

## 研究报告

# 耐受微酸性次氯酸水乳酸菌的分离鉴定、耐受特性及益生特性

陈杜岚, 陈倩茹, 孙滔, 云雪艳, 董同力嘎\*

内蒙古农业大学食品科学与工程学院, 内蒙古 呼和浩特 010010

陈杜岚, 陈倩茹, 孙滔, 云雪艳, 董同力嘎. 耐受微酸性次氯酸水乳酸菌的分离鉴定、耐受特性及益生特性[J]. 微生物学通报, 2023, 50(10): 4544-4556.

CHEN Dulan, CHEN Qianru, SUN Tao, YUN Xueyan, DONG Tungalag. Isolation, identification, and probiotic properties of lactic acid bacteria with tolerance to slightly acidic hypochlorous acid water[J]. Microbiology China, 2023, 50(10): 4544-4556.

**摘要:**【背景】次氯酸水具有杀菌性, 当其作为饮用水可能会对畜禽肠道内有益菌造成负面影响。

【目的】筛选出具有耐受微酸性次氯酸水(slightly acidic hypochlorous acid water, SAHW)能力的乳酸菌并研究其益生特性。【方法】从内蒙古地区传统自然发酵制品中分离筛选出 8 株乳酸菌菌株, 经 16S rRNA 基因测序进行鉴定。进一步通过耐受 SAHW、耐酸、耐胆盐、疏水性及自凝聚能力试验进行耐受特性和益生特性研究。【结果】菌株 MBH3-2 为副干酪乳杆菌, 其经过质量浓度为 20 mg/L 的 SAHW 处理 2 h, 菌落对数值仅下降 0.3 lg(CFU/mL), 存活率为 50.10%; 而且在酸性 (pH 2.0、2.5 和 3.0)、胆盐环境下均可存活; 疏水率达 62.12%, 属于高度疏水性; 自凝聚能力在 2 h 达到 97.29%。【结论】最终确定一株具有优良耐受 SAHW 及基本满足作为微生态制剂要求的菌株, MBH3-2 具有作为新型微生态制剂菌株的潜力。

**关键词:** 乳酸菌; 微酸性次氯酸水; 分离鉴定; 耐受特性; 益生特性

## Isolation, identification, and probiotic properties of lactic acid bacteria with tolerance to slightly acidic hypochlorous acid water

CHEN Dulan, CHEN Qianru, SUN Tao, YUN Xueyan, DONG Tungalag\*

College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010010, Inner Mongolia, China

**Abstract:** [Background] The bactericidal hypochlorous acid water may negatively affect the beneficial bacteria in the intestinal tracts of domesticated animals when being used as drinking

\*Corresponding author. E-mail: dongtlg@imau.edu.cn

Received: 2023-02-17; Accepted: 2023-04-25; Published online: 2023-06-07

water. **[Objective]** To isolate the lactic acid bacteria with tolerance to slightly acidic hypochlorous acid water (SAHW) and investigate their probiotic properties. **[Methods]** Eight strains of *Lactobacillus* were isolated from the traditional natural fermentation products in Inner Mongolia and identified by 16S rRNA gene sequencing. The tolerance to SAHW, acid, and bile salt, hydrophobicity, and self-agglutination properties of the isolates were examined. **[Results]** The strain MBH3-2 was identified as *Lactobacillus paracasei*. After treatment with 20 mg/L SAHW for 2 h, the strain showed the count decrease of 0.3 lg(CFU/mL) and the survival rate of 50.10%. MBH3-2 was highly hydrophobic with the hydrophobicity of 62.12%, and its self-agglutination rate reached 97.29% at the time point of 2 h. **[Conclusion]** Strain MBH3-2 with strong tolerance to SAHW and basically meeting the requirements as a microecological preparation was identified, demonstrating the potential to be developed as a new microecological preparation.

**Keywords:** lactic acid bacteria; slightly acidic hypochlorous acid water; isolation and identification; tolerance properties; probiotics properties

当前畜禽行业提倡绿色、健康、无污染的发展理念, 微生态制剂不仅可以促进动物机体生长发育, 而且具有无残留、无毒害及无耐药性等优点<sup>[1]</sup>。乳酸菌是一种能利用可发酵碳水化合物产生大量乳酸、乙酸等有机物的微生物<sup>[2]</sup>, 其能够作为抗生素的替代品来调节胃肠道的菌群平衡。目前有多种乳酸菌被用作微生物饲料添加剂, 研究表明乳酸菌添加剂能在动物的胃肠道中黏附和存活, 保护畜禽肠道健康、提高免疫力, 进而降低料肉比、提高产蛋率及改善畜禽肉品质等<sup>[3-7]</sup>。

次氯酸(HClO)被认为是一种具有强烈杀菌效果的弱酸性强氧化剂, 能与多种生物大分子发生反应, 破坏其结构, 造成致死性伤害<sup>[8]</sup>。目前, 次氯酸消毒剂的生成方式分为电解法(electrolytic process, EP)和非电解法(non electrolytic process, NEP)<sup>[9]</sup>, 电解法制备的产品有效氯浓度容易受到外界环境的影响而减小, 需用现制。非电解法采用了喷射流式相界面反应法, 能产生稳定的无漂白作用的非电解微酸性次氯酸水<sup>[10]</sup>。目前, 次氯酸水广泛应用于食品保鲜<sup>[11-13]</sup>、农业生产<sup>[14-16]</sup>及医疗<sup>[17-19]</sup>等方面, 达到消毒杀菌的作用。研究表明, 低质量浓度的微酸性次氯酸水可代替拌入粉状饲料的普通水, 也可直接

作为饮用水饮用, 能够降低动物肠道内有害菌的数量, 减少畜禽的治疗次数, 提高健康水平<sup>[20-24]</sup>。

因次氯酸水具有杀菌性, 在杀灭机体肠道内有害菌的同时, 在一定程度上也会对肠道内的有益菌造成负面影响。目前鲜有研究表明乳酸菌具有次氯酸耐受性, 现有的乳酸菌较难应用于次氯酸水拌和饲料或者作为饮水消毒的场景, 限制了特定场景下其益生功能的发挥。本试验筛选能够耐受一定质量浓度微酸性次氯酸水(slightly acidic hypochlorous acid water, SAHW)的乳酸菌菌株, 并研究其作为微生态制剂的能力, 为今后将微生态制剂与 SAHW 协同作用于畜禽产业提供了新思路及理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品

2021年8月采集自内蒙古不同牧区的天然发酵乳制品及酸粥发酵液样品共6份。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

酵母提取粉、牛肉浸粉、胰蛋白胨、牛胆盐、革兰氏染色试剂盒等, 广东环凯微生物科技有限公司; 3%过氧化氢溶液购于海博生物技

术有限公司; PCR 反应试剂、PCR 引物、PCR 测序等, 北京诺禾致源科技股份有限公司; 硫酸镁、硫酸锰、葡萄糖、磷酸氢二钾、柠檬酸二胺和碳酸钙等, 国药试剂公司, 纯度均为分析纯。

