

饲用微生物生态制剂及 生物活性饲料研究

» © 来航线 薛泉宏 著

中国农业科学技术出版社

饲用微生物生态制剂及 生物活性饲料研究

» © 来航线 薛泉宏 著

中国农业科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

饲用微生态制剂及生物活性饲料研究 / 来航线, 薛泉宏著. —北京:
中国农业科学技术出版社, 2017.12
ISBN 978-7-5116-3257-9

I. ①饲… II. ①来… ②薛… III. ①微生物—饲料—研究
②生物活性—饲料—研究 IV. ①S816

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2017) 第 228410 号

项目支撑

1. 国家“十二五”科技支撑计划：黄土高原农果牧复合循环技术集成与示范（2012BAD14B11）
2. 国家“十一五”科技支撑计划：农田循环高效生产模式关键技术与集成示范（2007BAD89B16）
3. 国家“十五”科技攻关计划奶业重大专项：西北农区（陕西）奶业现代化生产技术集成与产业化示范（2002BA518A17）

责任编辑 李冠桥

责任校对 贾海霞

出版者 中国农业科学技术出版社

北京市中关村南大街 12 号 邮编：100081

电话 (010) 82109705 (编辑室) (010) 82109702 (发行部)
(010) 82109709 (读者服务部)

传真 (010) 82106625

网址 <http://www.castp.cn>

经销者 各地新华书店

印刷者 北京建宏印刷有限公司

开本 880mm × 1 230mm 1/16

印张 24

字数 647 千字

版次 2017 年 12 月第 1 版 2017 年 12 月第 1 次印刷

定价 90.00 元

—— 版权所有 · 侵权必究 ——

《饲用微生物制剂及生物活性饲料研究》

著 者 名 单

主 著 来航线 薛泉宏

参著人员 （以姓氏笔画为序）

王国军	韦小敏	司美茹	刘壮壮	刘林丽	任雅萍
李巨秀	张文磊	李 肖	陈姣姣	李素俭	李海洋
汤 莉	肖 健	张高波	张艳群	来航线	辛健康
岳田利	杨保伟	杨雨鑫	贺克勇	封 晔	侯霞霞
高 印	郭志英	郭 俏	涂 璇	程 方	薛泉宏

前言

近年来,畜牧业生产面临许多重大问题,其中,饲料资源短缺已逐渐成为制约我国饲料行业及畜牧生产发展的瓶颈;饲料利用率低、饲用抗生素滥用、畜禽粪便不合理排放,以及畜禽养殖场集团化与集约化,导致畜禽养殖成本上升,疾病防控风险增加,环境污染加剧,食品安全压力增大。这些问题的出现使得安全、环保、高效的养殖理念逐步成为共识。而微生物发酵技术及其发酵产品,包括微生态制剂、酶制剂、活性物质添加剂以及微生物发酵饲料在维护畜禽肠道健康、改善畜舍环境、缓解不良应激、改善畜产品品质、提高饲料利用率、替代抗生素方面的优势,已在饲料生产及健康养殖上逐渐显现。因此,系统研究并在畜牧业生产中推广应用微生物发酵技术及其产品,对解决目前畜牧业生产中面临的诸多重大难题具有重要意义。

《饲用微生态制剂及生物活性饲料研究》约60万字,收录了51篇研究论文,较为系统的展示了西北农林科技大学资源环境学院微生物资源利用团队二十多年来在饲用微生态制剂、固态有机物微生物资源化及饲料化方面的研究成果。该文集的出版对这些成果在养殖业上的应用及深入研究具有重要的参考价值。

