菌落直径比值以及纤维素酶活性筛选获得产纤维素能力最强的菌株 ECL1.2, 其羧甲基纤维素酶活性为 18.61 U/mL, 经鉴定为枯草芽胞杆菌; ECL1.2 在培养 12 h 后进入对数生长期, 在培养 26 h 时进入稳定期; 其蛋白酶和  $\alpha$ -淀粉酶活力分别为 2.08 U/mL 和 19.7 U/mL; 可抑制大肠杆菌、肠炎沙门菌和金黄色葡萄球菌的生长; 在 pH 值为 2~7 培养 4 h 及胆盐浓度为 0.1%~0.3% 培养 8 h 条件下存活率大于 60%, 具有一定耐酸耐胆盐性; 除对林可霉素低敏、对庆大霉素中敏外, 对青霉素、头孢唑啉、克拉霉素、诺氟沙星、万古霉素、利福平极其敏感; 对小鼠器官和肠道无危害, 并能提高小鼠日增重和采食量。综上, 枯草芽胞杆菌 ECL1.2 可作为潜在益生菌。

**关键词:** 微生物发酵; 纤维素酶; 分离鉴定; 生物学特性; 益生菌

中图分类号: S852.6

文献标志码: A

文章编号: 0529-5130(2025)06-0038-06

## Isolation, identification and biological characteristics of a high-yield cellulase *Bacillus subtilis*

WU Feifan<sup>1</sup>, WANG Jing<sup>1</sup>, CHANG Weichen<sup>1</sup>, KONG Liang<sup>1</sup>, LI Lulu<sup>1</sup>, XU Zenghao<sup>1</sup>,  
MAO Sai<sup>1</sup>, ZHANG Hongying<sup>1</sup>, YUAN Shuping<sup>2\*</sup>, YANG Mingfan<sup>1\*</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046, China;

2. Henan Province Animal Disease Prevention and Control Center, Zhengzhou 451460, China)

**Abstract:** This study aimed to screen potential high yield cellulase probiotics and to explore its probiotic effect to be used in production practice. Carboxymethyl cellulose plates were used to screen cellulase strains from the intestinal contents of sheep, in order to determine the cellulase activity and to select the target strain. Then, morphological analysis, biochemical tests and sequence analysis of the 16S rDNA gene were used to identify the target strain species. Finally, it's the growth curve, protease and  $\alpha$ -amylase production capacity, pathogen inhibition capacity, acid and bile salt resistance capacity, drug sensitivity, and host safety of the strain. The results showed that eight cellulase-producing strains were selected from the samples. The most cellulase-producing strain ECL1.2 was selected according to the ratio of transparent circle (H) and colony diameter (C) and cellulase activity. The carboxymethylcellulase activity was 18.61 U/mL, which was identified as *Bacillus subtilis*. ECL1.2 entered the logarithmic growth phase after 16 h of culture and reached a plateau at 24 h of culture. Its protease and  $\alpha$ -amylase viability were 2.08 U/mL and 19.7 U/mL, respectively, and it inhibited the growth of *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus*. Being in pH 2-7 culture for 4 h and in the culture with bile salt at concentration of 0.1% -0.3% culture

收稿日期: 2024-06-19; 修回日期: 2025-04-30

基金项目: 河南省重点研发项目 (221111111300); 河南省重点研发专项 (231111111600)

第一作者: 吴非凡, 男, 硕士研究生

\* 通信作者: 袁淑萍, 高级兽医师, 主要从事动物重要疫病病原学研究, E-mail: zhouziwen2019@163.com; 杨明凡, 教授, 主要从事动物重要疫病病原学、中兽医组方和益生菌筛选及防控技术和产品研究, E-mail: yangmingfan123@163.com。

for 8 h, the strain had a survival rate over than 60%, with a little acid resistance and bile salt resistance. ECL 1.2 had low sensitivity to lincomycin, intermediate sensitivity to gentamicin, and high sensitive to penicillin, cefazolin, clarithromycin, norfloxacin, vancomycin, and rifampin. It showed safety for mouse organs and intestines, and was helpful for their daily weight gain and food intake. In conclusion, *Bacillus subtilis* ECL 1.2 could be used as a potential probiotic fermentation strain.