超净工作台, 苏州净化设备有限公司; 生化培养箱, 上海中友仪器设备有限公司; 高速冷冻离心机, 安徽中科中佳科学仪器有限公司; 非电解微酸性次氯酸水生成设备, 上海万籁环保科技有限公司; 有效氯浓度测定仪, SIBATA 柴田科学株式会社; 紫外可见分光光度计, 上海光谱仪器有限公司。

### 1.1.3 培养基

De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) 固体培养基和 MRS 液体培养基的配制方法参考文献[25]。

## 1.2 方法

### 1.2.1 菌株的分离纯化

将采集到的样品置于无菌超净工作台中, 使用生理盐水将样品 10 倍比梯度稀释, 分别选取  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$  和  $10^{-3}$  这 3 个梯度的稀释液 0.1 mL 均匀涂布在含有 2% 碳酸钙的 MRS 固体培养基上, 将涂布好的培养基静置 20 min 后, 倒置于 37 °C 培养箱中培养 48 h。在培养基中挑取有明显溶钙圈的不同形态的黄色单一菌落, 接种在 MRS 液体培养基中, 于 37 °C、120 r/min 进行 24 h 的增菌培养, 然后再划线接种在 MRS 固体培养基上, 培养 48 h, 直至分离纯化 3 次。

### 1.2.2 菌株的保藏

用 MRS 液体培养基对分离纯化得到的菌株于 37 °C、120 r/min 培养 24 h。培养完毕后将菌液与 50% 甘油按照体积比 1:1 混匀置于 2 mL 冻存管中, 保存于 -80 °C 的冷冻冰箱中备用。

### 1.2.3 菌株的初步鉴定

#### 1) 菌落形态特征观察

参考文献[26]观察纯化后 MRS 固体平板中菌株的菌落形态。

#### 2) 菌体形态特征观察

用接种环将每个菌株的单一菌落挑取至灭菌的载玻片上, 经革兰氏染色后置于显微镜下观察, 菌体呈紫色或蓝紫色为阳性反应, 红色为阴性反应。

#### 3) 过氧化氢酶触试验

用接种环挑取适量生长良好的分离株菌落, 涂布在已滴有 3% 过氧化氢溶液的载玻片上, 观察其产气泡情况。若有气泡产生则细菌为阳性反应, 若无气泡产生则细菌为阴性反应。

### 1.2.4 16S rRNA 基因序列分析

将 8 株菌分别接种在 MRS 液体培养基中, 37 °C、120 r/min 培养 24 h 后 8 000 r/min 离心 10 min, 收集细菌。将菌体进行液氮速冻后移至 -80 °C 冰箱, 送至北京诺禾致源科技股份有限公司提取基因组 DNA 进行 PCR 扩增及测序。用天根细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取细菌的总 DNA, 取 5  $\mu$ L 的总 DNA 与 1  $\mu$ L 6 $\times$ loading buffer 混合, 进行 1% (质量体积分数) 琼脂糖凝胶电泳, 电压 120 V, 电泳液为 1 $\times$ TBE, 25 min 后取出。电泳结果后用凝胶成像系统观察, 目标片段应该接近 23 000 bp<sup>[27]</sup>。

提取的乳酸菌基因组 DNA 作为模板, 选择 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTGT TACGACTT-3') 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 (30  $\mu$ L): DNA (10 ng/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, 10 $\times$ 缓冲液 ( $Mg^{2+}$ ) 3  $\mu$ L, 上、下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 3  $\mu$ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2  $\mu$ L, *Taq*<sup>TM</sup> DNA 多聚酶 (5 U/ $\mu$ L) 0.2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补足 30  $\mu$ L。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 90 s, 34 个循环; 72 °C 5 min。

将测序结果在 NCBI 网站的 GenBank 数据库进行 BLAST 分析, 根据基因序列相似性分析选取不同的模式菌株, 采用 MEGA 11.0 构建系

统发育树, 确定菌株的种属关系<sup>[28]</sup>。

### 1.2.5 乳酸菌对 SAHW 的耐受力

#### 1) SAHW 的制备

使用非电解微酸性次氯酸水发生器, 用质量分数 6% 的次氯酸钠和质量分数 6% 的盐酸, 分别制备 10、20 和 30 mg/L 的非电解微酸性次氯酸水, 设备设置参数如表 1 所示。

#### 2) 供试菌液的制备

取出在 -80 °C 冰箱保藏的菌株解冻并活化 3 代, 在 8 000 r/min 条件下离心 10 min, 弃掉上清液, 加入 10 mL 灭菌 PBS 溶液再次离心洗涤菌体。再次弃掉上清液加入灭菌 PBS 溶液, 直至清洗 3 次后振荡混匀, 将菌悬液浓度调为  $1.0 \times 10^8$  CFU/mL, 即成为供试菌液。

#### 3) 耐 SAHW 乳酸菌的筛选

将供试菌液按体积比 1:1 分别加入 2 mL 不同质量浓度(10、20 和 30 mg/L) SAHW 中处理 2 h<sup>[29]</sup>, 取混合液 1 mL 加入 9 mL 中和剂作用 10 min 后, 进行梯度稀释取 0.1 mL 涂布平板, 以 0.85% 生理盐水作为对照组, 在 37 °C 恒温下培养 48 h。菌落形成后对菌落数在 30-300 的培养皿进行计数, 换算为对数值。

### 1.2.6 耐酸性试验

将 8 株菌按照 1.2.5 中方法制备供试菌液, 参考 Stavros 等<sup>[30]</sup>的方法, 以 2% (体积分数) 接种量分别接种于不同 pH 值(2.0、2.5 和 3.0)的 MRS 液体培养基中, 37 °C、120 r/min 培养 24 h, 并划线于 MRS 固体培养基于 37 °C 培养 48 h, 观察细菌在平板上的生长情况。采用无菌 MRS

液体培养基作为空白对照, 测定  $OD_{595}$  值, 筛选出耐酸乳酸菌菌株。

### 1.2.7 耐胆盐试验

将 8 株菌按照 1.2.5 中方法制备供试菌液, 参考柳青<sup>[25]</sup>的方法, 按 2% (体积分数) 的接种量接种于含 0.3% (质量体积分数) 胆盐的 MRS 液体培养基中, 于 37 °C、120 r/min 培养 24 h, 测定其  $OD_{630}$  值。同时移取菌液划线于 0.3% (质量体积分数) 胆盐浓度的 MRS 固体培养基上, 37 °C 培养 48 h, 并观察是否有菌落生长。

