

饲用复合生态制剂的研究

I. 需氧芽孢杆菌的分离与鉴定

任守让 王瑞霞 隗晓薇 马西艺

(吉林省农科院,公主岭 136100)

提 要 本文报道了饲用复合生态制剂中主要微生物菌种的分离、筛选与鉴定研究结果。从不同生态区土壤样品分离和筛选获得一株吸氧力强的需氧芽孢杆菌菌株 SB-15,经细菌学分类鉴定,该菌株属蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)。DNA中(G+C)mol%为34.4%,表现SOD酶活性。

关键词 微生态制剂;需氧芽孢杆菌;SB-15;分类鉴定;蜡状芽孢杆菌

目前,世界各国对饲料添加剂的研究与应用十分重视,在饲料工业竞争中视为提高品质的关键。在我国饲料工业中,添加剂的开发应用尚属薄弱环节,添加剂的类型、品种、功能、质量等方面与国外先进国家及国内生产需要都存在差距。因此,多途径、多层次、多品种开发研究和利用添加剂资源,提高我国饲料工业生产水平和饲料品质及效益,对发展畜禽饲养业有着极其重要的意义。

抗菌素作为饲料添加剂,在畜禽防疫方面,虽起到积极的作用,但近10多年来,由于科学水平的提高,国外饲料业和饲养业中很多人反对用抗菌素做饲料添加剂,这是因为抗菌素在预防性应用时,其化学残留污染肉、蛋、奶;另外,抗菌素会抑制和杀死动物肠道内的有益菌群,造成肠道正常菌群生态失调,导致疫病的发生,同时,畜禽生产中广泛使用抗菌素防疫和促生长已导致耐抗菌素病原菌系和突变体细菌的产生,出现二重感染,有碍于人畜健康。有鉴于此,国内外研究者对研究开发微生态制剂或称活菌制剂或称“益生菌”(Probiotics)用于畜禽养殖日趋关注。英、美、德、日本、前苏联、瑞典、匈牙利和韩国等国均有研究,应用效果明显。

动物肠道正常菌群的生态平衡,对消化和免疫功能至关重要,一旦其平衡失调,则会导致消化和免疫功能下降,影响生长发育,根据微生物生态平衡及菌群调整原理,研究的微生物活菌制剂可扶持肠道正常菌群中优势成员厌氧菌,恢复生态平衡,提高宿主的定植抗力(Colonization Resistance)和免疫力,既可防治畜禽腹泻、痢疾等肠道疾病,又有利于生产。国内外研制活菌制剂应用的微生物主要为乳酸杆菌类和需氧芽孢杆菌类,但目前国外发展趋势是复合制剂,在这方面国内尚少报道。我们的研究目标在于开发以需氧芽孢杆菌为主,包含乳酸菌的纯天然新型复合微生物活菌制剂。本文报道需氧芽孢杆菌的分离、筛选和鉴定。

1 材料与方 法

1.1 样品来源

从吉林省不同生态区及黑龙江三江平原沼泽区采集多种类型土壤(黑土、白浆土、山地棕壤、淡栗钙土、盐碱土、泥炭等)样品 58 份进行分离。

1.2 培养基

采用高盐普通营养培养基。

1.3 分离方法

根据需氧芽孢杆菌的芽孢耐热特点,用加热选择培养法和稀释平板法分离,观察菌落形态及涂片染色镜检。经多次筛选,选出耐热、耐高盐的菌株,进行各项测试和鉴定。

1.4 吸氧力试验

用生物厌氧法测定。以厌氧乳酸菌为指示菌同皿对应培养,另设乳酸菌琼脂平板单独培养的为对照,适温定时培养,观察乳酸菌的生长情况。

1.5 菌种生物学特征鉴定

根据 Bergey's manual of systematic Bacteriology 进行鉴定。

1.6 细菌 DNA 中碱基含量(G + C)mol%测定

用热变性温度法(T_m)。

1.7 超氧化的歧化酶(SOD)检测

用 NBT 法测定 SOD 活性(U/mL)。

2 结果与讨论

2.1 菌种的分离与筛选

由各地采集的 58 份土样样品中分离获得需氧芽孢杆菌 103 株。通过耐盐性和吸氧力的反复试验,筛选出耐高盐和吸氧力强的优良菌株 SB-15,该菌株的吸氧力和耐盐性见表 1、表 2。

表 1 需氧芽孢杆菌耐盐性比较

NaCl (%)	菌 株					
	SB-3	SB-10	SB-16	SB-20	SB-32	SB-15
5	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+
7	-	-	-	-	±	+
10	-	-	-	-	-	±

+ 生长, - 不生长, ± 生长不良

表 2 不同需氧菌种对厌氧菌生长作用比较

需 氧 菌	厌氧菌(乳酸杆菌)	
	菌株 I	菌株 II
SB-15 杆菌	+++	+++
SB-32 杆菌	++	+++
枯草杆菌	++	+++
大肠杆菌	+	+

