

解淀粉芽孢杆菌实时荧光定量 PCR 测定方法的建立及其在豆粕发酵中的应用

杨湘黔¹ 崔京春^{1*} 曾诗娴¹ 成丽¹ 张珂彬¹ 胡晓红¹ 鲍雅静^{2*}

(1. 大连民族大学生命科学学院, 大连 116600; 2. 大连民族大学环境与资源学院, 大连 116600)

摘要: 本试验旨在通过快速定量不同发酵时期下发酵豆粕中解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 的数量, 以解决豆粕发酵过程品质监控的瓶颈难题, 建立解淀粉芽孢杆菌的实时荧光定量 PCR 方法。根据解淀粉芽孢杆菌 DNA 解旋酶 A 亚基 (*gyrA*) 基因及 16S 核糖体 RNA (16S rRNA) 基因的保守区设计出 3 对引物, 利用常规 PCR 筛选出 1 对特异性引物, 并以该引物的扩增产物构建的重组质粒作为标准品, 建立实时荧光定量 PCR 方法, 并对该方法进行特异性、灵敏性、重复性检验, 核酸水平抗干扰验证及豆粕对检测敏感度的干扰验证, 最后对发酵的豆粕样品进行定量检测。结果表明: 1) 以 *gyrA* 基因设计的引物构建的质粒标准品建立的实时荧光定量 PCR 方法具有良好的特异性; 2) 该方法检测解淀粉芽孢杆菌核酸和菌液的最低检测限分别为 102 copies/ μL 和 10^3 CFU/mL; 3) 该方法组内变异系数在 0.76%~3.27%, 组间变异系数在 0.34%~1.88%, 均低于 5%, 说明重复性良好; 4) 含有与不含副干酪乳杆菌核酸的解淀粉芽孢杆菌的 Ct 值无显著差异 ($P>0.05$), 说明该方法不受检样中其他微生物的核酸干扰; 5) 该方法对豆粕中解淀粉芽孢杆菌的检测限为 10^4 CFU/mL, 比纯菌液最低检测敏感度 (10^3 CFU/mL) 降低了 1 个数量级 (但不影响该方法的实际检测应用)。解淀粉芽孢杆菌在不同发酵时期发酵豆粕样品中定量检测结果表明, 发酵 0 d 解淀粉芽孢杆菌的数量为 9.33×10^5 copies/g, 发酵至 5 d 接种菌数量为 4.16×10^8 copies/g。由此可见, 本试验建立的解淀粉芽孢杆菌实时荧光定量 PCR 方法特异性强, 灵敏度高, 抗干扰能力强, 可快速定量发酵豆粕中的解淀粉芽孢杆菌的数量。

关键词: 发酵豆粕; 解淀粉芽孢杆菌; 实时荧光定量 PCR; *gyrA* 基因; 定量方法

中图分类号: S816

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2021)01-0494-12

豆粕是大豆加工的副产物, 因富含多种营养物质, 是目前使用最广泛的植物性蛋白质饲料原料, 但因豆粕中含有抗营养因子影响了动物对饲料的消化吸收和利用^[1-3]。解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 是一种广泛被用于开发微生物饲料添加剂的革兰氏阳性芽孢杆菌^[4-5], 它能够产生蛋白酶、纤维素酶、淀粉酶、脂肪酶等多种酶类, 并能产生对动物病原菌中的大肠杆菌、梭状芽孢杆菌、沙门氏菌等具有较强的抑制能力的物

质^[6-8]。研究表明, 利用解淀粉芽孢杆菌发酵豆粕不仅可以降低豆粕中的抗营养因子含量, 且可提高动物对豆粕饲料的消化吸收率^[9-12]。解淀粉芽孢杆菌在发酵豆粕饲料中的数量是影响豆粕发酵效果的关键因素之一, 而由于用于发酵的豆粕为未灭菌原料, 在进行接种菌的数量检测时会因自身带有的微生物的干扰, 造成常用的微生物数量检测平板活菌计数法计数不准或者难以计数, 并且由于该方法检测周期通常长达 2~3 d, 无法实现

收稿日期: 2020-06-13

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31272584); 国家重点研发项目 (2016YFC050050302)

作者简介: 杨湘黔 (1996—), 男, 贵州铜仁人, 硕士研究生, 微生物发酵研究专业。E-mail: 465455121@qq.com

* 通信作者: 崔京春, 教授, 硕士生导师, E-mail: cjc@dlnu.edu.cn; 鲍雅静, 教授, 硕士生导师, E-mail: byj@dlnu.edu.cn

表 1 引物、探针序列
Table 1 Sequences of primers and probes

| 引物/探针 Primers/probes | 序列 Sequence (5'—3') | 靶基因 Target gene | 产物大小 Product size/bp |
|-------------------------|---|--------------------|-------------------------|
| gyrA1 | F:CGTACACCGGCTTCAGAATAC R:CTTCGCCTCTTGTGGCTTTA | DNA 解旋酶 A 亚基 | 115 |
| | FAM-TGACAGTAACGGTCCGCTAGTAACAGT-TAMRA | | |
| gyrA2 | F:CGAAGGTGCTAAGCCTGAAA R:GGAGTTCGTAAGCCGTTCTG | DNA 解旋酶 A 亚基 | 96 |
| | FAM-CAATGTCTGGAGCATTATCTTGATCACCA-TAMRA | | |
| 16S rRNA | F:GCATGTGGTTTAATTCTGA R:CTGGCAACTAAGATCAAG | 16S 核糖体 RNA | 164 |
| | FAM-CCAGGTCTTGACATCCTCTGACAA-TAMRA | | |

