

饲用微生物制剂菌种的分离及毒性研究^{*}

张克强 张俊亭 沈 跃 李治祥

(农业部环境保护科研监测所, 天津 $z\tau\alpha\alpha Zr$)

摘 要 叙述了从乳猪新鲜粪便中分离菌种的方法及结果; 并对获得菌株进行了耐受性及毒性试验, 最终筛选出了 A 株芽孢杆菌和 y 株乳酸菌, 可供制作生态制剂菌种使用。

关键词 生态制剂 菌种 毒性试验

饲用微生物制剂是作为饲料添加剂使用, 在动物体内产生有益作用的, 具有生活力的微生物制剂, 使用的目的是维持动物肠道内微生物的良好平衡, 提高饲料利用率, 防治动物疾病, 最终提高动物的生产力。世界上已有许多国家大量使用微生物制剂, 日本每年益生素用量在 $x\tau\alpha\alpha\upsilon^8$ 以上。在我国, 目前尚处于研制和应用的起步阶段, 国内现已问世的生态制剂也已有若干种。微生物制剂在推广应用方面的主要问题是产品加工处理后稳定性差, 细菌易失活, 功效降低。所以生产优良制剂的重要途径是获得对动物消化道适应性强, 同时能经受制剂加工过程中不利条件的菌种。为此, 我们进行了生态制剂菌种选育工作, 经过两年的努力, 取得了较为满意的结果。

x 菌种的分离

$x\iota\alpha$ 培养基

牛肉膏蛋白胨培养基 $o\partial O$) H 牛肉膏 xw υ , 蛋白胨 $xw\upsilon$, $\partial\xi\iota\iota\ B\upsilon$, 水 $x\tau\alpha\alpha\upsilon\ 1\ \partial$, $4\ \Phi\Delta\iota y$ 。

乳酸菌培养基 H 酵母膏 $\Delta\iota B\upsilon$, 葡萄糖 xw υ , 蛋白胨 $\Delta\iota B\upsilon$, $\Omega\Phi_y\phi\phi_A y\upsilon$, 西红柿汁 $x\tau\alpha\upsilon\ 1\ \partial$, $\alpha\ 1\ \sigma\sigma^2\ E\kappa\tau\upsilon\iota B\ 1\ \partial$, 水 $Z\iota\alpha\upsilon\ 1\ \partial$, $4\ \Phi\Delta\iota\upsilon$ 。

芽孢杆菌发酵用培养基 H 豆粉 $y\%$, 玉米

粉 $x\iota B\%$, 酵母粉 $w\iota B\%$, 鱼粉 $w\iota B\%$, 碳酸钙 $w\mu\mu\chi\%$, 水 $x\tau\alpha\alpha\upsilon\ 1\ \partial$, $4\ \Phi\Delta\iota E$ 。

$x\iota y$ 菌种来源

$x\iota y\iota\alpha$ 芽孢杆菌 采取 A 日龄健康乳猪的新鲜粪便用 ∂O 培养液进行预培养 $yA\phi$, 置 $\Delta B\sim E\upsilon\ ^\circ C$ 水浴中热处理 $xw\ 1\ \chi^2$, 通过稀释平板法, 选取表面湿润、蜡质状、边缘不整齐的典型菌落, 重新划线置 $zy\ ^\circ C$ 培养 $yA\phi$, 进行革兰氏染色, 选取 Υ^+ 菌株, 再用直接染色法检查是否有芽孢, 将产生芽孢的细菌再纯化培养, 转接斜面备用。从 Γ 头猪的粪便中共分离到 yw 株菌株。

$x\iota y\iota y$ 乳酸菌 B 株菌株是作者保存的菌株, 经复壮后使用。

$x\iota\kappa$ 细菌的扩大培养

芽孢杆菌采用芽孢杆菌发酵用培养基 s 乳酸菌采用乳酸菌培养基。第一步, 将上述 yB 株菌株分别接一环于内盛 $yw\ 1\ \partial$ 培养液的 $yB\upsilon\ 1\ \partial$ 三角烧瓶内, 进行摇床发酵, $zw\ ^\circ C$ 下培养 $yA\phi$ 取出; 第二步, 以 $B\%$ 接种量将培养好菌液接种于内盛 $x\tau\alpha\upsilon\ 1\ \partial$ 培养液的 $B\alpha\upsilon\ 1\ \partial$ 三角烧瓶中, $zw\ ^\circ C$ 摇床培养 $yA\phi$ 取出; 第三步, 将菌液浓缩 x 倍, 冷冻干燥后供耐受性及毒性试验使用。