**Keywords:** microbial fermentation; cellulase; isolation and identification; biological characteristics; probiotics

纤维素是一种广泛存在的可再生生物资源，主要存在于植物和谷物中。使用纤维素降解酶利用纤维素资源是当前的研究热点，其对于工业和农业经济的发展有极大的价值<sup>[1]</sup>。分泌高效降解组合酶菌株的选育是利用纤维素资源的关键，直接从自然环境中筛选菌株具有安全可靠<sup>[2]</sup>。目前，在畜牧禽畜养殖行业，益生菌发酵饲料和发酵中药等被广泛用来提高饲料利用率、预防动物疾病、提高生产性能、增强动物机体免疫和改善养殖环境等<sup>[3-7]</sup>。益生菌发酵过程中产生的纤维素胞外酶可以与底物作用，使饲料营养成分和中药有效成分大量释放，所以产纤维素酶能力的大小是进行发酵菌株筛选的主要指标。芽胞杆菌具有高产纤维素酶的能力，能够在低 pH 值下存活，次级代谢产物在宿主体内发挥益生作用，发酵产品在室温下耐储存等优势，因此被认为是最理想的微生物添加剂<sup>[8-9]</sup>。

本试验从绵羊肠道中分离得到 8 株菌，并从中筛选出一株高产纤维素酶的芽胞杆菌菌株，且对其产蛋白酶和  $\alpha$ -淀粉酶能力进行了检测，研究了其抑制病原菌和耐酸耐胆盐能力和安全性，为筛选有效利用纤维素资源的益生菌奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验样品取自 10 月龄健康绵羊的盲肠和结肠内容物，液氮速冻后  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存；40 只 4 周龄健康雌性昆明小鼠购于河南实验动物中心。

CMC-Na 固体培养基：CMC-Na 5 g、酵母提取物 2 g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 g、琼脂 20 g，去离子水定容至 1 L；LB 培养基：胰蛋白胨 10 g，酵母提取物 5 g、氯化钠 10 g 去离子水定容至 1 L（固体培养基需再添 20 g 琼脂）。琼脂、蛋白胨、酵母提取物均购自北京奥博星生物技术有限责任公司；葡萄糖、可溶性淀粉、干酪素、磷酸氢二钾等均购自国药集团化学试剂有限公司；福林酚购于北京索莱宝科技有限公司；刚果红、复红染液购自郑州安图生物有限公司；3, 5-二硝基水杨酸 (DNS) 试剂、CMC-Na、牛胆盐、枯草芽胞杆菌生化鉴定管购自青岛海博生物有限公司；细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自生工生物工程（上海）股份有限公司；药敏纸片购自杭州微生物有限

公司。

### 1.2 高产纤维素酶菌株的筛选

取采集的肠道内容物样本 10 g，加入装有 90 mL 无菌生理盐水的锥形瓶中，震荡混匀， $85\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴 10 min，倍比梯度稀释，吸取  $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  稀释液 100  $\mu\text{L}$  均匀涂布于 CMC-Na 平板上， $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 24 h 后选取单菌落纯化 2 代。将分离菌株点种于 CMC-Na 平板上，做 3 个重复，用超纯水做对照点， $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 24 h，刚果红染色法染色后，观察菌落周围的透明圆，测量透明圆直径 (H) 与菌落直径 (C) 的比值。

将分离菌株接种至 LB 液体培养基， $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 36 h，离心取得上清液即为菌株的粗酶液。采用董雪丽<sup>[10]</sup>的 DNS 方法测定羧甲基纤维素酶 (CMC 酶) 活力。酶活定义：1 mL 液体酶在  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，每分钟水解 CMC-Na 底物，产生相当于 1  $\mu\text{g}$  葡萄糖的还原糖量，为 1 个酶活单位 (U/mL)。筛选出透明圆直径与菌落直径的比值最大以及 CMC 酶活性最高的菌株作为目标菌株。