1.2.6 标准曲线的建立及灵敏性、重复性验证

pMD18T-*gyrA* 基因重组质粒的构建:以解淀粉芽孢杆菌 *KCA* 基因组为模版及引物 *gyrA1-F/gyrA1-R* 进行扩增获得目的片段(115 bp),将其与 pMD18-T 载体连接,连接后的产物进行 PCR 和测序验证。验证正确后转化至大肠杆菌 DH5 α 细胞中,然后采用 SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒提取重组质粒,通过核酸微量测定仪测定其浓度并通过公式换算成拷贝数。公式如下:

$$\text{拷贝数 (copies)} = \frac{X \times 6.021 \times 10^{22} (\text{molecules/mole})}{[N \times 660 (\text{g/mole}) \times 1.0 \times 10^9 (\text{ng/g})]}。$$

式中: X 为重组质粒的所测浓度; N 为重组质粒的碱基数。

标准曲线的建立:以洗脱缓冲液 TE 将标准品 pMD18T-*gyrA* 进行 10 倍稀释后作为模板进行实时荧光定量 PCR 反应。以拷贝数的对数为横坐标,Ct 值为纵坐标建立标准曲线。扩增效率(E) 计算公式为:

$$E = 10^{-1/\text{slope}} - 1 \times 100。$$

每个稀释度重复 3 次,以无菌水为阴性对照。

灵敏性验证:重组质粒标准品灵敏度检测是将标准品 pMD18T-*gyrA* 进行 10 倍梯度稀释并稀释成 6 个梯度,以作为实时荧光定量 PCR 的模版,不同稀释度的标准品重复 3 次检测;菌液灵敏度检测是将 *KCA* 菌原菌液进行 10 倍梯度稀释,分别提取各个稀释度菌液的基因组 DNA,最后进行实时荧光定量 PCR 反应。

重复性验证:用 5 个稀释度的 pMD18T-*gyrA* 标准品的 Ct 值变异系数(CV)评价该方法的重复性。组内重复性验证分别以 5 个稀释度的标准品

作为模板进行实时荧光定量 PCR 反应,每个稀释度重复 3 次,并以 *KCA* 菌的 DNA 和无菌水作为阳性对照和阴性对照。组间重复性验证以上述 5 个稀释度的标准品作为模板分 3 次进行实时荧光定量 PCR 反应,以 *KCA* 菌的 DNA 和无菌水作为阳性和阴性对照。

1.2.7 抗干扰验证

核酸水平抗干扰检测:分别提取 10^8 、 10^3 CFU/mL 菌液量的解淀粉芽孢杆菌 *KCA* 基因组 DNA,分别加入 10^8 CFU/mL 菌液量的副干酪乳杆菌 *rg-1* (*Lactobacillus paracasei* rg-1) 所提取的 DNA,以纯的解淀粉芽孢杆菌 *KCA* 的基因组 DNA 为对照进行实时荧光定量 PCR 检测,重复 3 次。

豆粕样品对接种菌吸附干扰的检测:取 6 g 灭菌的豆粕样品分别添加 4 mL 解淀粉芽孢杆菌 *KCA* 的不同稀释度菌液,静置 10 min 后加入 20 mL 磷酸盐缓冲液(PBS),颠倒 2~3 次后斜面振荡 15 min,静置 5 min 后吸取上清,3 000 \times g 离心 6 min,弃上清,加入 2 mL TE Buffer 后提取基因组 DNA;同时提取 2 mL 不同稀释度纯菌液的基因组 DNA 作为对照,并进行实时荧光定量 PCR 检测。每个稀释度检测 3 次。

1.2.8 发酵豆粕中解淀粉芽孢杆菌数量的检测

解淀粉芽孢杆菌 *KCA* 培养至 10^8 ~ 10^9 CFU/mL,以 4% 的接种量接种至水分含量为 40%~45% 的豆粕中,室温发酵 0、1、2、3、5 d;取样根据 1.2.2 所提供的豆粕中 DNA 提取方法提取细菌 DNA,利用所建立的实时荧光定量 PCR 方法进行检测。

1.3 数据统计分析

试验数据采用 GraphPad Prism 7.00 软件进行统计分析并作图。结果以平均值±标准差表示。

2 结果与分析

2.1 特异性验证

2.1.1 常规 PCR 法验证、特异性引物筛选

以 *gyrA* 及 16S rRNA 基因为靶标设计出的 3 对引物进行常规 PCR 扩增,由表 2 可知,只有引物对 *gyrA1-F/gyrA1-R* 扩增解淀粉芽孢杆菌 KCA,采用 *gyrA2-F/gyrA2-R* 可同时扩增解淀粉芽孢杆菌 KCA 及地衣芽孢杆菌 KCB;采用引物对 16S

rRNA-F/16S rRNA-R 可将芽孢杆菌属内的菌株扩增出条带(164 bp)。这表明引物对 *gyrA1-F/gyrA1-R* 能特异性扩增解淀粉芽孢杆菌,因此选用 *gyrA1-F/gyrA1-R* 作为本研究建立实时荧光定量 PCR 方法的特异性引物对。

2.1.2 实时荧光定量 PCR 方法特异性的验证

利用引物对 *gyrA1-F/gyrA1-R* 及探针 *gyrA1* 进行实时荧光定量 PCR 反应,KCA 菌在 22~24 个循环处出现扩增曲线,而其他 4 株芽孢杆菌、5 株非芽孢杆菌及阴性对照则在 35 个循环后出现扩增曲线(图 1)。这表明本研究所建立的方法对于 KCA 菌有较强的特异性。

