

饲用复合微生态制剂的研究

II. 乳酸菌的分离与鉴定

任守让 王瑞霞 隗晓微 马西艺

(吉林省农业科学院, 公主岭 136100)

提 要 从健康畜禽粪便分离、筛选出 1 株乳酸菌(Lb-10);根据 Bergey's 手册,经细菌学分类鉴定为乳酸杆菌(*Lactobacillus sp.*)。该菌株产酸量高达 1.2%。

关键词 微生态制剂;Lb-10;鉴定;乳酸杆菌属

近年来,由于微生物学研究方法和技术的不断改进,尤其是严格的厌氧培养方法的建立和采用已证实,人或动物肠道正常菌群中优势菌群是专性厌氧菌,它几乎占有所有被分离菌株的 99% 以上,是厌氧乳酸杆菌优势菌群主要成员之一。它与肠道菌群其他成员之间的数量比例,影响肠道菌群的生态平衡,数量一旦减少,平衡破坏,有害病原菌乘机增殖。因此,国内外从动物肠道正常菌群中分离产酸的乳酸菌类有益菌,作为活菌饲料添加剂,保持肠道菌群间的有益平衡,达到防病治病,促进畜禽生长发育,提高生产性能的目的。

我们为了将厌氧乳酸杆菌用于新型复合微生物活菌饲料添加剂的构成菌种之一,进行了乳酸杆菌菌种的分离、筛选与鉴定。

1 材料与方 法

1.1 样品来源

由公主岭地区畜禽养殖场、户采集的健康雏鸡、仔猪、家兔等粪便和牛乳、泡菜水等 25 份样品中分离乳酸杆菌。

1.2 培养基

YG 液体培养基,加富培养用。改良 MRS 固体培养基,菌种分离培养用。

1.3 菌种分离方法

根据样品类型,采用两种方法。酸奶和泡菜水用细玻璃管法,琼脂用深层培养后分离纯化法。畜禽粪便样品,则先行加富培养,然后用稀释平板法在厌氧条件下(化学除氧法)培养,选择溶解碳水钙而呈透明圈的菌落,按常规方法进行单菌落分离、纯化,获得纯菌。

1.4 产酸试验

脱脂奶培养用 0.1 mol/L NaOH 滴定,计算其产酸量(%)。

1.5 菌种生物学特性鉴定

根据[2,3]方法鉴定。

1.6 培养基试验

5 种不同培养基液体深层培养, 37°C、48 h。用稀释平板法厌氧培养, 测定并计算活菌数量。

2 结果与讨论

2.1 乳酸菌菌种分离与筛选

菌种由 25 份样品中分离获得乳酸菌 34 株, 经脱脂奶培养产酸试验, 筛选出总酸量较高和产酸较快的菌株 3 株, 结果见表 1。

产酸试验结果表明, Lb-10 菌株的产酸量和产酸速度最高, 产酸量为 1.2%, 产酸速度(牛奶凝固时间)为 5 h, 试验证明乳酸菌的产酸水平, 取决于菌株本身的特性。

2.2 Lb-10 菌株的生物学特性和鉴定

对筛选出的产酸量高和产酸快的乳酸杆菌 Lb-10 菌株进行了分类鉴定。

其主要生物学特性如下: Gram 染色阳性, 菌体杆状, 大小为 (0.7~0.8 × 2.5~6.0) μm, 单个, 成对或短链, 无芽胞、无鞭毛, 不运动, 小菌落, 圆形, 直径 1.0 mm 左右, 边沿整齐光滑, 呈淡乳白色, 液体培养混浊生长; 兼性厌氧, 生长最适温度 37~42°C, 最适 pH 5.5~6.2, 接触酶阳性, 不液化明胶, 不还原硝酸盐, 不产生吲哚、硫化氢, 不分解尿素, MR 反应阳性, VP 反应阳性, 利用柠檬酸盐、葡萄糖、蔗糖和乳糖发酵产酸。

根据《Bergey's 系统细菌学》, 上述各项试验结果符合乳酸杆菌属特征。故 Lb-10 菌株可定为乳酸杆菌 (*Lactobacillus sp.*)。

目前, 作为饲用微生态制剂的乳酸菌有嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*)、乳酪乳杆菌 (*L. casei*)、植物乳杆菌 (*L. plantarum*)、唾液乳杆菌 (*L. salivarius*) 和短小乳杆菌 (*L. brevis*) 等, 但主要为嗜酸乳杆菌。因该细菌分布广泛, 共栖于哺乳动物的消化道, 在肠内分解糖类生成乳酸, 使肠道 pH 值降低, 从而抑制致病菌的繁殖, 防止消化道疾病的发生。