### 1.2.8 疏水性测定

将 8 株菌按照 1.2.5 中方法制备供试菌液, 以 PBS 缓冲液作为空白对照, 将细菌的初始浓度调节到  $OD_{600}$  值约为  $0.6 \pm 0.05$  ( $A_0$ )。将调整过浓度的菌液 4 mL 加二甲苯 0.8 mL 后高速涡旋 2 min, 静置 10 min 进行分层, 取下层水相, 测其  $OD_{600}$  值 ( $A_1$ )<sup>[31]</sup>。按公式(1)计算疏水性。

$$\text{疏水性}(\%) = \left(1 - \frac{A_1}{A_0}\right) \times 100 \quad (1)$$

式中:  $A_0$  为菌体初始吸光值;  $A_1$  为与二甲苯混匀后菌液的吸光值。

### 1.2.9 自凝聚能力测定

将 8 株菌按照 1.2.5 中方法制备供试菌液, 以 PBS 缓冲液作为空白对照, 将细菌的初始浓度调节到  $OD_{600}$  值约为  $0.6 \pm 0.05$  ( $A_0$ )。置于 37 °C 条件下培养 24 h, 并在第 2、4、6、12 和 24 小时吸取培养液, 测定  $OD_{600}$  值 ( $A_2$ )<sup>[32]</sup>。按公式(2)计算乳酸菌细胞自凝聚能力。

$$\text{自凝聚率}(\%) = \left(1 - \frac{A_2}{A_0}\right) \times 100 \quad (2)$$

式中:  $A_0$  为菌体初始吸光值;  $A_2$  为  $t$  时培养液的吸光值。

## 1.3 数据处理

每组试验重复 3 次, 所有数值用平均值  $\pm$  标准误差表示, 使用 Duncan 检验进行差异显著性分析 ( $P < 0.05$ ), 使用 SPSS 22.0 软件对试验数据进行统计学分析, 使用 Origin 2018 软件进行绘图。

表 1 微酸性次氯酸水的设置参数

Table 1 Setting parameters for SAHW

Quality concentration (mg/L)	pH	NaClO set value	HCl set value
10	6.42	66	38
20	6.44	42	29
30	6.43	30	28

## 2 结果与分析

### 2.1 乳酸菌的初步鉴定结果

#### 2.1.1 形态学鉴定结果

通过将样品稀释涂布发现, 大部分样品的 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$  稀释液在含有  $\text{CaCO}_3$  的 MRS 琼脂培

养基上菌落分散、长势较好, 可以满足分离要求。选择带有透明环的具有不同大小、形状和颜色的单个菌落, 在 MRS 固体培养基上进行划线纯化培养, 观察菌落形态结果如图 1 所示。将分离纯化得到的菌落对菌落进行形态学描述, 结果如表 2 所示。

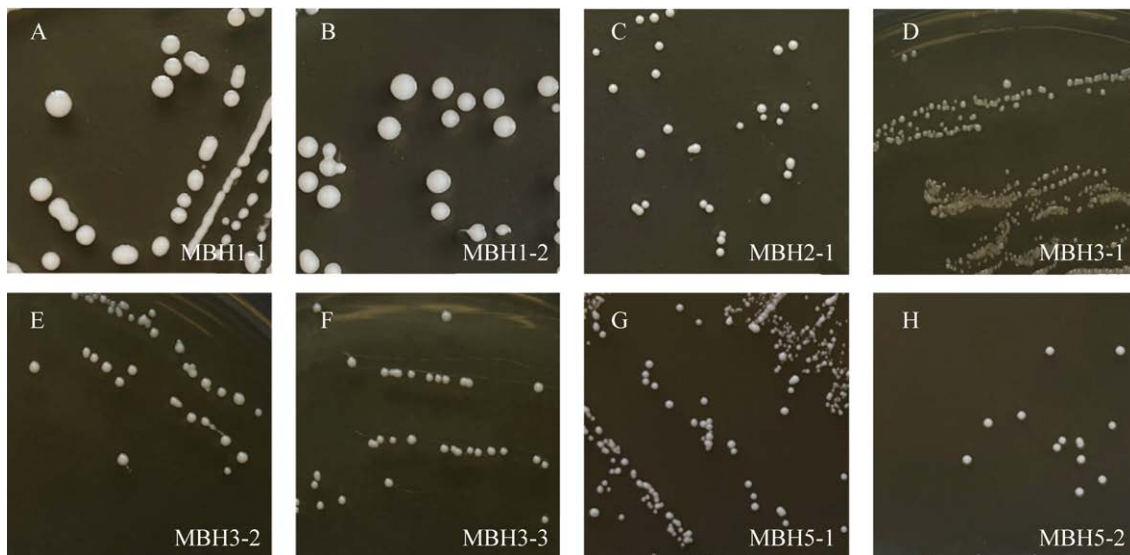


图 1 微生物初步分离菌落形态特征

Figure 1 Morphological characteristics of colonies isolated from microorganisms.

表 2 微生物菌落形态特征

Table 2 Morphological characteristics of microbial colonies

菌种编号 Strain No.	边缘整齐度 Edge neatness	光滑度 Smoothness	黏稠度 Viscosity	菌落颜色 Colony color	透明度 Transparency	表面凸起 Surface protrusion
MBH1-1	整齐 Neat	光滑 Smooth	黏稠 Sticky	乳白色 Milky white	不透明 Opaque	凸起 Protrusion
	整齐 Neat	光滑 Smooth	黏稠 Sticky	乳白色 Milky white	不透明 Opaque	凸起 Protrusion
MBH2-1	整齐 Neat	光滑 Smooth	不黏稠 Non-sticky	乳白色 Milky white	不透明 Opaque	凸起 Protrusion
	整齐 Neat	光滑 Smooth	不黏稠 Non-sticky	淡黄色 Faint yellow	透明 Transparent	凸起 Protrusion
MBH3-1	不规则 Irregular	不光滑 Rough	不黏稠 Non-sticky	淡黄色 Faint yellow	透明 Transparent	凸起 Protrusion
	整齐 Neat	不光滑 Rough	不黏稠 Non-sticky	白色 White	微透明 Slightly transparent	凸起 Protrusion
MBH3-2	整齐 Neat	不光滑 Rough	不黏稠 Non-sticky	白色 White	微透明 Slightly transparent	凸起 Protrusion
	不规则 Irregular	不光滑 Rough	不黏稠 Non-sticky	白色 White	微透明 Slightly transparent	凸起 Protrusion
MBH5-1	整齐 Neat	光滑 Smooth	不黏稠 Non-sticky	乳白色 Milky white	不透明 Opaque	凸起 Protrusion
	整齐 Neat	光滑 Smooth	不黏稠 Non-sticky	乳白色 Milky white	不透明 Opaque	凸起 Protrusion
MBH5-2	整齐 Neat	光滑 Smooth	不黏稠 Non-sticky	乳白色 Milky white	不透明 Opaque	凸起 Protrusion
	整齐 Neat	光滑 Smooth	不黏稠 Non-sticky	乳白色 Milky white	不透明 Opaque	凸起 Protrusion



对 8 株菌进行革兰氏染色观察菌体形态, 结果如图 2 所示。8 株菌均为革兰氏阳性菌, 菌体呈长杆或短杆状, 排列方式为单个和短链排列或分散排列, 根据伯杰细菌鉴定手册可知, 这 8 株菌符合乳酸菌的形态特征。

### 2.1.2 过氧化氢酶触试验结果

将载玻片上的 8 株乳酸菌菌株分别与 3% 过氧化氢溶液接触后, 均不产生气泡, 由此可以判断出这 8 株菌株过氧化氢酶触试验呈阴性, 符合乳酸菌特征, 需结合分子生物学技术进一步确定。