本文集按研究内容分为五部分:1. 饲用微生物筛选与鉴定。从好氧发酵剂、青贮厌氧发酵剂、微生态制剂和酶制剂生产用菌等方面对分离自不同生境的大量霉菌、酵母菌、乳酸菌和芽孢菌进行筛选,获得了一批具有良好饲用生产性能的菌株。如黑曲霉、烟曲霉、戊糖片球菌、植物乳杆菌、粪肠球菌、蜡样芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌,丰富了饲用微生物资源,该研究可为饲用微生态制剂和生物发酵饲料生产提供优良的菌株。2. 优良菌株的发酵特性。从水解酶活性、产酸能力、产氨基酸和提高饲料蛋白能力等方面对优良菌株的好氧发酵和青贮厌氧发酵效果进行了较为系统的研究,获得了多株具有重要应用价值和市场潜力的饲用真菌及细菌。3. 非粮饲料原料的微生物饲料化技术。探讨了以苹果渣、马铃薯渣及菌糠等非粮原料生产生物活性饲料时麸皮、玉米浆、油渣、尿素和硝酸铵等不同种类碳氮源对非粮原料生物发酵饲料中益生菌、水解酶、氨基酸、多肽、中性洗涤纤维和蛋白质等营养品质的影响,并研究了不同菌株协同发酵的效果,确立了以苹果渣、马铃薯渣及菌糠等非粮原料生产生物活性饲料的发酵配方。4. 微生态制剂及生物活性饲料发酵工艺研究。从微生态制剂制备、果渣青贮及生物活性饲料生产三个方面进行了pH、温度、时间和含水量等工艺参数优化,并建立了好氧+厌氧“两步发酵工艺”,为微生物发酵技术在饲料行业的应用提供了优化工艺。5. 发酵饲料营养价值及生物学效价评定。从动物生长和生产性能、肠道菌群、血液生理生化指标及疾病预防与治疗等方面,对生物活性蛋白饲料、微生态制剂进行了系统的营养效果和生防效果评价,所得结果可为微生物发酵产物在畜牧业中应用提供科学依据和指导。

本文集在编辑出版过程中,得到中国农业科学技术出版社的支持和帮助,同时资环学院李海洋博士在文集材料组织和修改中做了大量的工作;在相关研究中,先后得到了西北农林科技大学动物

科技学院姚军虎、咎林森、曹斌云教授和动物医学学院王晶钰、王高学教授的悉心指导，并得到陕西博秦生物科技有限公司杨博总经理的大力支持，在此一并表示感谢。

西北地区作为我国重要的苹果和马铃薯主产区，每年因深加工而产生 100 多万吨的苹果渣和 200 万吨的马铃薯渣，作为重要的非粮饲料资源并没有得到有效地利用，而且造成了严重的环境污染。同时西北地区养殖量大，特别是山羊、牛和骆驼等养殖特色突出，因此开发非粮饲料资源、提升饲料品质对西北地区养殖业快速发展具有重要的作用。课题组立足于西北地区独特的种植结构和养殖特色，多年来致力于生物活性饲料和微生态制剂研究，在菌种选育、非粮饲料开发、发酵工艺优化、发酵产品评价等方面做了系统的研究工作。作者希望通过本文集出版对已有工作进行总结，同时为相关专业的读者了解微生物发酵技术在养殖业中的应用提供我们课题组的研究成果和一家之言，为微生物发酵技术及产品在养殖业中的推广应用提供新思路及技术方案。

由于作者水平和经验有限，加之时间仓促，不足之处在所难免，恳请同行专家、学者和广大读者提出宝贵的意见。

著 者

2017 年 12 月

目 录

一、饲用微生物的筛选与鉴定

9 株芽孢杆菌的初步分离鉴定与拮抗性试验	2
两株蜡样芽孢杆菌的鉴定及液体培养基筛选	7
两株芽孢杆菌的鉴定	12
饲用芽孢杆菌的筛选鉴定及固态发酵培养基的优化	18
青贮用乳酸菌的筛选及其生物学特性研究	27
紫外线与亚硝酸诱变处理对青霉、烟曲霉纤维素酶活性的影响	38
高产纤维素酶菌株的筛选及诱变育种	46
青贮用乳酸菌的分离、筛选及鉴定	57
饲用优良乳酸菌鉴定及生物学特性研究	65
产复合酶优良菌株筛选及苹果渣固态发酵效果研究	75

二、优良菌株的发酵特性

3 株蜡样芽孢杆菌生理特性及 SOD 发酵条件的研究	86
一株野生酵母的 SOD 酶酶学特性的鉴定	90
不同菌株对苹果渣青贮饲料发酵效果的影响	94
2 种真菌纤维素酶系组分活性研究初报	101
多元混菌发酵对纤维素酶活性的影响	105
混合发酵对纤维素酶和淀粉酶活性的影响	112
菌种对苹果渣发酵饲料中蛋白酶活、纤维素酶活及总酚含量的影响	118
多菌种混合发酵马铃薯渣产蛋白饲料的研究	125
固态复合发酵剂用于苹果渣蛋白饲料发酵效果研究	134
混菌固态发酵对苹果渣不同氮素组分的影响	140
添加复合发酵剂对奶牛饲料纯蛋白质含量的影响	147
苹果渣青贮复合微生物添加剂配伍效果试验	152
苹果渣青贮最优乳酸菌菌株配伍筛选	158
微生物添加剂对苹果渣青贮效果的影响	168