### 1.3 高产纤维素酶菌株鉴定

观察目标菌株在 LB 固体培养基上的菌落形态并进行革兰染色镜检，进行菌株形态学观察。参照《伯杰细菌鉴定手册》，采用微量生化鉴定管进行菌株生化特征分析。提取菌株的 DNA，用 27F/1492R 通用引物对 (27F:  $5' - \text{AGAGTTTGATCCTGGCTCAG} - 3'$ , 1492R:  $5' - \text{TACGGCTACCTTGTTACGACT} - 3'$ ) 进行 16S rDNA 片段扩增<sup>[11]</sup>。由擎科公司进行测序，采用邻接法构建系统进化树。

### 1.4 生长曲线的建立

采用倍比稀释法用 LB 平板测定目标菌株在 0~46 h 的活菌数，每隔 2 h 进行计数。以培养时间为横坐标、活菌数量为纵坐标，绘制生长曲线。

### 1.5 蛋白酶、 $\alpha$ -淀粉酶活力的测定

采用王梦超等<sup>[12]</sup>的福林酚法测定蛋白酶活力，酶活定义：1 mL 粗酶液，在  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，每分钟水解酪蛋白产生 1  $\mu\text{g}$  酪氨酸的含量为 1 个酶活单位。

采用 DNS 法<sup>[10]</sup>测定  $\alpha$ -淀粉酶活力。酶活定义：1 mL 液体酶，在  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，每分钟水解淀粉产生 1  $\mu\text{g}$  葡萄糖的还原糖量为 1 个酶活单位。

## 1.6 抑菌活性及耐酸性、耐胆盐性测定

采用琼脂扩散法进行体外抑菌试验。取 80  $\mu\text{L}$  浓度  $1 \times 10^7$  CFU/mL 的大肠杆菌、沙门菌和金黄色葡萄球菌涂布于 LB 固体培养基上，待完全吸收后，取灭菌的牛津杯轻置于培养基上。取 200  $\mu\text{L}$  目标菌株的菌液加入牛津杯中。用 PBS 作为对照。4  $^{\circ}\text{C}$  扩散 12 h 后 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 16 h，测量抑菌圈直径，取平均值。判断标准： $\leq 5$  mm，不敏感； $>5 \sim 10$  mm，低度敏感； $>10 \sim 15$  mm，中度敏感； $>15 \sim 20$  mm，高度敏感； $>20$  mm，极度敏感。测定目标菌株在 pH 值 2.0、3.0、4.0 和 7.0 条件下处理 4 h 后的存活率。复检 0、0.1%、0.2% 和 0.3% 胆盐处理 8 h 后目标菌株的耐受性。

## 1.7 安全评估

采用纸片扩散试验检测目标菌株对青霉素、头孢唑啉、庆大霉素、克拉霉素、林可霉素、诺氟沙星、万古霉素、利福平的敏感性。测定抑菌区，并对被测菌株进行药敏评价。

将 32 只 26~28 g 的健康雌性昆明小鼠均分为低剂量、中剂量、高剂量和对照 4 组，分别灌胃 0.2 mL 浓度为  $10^8$ 、 $10^9$ 、 $10^{10}$  CFU/mL 的目标菌株培养液，对照组灌胃无菌 LB 液体培养基，记录小鼠采食和体重情况，连续灌胃 14 d 后处死小鼠，剖检观察脏器。

## 1.8 数据统计与分析

利用 SPSS 26.0 软件对试验数据进行单因素方差分析，结果用“平均值 $\pm$ 标准差”表示，以  $P < 0.05$  表示差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 高产纤维素酶菌株的筛选

在以 CMC-Na 作为唯一碳源的培养基上稀释涂布绵羊肠道内容物，分离纯化出 8 株菌，分别命名为 K1、K3、KC、ECL1、ECL1.2、ECL3、T、DY。将纯化的菌株点种在 CMC-Na 平板上，经刚果红染色，结果显示，菌株 ECL1.2 的透明圈直径与菌落直径比值为  $5.79 \pm 0.53$ ，显著高于其他菌株 ( $P < 0.05$ ) (表 1)。通过 DNS 法建立的葡萄糖标准曲线 ( $y = 0.0004x - 0.011$ ,  $R^2 = 0.9963$ ) 可准确反映酶活水平，由表 2 可知 ECL1.2 的酶活力为 18.61 U/mL，同样显著优于其他菌株 ( $P < 0.05$ )。综合上述筛选结果，菌株 ECL1.2 表现出最优的纤维素降解能力，故将其作为后续研究的目标菌株。