## 2.2 16S rRNA 基因序列分析

对 8 株菌的 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增及序列测定。结果发现各菌株在 1 500 bp 左右均有条带, 说明扩增成功。将测定的序列用 BLAST 在 GenBank 数据库中搜索已知细菌的 16S rRNA 基因片段序列进行比较鉴定, 通过 MEGA 软件构建系统发育树(图 3)。

由图 3 可知, 系统发育树呈现 3 个较大分支, 其中 MBH1-1、MBH1-2 与 CIP 102980 处于同一

分支, 相似性为 100%, 为发酵乳酸杆菌; MBH2-1、MBH5-1、MBH5-2 与 DSM 21115 属于同一分支, 相似性为 99%, 为植物乳杆菌; MBH3-1、MBH3-2、MBH3-3 与 NBRC 15906 处于同一分支, 相似性为 99%, 为副干酪乳杆菌。

## 2.3 耐 SAHW 乳酸菌的筛选结果

八株乳酸菌对不同质量浓度的 SAHW 耐受程度如图 4 所示。随着 SAHW 质量浓度的增加, 8 株菌较未处理组的菌落对数值都有所降低, 尤其在质量浓度为 30 mg/L 时所有菌株的对数值都有很明显的降低, 致死率达 97.62%–99.98%, 表明 8 株菌在此质量浓度下均不耐受。其中, 乳酸菌 MBH1-1、MBH3-2 在 20 mg/L 处理下依然保持较高的菌落对数值, 菌落对数值较对照组下降范围控制在 0.34 lg(CFU/mL) 以内, 即存活率为 45.66% 以上。然而菌株 MBH2-1、MBH3-3 和 MBH5-1 在 10 mg/L 的质量浓度下, 菌落对数值下降范围在 0.24 lg(CFU/mL) 以内, 即存活率为 57.29% 以上, 表明这 5 株乳酸菌具备耐受 SAHW 的能力。

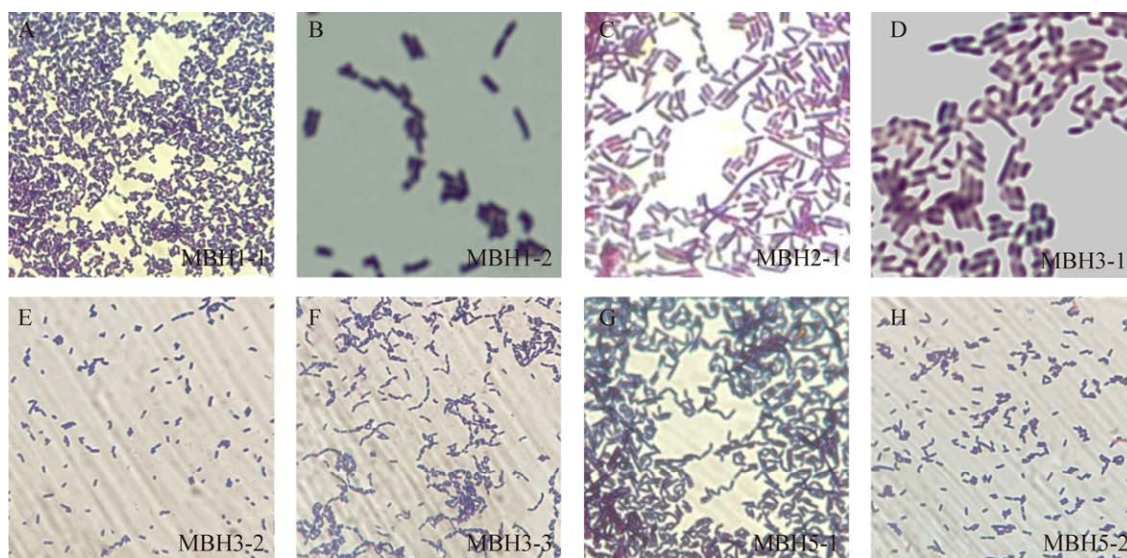


图 2 八株微生物菌体形态图

Figure 2 Morphology of eight strains of microorganisms.

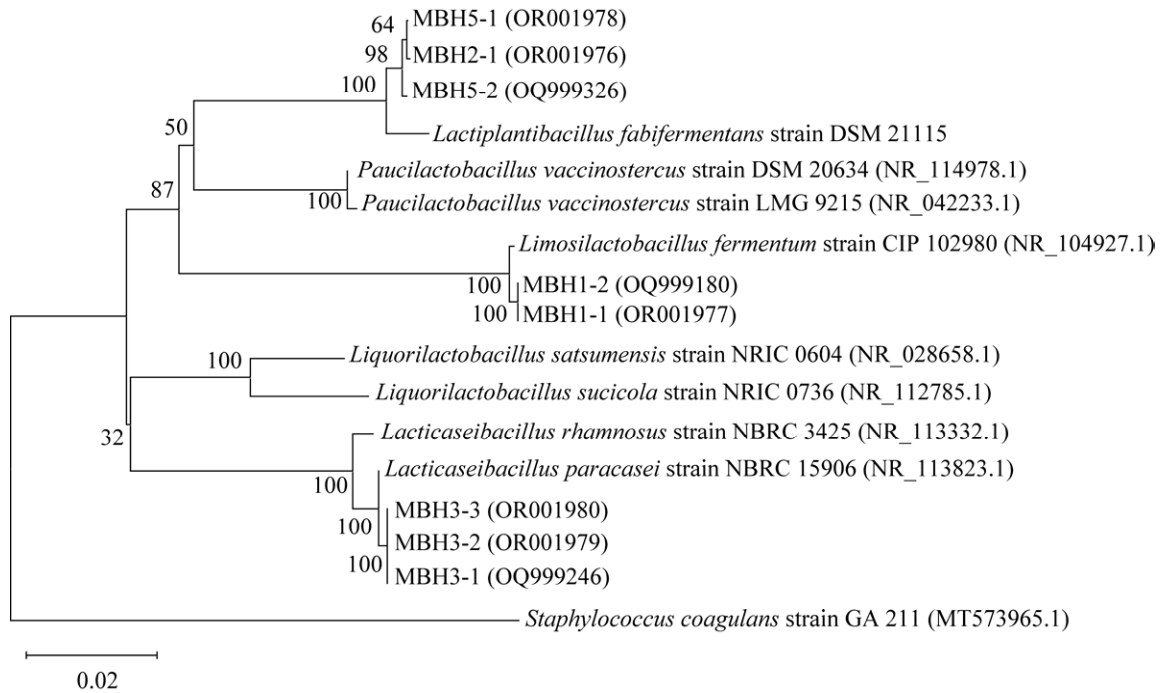


图 3 乳酸菌菌株基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 括号内数值为菌株在 GenBank 中登录号; 分支点上数字为重复 1 000 次自展值; 发育树标尺为 0.02, 表示平均每个核苷酸位置有 0.02 个差异  
Figure 3 Phylogenetic tree of LAB strains constructed based on 16S rRNA gene sequences. Numbers in parentheses are GenBank accession numbers; Numbers at the nodes indicate the level of bootstrap values based on 1 000 replications; Bar is 0.02, representing 0.02 substitutions per nucleotide position.