三、非粮饲料原料的微生物饲料化技术

添加苹果渣对纤维素酶活性及蛋白质含量的影响..... 178

发酵剂及玉米浆对苹果渣发酵饲料氨基酸含量及种类的影响..... 183

氮素及原料配比对苹果渣发酵饲料纯蛋白质含量和氨基酸组成的影响..... 191

氮素及混菌发酵对苹果渣发酵饲料纯蛋白含量和氨基酸组成的影响..... 197

苹果渣发酵饲料活性物质含量及影响因素研究..... 202

马铃薯渣单细胞蛋白发酵饲料活性物质含量及影响因素研究..... 209

苹果渣发酵饲料中性洗涤纤维含量及影响因素研究..... 217

原料及发酵剂对苹果渣发酵饲料酵母菌活菌数及纯蛋白质含量的影响..... 224

发酵条件对苹果渣发酵饲料中 4 种水解酶活性的影响..... 230

马铃薯渣发酵饲料 4 种水解酶活性研究..... 240

高产纤维素酶菌株固态发酵产酶条件优化..... 249

四、微生物制剂及生物活性饲料发酵工艺研究

高产纤维素酶菌株的筛选及其产酶条件研究..... 257

不同预处理对苹果渣还原糖含量的影响..... 266

苹果渣生产菌体蛋白饲料发酵条件的研究..... 272

苹果渣生物活性饲料两步固态发酵工艺研究..... 276

鲜苹果渣蛋白饲料发酵工艺研究..... 282

蜡样芽孢杆菌的固态发酵工艺..... 288

蜡样芽孢杆菌的液体发酵工艺..... 295

优良芽孢杆菌的液态发酵..... 306

五、发酵饲料营养价值及生物学效价评定

复合微生物制剂对断奶仔猪和雏鸡喂养效果的研究..... 320

奶山羊饲喂苹果渣青贮饲料效果的研究..... 327

纤维素酶酶解麦草条件试验..... 331

苹果渣饲料的营养价值与加工利用..... 335

益生菌发酵苹果渣对仔猪表观消化率、血清免疫指标、肠道菌群与形态的影响..... 339

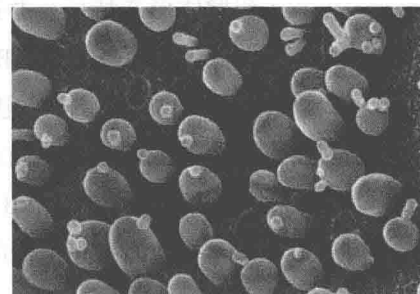
益生菌发酵苹果渣对断奶仔猪生长性能、血清生化指标和粪便微生物菌群的影响..... 349

动物饲喂苹果渣饲料试验..... 359

芽孢杆菌安全性试验及动物喂养试验..... 370

一

饲用微生物的筛选 与鉴定



9 株芽孢杆菌的初步分离鉴定与拮抗性试验

来航线, 杨保伟, 邱学礼, 薛泉宏

(西北农林科技大学资源环境学院, 陕西杨凌 712100)

摘要: 通过对采集样品中细菌的分离与纯化, 获得 9 株芽孢杆菌, 经纯化培养后观察其个体和群体形态特征, 并进行了 12 项生理生化特征鉴定。结果表明, B10 为地衣芽孢杆菌, B13 为巨大芽孢杆菌, B12、B14 为短小芽孢杆菌, B15 为苏芸金芽孢杆菌, B16 为蕈状芽孢杆菌, B11、B17、B18 为蜡样芽孢杆菌。通过对 8 株植物病原菌和 3 株动物病原菌的拮抗试验, 初步确定 B13、B16、B17、B18 的抗菌谱较广, 其中 B10、B15 对棉花枯萎菌, B13、B17 对辣椒疫霉菌, B11 对西瓜枯萎菌, B10、B17、B18 对 3 株动物病原菌有较好的拮抗能力。