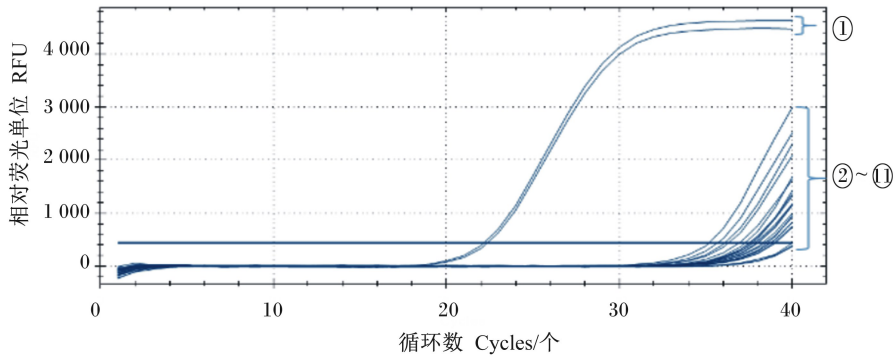
表 2 不同引物特异性检测

Table 2 Specificity detection of different primers

| 分类 Classification | 菌种 Strains | 菌种编号 Strain numbers | 菌种来源 Strain sources | 3 对引物的常规 PCR 结果 Results of three pairs of primers by conventional PCR | | |
|-------------------------------|---|------------------------|------------------------|--|---|---|
| | | | | ① | ② | ③ |
| 芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i> | 解淀粉芽孢杆菌 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | KCA | 自备菌种 | + | + | + |
| | 地衣芽孢杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i> | KCB | 自备菌种 | - | + | + |
| | 蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i> | KCC | 自备菌种 | - | - | + |
| | 纳豆芽孢杆菌 <i>Bacillus natto</i> | KCD | 自备菌种 | - | - | + |
| | 枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i> | ATCC19217 | 美国模式培养物保藏中心 | - | - | + |
| | 副干酪乳杆菌 <i>Lactobacillus paracasei</i> | rg-1 | 自备菌种 | - | - | - |
| 其他菌属 Other bacterial genus | 植物乳杆菌 <i>Lactobacillus plantarum</i> | rg-2 | 自备菌种 | - | - | - |
| | 金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i> | ATCC12600 | 美国模式培养物保藏中心 | - | - | - |
| | 藤黄微球菌 <i>Micrococcus luteus</i> | CMCC28001 | 中国医学细菌保藏管理中心 | - | - | - |
| | 大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i> | ATCC25922 | 美国模式培养物保藏中心 | - | - | - |
| | 灭菌水(阴性对照) Sterile water (negative control) | | | - | - | - |

自备菌种为经本实验室分离、16S rRNA 测序、鉴定后的菌种;①为 *gyrA1-F/gyrA1-R* 引物对,产物大小为 115 bp;②为 *gyrA2-F/gyrA2-R* 引物对,产物大小为 96 bp;③为 16S rRNA-F/16S rRNA-R 引物对,产物大小为 164 bp。“+”表示常规 PCR 反应阳性,“-”表示常规 PCR 反应阴性。

Self-provided strain was the strain which was isolated by our laboratory and sequenced and identified via 16S rRNA; ① was *gyrA1-F/gyrA1-R* primer pair, and the product size was 115 bp; ② was *gyrA2-F/gyrA2-R* primer pair, and the product size was 96 bp; ③ was 16S rRNA-F/16S rRNA-R primer pair, and the product size was 164 bp. Conventional PCR results were scored as “+” for positive reaction, and “-” for negative reaction.



①~⑩分别为解淀粉芽孢杆菌 KCA、4 株芽孢杆菌、5 株非芽孢杆菌属及阴性对照。

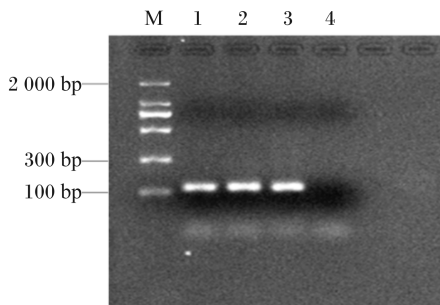
The *Bacillus amyloliquefaciens* KCA, 4 *Bacillus*, 5 non *Bacillus* and negative control were ① to ⑩, respectively.

图 1 实时荧光定量 PCR 方法的特异性

Fig.1 Specificity of real-time PCR method

2.2 pMD18T-gyrA 标准品的制备及标准曲线的建立

以 KCA 菌基因组 DNA 为模版,以引物对 *gyrA1-F/gyrA1-R* 进行常规 PCR 扩增,获得 115 bp 大小的片段(图 2),结果与预期相符。将扩增产物与 pMD18-T 载体连接,构建重组质粒 pMD18T-*gyrA*。构建后的质粒经酶切、测序验证正确后,使用核酸微量测定仪测定其浓度(结果未给出),并计算出其拷贝数为 5.74×10^{10} copies/ μL ,以此作为所建立的实时荧光定量 PCR 方法的标准品。



M 为 DNA Marker (2 000 bp);泳道 1~3 为 *gyrA1-F/gyrA1-R* 引物对的扩增产物;泳道 4 为阴性对照。

M was DNA Marker (2 000 bp); lanes 1 to 3 were amplification product of *gyrA1-F/gyrA1-R* primer pair; lane 4 was negative control.

图 2 *gyrA1-F/gyrA1-R* 引物对的常规 PCR 扩增结果

Fig.2 Conventional PCR amplification results of *gyrA1-F/gyrA1-R* primer pair

将标准品 pMD18T-*gyrA* 进行 10 倍梯度稀释,分别以各个稀释度的标准品作为模板进行实时荧光定量 PCR 反应,获得的扩增曲线规律较好,各稀释度之间的扩增 Ct 值相差在 2~3 个循环之间(图 3);以不同稀释度的标准品拷贝数的对数为 X 轴、Ct 值为 Y 轴建立标准曲线,该曲线的斜率为 -3.468,扩增效率为 0.94,截距为 41.86,相关系数 $R^2 = 0.9993$ (图 4),表明标准品浓度在 $5.74 \times 10^7 \sim 5.74 \times 10^2$ copies/ μL 有较好的线性关系。

2.3 实时荧光定量 PCR 方法的灵敏性及重复性检测

2.3.1 重组质粒标准品的灵敏度检测

以 $10^2 \sim 10^7$ copies/ μL 各个稀释度标准品 pMD18T-*gyrA* 为模板,利用所建立的方法进行检测。结果表明,该方法最小检出量为 5.74×10^2 copies/ μL (表 3)。