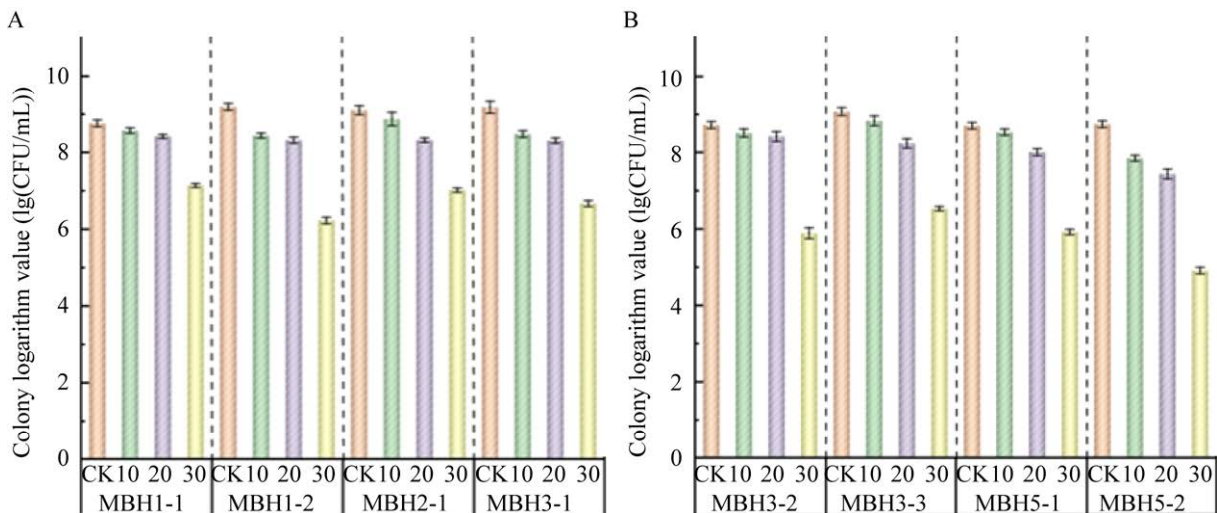


图 4 乳酸菌菌株耐受 SAHW 试验结果  
Figure 4 Results of SAHW tolerance test for LAB strains.

表 3 乳酸菌菌株耐酸性试验结果

Table 3 Results of acid tolerance test for LAB strains

菌株编号 Strain No.	pH 2.0		pH 2.5		pH 3.0	
	MRS 平板	$OD_{595}$	MRS 平板	$OD_{595}$	MRS 平板	$OD_{595}$
	MRS plate		MRS plate		MRS plate	
MBH1-1	-	0.098±0.090c	+	0.101±0.010c	+	0.110±0.006c
MBH2-1	+	0.158±0.009b	+	0.153±0.014b	+	0.218±0.018a
MBH3-2	+	0.190±0.018a	+	0.190±0.013a	+	0.198±0.008a
MBH3-3	+	0.173±0.012ab	+	0.182±0.009a	+	0.187±0.013ab
MBH5-1	-	0.130±0.008bc	+	0.136±0.008b	+	0.148±0.010b

+: 有菌落生长, -: 无菌落生长. 数据以  $\bar{x} \pm SD$  表示. 标有不同小写字母表示不同菌株同一 pH 时具有显著性差异,  $P < 0.05$   
+: Bacterial colony growth. -: Sterile colony growth. Data in  $\bar{x} \pm SD$  represents. Marked with different lowercase letters indicate significant differences between different strains and the same pH,  $P < 0.05$ .

## 2.4 耐酸性试验结果

将耐受 SAHW 的 5 株乳酸菌分别接种于初始 pH 不同的 MRS 液体培养基中, 耐受能力如表 3 所示。

当细菌通过胃进入肠道时, 其活性主要受到胃液 pH 值的影响。动物胃中的 pH 值范围常在 2.0–7.0 之间, 一般为 3.0<sup>[33]</sup>。因此, 乳酸菌能够存活于畜禽胃肠道中才能发挥其益生作用, 需要具有一定的耐酸能力。对于 5 株乳酸菌来说, pH 值在 3.0 和 2.5 的条件下都具有一定的存活量且 MRS 平板上都有相应菌落。在 pH 值为 2.0 时, 乳酸菌 MBH2-1、MBH3-2 和 MBH3-3 对应的 MRS 平板上均长出菌落, 耐酸能力优于 MBH1-1 和 MBH5-1, 说明这些菌株可在胃酸环境中保持较高的活性。

## 2.5 耐胆盐试验结果

将 5 株乳酸菌接种于胆盐添加浓度为 0.3% (质量体积分数) 的 MRS 液体培养基中, 试验结果见表 4。

胆盐的耐受性是检测乳酸菌益生作用的重要指标之一。畜禽消化道中的胆盐含量为 0.03%–0.3%<sup>[34]</sup>, 本试验为了筛选性能更好的菌株, 选定胆盐添加量为 0.3% 进行试验。 $OD_{630}$  值大于 0.05, 表明菌株在 0.3% 胆盐的环境中长

势良好<sup>[35]</sup>。由表 4 中数据可知, 5 株菌中 MBH1-1 耐受胆盐的能力较弱, 而其他 4 株菌耐受能力较强, 在添加 0.3% 胆盐的 MRS 固体培养基上长势很好, 菌落布满平板。表明该菌株对胆盐胁迫的不良反应具有一定的抑制作用, 在此胆盐浓度条件下生存的菌体细胞能够维持良好的活性, 并且呈现出生长的趋势, 其中 MBH3-2 的  $OD_{630}$  值为 0.183±0.021, 表现出较好的胆盐耐受性。

表 4 乳酸菌菌株耐胆盐试验结果

Table 4 Results of bile salt tolerance test for LAB strains

菌株编号 Strain No.	$OD_{630}$	MRS 平板 MRS plate
MBH1-1	0.054±0.007c	-
MBH2-1	0.165±0.009b	+
MBH3-2	0.183±0.021a	+
MBH3-3	0.159±0.007b	+
MBH5-1	0.154±0.011b	+

+: 有菌落生长, -: 无菌落生长. 数据以  $\bar{x} \pm SD$  表示. 标有不同小写字母表示不同菌株同一 pH 时具有显著性差异,  $P < 0.05$

+: Bacterial colony growth. -: Sterile colony growth. Data in  $\bar{x} \pm SD$  represents. Marked with different lowercase letters indicate significant differences between different strains and the same pH,  $P < 0.05$ .