关键词: 芽孢杆菌 (*Bacillus*); 分离鉴定; 拮抗试验

Isolation Identification and Antibiotic Experiment of Nine Strains of *Bacillus cereus*. B. C

LAI Hang-xian, YANY Bao-wei, QIU Xue-li, XUE Quan-hong

(College of Natural Resources and Environment , Northwest Sci - Tech University of Agriculture and Forestry , Yangling ,
Shaanxi 712100, China)

Abstract: Nine strains of *Bacillus cereus*. B. C were isolated from several samples and identification of the nine strains' characters of individual and integral morphology was made, and the identification is physiology and biochemistry experiments with *Bacillus cereus*. B. C classification standards. The results show: B10 was *Bac. licheniformis*, B13 was *Bacillus megaterium*, B12 and B14 were *Brevibacilli breris*. B. r. B15 was *Bacillus thuringiensis*, B. t, B 16 was *B. mycoides* Flugge, B11, B17 and B18 were *Bacilli cereus*. B. The results of antibiotic experiments indicated nine strains of *Bacillus cereus*. B. C had antibiosis to three strain animal pathogens and eight strain plant pathogens.

Key words: *Bacillus*; isolation and identification; antibiologic experiment

芽孢杆菌 (*Bacillus*) 是一类重要的微生物资源, 其富含蛋白酶、淀粉酶、脂酶等酶类以及其他

基金项目: 企业协作“新型生物饲料添加剂研制”项目。

通信作者: 来航线 (1964—), 男, 陕西礼泉人, 副教授, 在读博士, 主要从事农业微生物及微生物发酵等方面的教学和科研工作。

丰富的代谢产物,部分菌还可以分解土壤中的不溶性磷酸盐,与其他微生物一起在土壤中起着重要作用(林毅,1998)。在动物生产方面,蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*, B.C)微生态制剂已在养殖业上得到应用,芽孢杆菌可抑制肠道内有害菌的生长,减少宿主染病的机会,保证宿主的健康。另外,这种菌在生长过程中,还会产生一系列有益的代谢产物,可以刺激和促进宿主的生长。在植物生产方面,一些芽孢杆菌不仅有防病作用,而且有增产作用,可以改善植物根际环境,刺激和调控作物生长,抑制作物病害的发生。李建文(1999)研究发现,部分芽孢杆菌产生的代谢物对植物病原菌有抑制作用,如对棉花枯萎病、辣椒疫霉等孢子萌发以及动物病原菌白痢有强烈的抑制作用。根据这一发现,使得微生态制剂成为替代农药、抗生素等的有效途径之一。人类可以通过对微生态环境的调控来抑制有害微生物(病原菌),促进有益微生物作用,从而达到使宿主强壮的目的,并调控微生态环境的生态平衡朝着有利于宿主的方向发展(李建文,1999;刘建国,1999),同时,还可克服农药及抗生素的过多使用,减少环境污染。本试验对分离获得的9株芽孢杆菌进行了形态及生理生化特征分析,并进行了初步鉴定,同时对8株植物病原菌和3株动物病原菌进行了拮抗试验,初步确定了9株芽孢杆菌的抗病能力,以期为其进一步研究和应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

芽孢杆菌分离(*Bacillus* sp.)芽孢杆菌B10、B11、B12、B13和B14分离于饲料添加剂材料;B15分离于西北农林科技大学农作一站土壤;B16分离于西北农林科技大学养殖场粪肥中;B17、B18由本实验室保藏。病原菌(Pathogens)西瓜枯萎菌、黄瓜枯萎菌、辣椒疫霉和棉花枯萎菌由微生物组薛泉宏教授提供;啤酒酵母、米曲霉、葡萄球菌、大肠杆菌由西北农林科技大学资源环境学院菌种室提供;白痢1、白痢2及伤寒病菌由西北农林科技大学动物科技学院卫检实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 细菌的分离纯化及培养特征(程丽娟,2000)将分离的B10、B11、B12、B13、B14、B15、B16、B17和B18共9株菌,采用稀释平板法及划线法进行纯化,于28℃培养2d,于24h和48h分别进行革兰氏染色,并观察菌体形态及菌落特征。