表 1 分离菌株在 CMC-Na 平板上透明圈的大小

菌株	透明圈直径/mm	菌落直径/mm	H/C
K1	6.17 $\pm$ 0.58	3.03 $\pm$ 0.58	2.03 $\pm$ 0.04 <sup>e</sup>
K3	6.00 $\pm$ 0.10	2.07 $\pm$ 0.12	2.91 $\pm$ 0.20 <sup>e</sup>
KC	5.00 $\pm$ 0.11	2.07 $\pm$ 0.12	2.42 $\pm$ 0.09 <sup>d</sup>
ECL1	4.07 $\pm$ 0.12	1.47 $\pm$ 0.58	2.77 $\pm$ 0.10 <sup>e</sup>
ECL1.2	6.33 $\pm$ 0.58	1.10 $\pm$ 0.10	5.79 $\pm$ 0.53 <sup>a</sup>
ECL3	7.03 $\pm$ 0.58	2.53 $\pm$ 0.58	2.78 $\pm$ 0.08 <sup>e</sup>
T	8.03 $\pm$ 0.58	2.10 $\pm$ 0.10	3.83 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>
DY	5.13 $\pm$ 0.58	1.23 $\pm$ 0.58	4.17 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>

注：同列不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )，下同。

表 2 分离菌株粗酶液中纤维素酶活力

菌株	OD 值	葡萄糖含量/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	CMC 酶活/ ( $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
K1	0.092 $\pm$ 0.002	257.5 $\pm$ 5.0	8.58 $\pm$ 0.17 <sup>e</sup>
K3	0.126 $\pm$ 0.002	341.7 $\pm$ 5.2	11.39 $\pm$ 0.17 <sup>e</sup>
KC	0.107 $\pm$ 0.003	295.0 $\pm$ 7.5	9.83 $\pm$ 0.25 <sup>e</sup>
ECL1	0.113 $\pm$ 0.002	310.8 $\pm$ 5.2	10.36 $\pm$ 0.17 <sup>d</sup>
ECL1.2	0.212 $\pm$ 0.002	558.3 $\pm$ 3.8	18.61 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>
ECL3	0.102 $\pm$ 0.003	283.3 $\pm$ 8.0	9.44 $\pm$ 0.27 <sup>f</sup>
T	0.126 $\pm$ 0.002	343.3 $\pm$ 5.2	11.44 $\pm$ 0.17 <sup>e</sup>
DY	0.132 $\pm$ 0.002	358.3 $\pm$ 3.8	11.94 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>

### 2.2 菌株 ECL1.2 的形态学特征

菌株 ECL1.2 在 LB 平板上的菌落形态近似圆形，表面粗糙不透明，白色或淡黄色 (图 1A)；油镜下观察其革兰染色呈现蓝紫色，为革兰阳性杆菌，有芽胞 (图 1B)。

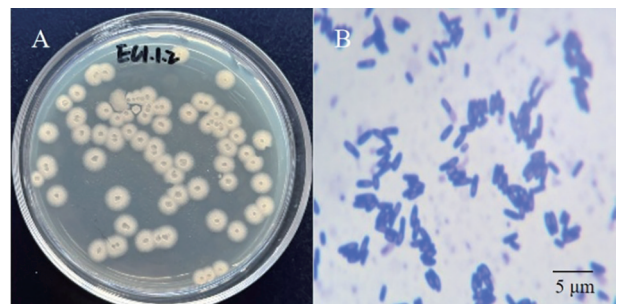


图 1 菌株 ECL1.2 的菌落形态 (A) 和革兰染色 (B)

### 2.3 菌株 ECL1.2 的生化特性

对菌株 ECL1.2 进行系统生化鉴定，结果显示其具备枯草芽孢杆菌的典型代谢特征：明胶液化阳性、葡萄糖/蔗糖/甘露醇/淀粉水解阳性表明该菌分泌多种水解酶，支持其碳源利用能力；硝酸盐还原性及 V-P 试验阳性提示其具备氮代谢与次级代谢产物合