## 2.6 疏水性试验结果

表面疏水性是决定乳酸菌非特异性黏附的重要因素<sup>[36]</sup>。本试验通过乳酸菌对碳氢化合物的亲和力反映菌株表面疏水性,采用微生物黏着碳氢化合物法测定乳酸菌细胞表面疏水性。一般情况下,当疏水率大于 50%时,菌株被认为是高度疏水的;当疏水率为 20%–50%时,菌株被认为是中度疏水的;当疏水率小于 20%时,则被认为是低疏水性的<sup>[37]</sup>。5 株乳酸菌的疏水性如图 5 所示,5 株菌的疏水率在 20.79%–62.12%之间,具有良好的疏水性。其中菌株 MBH3-3 的疏水率最高,达到 62.12%,MBH5-1 疏水率最低。大多数文献报道称不同菌株的疏水性差别较大,由此可见菌株 MBH3-3 对二甲苯的吸附能力较强,其次是 MBH3-2,为 54.70%。

## 2.7 自凝聚能力试验结果

除了疏水性,自凝聚能力同样对于乳酸菌向肠道上皮细胞的顺利黏附和稳固定殖至关重要<sup>[38]</sup>。5 株乳酸菌的自凝聚能力如图 6 所示。从图 6 能够看出,5 株菌的自凝聚力随着时间的增加呈现出非线性上升的趋势。菌株 MBH3-2

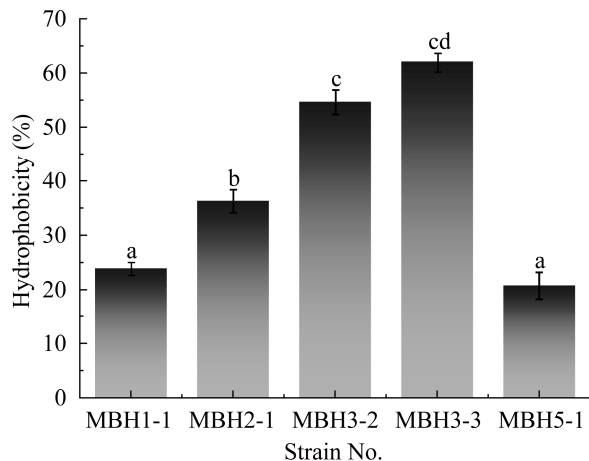


图 5 乳酸菌菌株的疏水率 不同小写字母代表差异显著

Figure 5 Hydrophobicity of LAB strains. The different lowercase letters indicate significant differences.

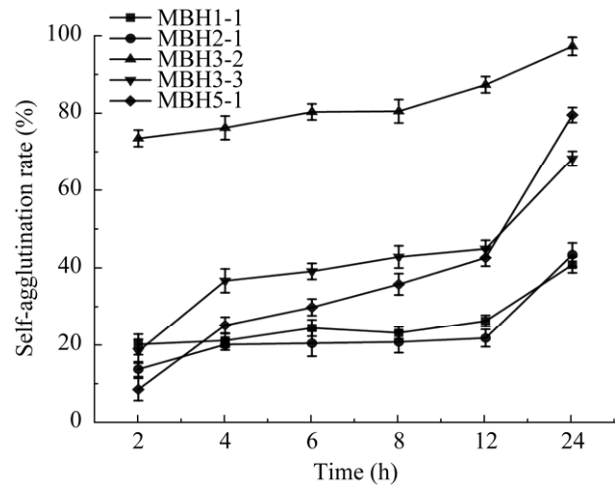


图 6 乳酸菌菌株的自凝聚率

Figure 6 Self-agglutination rate of LAB strains.

的自凝聚力在 5 株菌中最强,2 h 就可以迅速达到平台期,约为 73.51%,且在 24 h 时达到最大,约为 97.29%,优于夏海燕等<sup>[39]</sup>筛选的发酵乳杆菌 18-2 (70.50%)和 17-1 (70.67%)。其他菌株在静置的 2–12 h 期间,自凝聚能力有所增加但差异不大,至 24 h 则均迅速增加到 40.93%以上。

## 3 讨论与结论

目前将次氯酸水作为畜禽饮用水的报道表明其可以有效减少肠道内有害菌的数量和提高动物健康水平,但无研究表明肠道内乳酸菌具有耐受次氯酸的能力,意味着其在一定程度上也会对肠道内的乳酸菌造成负面影响。本研究从内蒙古牧区天然发酵制品中分离出 8 株乳酸菌,从中筛选出 3 株耐受 SAHW 质量浓度为 10 mg/L 的菌株,以及 2 株耐受 SAHW 质量浓度为 20 mg/L 的菌株。在 Guentzel 等<sup>[12]</sup>的研究中,SAHW 质量浓度 20 mg/L 处理 10 min 条件下,电解水对大肠杆菌、鼠伤寒沙门菌、金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌和粪肠球菌的纯培养物均具有 100% 的灭活作用。在谢丹<sup>[40]</sup>的研究中,将 SAHW 作

为饮用水应用于断奶仔猪的日常喂养, 结果表明饮用 SAHW 降低了患病次数, 提高了断奶仔猪的健康水平, 同时会降低肠道微生物中放线菌门与互养菌门的相对丰度。因此, SAHW 在 10 mg/L、20 mg/L 质量浓度的条件下, 既能达到一定程度上杀灭大肠杆菌等有害菌的作用, 又能保证饮用 SAHW 对畜禽的健康无明显影响, 所筛选的 5 株乳酸菌满足作为微生态制剂的初步要求。

通过 16S rRNA 基因测序分别为 1 株发酵乳酸杆菌 MBH1-1、2 株植物乳杆菌 MBH2-1 和 MBH5-1, 2 株副干酪乳杆菌 MBH3-2 和 MBH3-3。通过耐酸、耐胆盐试验结果表明, 菌株 MBH3-2 在逆境保持较高的存活率, 具备一定的抗逆境能力。疏水性及自凝聚能力试验结果表明, 菌株 MBH3-2 对肠道具有很好的黏附能力, 有利于实现在肠道定殖和繁殖, 进而发挥其益生功能。

本试验为今后开发与 SAHW 协同作用的微生态制剂提供了优良菌株, 可将其应用在畜禽产业中, 在 SAHW 杀灭肠道有害菌的同时对肠道进行菌群补给, 发挥调节畜禽肠道菌群的作用, 为避免抗生素的过度使用产生耐药性发挥积极作用, 拓展了 SAHW 的应用范围。本研究主要在实验室条件下进行, 菌株生存状态和生理特性与应用于活体研究有所差别, 为使试验结果更具有实用性, 应在实验室研究基础上实际应用于畜禽日粮中进行更加细致的研究。对于耐受次氯酸的机理还可以从基因组学角度进一步深入, 并寻找不同种类耐受次氯酸细菌的共同特性。