1.2.2 生长条件试验(张纪忠,1998;陈天寿,1995)耐盐性试验(NaCl的质量浓度分别为20g/L、30g/L、40g/L、50g/L、57g/L、70g/L、80g/L)、耐酸碱试验(pH分别为4,5,5.7,8,9,10)和温度梯度试验(温度分别为40℃、45℃、50℃、55℃和60℃),分别参照文献(程丽娟,2000;张纪忠,1998)方法进行。

1.2.3 生理生化试验 M.R 试验、V.P 试验、淀粉水解试验、明胶水解试验、吲哚试验、H₂S 试验、硝酸还原试验、卵磷脂水解试验、碳源利用试验和氮源利用试验,分别参照文献(程丽娟,2000;张纪忠,1998;陈天寿,1995)方法进行。

1.2.4 拮抗试验 参照文献(程丽娟,2000),采用琼脂块法将9株待试菌接种于涂好病原菌的平板上,正放12h后再倒置培养2~3d,观察琼脂块周围病原菌的生长情况,并记录抑菌圈大小。

2 结果与分析

2.1 菌落及形态特征

9 株参试菌的菌落及形态特征见表 1。

表 1 9 株参试菌的菌落及形态特征

菌株	长 (μm) Length	宽 (μm) Width	G ⁺ /G ⁻	形状 Shape	表面光滑度 Surface	边缘形状 Edge	颜色 Color	透明度 Transparency
B10	2.0~5.0	1.0~1.5	+	圆形	光滑	整齐	乳白	不透明
B11	2.0~5.0	1.0~1.2	+	圆形	光滑	整齐	乳白	不透明
B12	2.5~5.0	1.0~1.4	+	不规则	粗糙	不整齐	乳白	不透明
B13	2.0~4.5	1.0~1.2	+	圆形	光滑	整齐	乳白	不透明
B14	2.0~4.5	1.0~1.2	+	圆形	粗糙	不整齐	无色	不透明
B15	2.0~5.0	1.0~1.2	+	圆形	粗糙	不整齐	乳白	不透明
B16	2.0~5.0	1.0~1.5	+	圆形	光滑	整齐	乳白	不透明
B17	2.5~4.0	1.0~1.4	+	圆形	光滑	整齐	乳白	不透明
B18	2.0~4.0	1.0~1.5	+	规则	光滑	整齐	无色	不透明

注：“+”表示革兰氏阳性

2.2 生长条件试验

采用细菌培养基，测定 9 株参试菌在不同 NaCl 浓度、不同温度、不同 pH 条件下的生长情况，结果见表 2。

表 2 9 株参试菌的生长条件试验

菌株	NaCl (g/L)							T (℃)					pH					
	20	30	40	50	57	70	80	40	45	50	55	60	4	5	5.7	8	9	10
B10	+	+	++	++	+++	++	+	++	++	+	+	-	-	++	++	++	+	-
B11	+	+	+	+	++	+	+	++	++	+	-	-	-	++	++	+	+	-
B12	++	++	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	++	++	+	+	+
B13	+++	+	+	+	-	-	-	++	+	-	-	-	+	++	++	+	+	+
B14	+++	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
B15	-	-	-	++	+	+	+	++	++	+	-	-	+	++	++	++	+	-
B16	+++	++	++	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	++	+	-	-
B17	++	++	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	++	++	+	-
B18	++	++	++	+	+	+	+	+	+	-	-	-		++	++	++	+	-

注：表中“-”表示不生长；“+”表示生长；“++”表示生长较好；“+++”表示生长好

由表 2 可以看出，9 株参试菌 28℃培养 2~3d 后，其生长情况表现为：B10 和 B11 的生长与盐浓度大小关系不明显；B12、B14、B16、B17 和 B18 是中强度耐盐菌株；B13 是弱性耐盐菌株；B10、B11、B16、B17 和 B18 均是不耐酸碱的菌株；B12、B13 和 B14 是耐碱性菌株；9 株参试菌均能在 40℃~45℃下良好生长，其中 B10、B11、B12 和 B15 菌株可耐温至 50℃。