2.3.2 菌液灵敏度检测

将 KCA 菌的原菌液(4.0×10^8 CFU/mL)进行 10 倍梯度稀释,从 $10^7 \sim 10^2$ 各稀释度提取核酸作为模板,并进行实时荧光定量 PCR 反应。由表 4 可知,该方法的菌液最小检出限为 10^3 CFU/mL。

2.3.3 重复性检测

以不同稀释度的重组质粒标准品 pMD18T-*gyrA* 测定 3 次,组内重复 Ct 值的变异系数介于 0.76%~3.27%,标准偏差(SD)介于 0.10~0.55,组间重复 Ct 值的变异系数介于 0.34%~1.88%,SD 介于 0.07~0.62,均在可接受范围内,证明建立的实时荧光定量 PCR 方法组内和组间重复较好。

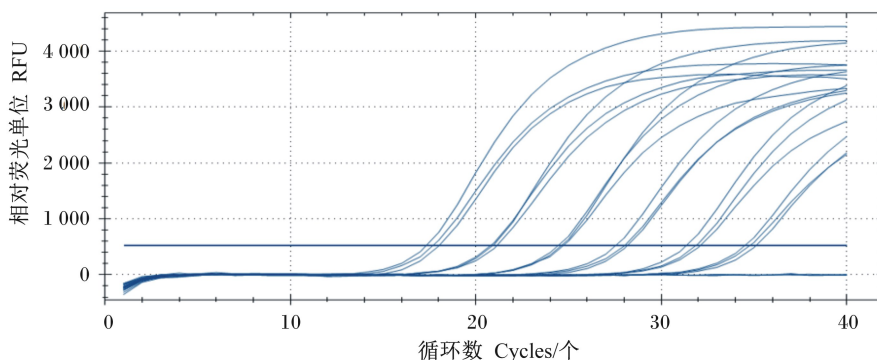


图3 不同稀释度标准品的扩增曲线

Fig.3 Amplification curve of different standard samples dilution

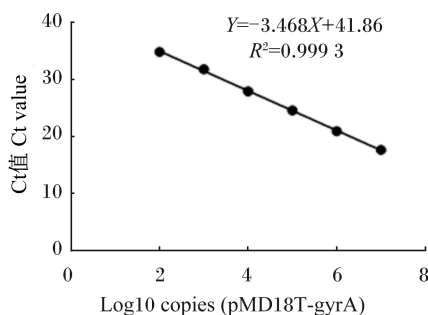


图4 实时荧光定量 PCR 标准曲线

Fig.4 Standard curve of real-time PCR

2.4 实时荧光定量 PCR 方法的抗干扰验证

2.4.1 核酸水平抗干扰检测

由表 5 可知,从 10^8 和 10^3 CFU/mL 菌液浓度

的 KCA 菌所提取的核酸中分别加入 10^8 CFU/mL 的副干酪乳杆菌 rg-1 核酸提取物时(核酸浓度为 $6.7 \text{ ng}/\mu\text{L}$),KCA 纯菌液的 Ct 值均不受影响,且与无 rg-1 干扰下的 KCA 纯菌液的 Ct 值无显著差异($P>0.05$)。

2.4.2 豆粕对检测方法的干扰

由表 6 可知,纯菌液最低检测限为 10^3 CFU/mL,其中同等浓度下的纯菌液与豆粕的混合物的最低检出限为 $10^4 \sim 10^5$ CFU/mL,3 次重复结果均比纯菌液检测限低 1~2 个梯度,表明以此方法检测发酵豆粕中目的菌的检测值比实际含量低 10~100 倍。

表 3 实时荧光定量 PCR 标准品的灵敏度

Table 3 Sensitivity of real-time PCR standard samples

| 标准品浓度 Concentration of standard samples/(copies/ μL) | 阳性次数/试验次数 No. of positive wells/No. of tested wells | Ct 值 Ct value |
|---|--|------------------|
| 5.74×10^7 | 3/3 | 17.66 ± 0.36 |
| 5.74×10^6 | 3/3 | 20.92 ± 0.18 |
| 5.74×10^5 | 3/3 | 24.56 ± 0.14 |
| 5.74×10^4 | 3/3 | 27.89 ± 0.33 |
| 5.74×10^3 | 3/3 | 31.75 ± 0.39 |
| 5.74×10^2 | 3/3 | 34.77 ± 0.31 |
| 阴性对照 Negative control | 2/3 | 38.92 ± 0.51 |

2.5 发酵豆粕样品的实时荧光定量 PCR 检测结果

分别提取 0、1、2、3、5 d 的发酵豆粕样品基因组 DNA 作为模板,利用 gyrA1-F/gyrA1-R 引物对

进行常规 PCR 检测。如图 5 所示,不同发酵天数的豆粕提取的 DNA 均有扩增条带,且随着发酵时间延长,条带越清晰,表明豆粕样品中的细菌 DNA 均提出。

表 4 实时荧光定量 PCR 检测 KCA 菌液样品的灵敏度

Table 4 Sensitivity of real-time PCR for KCA bacterial liquid

| 菌株 Strain | KCA 菌液浓度 Concentration of KCA bacterial liquid/(CFU/mL) | 阳性次数/试验次数 No. of positive wells/ No. of tested wells | Ct 值 Ct value |
|--|---|--|------------------|
| 解淀粉芽孢杆菌 KCA <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> KCA | 10^7 | 3/3 | 16.47±0.17 |
| | 10^6 | 3/3 | 21.32±0.12 |
| | 10^5 | 3/3 | 26.90±0.25 |
| | 10^4 | 3/3 | 31.13±0.17 |
| | 10^3 | 3/3 | 34.97±0.60 |
| | 阴性对照 Negative control | 3/3 | 36.50±0.35 |