## REFERENCES

- [1] 谢昕. 牛源微生态制剂的研制及临床应用效果评价[D]. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文, 2020.  
XIE X. Preparation of bovine microecological agents and evaluation of its clinical application[D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [2] 鲁宇檀, 陈群. 乳酸菌在畜禽生产中应用的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医(上半月), 2019(2): 45-46, 51.  
LU YT, CHEN Q. Research progress on application of lactic acid bacteria in livestock and poultry production[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2019(2): 45-46, 51 (in Chinese).
- [3] ZHU MM, XIE RQ, CHEN LY, YOU MH, GOU WL, CHEN C, LI P, CAI YM. Milk production and quality of lactating yak fed oat silage prepared with a low-temperature-tolerant lactic acid bacteria inoculant[J]. Foods, 2021, 10(10): 2437.
- [4] 刘建华, 徐磊, 梁正. 饲喂复合益生菌发酵液对哺乳母猪生产性能的影响[J]. 当代畜禽养殖业, 2019(2): 5.  
LIU JH, XU L, LIANG Z. Effect of feeding compound probiotic fermentation broth on performance of lactating sows[J]. Modern Livestock and Poultry Breeding Industry, 2019(2): 5 (in Chinese).
- [5] 薛晨. 复合菌培养物和微生物发酵饲料对肉牛生长性能、非特异性免疫和抗氧化功能的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2021.  
XUE C. Effects of compound bacteria culture and microbial fermented feed on growth performance, nonspecific immunity and antioxidant function of beef cattle[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia Agricultural University, 2021 (in Chinese).
- [6] ZHANG M, DING X, LI L. Screening of lactic acid bacteria feeding for pig, preparing of compound probiotics and its feeding effect on growing pigs[J]. New Biotechnology, 2018, 44: S81-S82.
- [7] GUO W, XU LN, GUO XJ, WANG W, HAO QH, WANG SY, ZHU BC. The impacts of fermented feed on laying performance, egg quality, immune function, intestinal morphology and microbiota of laying hens in the late laying cycle[J]. animal, 2022, 16(12): 100676.
- [8] 顾峥嵘, 陈晓, 翁蔚宗, 曹烈虎, 苏佳灿. 次氯酸临床研究及使用进展[J]. 世界复合医学, 2015, 1(4): 336-339.  
GU ZR, CHEN X, WENG WZ, CAO LH, SU JC. Clinical application of hypochlorous acid[J]. World Journal of Complex Medicine, 2015, 1(4): 336-339 (in Chinese).
- [9] 堀田国元, 郭永明. 酸性电解水的基础、应用及发展动向[J]. 中国护理管理, 2008, 8(4): 7-11.

- KU TGY, GUO YM. Foundation, application and development trend of acidic electrolyzed water[J]. Chinese Nursing Management, 2008, 8(4): 7-11 (in Chinese).
- [10] 照那木拉, 戴竹君, 山本善和, 李建昭. 非电解微酸性次氯酸水生成设备: CN210796076U[P]. 2020-06-19. ZHAO NML, DAI ZJ, SHAN BSH, LI JZ. Non-electrolytic subacid hypochlorous acid water generating equipment: CN210796076U[P]. 2020-06-19 (in Chinese).
- [11] 蓝蔚青, 张炳杰, 周大鹏, 莫雅娴, 冯豪杰, 谢晶. 超声联合微酸性电解水处理对真空包装海鲈鱼冷藏期间品质变化的影响[J]. 食品科学, 2022, 43(5): 62-68. LAN WQ, ZHANG BJ, ZHOU DP, MO YX, FENG HJ, XIE J. Effect of ultrasonic combined with slightly acidic electrolyzed water treatment on quality changes of vacuum-packaged sea bass (*Lateolabrax japonicas*) during refrigerated storage[J]. Food Science, 2022, 43(5): 62-68 (in Chinese).
- [12] GUENTZEL JL, LIANG LK, CALLAN MA, EMMONS SA, DUNHAM VL. Reduction of bacteria on spinach, lettuce, and surfaces in food service areas using neutral electrolyzed oxidizing water[J]. Food Microbiology, 2008, 25(1): 36-41.
- [13] 周然, 谢晶, 高启耀, 陈清艳. 微酸性电解水结合壳聚糖对水蜜桃护色保鲜的效果[J]. 农业工程学报, 2012, 28(18): 281-286. ZHOU R, XIE J, GAO QY, CHEN QY. Effects of slightly acidic electrolyzed water and carboxymethyl chitosan preservative on flesh discoloration of peaches[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2012, 28(18): 281-286 (in Chinese).
- [14] 李慧颖, 李嘉欣, 郝建雄. 微酸性电解水对溶液体系中有机磷农药的降解机制及途径分析研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(5): 1906-1913. LI HY, LI JX, HAO JX. Study on the degradation mechanism and pathway of chlorpyrifos by slightly acidic electrolyzed water in aqueous system[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(5): 1906-1913 (in Chinese).
- [15] 万阳芳. 电解离子水降解果蔬中有机磷农药作用机理研究[D]. 石家庄: 河北科技大学硕士学位论文, 2015. WAN YF. Study on degradation mechanism of organophosphorus pesticides in fruits and vegetables by electrolytic ionized water[D]. Shijiazhuang: Master's Thesis of Hebei University of Science and Technology, 2015 (in Chinese).
- [16] QIN MQ, FU YW, LI N, ZHAO YY, YANG BW, WANG L, OUYANG SH. Effects of wheat tempering with slightly acidic electrolyzed water on the microbiota and flour characteristics[J]. Foods, 2022, 11(24): 3990.
- [17] 曹程, 李平, 胡贞卿, 李自良. 16S rDNA 测序分析微酸性电解水对牙周炎患者口腔菌群的影响[J]. 口腔医学研究, 2020, 36(11): 1012-1015. CAO C, LI P, HU ZQ, LI ZL. Effect of slightly acidic electrolyzed water on oral flora in patients with periodontitis by 16S rDNA sequencing analysis[J]. Journal of Oral Science Research, 2020, 36(11): 1012-1015 (in Chinese).
- [18] CHEN XQ, AKANKSHA T, SELVAKUMAR V, RAMACHANDRAN C, UMAIR S, DEOG HO. Anti-adhesion and anti-biofilm activity of slightly acidic electrolyzed water combined with sodium benzoate against *Streptococcus mutans*: a novel ecofriendly oral sanitizer to prevent cariogenesis[J]. Microbial Pathogenesis, 2022, 166: 105535.
- [19] SONG H, DANG YM, HA S, HA JH. Evaluation of virucidal efficacy of human norovirus using combined sprayed slightly acidic electrolyzed water and ultraviolet C-light-emitting diode irradiation treatment based on optimized capture assay for quantitative RT-qPCR[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 841108.
- [20] 丁岚峰, 刁春文, 刘长军, 才学鹏. 非电解微酸性次氯酸消毒剂在畜牧养殖业中的应用与展望[J]. 中国兽药杂志, 2020, 54(9): 61-71. DING LF, DIAO CW, LIU CJ, CAI XP. Applications and prospects of non-electrolytic micro-acidic hypochlorite water disinfectant in animal husbandry[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2020, 54(9): 61-71 (in Chinese).
- [21] BÜGENER E, KUMP AW, CASTEEL M, KLEIN G. Benefits of neutral electrolyzed oxidizing water as a drinking water additive for broiler chickens[J]. Poultry Science, 2014, 93(9): 2320-2326.
- [22] BODAS R, BARTOLOMÉ DJ, TABERNERO MJ, POSADO R, GARCÍA JJ, RODRÍGUEZ L, OLMEDO S, MARTÍN-DIANA AB. Electrolyzed water as novel technology to improve hygiene of drinking water for dairy ewes[J]. Research in Veterinary Science, 2013, 95(3): 1169-1170.