2.3 生理生化特征

参照文献（陈天寿，1995）芽孢杆菌鉴定表中规定的相关测定项目，对参试的 9 株芽孢杆菌进行了 12 项生理生化特征鉴定，结果见表 3。

表 3 9 株参试菌的生理生化特征

特征 Character	B10	B11	B12	B13	B14	B15	B16	B17	B18
明胶水解 Gelatinhydrolysis	+	+	+	-	+	+	+	+	-
吡哞 Indole	+	+	-	+	-	-	+	+	+
H ₂ S	+	+	+	+	+	+	+	+	+
硝酸还原 Nitricacidreduction	+	+	+	+	-	+	+	+	+
卵磷脂水 Lecithinhydrolysis	-	+	-	+	-	+	+	+	+
M.R 试验	+	+	-	+	-	+	+	+	+
M.R experiment									
V.P 试验	+	+	+	-	+	+	+	-	+
V.P experiment									
V.P 中 pH	6.0~6.8	5.4~5.8	5.0~5.8	6.2~6.4	6.2~6.4	6.7	5.4~5.8	7	6.7~6.8
pH in V.P									
淀粉水解 Starch hydrolysate	+	+	-	+	-	+	+	+	+
水解圈（mm）	15	25		30	12	28	33	37	40
Diameter of drolyzation circle									
菌落（mm） Colony	8	15		16	5	18	14	14	22
阿拉伯糖 Arabinose	+	-	+	-	-	-	-	-	-
木糖 Xylose	+	-	-	-	-	-	-	-	-
葡萄糖 Glucose	+	+	+	+	-	+	+	+	+
果糖 Fructose	+	-	-	-	-	-	-	+	+
蔗糖 Sucrose	+	-	+	-	+	-	-	-	-
甘露醇 D-Mannose	+	-	+	+	-	-	+	-	-
酪氨酸 Tyrosine	-	-	-	-	-	-	-	-	-
酪素 Casein	+	+	+	+	+	+	+	+	+
马尿酸盐 Hippurate	+	+	-	-	-	+	-	+	-

注：表中“+”表示阳性或能够利用；“-”表示阴性或不能利用

分析表 1、表 3 试验结果，并参考文献（陈天寿，1995）芽孢杆菌鉴定表，可初步确定 B10 为地衣芽孢杆菌，其吻合率达 65%；B13 为巨大芽孢杆菌，吻合率达 70%；B12 和 B14 为短小芽孢杆菌，吻合率均达 65%；B15 为苏芸金芽孢杆菌，吻合率达 65%；B16 为蕈状芽孢杆菌，吻合率达 70%；B11、B17 和 B18 为蜡样芽孢杆菌，吻合率分别达 70%、80% 和 85%。

2.4 拮抗试验

利用微生态环境的调控来抑制有害微生物（病原菌），促进有益微生物生长，从而达到宿主健壮的目的，使调控微生态环境的生态平衡朝着有利于宿主的方向发展，是当今研究的重要方向。有研究发现，部分芽孢杆菌产生的代谢物对植物病原菌，如棉花枯萎病、辣椒疫霉等孢子萌发以及动

物病原菌白痢有强烈的抑制作用。用 9 株参试菌对 8 株植物病原菌和 3 株动物肠道病原菌进行了皿内拮抗试验，其结果见表 4。

表 4 9 株参试菌的拮抗试验结果

病原菌 Pathogens	B10	B11	B12	B13	B14	B15	B16	B17	B18
棉花枯萎病 <i>Fusarium oxysporum</i>	++	-	+	+	-	++	-	+	+
辣椒疫霉 <i>P.capsicil</i>	+	-	+	++	-	+	+	++	+
西瓜枯萎 <i>Fusarium oxysporum</i>	+	++	+	-	+	-	+	+	-
黄瓜枯萎 <i>Fusarium oxysporum</i>	-	-	-	+	-	-	+	-	+
啤酒酵母 <i>S.carlsbergensis</i>	-	-	-	+	+	-	+	+	-
米曲霉 <i>Aspergillus oryzae</i>	-	-	+	+	+	-	+	+	+
葡萄球菌 <i>Staphylococcus aures</i>	++	+	-	+	-	-	+	-	-
大肠杆菌 <i>E.coli</i>	+	+	-	+	++	+	+	++	++
白痢1 <i>Salmonella pullorum</i> 1	+	+	+	+	+	+	-	+	++
白痢2 <i>Salmonella pullorum</i> 2	+	-	-	+	+	+	++	+	++
伤寒 <i>S.gallinarum</i>	-	+	+	+	-	+	-	+	+

