

文章编号 :1003-8701(2004)01-0044-03

饲用复合微生物生态制剂的研究

Ⅲ.微生物生态制剂的试生产

任守让 ,马西艺

(吉林省农业科学院 ,吉林 公主岭 136100)

摘 要 :采用分离筛选的两株有效菌株蜡状芽孢杆菌 SB-15(*Bacillus cereus* SB-15)及乳酸杆菌 Lb-10(*Lactobacillus sp.* Lb-10) ,经微生物深层发酵及相关后处理工艺 ,研制成功新型复合微生物活菌饲料添加剂(暂名“利生 931”)。该试生产制剂中的活菌数、水分及细度均符合国家有关主管部门颁布的《微生物生态制剂制造、检验暂行规定(大纲)》标准。安全毒理学检验认定无毒、安全。

关键词 :微生物生态制剂 ;工业试生产 ;深层发酵 ;安全性

中图分类号 :Q939.9

文献标识码 :A

随着生物科学技术的发展 ,微生物学理论研究的不断深入和微生物生态工程的开发 ,用于畜禽饲养的活体微生物制剂 (或称活菌制剂)的开发研究正在国内外兴起 ,各类型产品相继问世 ,饲养业和饲料业学者及生产者们对此日趋关注。目前 ,国内外研制开发的饲用微生物添加剂多为单一菌型 ,但近年来出现复合菌型的发展新趋势。我们在微生物菌种分离、筛选及培养条件等研究基础上 ,进行和完成了以需氧蜡状芽孢杆菌为主的饲用复合微生物添加剂(试产品暂定名“利生 931”)的研制 ,获得了合格产品 ,现将其工业试生产工艺报告于后。

1 材料与方 法

1.1 工业试生产工艺

1.1.1 菌种

蜡状芽孢杆菌 SB-15(*Bacillus cereus* SB-15)是肥沃黑土分离和筛选的高吸氧活性菌株。乳酸杆菌 Lb-10(*Lactobacillus sp.* Lb-10)是畜禽粪便分离和筛选的高产酸菌株。

1.1.2 培养基

蜡状芽孢杆菌菌株 SB-15 种子菌采用普通营养琼脂(1 级)及我们筛选的 1 号培养液(2 级) ,发酵采用 1 号培养液。

乳酸杆菌菌株 Lb-10 种子菌采用脱脂牛乳 ,发酵用筛选的ⅢS 培养液。

1.1.3 发酵工艺

发酵工艺流程 :保存菌种→种子菌→发酵罐培养→放罐、浓缩→干燥、粉细→填充剂→组合→成品。

收稿日期 :2003-06-30

作者简介 :任守让(1925-) ,男 ,山西省太原市人 ,吉林省农业科学院研究员 ,主要从事农业微生物资源利用研究。

* 参加研究工作的还有王瑞霞和隗晓薇 ,在此致谢 !

发酵条件:300 L 发酵罐,罐温 $(38\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 。

1.2 试生产菌剂质量检测

活菌计数用稀释平板法,水分含量用烘干法,细度经过标准筛(80 目)。

1.3 安全性检验

直观试验:雏鸡饲喂观察,设对照比较。

毒理学检验:委托中国人民解放军军需大学军事兽医研究所(国家农业部指定国家级检验单位)进行,按农业部颁发的《新兽药一般毒性试验技术要求》,以 Wistar 大鼠为试验动物进行急性和亚慢性毒性试验。

2 结果与讨论

经微生物深层发酵及后处理调制工艺,生产出优质饲用活菌添加剂。实践证明,所采用的工业生产工艺是可行的。

2.1 试生产菌剂的特征

2.1.1 发酵状况

在发酵罐培养过程中,着重研究了 SB-15 菌株在 300 L 发酵罐中的发酵状况,结果见表 1。

结果表明,SB-15 菌株在 300 L 罐的发酵条件下,生长发育良好,平均发酵周期 51 h,发酵液平均菌数 20.1 亿/mL,平均芽孢形成率 91.1%,该菌株的发酵状况正常、稳定。工业生产性能良好。

2.1.2 试生产菌剂的质量

对制成的菌剂进行了质量检查,活菌数是产品质量的首要技术指标。用稀释平板法测定供试样品中的活菌数。同时以烘干法测定水分含量。结果见表 2。

从表 2 测试结果可见,在试生产菌剂中的活菌数,需氧蜡状芽孢杆菌平均为 $5.8\times 10^8/\text{g}$,厌氧的乳酸杆菌平均为 $22\times 10^8/\text{g}$,水分 9.2%,细度 80 目。符合国家有关主管部门颁布的《微生态制剂的制造、检验暂行规定(大纲)》要求的活菌数在 $5\times 10^8/\text{g}$ 以上,水分不超过 10%和细度 80 目的标准。

2.1.3 试生产菌剂的保存期

菌剂制成后,分别保存在室温及冰箱内($4\sim 6^{\circ}\text{C}$),分不同时期取样监测,测定菌剂主体菌 SB-15 菌株的活菌数变化,计算存活率(表 3)。

由表 3 结果可见,存活率在冰箱低温条件保存下,3 个月内无变化,6 个月和 12

表 1 SB-15 菌株在 300 L 罐中发酵状况

批次数	周期(h)	菌数($\times 10^8/\text{mL}$)	芽孢(%)
1	53	13.9	89.5
2	49	23.6	92.8
3	51	22.8	91.0
平均	51	20.1	91.1