表 5 核酸水平抗干扰检测

Table 5 Nucleic acid level anti-interference detection

| 菌液浓度 Concentration of bacterial liquid/ (CFU/mL) | Ct 值 Ct value | | | | | | | |
|---|--------------------------------------|-------|-------|------------|--|-------|-------|------------|
| | KCA 纯菌液 KCA pure bacterial liquid | | | | KCA 纯菌液+rg-1 菌液 KCA pure bacterial liquid+ <i>L. paracasei</i> rg-1 bacterial liquid | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 均值 Mean | 1 | 2 | 3 | 均值 Mean |
| 10^8 | 12.37 | 12.67 | 12.40 | 12.48±0.17 | 12.34 | 12.90 | 12.23 | 12.49±0.36 |
| 10^3 | 34.47 | 34.13 | 34.20 | 34.27±0.18 | 34.22 | 34.09 | 34.22 | 34.18±0.08 |

表 6 豆粕对接种菌 KCA 检测的干扰

Table 6 Interference of soybean meal to KCA detection of inoculant bacteria

| 菌液浓度 Concentration of bacterial liquid/(CFU/mL) | Ct 值 Ct value | | |
|---|--------------------------------------|--|--------------------------|
| | KCA 纯菌液 KCA pure bacterial liquid | KCA 纯菌液+豆粕 KCA pure bacterial liquid+ soybean meal | 阴性对照 Negative control |
| 10^7 | 16.47±0.17 | 24.29±0.26 | |
| 10^6 | 21.32±0.12 | 28.45±0.09 | |
| 10^5 | 26.90±0.25 | 32.57±0.29 | 36.88±0.41 |
| 10^4 | 31.13±0.17 | 35.18±0.23 | |
| 10^3 | 34.97±0.60 | 35.57±0.71 | |

实时荧光定量 PCR 方法检测结果表明(表 7),发酵 0 d 解淀粉芽孢杆菌数量为 9.33×10^5 copies/g (理论接种菌量为 1.0×10^6 CFU/mL),发酵 5 d 时,解淀粉芽孢杆菌的数量为 4.16×10^8 copies/g,此时的该菌的数量是发酵初期的 1 000 倍,说明本研究建立的实时荧光定量 PCR 方法能定量检测发酵豆粕中的解淀粉芽孢杆菌。

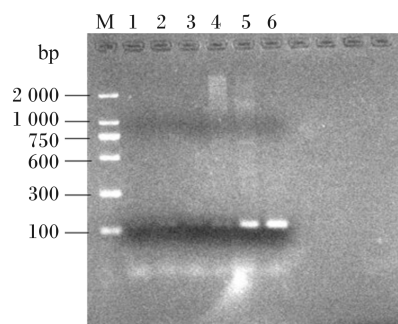
3 讨论

解淀粉芽孢杆菌属于芽孢杆菌属(*Bacillus*),是枯草芽孢杆菌近缘种群的芽孢杆菌,该菌群中主要被用于微生物添加剂生产的近缘菌还有枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)^[27-28]。细菌的 16S rDNA 序列素有“细菌化石”之称,已成为细菌系统发育分析的

金标准。有研究表明,采用 16S rDNA 可以区分芽孢杆菌属内的菌种,但难以区分枯草近缘种群中的各类芽孢杆菌^[29-30]。因此近几年采用细菌解旋酶 *gyrA* 基因进行细菌分类、鉴定颇受关注,Chun 等^[31]曾用 *gyrA* 基因设计枯草芽孢杆菌近缘种群的引物进行序列分析,表明 *gyrA* 基因能够区分枯草近缘种群中的芽孢杆菌。本研究针对解淀粉芽孢杆菌 16S rRNA 基因及 *gyrA* 基因的保守区设计了引物,常规 PCR 检测结果表明以 *gyrA* 基因设计出的引物进行扩增获得了良好的种间特异性,可将目的菌与近缘菌区别,而针对 16S rRNA 基因设计出的引物只能达到属间特异,这与曹凤明等^[32]描述一致。

利用实时荧光定量 PCR 方法进行微生物的数量检测已在发酵领域得到较好的应用。Yong 等^[33]研究了固体发酵机制中产聚 γ -谷氨酸的解淀粉芽孢杆菌生长规律,并与活菌计数进行对比,表明建立的实时荧光定量 PCR 方法与活菌计数无显著差异;夏雪娟等^[34]利用实时荧光定量 PCR 方法检测麻竹腌制过程中乳酸球菌的动态变化,结果表明随着腌制时间的延长,乳酸球菌数量逐渐升高,在 14 d 达到峰值 (4.63×10^8 copies/ μL),相比于 0 d (2.41×10^2 copies/ μL) 增加了 6 个数量级。这些研究结果均表明,实时荧光定量 PCR 可以定量检测发酵过程中优势菌或接种菌的生长变化。本研究成功设计了可特异性检测解淀粉芽孢杆菌 KCA 的引物,并利用此引物扩增的产物构建的重组质粒,建立了标准曲线,建立了定量检测豆

粕发酵过程中解淀粉芽孢杆菌 KCA 的实时荧光定量 PCR 的方法。该方法的标准品在 $5.74 \times 10^7 \sim 5.74 \times 10^2$ copies/ μL 有较好的线性关系,核酸水平最低检测限在 102 copies/ μL ,纯菌液水平在 10^3 CFU/mL,说明该方法的灵敏性很好。此外,发酵豆粕的原料为未灭菌状态,从检样中提取细菌基因组 DNA 时通常为混菌的 DNA,进行核酸水平、菌体水平抗干扰检测结果均表明所建立的方法抗干扰能力强,添加干扰菌核酸并不影响检测值。



M 为 DNA Marker (2 000 bp);泳道 1 为阴性对照;泳道 2、3、4、5、6 分别为发酵 0、1、2、3、5 d 豆粕样品。

M was DNA Marker (2 000 bp); lane 1 was negative control; lanes 2, 3, 4, 5, and 6 were soybean meal samples fermented for 0, 2, 3 and 5 d, respectively.