2.3 不同培养基对乳酸杆菌的生长

经 5 种不同培养基液体深层培养试验, 乳酸杆菌 Lb-10 菌株的生长情况见表 2。乳酸菌在自然界中分布虽然广泛, 但较难培养, 因其生活营养要求严格复杂, 尤其重要的是对于维生素和氨基酸及有关生长素的需求, 由于乳酸菌体内酶系统构成单纯, 不能自身合成。因此, 为了乳酸菌很好的生长和发酵, 在培养基中必须增添必需的营养素。本试验中的培养基 III S 的组份较好地满足了乳酸菌的营养需求, 生长较好。5 种培养基比较, I M 及 III S 菌数较其他培养基高, 均在 10×10^8 /mL 以上, 但 IM 配方组份复杂, 而 III S 配方组份简单, 成本低, 适宜于工业采用。

表 1 不同乳酸菌菌株产酸比较

菌株	产酸量* (%)	产酸速度** (h)	来源
Lb-10	1.2	5.0	本研究分离
Lb-14	0.7	5.5	本研究分离
Lb-21	0.9	7.0	本研究分离
AS1 482(对照)	0.9	6.5	微生物所

* 3 次平均值, ** 牛乳凝固时间

表 2 不同培养基对乳酸杆菌 Lb-10 菌株的生长

培养基编号	pH	菌数 (1×10^8 /mL) *
I M	6.0	10.3
II Y	6.0	9.8
III S	6.0	10.2
IV P	6.0	8.2
V W	6.0	6.6

* 3 次测定平均值

(下转第 56 页)

中、短枝迅速增加,全株枝量可达 300~400 个,第四五年可达 600~700 个,第五六年可达 1 200 个以上,每公顷枝量可达 105~120 万个,10~12 年可达 150 万个以上。为了稳定树势,修剪后保持在 90~105 万个即可。

②枝类比:中、短枝占 85%~90%,长枝占 10%~15%。由于幼树长势旺,长枝较多,通过拉枝促进多形成中、短枝。

③叶面积系数:4 年生乔砧密植拉枝苹果梨,叶面积系数为 1.1,5 年生时为 1.7,6 年生时为 2.8,7 年生以后要稳定在 3~4。叶面积系数过大,寄生叶过多,往往会引起反作用。

④花芽百分率:苹果梨虽然自花不孕,但经过采取人工辅助授粉等措施,花序坐果率还是较高的。乔砧密植拉枝只要有 15%左右花芽即可达到 22 500~30 000 kg/hm² 的产量指标。在该区栽植苹果梨,花芽往往发生冻害,每遇到低温年,花芽受冻率可达 30%~50%,为使受害不减产,所以每年花芽量要保持在 20%~30%以上。

⑤单株负荷量:试验树从第 6~10 年,年平均株产果为 37.5 kg,平均单果重 160 g 左右。单株产量超过 45 kg 时,一般情况下果小,当年形成花芽少,第二年产量下降,易产生大小年。单株负荷量以株产 35~45 kg 为宜。

⑥枝果比、叶果比:乔砧密植苹果梨在公顷栽 1 110 株密度下,进入结果期后,枝果比为 6:1,叶果比为 36:1。进入盛果期叶果比为 30:1,枝果比为 4~5:1。

2.6 乔砧密植苹果梨树的寿命预测

有人认为密植拉枝早期结果,早期丰产会导致树体早衰。经多年试验和实践证明,1971 年定植的苹果梨,采用 3 m×3 m、3 m×4 m 的株行距,公顷栽 825~1 110 株,现已生长结果近 30 年,除了部分树由于腐烂病重而被淘汰外,尚有 85%的树存在。年公顷产仍在 15 000~22 500 kg 以上,平均株产 40 kg 左右。所以按原设计乔砧密植定植后经济年限 25~30 年是可行的。

2.7 乔砧密植苹果梨经济效益分析

经多年试验和生产实践证明,密植拉枝苹果梨,3 年见花,4 年见果,6 年生平均株产 27.02 kg,公顷产 30 000 kg,定植后 10 年累计产量 202 500 kg,是大冠稀植(公顷栽 240 株),公顷产 22 590 kg 的 8 倍。20 年生累计产量约 457 500 kg,是大冠稀植产量的 2~3 倍。

目前,该地区密植苹果梨占新栽植苹果梨总面积的 90%以上。(责任编辑:任 禾)

(上接第 49 页)

3 结 语

从健康畜禽粪便等采集的 25 份样品中,分离获得乳酸菌 34 株,筛选出产酸量高、产酸快的菌株 Lb-10,产酸量为 1.2%。经分类鉴定为乳酸杆菌属(*Lactobacillus sp.*)。

培养基 III S 为培养乳酸杆菌 Lb-10 菌株的最佳培养基,可供工业生产采用。

参 考 文 献

- 1 薛恒平,等.用微生态疗法防治幼畜幼禽腹泻和提高增加的试验.中国微生态学杂志,1989,1(1):99~102
- 2 王大.细菌分类基础.北京:科学出版社,1977.126~160
- 3 Krieg N R, et al. Bergey's manual of systematic Bacteriology (Vol. 1) 1984 Williams and Wilkins Baltimore /London

(责任编辑:任 禾)