- [23] 姬真真, 惠雪, 石志芳, 席磊, 宁丽丽. 饮用微酸性电解水对肉鸡肠道微生物及免疫功能的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2020, 48(4): 27-32.  
JI ZZ, HUI X, SHI ZF, XI L, NING LL. Effects of drinking slightly acidic electrolyzed water on intestinal microbial and immune function of broilers[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2020, 48(4): 27-32 (in Chinese).
- [24] 关文怡, 胡平, 于凤芝, 岳子易, 杨子毅, 陆佳涵, 王丹阳, 张瑞雪, 曹授俊. 微酸性电解水对大鼠血液生理生化指标的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2017, 53(2): 122-126.  
GUAN WY, HU P, YU FZ, YUE ZY, YANG ZY, LU JH, WANG DY, ZHANG RX, CAO SJ. Effect of slightly acidic electrolyzed water on blood physiological and biochemical indexes in rats[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2017, 53(2): 122-126 (in Chinese).
- [25] 柳青. 具有潜在益生特性乳酸菌的筛选鉴定及其特性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2018.  
LIU Q. Screening, identification and characterization of lactic acid bacteria with potential probiotic properties[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [26] 谷海瀛. 形态学检查方法的标准化及其在细菌鉴定中的作用[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(10): 951-953.  
GU HY. Standardization of morphological examination methods and its role in bacterial identification[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2006, 29(10): 951-953 (in Chinese).
- [27] 张洁, 徐桂花, 尤丽琴. 16S rRNA 序列分析法鉴定乳酸菌[J]. 农产品加工·创新版, 2009(4): 47-49, 69.  
ZHANG J, XU GH, YOU LQ. Identification of lactic acid bacteria by 16S rRNA sequencing[J]. Aem Roducts Rocessing, 2009(4): 47-49, 69 (in Chinese).
- [28] YANG JS, TAN HS, CAI YM. Characteristics of lactic acid bacteria isolates and their effect on silage fermentation of fruit residues[J]. Journal of Dairy Science, 2016, 99(7): 5325-5334.
- [29] 贾淑宇. 供水管网系统耐氯菌的分离鉴定与控制技术研究[D]. 济南: 山东建筑大学硕士学位论文, 2019.  
JIA SY. Study on isolation, identification and control technology of chlorine-resistant bacteria in water supply network system[D]. Ji'nan: Master's Thesis of Shandong Jianzhu University, 2019 (in Chinese).
- [30] STAVROS P, CHRYSANTHI N, ATHANASIOS K, STAVROS K, ATHANASIOS A, LOANNA M, PELAGIA C, MARIA F, ALEX G, EUGENIA B. Isolation, characterization and evaluation of the probiotic potential of a novel *Lactobacillus* strain isolated from Feta-type cheese[J]. Food Chemistry, 2017, 226: 102-108.
- [31] 黄燕燕, 郭均, 黎恒希, 杨爱君, 冯立科, 彭小霞, 刘冬梅. 降胆固醇乳酸菌的体外筛选及其降胆固醇机理探讨[J]. 食品科学, 2018, 39(6): 88-94.  
HUANG YY, GUO J, LI HX, YANG AJ, FENG LK, PENG XX, LIU DM. *In vitro* screening of lactic acid bacteria for cholesterol-lowering activity and the underlying mechanism[J]. Food Science, 2018, 39(6): 88-94 (in Chinese).
- [32] CAGGIA C, DE AM, PITINO I, PINO A, RANDAZZO CL. Probiotic features of *Lactobacillus* strains isolated from Ragusano and Pecorino Siciliano cheeses[J]. Food Microbiology, 2015, 50: 109-117.
- [33] 王焕. 鸡源益生菌 BL-Y-1 菌株分离鉴定、发酵条件及其耐受性研究[D]. 保定: 河北农业大学硕士学位论文, 2009.  
WANG H. Isolation, identification, fermentation conditions and tolerance of chicken probiotic BL-Y-1 strain[D]. Baoding: Master's Thesis of Hebei Agricultural University, 2009 (in Chinese).
- [34] 饶甜甜. 高稳定性乳酸菌饲料添加剂的开发[D]. 福州: 福州大学硕士学位论文, 2016.  
RAO TT. Development of high stability lactic acid bacteria feed additive[D]. Fuzhou: Master's Thesis of Fuzhou University, 2016 (in Chinese).
- [35] 李仁芳, 蒙晓明, 黄福卫, 孙宁, 黄丽, 杨攀, 李玲. 广西生榨米粉中益生乳酸菌的筛选及鉴定[J]. 中国酿造, 2020, 39(8): 59-64.  
LI RF, MENG XM, HUANG FW, SUN N, HUANG L, YANG P, LI L. Screening and identification of probiotic lactic acid bacteria from Guangxi fresh rice noodle[J]. China Brewing, 2020, 39(8): 59-64 (in Chinese).
- [36] 杨振泉, 靳彩娟, 张咪, 王晓霖, 高璐, 顾瑞霞. 高粘附性戊糖片球菌的筛选、标记及其表面疏水与自凝聚性特征[J]. 食品与生物技术学报, 2015, 34(9): 926-934.  
YANG ZQ, JIN CJ, ZHANG M, WANG XL, GAO L, GU RX. Screening and molecular marking of highly adhesive *Pediococcus pentosaceus* and the

- characteristics of their surface hydrophobicities and autoaggregation abilities[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2015, 34(9): 926-934 (in Chinese).
- [37] 孙世鑫, 李科, 骆鹏飞, 俞兰秀, 莫小叶, 孙海燕, 张丽君, 刘冬. 制备富含  $\gamma$ -氨基丁酸酸奶的乳酸菌筛选及相关特性分析[J]. *现代食品科技*, 2021, 37(3): 106-114, 285. SUN SX, LI K, LUO PF, YU LX, MO XY, SUN HY, ZHANG LJ, LIU D. Screening and characteristics of lactic acid bacteria for preparing  $\gamma$ -aminobutyric acid-rich yogurt[J]. *Modern Food Science & Technology*, 2021, 37(3): 106-114, 285 (in Chinese).
- [38] 龚虹, 王海霞, 马征途, 王春颖, 冯谦, 马跃英, 李晓军, 李康宁, 刘彦民. 乳酸菌粘附力与生物膜、疏水性和自凝集特性的研究[J]. *中国微生态学杂志*, 2016, 28(9): 1026-1028, 1033. GONG H, WANG HX, MA ZT, WANG CY, FENG Q, MA YY, LI XJ, LI KN, LIU YM. Biofilm hydrophobicity and auto-agglutination properties of five *Lactobacillus* strains[J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2016, 28(9): 1026-1028, 1033 (in Chinese).
- [39] 夏海燕, 周思多, 张明喆, 方晗, 黄艺, 董明盛. 酢辣椒中益生乳酸菌的筛选及其功能特性[J]. *食品科学*, 2019, 40(6): 93-99. XIA HY, ZHOU SD, ZHANG MZ, FANG H, HUANG Y, DONG MS. Screening and functional characteristics of probiotics from Zuolajiao, a traditional fermented hot pepper product[J]. *Food Science*, 2019, 40(6): 93-99 (in Chinese).
- [40] 谢丹. 微酸性电解水在断奶仔猪饮水中的应用研究[D]. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 2017. XIE D. Study on the application of slightly acidic electrolysis water in drinking water of weaned piglets[D]. Ya'an: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2017 (in Chinese).