图 5 不同发酵时间豆粕样品的常规 PCR 扩增结果

Fig.5 Conventional PCR amplification results of soybean meal samples with different fermentation time

表 7 不同发酵时间的豆粕中解淀粉芽孢杆菌的数量检测

Table 7 Quantification of *Bacillus amyloliquefaciens* in soybean meal fermented for different time

| 发酵时间 Fermentation time/d | Ct 值 Ct value | 解淀粉芽孢杆菌数量 Quantity of <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> / (copies/g) | 理论接种量 Theoretical inoculum quantity/(CFU/mL) |
|-----------------------------|------------------|--|--|
| 0 | 30.38±0.38 | 9.33×10^5 | 7.5×10^6 |
| 1 | 23.95±0.30 | 2.75×10^8 | — |
| 2 | 23.96±0.48 | 2.69×10^8 | — |
| 3 | 23.97±0.31 | 3.02×10^8 | — |
| 5 | 23.47±0.20 | 4.16×10^8 | — |

豆粕原料对照中解淀粉芽孢杆菌数量为 57.4 copies/g。

The number of *Bacillus amyloliquefaciens* in the original soybean meal control group was 57.4 copies/g.

在实际发酵生产中,豆粕为干燥的粉末状,加菌发酵时会对目标菌造成吸附,从而导致在提取

细菌 DNA 时会有残留,为了探讨豆粕类固体基质对样品中 DNA 检测的影响,本研究还进行了豆粕

的抗干扰验证试验,结果表明豆粕中目的菌的定量检测限为 $10^4 \sim 10^5$ CFU/mL,比纯菌液的高 10~100 倍,说明豆粕类固体基质对接种菌的 DNA 水平数量检测有干扰,但因发酵豆粕时是以 $10^8 \sim 10^9$ CFU/mL 的菌液、4% 的接种量进行的,接种之初豆粕样品中目的菌的含量至少在 10^6 CFU/mL,检测基线比所建立方法高出 1~2 个数量级以上,不影响该方法在实际检测中的应用。实际检测结果表明,不同发酵时期的豆粕中的解淀粉芽孢杆菌数量均发生变化,发酵初期(0 d),解淀粉芽孢杆菌的数量为 9.33×10^5 copies/g,发酵至 5 d,解淀粉芽孢杆菌的数量为 4.16×10^8 copies/g,是接种初期的 1 000 倍。同时表明解淀粉芽孢杆菌的数量随着发酵天数的延长而增加,进而降低豆粕中的抗营养因子含量,提高营养物质消化利用率,这与王梅等^[35]描述一致。以上结果证明本研究建立的解淀粉芽孢杆菌的实时荧光定量 PCR 的方法可良好地应用于豆粕发酵过程中解淀粉芽孢杆菌的定量检测。

4 结 论

本研究针对发酵豆粕中接种菌建立了特异性实时荧光定量 PCR 方法,可相对准确检测接种菌在发酵豆粕中不同时期的数量变化,解决了以豆粕等未灭菌生产原料进行固体发酵过程中监控接种菌生长情况难的瓶颈问题,为发酵豆粕生产企业进行生产过程品质监控提供了新的科学的技术手段。

参考文献:

- [1] 程友飞.微生物固态发酵豆粕及其致敏性研究[D].硕士学位论文.南昌:南昌大学,2016:1-9.
CHEN Y F.Study on the preparation and allergenicity of soybean meal by microbial solid state fermentation [D].Masters' s Thesis. Nanchang: Nanchang University, 2016:1-9.(in Chinese)
- [2] 于海涛,周智旋,陆文清.角蛋白酶水解豆粕的微生物多样性分析[J].微生物学通报,2019,46(4):729-740.
YU H T, ZHOU Z X, LU W Q.Microbial diversity of soybean meal hydrolysate treated by keratinase[J]. Microbiology China, 2019, 46(4):729-740.(in Chinese)
- [3] 李莹,韩云胜,赵青余,等.豆粕与发酵豆粕中主要营养成分、抗营养因子及体外消化率的比较分析[J].中国饲料,2019(23):76-81.
YI Y, HAN Y S, ZHAO Q Y, et al.Comparative analysis of main nutrients, anti-nutritional factors and *in vitro* digestibility between soybean meal and fermented soybean meal[J].China Feed, 2009(23):76-81.(in Chinese)
- [4] YE M, SUN L H, YANG R, et al.The optimization of fermentation conditions for producing cellulase of *Bacillus amyloliquefaciens* and its application to goose feed[J]. Royal Society Open Science, 2017, 4(10):171012.
- [5] 王美玲,吴骏晨,朱赟程,等.解淀粉芽孢杆菌在动物生产中应用的研究进展[J].中国畜牧杂志,2017,53(2):19-23.
WANG M L, WU J C, ZHU Y C, et al.Research progress on application of *Bacillus amyloliquefaciens* in animal production[J].Chinese Journal of Animal Science, 2017, 53(2):19-23.(in Chinese)
- [6] 王卉,游成真,秦宇轩,等.解淀粉芽孢杆菌 L-S60 生物学特性及其固态发酵工艺研究[J].中国农业大学学报,2016,21(9):133-142.
WANG H, YOU C Z, QIN Y X, et al.The biological characteristics and solid-state fermentation of *Bacillus amyloliquefaciens* L-S60 [J]. Journal of China Agricultural University, 2016, 21(9):133-142.(in Chinese)
- [7] 戴秀华,张荣胜,陈志谊.解淀粉芽孢杆菌 Lx-11 生物学特性研究[J].中国生物防治学报,2014,30(4):573-581.
DAI X H, ZHANG R S, CHEN Z Y.The biological characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* Lx-11 [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2014, 30(4):573-581.(in Chinese)
- [8] 陈洁梅,张灿辉,艾田.解淀粉芽孢杆菌 KN-BL-1 及其发酵豆粕产抗菌肽类物质的研究[J].中国生物工程杂志,2014,34(10):61-66.
CHEN J M, ZHANG C H, AI T.Study of the antibacterial peptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* KN-BL-1 and its fermented soybean meal [J]. China Biotechnology, 2014, 34(10):61-66.(in Chinese)
- [9] SUPRIYATI, HARYATI T, SUSANTI T, et al.Nutritional value of rice bran fermented by *Bacillus amyloliquefaciens* and humic substances and its utilization as a feed ingredient for broiler chickens [J]. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences (AJAS), 2015, 28(2):231-238.