注:每批样品 3 次重复平均值(下表同)。

表 2 试生产菌剂质量测试结果

样品	活菌数($\times 10^8/\text{g}$)		水分(%)
	SB-15	Lb-10	
1	5.5	20.2	9.3
2	6.4	23.0	9.1
3	5.2	49.5	9.4
4	6.0	26.1	9.0
5	6.1	21.3	9.2
平均	5.8	22.0	9.2

注:细度 80 目。

表 3 蜡状芽孢杆菌 SB-15 保存期存活状况

保存条件	SB-15 菌存活状况			
	开始	3 个月	6 个月	12 个月
冰箱($4\sim 6^{\circ}\text{C}$)	6.0/100	6.0/100	5.7/95	5.4/90
室温	6.0/100	5.8/97	5.3/88	5.0/83

注:存活数($\times 10^8/\text{g}$)/存活率(%)

个月分别下降到 95%和 90% ; 在室温下 ,3 个月无太大变化 ,6 个月和 12 个月分别为 88%和 83% ,室温保存较冰箱保存的存活率变化较大 ,但 1 年内 SB-15 的活菌数仍保持 5 亿/g 水平。据此 ,本菌剂保存期可暂定为 1 年。其后活菌数变化如何有待进一步监测。

2.1.4 试生产菌剂的安全性

直观试验 :采用 5~10 d 雏鸡 ,饲料中拌入本试生产菌剂 1 g/只·d ,连续饲养 10 d ,与对照比较 ,雏鸡未见异常和死亡。

毒理学检验 :中国人民解放军军需大学军事兽医研究所的毒性试验结果表明 ,本试生产菌剂对动物不表现任何毒性作用 ,是一种安全的饲用微生物添加剂。具体试验结果如下 :

急性毒性试验 :应用 100 亿菌/g 的“利生 931 ”饲用微生物添加剂给大白鼠灌胃 ,其 LD50 大于 12.0 g/kg 体重 ,无任何毒性反应。

亚慢性毒性试验 :①饲喂不同剂量“利生 931 ”饲用微生物添加剂的大白鼠 ,在 30 d、60 d 平均增重明显高于对照组 ,并能提高利用率 ,60 d 以后各组体重增长减缓 ;②不同时期采血 ,测得各组的红细胞、血红蛋白、白细胞及其分类计数均与对照组相近 ;③取 30 d、60 d 和 90 d 大白鼠血清进行总蛋白、白蛋白、尿素氮、碱性磷酸酶、谷丙转氨酶和谷草转氨含量测定 ,各剂量组均与对照组无明显差异 ;④各组大白鼠心、肝、脾、肾的脏/体比值接近 ,并与对照组无明显差异 ;⑤各组动物尸检和病理学检查未见明显异常改变。

3 结 语

采用 300 L 罐发酵和菌剂组合调制技术的配套工业生产工艺 ,完成饲用复合微生物添加剂的批量生产是可行的。

试生产菌剂的平均活菌数蜡状芽孢杆菌为 5.8 亿/g(>5 亿) ,乳酸杆菌为 22 亿/g ,水分 9.2%(<10%) ,细度 80 目 ,保存期 1 年。符合国内暂行规定的质量标准。

本试生产菌剂经国家指定部门安全毒理学检验认定 ,无毒性反应 ,是一种安全、无污染和无公害的有效生物制剂。

参考文献 :

[1] 吴锦圆 . 益生菌及其研究与应用[J] . 饲料工业 ,1990 ,(1) :22-24 .
 [2] 康 白 . 促菌生的研究总结报告[J] . 大连医学院学报 ,1984 ,(6) :1-10 .
 [3] 薛恒平 ,等 . 用微生物疗法防治幼畜离腹泻和提高增重的试验[J] . 中国微生物学杂志 ,1989 ,(1) :99-100 .
 [4] Sogarrd, H. Microbials for feed: Beyond bacteria lactic acid bacteria. Feed international. 1990, Vol.11, No.4: 22-27.
 [5] Aimutis, W R. Production of direct-fed microbials and silage inoculant-Judging microbials. Feed management. 1991. 42: 25-32 .
 [6] 薛恒平 . 复合菌剂饲养仔鸡试验[J] . 中国饲料 ,1992 ,(3) :28-29 .
 [7] 任守让 ,等 . 饲用复合微生态制剂研究(I) [J] . 吉林农业科学 ,1998 ,(23) :78-80 .
 [8] 任守让 ,等 . 饲用复合微生态制剂研究(II) [J] . 吉林农业科学 ,1999 ,(24) :48-49 .



(上接第 43 页)

[45] 徐阳春 ,沈其荣 ,冉 炜 . 长期免耕与施用有机肥对土壤微生物生物量碳、氮、磷的影响[J] . 土壤学报 ,2002 ,(39) :89-96 .
 [46] Lathbridge G. Davidson M S. Microbial biomass as a source of nitrogen for cereal[J]. Soil Biol. Biochem, 1983, (15).
 [47] Zagal E E. Persson J. Immobilization and remineralization of nitrogen addition[J]. Soil Biol. Biochem, 1994, (26).
 [48] Montagnini F. & R. Buschbacher. Nitrogen transformations following tropical forests and three slash-and-burn sites of the Venezuelan Amazon[J]. Biotropica, 1989, 21: 9-14.
 [49] 王其兵 ,等 . 气候变化对草甸草原土壤氮素矿化作用影响的实验研究[J] . 植物生态学报 ,2000 ,(24) .