+++ 生长良好, ++ 生长中等, + 生长不良

从表 1 结果可见,在被测菌株中 SB-15 对高盐的耐受性最大,在氯化钠为 7% 的高浓度下仍可正常生长。

吸氧试验结果表明,需氧芽孢杆菌 SB-15 是一株氧吸收力强的菌株,能促进厌氧菌的生长,乳酸杆菌与其同皿对应培养,生长表现明显优于其他需氧菌,尤其优于大肠杆菌。氧吸收力是我们筛选需氧芽孢杆菌菌种的主攻目标。因可通过其吸氧作用而降低肠道氧化还原电位,促进肠道正常菌群中在种类上和数量上占绝对优势的厌氧菌生长繁殖,达到保持和调整肠道菌群的生态平衡和失调的作用,以防病、治病。

2.2 菌种的生物学特征和鉴定

在菌种筛选的基础上,对吸氧力强的菌株 SB-15 进行了各项特征测试和分类鉴定。SB-15 菌株的主要生物学特征如下:

2.2.1 形态与染色特征

Gram 染色阳性,菌体杆状,大小为 $1.0 \sim 1.1 \mu\text{m} \times 2.5 \sim 4.0 \mu\text{m}$, 单个或短链排列,芽孢呈椭圆形,近中生不膨大,胞内有聚 β -羟基丁酸盐(PHB)颗粒积累,无荚膜,有鞭毛。

2.2.2 培养特征

普通培养基上生长,需氧培养良好,在厌氧条件下生长不良。普通琼脂平板培养,在 37°C 下 24 h 菌落扁平,边沿不整齐,呈灰白色。肉汤培养均匀混浊,有较薄菌膜,有少许沉淀。最适生长温度为 $30 \sim 37^\circ\text{C}$,最适 pH 为 $7.0 \sim 7.2$ 。

2.2.3 生理生化特征

接触酶和氧化酶皆阳性,对葡萄糖产酸,对阿拉伯糖、木糖和甘露醇不产酸,水解淀粉,分解酪朊,还原硝酸盐,卵磷脂酶阳性,V-P 反应和 M、R 反应皆阳性,利用柠檬酸盐和丙酸盐。

2.2.4 分子遗传型特征

细菌 DNA(G+C)mol% 为 34.4(Tm)。根据各项鉴定特征测试结果,需氧芽孢杆菌 SB-15 菌株,符合蜡状芽孢杆菌特征,1994 年送交中国科学院微生物研究所,经鉴定确认是蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)。

饲用微生态制剂的质量和效果,主要取决于微生物菌种的可用性能,因而在微生物菌种的筛选方面,世界各国十分注意,都在寻找自己的高质量菌源。目前,饲用微生态制剂选用的需氧芽孢杆菌有枯草芽孢杆菌(*Bac. subtilis*)、地衣芽孢杆菌(*Bac. licheniformis*)、Toyi 杆菌(*Bac. Toyi*)及蜡状芽孢杆菌(*Bac. cereus*)等,而我国研究开发的饲用微生物制剂,如促菌生、调痢生、DM 423 以及本项研究均选用的是蜡状芽孢杆菌,因其具有吸氧力强的特点,为动物肠道内的正常厌氧菌群繁殖提供有益条件。

饲用微生态制剂的现有微生物菌种,均来源于自然的野生菌株,今后尚有待于发展微生物基因生物技术,构造高质量工程菌。

2.2.5 超氧化物歧化酶(SOD)活性

测定结果表明,SB-15 菌株产生 SOD,其发酵液酶活性为 42.3U/mL 。SOD 是保护生物细胞最重要的酶之一,具有提高机体抗性和促进生长发育,延缓衰老等重要生理功能,外源 SOD 可促进机体酶活性的提高,为此,引起国内外动、植物营养学家的关注。

3 结 语

由 58 份不同类型土壤样品分离获得的 103 株需氧芽孢杆菌,经筛选获得一株吸氧力强和耐受高盐的菌种,编号 SB-15,经分类鉴定为蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)。该菌表现淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶及 SOD 等生理生化活性。

参 考 文 献

- 1 康 白. 促菌生的研究总结报告. 大连医学院学报, 1984, 6(1): 1~16
- 2 康 白主编. 微生物学. 大连: 大连出版社, 1988, 114~131
- 3 吴锦圃. 维生素及其研究与应用. 饲料工业, 1990, 11: 22~24
- 4 计平生等. 增产菌作用机理研究与进展. 中国微生态学杂志, 1992, 4(1): 24~28
- 5 林万明主编. 细菌分子遗传学分类鉴定法. 上海: 上海科技出版社, 1990, 84~100
- 6 Fuller R. Probiotics in Man and Animals. J. Appl. Bacteriol, 1989, (6): 365~378
- 7 Krieg N R, et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1986, Vol. 2, 1105~1138

(责任编辑:任 禾)