- [10] CHI C H, CHO S J. Improvement of bioactivity of soybean meal by solid-state fermentation with *Bacillus amyloliquefaciens* versus *Lactobacillus* spp. and *Saccharomyces cerevisiae* [J]. LWT-Food Science and Technology, 2016, 68: 619-625.
- [11] 付文娟, 杨亚晋, 王庆, 等. 高产蛋白酶菌株的筛选及其提高发酵豆粕肽含量效果研究[J]. 中国畜牧杂志, 2013, 49(23): 41-46.
FU W J, YANG Y J, WANG Q, et al. Screening of a new *Bacillus* which produces high protease and study on its peptide promoting effect on fermented soybean meal[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2013, 49(23): 41-46. (in Chinese)
- [12] 石俭. 玉米芯发酵饲料的研制及其对兔、鸭饲喂效果的研究[D]. 硕士学位论文. 保定: 河北农业大学, 2013: 38-51.
SHI J. Study on preparation of corncob fermentation feed and its feeding effect in rabbit, duck[D]. Masters' s Thesis. Baoding: Agricultural University of Hebei, 2013: 38-51. (in Chinese)
- [13] 王毕英, 王洪丽, 刘彦民. 微生态制剂活菌数方法研究进展[J]. 农产品加工, 2018(24): 77-79.
WANG B Y, WANG H L, LIU Y M. Advances in methods of living bacteria count for microecological agents[J]. Farm Products Processing, 2018(24): 77-79. (in Chinese)
- [14] MARTÍNEZ-BLANCH J F, SÁNCHEZ G, GARAY E, et al. Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of enterotoxigenic members of *Bacillus cereus* group in food samples[J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 135(1): 15-21.
- [15] DING T, SUO Y J, ZHANG Z H, et al. A multiplex RT-PCR assay for *S. aureus*, *L. monocytogenes*, and *Salmonella* spp. detection in raw milk with pre-enrichment[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 989.
- [16] ZHAO X H, ZHONG J L, WEI C J, et al. Current perspectives on viable but non-culturable state in food-borne pathogens[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 580.
- [17] YANG J, ZHANG N N, LV J, et al. Comparing the performance of conventional PCR, RTQ-PCR, and droplet digital PCR assays in detection of *Shigella*[J]. Molecular and Cellular Probes, 2020, 51: 101531.
- [18] 李天芝, 于新友, 莫玲. 基于 16S rRNA 基因的枯草芽孢杆菌 PCR 快速检测方法的建立[J]. 广东畜牧兽医科技, 2016, 41(1): 30-33.
LI T Z, YU X Y, MO L. Establishment and application of 16S rRNA gene-based PCR assay for detection of *Bacillus subtilis*[J]. Guangdong Journal of Animal and Veterinary Science, 2016, 41(1): 30-33. (in Chinese)
- [19] 孙晓棠, 龙良鲲, 崔汝强, 等. 利用 PCR-DGGE 技术快速检测鉴定饲用微生物[J]. 华南农业大学学报, 2010, 31(4): 72-75.
SUN X T, LONG L K, CUI R Q, et al. Detection and identification of direct fed microbials by PCR-DGGE[J]. Journal of South China Agricultural University, 2010, 31(4): 72-75. (in Chinese)
- [20] YONG X Y, CUI Y Q, CHEN L H, et al. Dynamics of bacterial communities during solid-state fermentation using agro-industrial wastes to produce poly- γ -glutamic acid, revealed by real-time PCR and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 92(4): 717-725.
- [21] FERNÁNDEZ-ÁLVAREZ C, GONZÁLEZ S F, SANTOS Y. Quantitative PCR coupled with melting curve analysis for rapid detection and quantification of *Tenacibaculum maritimum* in fish and environmental samples[J]. Aquaculture, 2019, 498: 289-296.
- [22] 郭佳佳, 王立元, 翁美芝, 等. 半夏曲中 4 种优势微生物的荧光定量 PCR 方法的建立[J]. 中草药, 2017, 48(24): 5130-5135.
GUO J J, WANG L Y, WENG M Z, et al. Establishment of fluorescent quantitative PCR method for four dominant microorganisms in Rhizoma Pinelliae fermentata[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2017, 48(24): 5130-5135. (in Chinese)
- [23] 程海星, 郭月英, 任霆, 等. 实时荧光定量 PCR 技术原理及在食品检测中的应用[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(3): 243-247.
CHENG H X, GUO Y Y, REN T, et al. Principle and application of fluorogenic real-time PCR in food detection[J]. Food and Fermentation Industries, 2015, 41(3): 243-247. (in Chinese)
- [24] 吕旭聪, 刘志彬, 张雯, 等. 红曲黄酒传统酿造过程中优势细菌活菌检测方法的构建及应用[J]. 中国食品学报, 2018, 18(7): 210-219.
LV X C, LIU Z B, ZHANG W, et al. Construction and application of detection method for viable dominant bacteria during traditional brewing of *Hongqu* glutinous rice wine[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(7): 210-219. (in Chinese)