注：表中“-”表示无拮抗；“+”表示拮抗圈半径 0~5cm；“++”表示拮抗圈半径 >5cm

表 4 结果表明，B13、B16、B17 和 B18 的抗菌谱较广，其中 B10 和 B15 对棉花枯萎菌，B13 和 B17 对辣椒疫霉菌，B11 对西瓜枯萎菌，B10、B17 和 B18 对白痢 1、白痢 2 及伤寒病菌等肠道病原菌有较好的拮抗能力，皿内拮抗圈半径均大于 5cm。

3 结 论

(1) 通过对几个采集样品中细菌的分离与纯化，获得了 9 株芽孢杆菌。对 9 株芽孢杆菌进行的个体和群体形态特征观察及生理生化特征测定表明，B10 为地衣芽孢杆菌；B13 为巨大芽孢杆菌；B12、B14 为短小芽孢杆菌；B15 为苏芸金芽孢杆菌；B16 为蕈状芽孢杆菌；B11、B17 和 B18 为蜡样芽孢杆菌。

(2) 9 株芽孢杆菌中，B12、B14、B16、B17 和 B18 是中强度耐盐菌株，B13 是弱耐盐菌株；B12、B13 和 B14 是耐碱性菌株，可在 pH=10 的条件下生长；9 株参试菌均能在 40~45℃ 下良好生长，其中 B10、B11、B12 和 B15 可耐温至 50℃。

(3) 通过 9 株芽孢杆菌对 8 株植物病原菌和 3 株动物病原菌的拮抗试验，初步确定了 9 株芽孢杆菌的抗病能力。结果表明，B13、B16、B17 和 B18 的抗菌谱较广，其中 B10、B15 对棉花枯萎菌，B13 和 B17 对辣椒疫霉菌，B11 对西瓜枯萎菌，B10、B17 和 B18 对白痢 1、白痢 2 及伤寒病菌等肠道病原菌有较好的拮抗能力。

参考文献共 6 篇（略）

原文发表于《西北农林科技大学学报（自然科学版）》，2004，32（7）：93-96.

两株蜡样芽孢杆菌的鉴定及液体培养基筛选

来航线，盛敏，刘强

(西北农林科技大学资环学院，陕西杨陵 712100)

摘要：通过对两株待试芽孢杆菌的卵磷脂酶等 13 个生理生化特征，4 种氮源，12 种碳源利用及动物毒理试验（小白鼠），鉴定出两株待试芽孢杆菌为蜡样芽孢杆菌（*Bacillus cereus*, B.C）。通过 pH 梯度，温度梯度，NaCl 浓度梯度等试验，初步断定此三株菌最适生长条件为 pH 为 7~8，温度 37℃，NaCl 10g/L；通过对 I，II，III，IV，V 5 种培养基的液体培养筛选和验证实验，初步断定培养基 III 在保证菌数的前提下，最为廉价，芽孢率也最高，为最适生产用液体发酵培养基；通过动物毒性实验，02 号、03 号与 09 号菌株作为添加剂或药剂（菌数 $\leq 10^9$ /g）均安全无毒。

关键词：蜡样芽孢杆菌；鉴定；液体培养基

Identification of Two Strains of *Bacillus Cereus*. B. C and Selection of their Liquid Culture Medium

LAI Hang-xian, SHENG Min, LIU Qiang

(College of Natural Resources and Environment, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: By some indexes, including physiological and biochemical characters, such as lecithinase, useness of 4 kinds of nitrogenous nutrition and 12 kinds of carbon nutrition and little white rat toxicology text, identify that two strains of tested *Bacillus* are *Bacillus cereus*; By the test of pH, T and NaCl concentration gradient, preliminarily concluded that pH 7~8, temprature 37℃ and NaCl 10 g/L are the best growth conditions of these three strains .By liquid growth screening of five kinds of culture medium (I , II , III , IV , V) and identified test, preliminarily draw a conclusion that the culture medium is the cheapest with the most spore rate and the best liquid fermentation culture medium in production; little

基金项目：企业协作“新型生物饲料添加剂研制”项目。

通信作者：来航线（1964—），男，陕西礼泉人，副教授，在读博士，主要从事农业微生物及微生物发酵等方面的教学和科研工作。

white rat toxicology text identified that three strains of *Bacillus cereus*. B. C are safe for producing medicament or submedicament when the number of *Bacillus cereus*. B.C don't exceed 10^9 per gram.