成潜力；而产气阴性与1%马尿酸钠水解阴性则排除蜡样芽胞杆菌和解淀粉芽胞杆菌的干扰；吡啶试验阴性进一步佐证其营养代谢特性符合枯草芽胞杆菌的生理特性（表3）。上述结果与枯草芽胞杆菌生化图谱吻合，后续结合基因序列分析进一步验证。

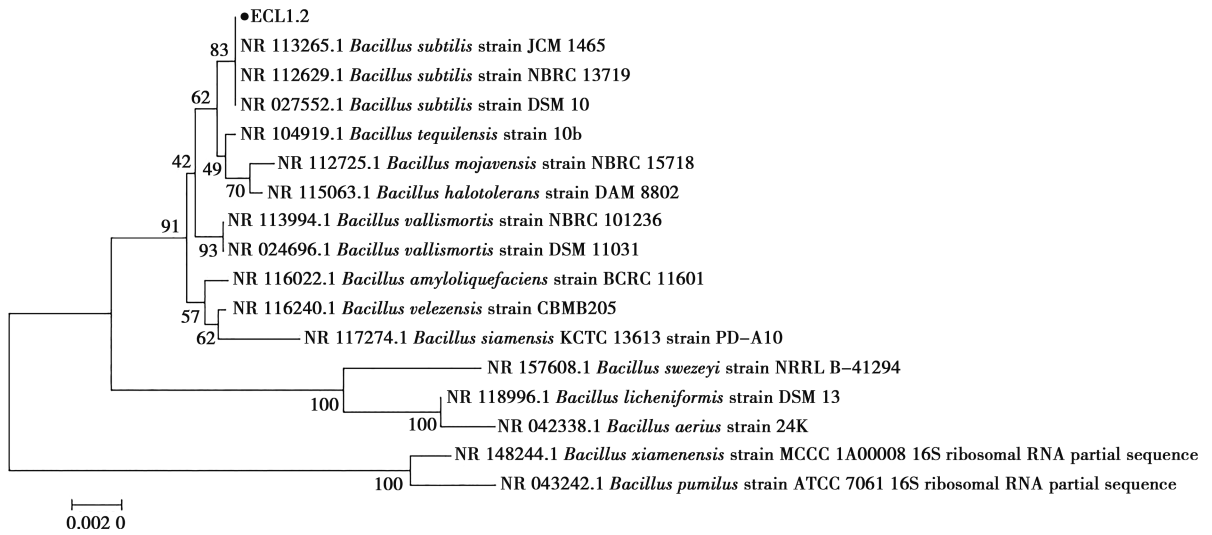
### 2.4 菌株 ECL1.2 的 16S rDNA 序列分析

菌株 ECL1.2 的 16S rDNA 基因扩增片段长度约为 1 500 bp，符合预期。将其测序结果在 NCBI 数据库进行 BLAST 相似性搜索后下载同源性较高的序列，利用 MEGA7 软件建立遗传基因系统进化树。菌株 ECL1.2 与枯草芽胞杆菌 NR113265.1、NR112629.1 和 NR027552.1 同源性高达 99%。鉴于此，参考《伯杰氏细菌系统鉴定手册》进行综合判定，确定得到的纯化菌株种属为枯草芽胞杆菌。

表 3 菌株 ECL1.2 的生化鉴定结果

项目	结果
明胶液化	+
葡萄糖	+
蔗糖	+
甘露醇	+
淀粉水解	+
山梨醇	+
硝酸盐还原	+
V-P	+
产气	-
1%马尿酸钠	-
吡啶	-

注：“+”表示阳性；“-”表示阴性。



● 本研究分离株。

图 2 基于菌株 16S rDNA 构建的系统发育树

### 2.5 菌株 ECL1.2 的生长曲线

菌株 ECL1.2 在 0~12 h 为迟缓期，细菌增长缓慢；12 h 后进入对数生长期，细菌增殖速率最大；26 h 后进入稳定期，一直持续到第 38 小时；后进入衰亡期，菌体数量下降并保持稳定（图 3）。