- [25] ROONEY A P, PRICE N P J, EHRHARDT C, et al. Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov. [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59(10): 2429–2436.
- [26] 王琼,唐俊妮,汤承,等.一种采用微波炉加热快速提取细菌 DNA 用于 PCR 扩增的方法[J].西南民族大学学报(自然科学版),2015,41(2):150–155.
WANG Q, TANG J N, TANG C, et al. Rapid method with microwave oven heating for bacterial DNA extraction applied to PCR amplification [J]. Journal of Southwest University for Nationalities (Natural Science Edition), 2015, 41(2): 150–155. (in Chinese)
- [27] 巨向红,叶小妹,张金燕,等.一株枯草芽孢杆菌的饲料学特性研究[J].中国草食动物科学,2015,35(4):32–35,39.
JU X H, YE X M, ZHANG J Y, et al. Study on the feed performance of a strain of *Bacillus subtilis* [J]. China Herbivore Science, 2015, 35(4): 32–35, 39. (in Chinese)
- [28] 张明,董玲.饲料微生物添加剂——地衣芽孢杆菌检验方法验证初探[J].饲料工业,2019,40(13):58–61.
ZHANG M, DONG L. Validation of the test method for microbiological additive of feed *Bacillus licheniformis* [J]. Feed Industry Magazine, 2019, 40(13): 58–61. (in Chinese)
- [29] WANG L T, LEE F L, TAI C J, et al. *Bacillus velezensis* is a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens* [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58 (Pt 3): 671–675.
- [30] 严婉荣,肖敏,陈圆,等.芽孢杆菌基本特征、16S rRNA 对比分析及特异性基因挖掘[J].基因组学与应用生物学,2017,36(11):4686–4692.
YAN W R, XIAO M, CHEN Y, et al. Comparative analysis between basic characteristics and 16S rRNA, and specific gene discovery of *Bacillus* [J]. Genomics and Applied Biology, 2017, 36(11): 4686–4692. (in Chinese)
- [31] CHUN J, BAE K S. Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* and related taxa based on partial *gyrA* gene sequences [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2000, 78(2): 123–127.
- [32] 曹凤明,杨小红,马鸣超,等.枯草芽孢杆菌近缘种群鉴定方法研究进展[J].微生物学通报,2014,41(5):968–974.
CAO F M, YANG X H, MA M C, et al. Advances in the identification of *Bacillus subtilis* and closely related species [J]. Microbiology China, 2014, 41(5): 968–974. (in Chinese)
- [33] YONG X Y, ZHANG R F, ZHANG N, et al. Development of a specific real-time PCR assay targeting the poly- γ -glutamic acid synthesis gene, *pgsB*, for the quantification of *Bacillus amyloliquefaciens* in solid-state fermentation [J]. Bioresource Technology, 2013, 129: 477–484.
- [34] 夏雪娟,郑炯,叶秀娟,等.实时荧光定量 PCR 技术监测腌制麻竹笋中乳酸乳球菌动态变化[J].食品科学,2016,37(4):88–92.
XIA X J, ZHENG J, YE X J, et al. Detection of *Lactococcus lactis* in pickled *Ma* bamboo shoots by quantitative real-time PCR [J]. Food Science, 2016, 37(4): 88–92. (in Chinese)
- [35] 王梅,谢全喜,侯楠楠,等.三种益生菌发酵剂固态发酵对豆粕营养品质的影响[J].中国酿造,2020,39(2):115–119.
WANG M, XIE Q X, HOU N N, et al. Effects of solid-state fermentation of three probiotic fermentation starters on the nutritional quality of soybean meal [J]. China Brewing, 2020, 39(2): 115–119. (in Chinese)

Development of Real-Time Fluorescent Quantitative PCR Detection Method for *Bacillus amyloliquefaciens* and Its Application in Fermented Soybean Meal

YANG Xiangqian¹ CUI Jingchun^{1*} ZENG Shixian¹ CHENG Li¹
ZHANG Kebin¹ HU Xiaohong¹ BAO Yajing^{2*}

(1. College of Life Science, Dalian Minzu University, Dalian 116600, China; 2. College of Environment and Resources Sciences, Dalian Minzu University, Dalian 116600, China)

Abstract: A new real-time fluorescent quantitative PCR (qPCR) detection method for detection of the quantity of *Bacillus amyloliquefaciens* in fermented soybean meal at different fermentation stages was developed in our study to solve the bottleneck problem of quality monitoring in the fermentation process of soybean meal. Three pairs of primers were designed from the conservative region of gyrase subunit A (*gyrA*) gene and 16S ribosomal RNA gene of *B. amyloliquefaciens*. A pair of specific primers were screened out by conventional PCR, and the recombinant plasmid constructed by the amplification products of the primers was used as the standard. Then a real-time fluorescent quantitative PCR method was established. The established method was assessed with respect to specificity, sensitivity and repeatability, and the level of nucleic acid anti-interference, interference of soybean meal detection sensitivity. Finally, it was applied to detection of the fermented soybean meal samples. The results showed as follows: 1) the real-time fluorescent quantitative PCR method based on plasmid standard constructed with primers designed by *gyrA* gene had good specificity; 2) the minimum detection limits of nucleic acid level and bacterial solution of *B. amyloliquefaciens* were 10^2 copies/ μL and 10^3 CFU/mL, respectively; 3) the coefficient variation (CV) were 0.76% to 3.27% in the intragroup and 0.34% to 1.88% in the intergroup, all of which were lower than 5%, indicating good repeatability; 4) there was no significant difference in Ct value between *B. amyloliquefaciens* with and without nucleic acid of *Lactobacillus paracasei* ($P>0.05$), indicating that the method was not interfered by nucleic acid of other microorganisms in the sample; 5) the detection limit of this method for *B. amyloliquefaciens* in soybean meal was 10^4 CFU/mL, which was one order of magnitude lower than the lowest detection sensitivity (10^3 CFU/mL) of pure bacterial solution (but did not affect the actual detection application of this method). The results showed that the number of *B. amyloliquefaciens* was 9.33×10^5 copies/g on the first day of fermentation and 4.16×10^8 copies/g on the fifth day of fermentation. Comprehensively, the results indicate that the established qPCR method has good specificity, sensitivity, anti-interference ability, and it can rapidly quantify the *B. amyloliquefaciens* in fermented soybean meals. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2021, 33(1):494-505]

Key words: fermented soybean meal; *Bacillus amyloliquefaciens*; real-time fluorescence quantitative PCR; *gyrA* gene; quantitative method

* Corresponding authors: CUI Jingchun, professor, E-mail: cjc@dnu.edu.cn; BAO Yajing, professor, E-mail: byj@dnu.edu.cn