^{*} 天津市 $y\chi$ 世纪青年基金资助项目内容之一
收稿日期 $HxZZE-\omega A-yB$

y 耐受性试验

微生物制剂要求所用菌对加工过程和动物体内所遇到的环境有一定的适应性和对不良条件有一定耐受性。为此,在菌种选择时,进行了耐受性选择试验。

y uα 抗酸性试验

一般动物胃内 Φ 值y uB~z uB,小肠段 Φ 约为B~Δ,近中性,所以消化道内基本上是酸性到中性的环境。细菌通过胃才能达到肠内作用部位,因而要求生态制剂所采用的细菌必须是耐酸性环境。抗酸试验采用ηχσφ₀-∂σσ₇₃₂法,其步骤为H挑取细菌细胞涂在载玻片上干燥固定,然后用ηχσφ₀石碳酸复红染色液染色,加热使有气泡冒出,再用水洗,干燥后,用z%的盐酸酒精脱色多次,用稀释B倍的∂öτρσ₆美兰液染色z w₇水洗干燥后镜检,染上红色的为抗酸性阳性。经检查发现新分离菌株中有x s z s A s Z s x w s x z s x B s x Γ s x Δ号共x w株菌株呈现阳性反应,乳酸菌是耐酸的,不再做耐受性试验。

y uγ 耐热性试验

一般颗粒饲料加工过程中温度常在E w℃以上。因而要求制剂所采用的细菌具有一定耐热性,抗御加工过程中的高温,保持必要性。故要进行耐热选择试验。针对上述x w株芽孢杆菌菌株和B株乳酸菌各取x v菌粉,用生理盐水配成x w v₁∂,加玻璃珠振摇x B₁χ₂。取若干支试管,每只试管中装入菌液x₁∂及生理盐水Z₁∂,分别置于B w℃处理x w₁χ₂,E w℃处理x₁χ₂,B₁χ₂及x w₁χ₂,取出试管迅速冷却至室温,稀释平板计数计算出活菌损失率∂对照活菌数-处理后活菌数v对照活菌数×x w v₀%,显然,芽孢杆菌的x s A s Z s x Δ号菌株及乳酸菌z s A号菌株耐热性较好o表x p。保留以上菌株继续进行研究。

y uε 耐贮存试验

试验菌株为芽孢杆菌x s A s Z s x Δ号,乳酸菌z ,A号共Γ个菌株。将其菌粉分别装入聚

表 x 不同温度处理对细菌生活力的影响
o 以活菌损失率%表示p

种类	编号	B w℃ x w ₁ χ ₂	E w℃		
			x ₁ χ ₂	B ₁ χ ₂	x w ₁ χ ₂
芽孢杆菌	x	w	w	w	-B
	z	w	w	-Z	-y w
	A	w	w	w	-B
	Z	w	w	w	-y
	x w	w	w	-x E	-A w
	x z	w	w	-x w	-y Δ
	x A	w	w	-y Γ	-A B
	x B	w	w	-x Δ	-z z
	x Γ	w	w	-y z	-y A
	x Δ	w	w	w	-Γ
乳酸菌	x	-x w	-B	-Δ w	-Z Γ
	y	-Z	-x w	-E w	-Z E
	z	-B	w	-A w	-E B
	A	-B	w	-B w	-Z w
	B	-y w	-x B	-E w	-Z Z

乙烯塑料袋内,密封。其中一半置于冰箱内(A℃),另一半室温下放置(房间内冬季无采暖设施)避光保存Δ个月。两种处理每月各取一包,做活菌计数。结果表明由x Z Z Δ年y月到E月的Δ个月内,前A个月,无论是存放冰箱内还是室温保存的菌剂,其活菌数均无明显变化。室温保存的A株芽孢杆菌经Δ、E两个月的高温季节后活菌率下降x w%左右;乳酸菌活菌数从Γ月份起开始下降,到试验结束下降Δ B%~E w%左右。然而,存放冰箱内的两类菌至试验结束,活菌数均无明显变化。总之,以上菌株,耐贮存性较好。

z 细菌的鉴定试验

两株乳酸菌分别是z号短乳杆菌($\partial \xi \pi ^ { 8 3 } 0 \xi \pi \rho ^ { 0 0 9 7 } s 0 6 \sigma ^ { 0 } \chi ^ { t }$)和A号嗜粪乳杆菌($\partial \xi \pi ^ { 8 3 } 0 \xi \pi \rho ^ { 0 0 9 7 } s \pi ^ { 3 4 6 3 4 } \varphi \chi ^ { 0 9 7 }$),有关芽孢杆菌的鉴定,根据《一般细菌常用鉴定方法》,选定表y中项目进行鉴定。

A 毒性试验