### 2.6 菌株 ECL1.2 的酶活分析

通过福林酚法和 DNS 法建立的酪氨酸标准曲线  $y = 0.0093x - 0.0396$ ， $R^2 = 0.9989$  和葡萄糖标准曲线  $y = 0.0004x - 0.011$ ， $R^2 = 0.9963$ ，测得 ECL1.2 粗酶液中蛋白酶和  $\alpha$ -淀粉酶活力，分别为 2.08 U/mL 和 19.7 U/mL（表 4）。

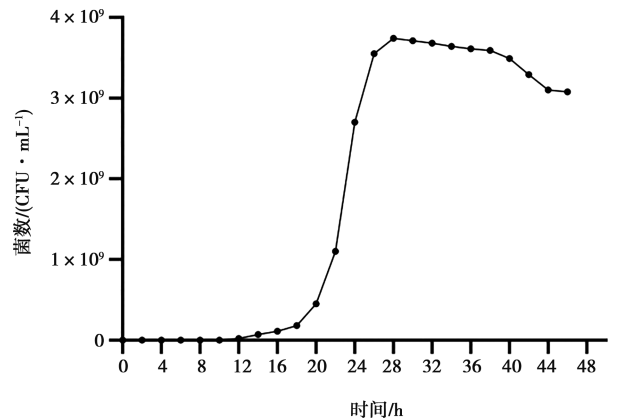


图 3 菌株 ECL1.2 生长曲线

表 4 ECL1.2 粗酶液中蛋白酶和  $\alpha$ -淀粉酶活力

粗酶液	OD 值	酶活力/ (U · mL <sup>-1</sup> )
蛋白酶	0.540±0.028	2.08±0.10
$\alpha$ -淀粉酶	0.225±0.013	19.70±1.10

## 2.7 菌株 ECL1.2 的抑菌活性及耐酸性、耐胆盐性

对于菌株 ECL1.2 的菌液，大肠杆菌高敏，沙门菌中敏，金黄色葡萄球菌极敏（表 5）。由表 6 可知，菌株的存活率随着 pH 值的降低而降低，但其在 pH 值为 2.0 时存在 4 h 仍有超过 60% 的存活率，说明菌株 ECL1.2 具有良好的耐酸性。由表 7 可知，菌株在 0.3% 胆盐培养基中存在 8 h 仍有 70% 的存活率，说明菌株 ECL1.2 具有良好的耐胆盐性。

表 5 菌株 ECL1.2 体外抑菌试验结果

病原菌	抑菌圈直径/mm	敏感度
大肠杆菌	15.95±0.95	+++
沙门菌	14.80±0.22	++
金黄色葡萄球菌	20.23±0.77	++++

注：“++++”表示极敏感度，“+++”表示高度敏感，“++”表示中敏感度，“+”表示低敏感度。下同。

表 6 菌株 ECL1.2 的耐酸性试验结果

pH 值	活菌数量/ (10 <sup>9</sup> CFU · mL <sup>-1</sup> )	存活率/%
2.0	2.62±0.08 <sup>c</sup>	75.94
3.0	2.90±0.14 <sup>b</sup>	84.06
4.0	3.21±0.14 <sup>a</sup>	93.04
7.0	3.45±0.19 <sup>a</sup>	100.00

表 7 菌株 ECL1.2 的耐胆盐性试验结果

胆盐浓度/%	活菌数量/ (10 <sup>9</sup> CFU · mL <sup>-1</sup> )	存活率/%
0	3.75±0.19 <sup>a</sup>	100
0.1	3.71±0.13 <sup>a</sup>	98.93
0.2	3.18±0.19 <sup>b</sup>	84.80
0.3	2.62±0.51 <sup>c</sup>	69.87

## 2.8 菌株 ECL1.2 的药敏试验

由表 8 可知，ECL1.2 对林可霉素低敏，对庆大霉素中敏，对青霉素、头孢唑啉、克拉霉素、诺氟沙星、万古霉素、利福平极其敏感。

表 8 菌株 ECL1.2 药敏试验结果

药品	敏感度
诺氟沙星	++++
万古霉素	++++
林可霉素	+
利福平	++++
克拉霉素	++++
庆大霉素	++
青霉素	++++
头孢唑啉	++++

## 2.9 菌株 ECL1.2 的动物试验

试验期间，各组小鼠均未出现中毒症状，精神状态良好且饮食正常，表明 ECL1.2 菌液灌胃处理安全性良好。试验数据显示，高、中、低剂量 ECL1.2 菌液灌胃处理显著提升了小鼠的体增重，其中中剂量组表现最佳，其体增重达 (7.07±0.29) g，显著高于对照组的 (6.43±0.23) g ( $P<0.05$ )；各组间日采食量无统计学差异。

表 9 不同剂量 ECL1.2 菌液对小鼠体重和采食量的影响

组别	初始体重/g	第 7 天体重/g	第 14 天体重/g	体增重/g	日采食量/g
对照	27.43±0.82	30.32±0.85	33.86±0.61	6.43±0.23 <sup>b</sup>	5.17±0.13
低剂量	27.43±0.82	31.38±0.58	34.10±0.40	6.73±0.32 <sup>a</sup>	5.24±0.13
中剂量	27.38±0.92	31.90±0.33	34.46±0.63	7.07±0.29 <sup>a</sup>	5.30±0.05
高剂量	27.40±0.85	31.4±0.56	34.26±0.64	6.86±0.22 <sup>a</sup>	5.25±0.11

## 3 讨论

益生菌在畜禽养殖应用中发挥重要作用。Talebi 等<sup>[13]</sup>从伊朗泡菜“torshi”中分离到 3 株芽胞杆菌作

为潜在益生菌；Lu 等<sup>[14]</sup>在金黄色葡萄球菌培养基中发现一株未知菌株，对其生长有明显的抑制作用，随后鉴定为枯草芽胞杆菌且该菌株的粗菌素可以抑制几种常见病原菌的生长；王贺等<sup>[15]</sup>通过液态发酵试验

探究植物乳杆菌单菌株及植物乳杆菌、枯草芽胞杆菌和黑曲霉多菌株发酵黄芩煎剂,发现黄芩煎剂在多菌株发酵后,黄芩不仅活性成分发生了变化,化学成分分子量和含量也发生了明显改变。

益生菌产生的胞外酶能促进中药或饲料中的有效物质的释放。李佳腾等<sup>[16]</sup>分离的枯草芽胞杆菌 P12 在 CMC-Na 平板上的 H/C 为 3.17, 酶活力为 1.17 U/mL; 马玉俊等<sup>[17]</sup>从白蚁肠道分离的高产纤维素酶的菌株 CX10 为坚强芽胞杆菌, H/C 为 2.78; Islam 等<sup>[18]</sup>等从糖浆中分离到一株芽胞杆菌 C2, 最佳产酶条件下, 酶活力约为 1.0 U/mL。本试验分离的枯草芽胞杆菌 ECL1.2 菌株在 CMC-Na 平板上的 H/C 为 5.79, 是 P12 和 CX10 的 2~3 倍; 纤维素酶活力为 18.61 U/mL, 是 P12、CX10 和 C2 的 15~18 倍。与前人结果相比, 本试验分离的芽胞杆菌具有较高的产纤维素酶能力以及良好的蛋白酶活性和淀粉酶活性, 后期可以继续深入研究该菌株的基因序列, 探讨其高产酶能力的机制。

本研究抑菌试验显示, 菌株 ECL1.2 的菌体对致病菌大肠杆菌、沙门菌和金黄色葡萄球菌有明显抑制作用, 表现出广谱抗菌活性, 而其培养上清抑菌作用不明显, 提示其抗菌活性可能与该菌株的营养性竞争力较强有关。耐受性试验发现, 其具有良好的耐酸和耐胆盐特性, 提示 ECL1.2 能通过消化道前段, 具备在肠道中发挥益生作用的潜力。

分离菌株若作为益生菌应用, 必须具备生物安全性。菌株的抗性基因具有潜在的转移给其他菌株的可能性, 耐药菌株的摄入会破坏肠道原有的菌群平衡。本试验对筛选出的 ECL1.2 进行药敏试验, 结果显示其对 80% 测试药品有高度甚至极度敏感性。小鼠安全性试验结果显示枯草芽胞杆菌 ECL1.2 能提高小鼠的体增重和采食量, 表现出良好的益生特性。

综上, 本试验从绵羊肠道中分离得到一株高产纤维素酶的枯草芽胞杆菌, 该菌株产纤蛋白酶和  $\alpha$ -淀粉酶能力也强, 具有良好的益生菌潜力。

## 参考文献:

- [1] 王晓涛, 魏佩玲, 胡波, 等. 纤维素降解酶研究进展 [J]. 草食家畜, 2019 (3): 13-18.
- [2] 郑玉荣, 靳军宝, 白光祖, 等. 基于专利角度的纤维素降解生物法预处理研发进展 [J]. 纤维素科学与技术, 2018, 26 (2): 82-88.
- [3] LV J, GUO L J, CHEN B X, et al. Effects of different probiotic fermented feeds on production performance and intestinal health of laying hens [J]. Poult Sci, 2022, 101 (2): 101570.
- [4] HAMZA A A, GUNYAR O A, . Functional properties of *Rhizopus oryzae* strains isolated from agricultural soils as a potential probiotic for broiler feed fermentation [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2022, 38 (3): 41.
- [5] WANG C, WEI S, XU B, et al. *Bacillus subtilis* and *Enterococcus faecium* co-fermented feed regulates lactating sow's performance, immune status and gut microbiota [J]. Microb Biotechnol, 2021, 14 (2): 614-627.
- [6] MAAMOURI O, BEN SALEM M. The effect of live yeast *Saccharomyces cerevisiae* as probiotic supply on growth performance, feed intake, ruminal pH and fermentation in fattening calves [J]. Vet Med Sci, 2022, 8 (1): 398-404.
- [7] ZOU W J, HUANG H L, WU H D, et al. Preparation, antibacterial potential, and antibacterial components of fermented compound Chinese medicine feed additives [J]. Front Vet Sci, 2022, 9: 808846.
- [8] YANG L J, ZENG X F, QIAO S Y, Advances in research on solid-state fermented feed and its utilization: the pioneer of private customization for intestinal microorganisms [J]. Anim Nutr, 2021, 7 (4): 905-916.
- [9] SU Y, LIU C, FANG H, et al. *Bacillus subtilis*: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine [J]. Microb Cell Fact, 2020, 19 (1): 173.
- [10] 董雪丽. 一株耐低温纤维素降解菌的产酶发酵和秸秆降解研究 [D]. 天津: 天津大学, 2021.
- [11] WEBSTER, G, NEWBERRY C J, FRY J C, et al. Assessment of bacterial community structure in the deep sub-seafloor biosphere by 16S rDNA-based techniques: a cautionary tale [J]. J Microbiol Methods, 2003, 55 (1): 155-164.
- [12] 王梦超, 郑宏臣, 赵兴亚, 等. 实验室芽胞杆菌菌种库中高产蛋白酶、糖基转移酶菌株的测定与筛选 [J]. 中国酿造, 2020, 39 (12): 81-85.
- [13] TALEBI S, MAKHDOUNI A, BAHREINI M, et al. Three novel *Bacillus* strains from a traditional lacto-fermented pickle as potential probiotics [J]. J Appl Microbiol, 2018, 125 (3): 888-896.
- [14] LU Z X, GUO W N, LIU C. Isolation, identification and characterization of novel *Bacillus subtilis* [J]. J Vet Med Sci, 2018, 80 (3): 427-433.
- [15] 王贺, 胡洪娇, 刘增琪, 等. 黄芩煎剂益生菌发酵液有效成份的分析 [J]. 中国预防兽医学报, 2024, 46 (3): 314-319.
- [16] 李佳腾, 杨凡提, 王世康, 等. 纤维素分解菌的筛选及杏鲍菇菌糠混菌发酵条件的优化 [J]. 动物营养学报, 2019, 31 (10): 4802-4816.
- [17] 马玉俊, 张凯, 王磊, 等. 白蚁肠道纤维素降解菌的分离和鉴定 [J]. 畜牧兽医学报, 2019, 50 (9): 1951-1954.
- [18] ISLAM F, ROY N. Screening, purification and characterization of cellulase from cellulase producing bacteria in molasses [J]. BMC Res Notes, 2018, 11 (1): 445.