Key words: *Bacillus cereus*; identification; liquid culture medium

蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*, B.C) 为 G⁺ 需氧型大杆菌, 广泛存在于土壤等环境中。部分菌株具有致病性, 被人误食后易导致呕吐和腹泻 (蔡妙英, 1985), 无毒的 B.C 菌却具有很广泛的应用。抗生素作为药品和饲料添加剂已使用多年, 但由于长期、大量的使用, 导致人和畜禽肠道微生态系统失调, 并产生抗药性和免疫力下降, 以及畜产品药物残留等副作用。用蜡样芽孢杆菌为代表的细菌生产的微生态制剂 (Microbial ecological agent, MEA) 可以代替抗生素减少这些副作用。B.C 菌制剂多为非消化性食品添加剂或药剂, 能选择性促进一种或几种定植于肠道内细菌的活性, 抑制肠道内有害菌的生长, 减少宿主染病的机会, 保证了宿主的健康。另外, B.C 菌在生长过程中, 还会产生一系列有益的代谢产物, 刺激和促进宿主的生长 (梁明振, 2003; 冯亚强, 1995; 周和平, 1999)。

本试验通过对两株待试芽孢杆菌进行形态及生理生化特征的分析, 并进行初步鉴定, 同时采用液体发酵的方式探索其最佳生产培养基, 为工业化生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

菌种: 02 号菌株从西农农一站土壤中分离纯化得到; 03 号菌株为本组菌种室保存; 参比蜡样芽孢杆菌 -09 号菌株购自陕西省微生物研究所。

实验动物: 一级小白鼠 (18~22g), 购自第四军医大学。

1.2 方法

培养特征 (程丽娟, 2000) 将 02、03 和 09 三株菌分别接种于培养基 I 的平板和液体培养基 (150mL 三角瓶装培养液 20mL) 中, 37℃ 培养 3d, 每 12h 取培养物进行革兰氏染色, 并观察菌体特征, 菌落特征及其液体培养特征。

碳源、氮源试验 (程丽娟, 2000; 张纪忠, 1998) 在无碳、无氮的基础培养基中分别加入各待测碳源 (20g/L), 各待测 N 源 (5g/L), 观察并记录 02、03 和 09 三株菌在基础培养基上 (CK) 与各碳、氮源培养基上的长势, 长势好于 CK 为利用 “+”, 否则为不利用 “-”。

其他生理生化试验 (张纪忠, 1998; 蔡妙英, 1998) 溶血酶, 卵磷脂酶, 淀粉水解酶, 柠檬酸盐利用, 酪蛋白酶, 石蕊牛奶, 明胶水解试验, VP, MR, 吡啶, H₂S 试验和硝酸盐还原试验均参照文献 (张纪忠, 1998) 方法进行, 耐盐试验 (NaCl 质量分数为 10g/L、30g/L、50g/L 和 90g/L), 耐酸碱试验 (pH 为 3、4、5、8 和 9), 生长温度试验 (37℃、40℃、45℃ 和 50℃), 采用液体培养, 每 24h 用血球计数板计数一次, 选出最适条件, 参照文献 (蔡妙英等, 1988) 方法进行。

毒性试验 (蔡妙英, 1985; 甘肃农大, 1994) 以腹腔注射、灌胃等方法分别注入 37℃ 培养 72h 的液体培养物、无菌培养液和菌粉, 同时做纯淀粉组 (CK), 不注射也不灌胃组对照 (CK)。生产用液体培养基筛选 (甘肃农大, 1994; 陈天寿, 1995) 采用 I、II、III、IV、V 五种培养基, 37℃ 培养 (150mL 三角瓶装培养液 20mL), 重复 5 次, 同一接种量, 每 12h 摇 1 次, 每次约

5 min，每 24 h 取样记录菌数及芽孢数。

2 结果与分析

2.1 培养特征

2.1.1 群体培养特征 在肉汤培养基中生长混浊并产生菌膜；在营养琼脂上 37℃ 培养 48 h，其菌落特征见表 1。

表 1 02、03 和 09 号菌株的固体培养特征

菌号	形状	边缘	表面	隆起度	颜色	质地
02	圆形	整齐	毛玻璃状	中心不突起	乳白色	均匀
03	不规则	不整齐	毛玻璃状	中心不突起	乳白色	均匀
09	圆形	整齐	毛玻璃状	中心不突起	乳白色	均匀

2.1.2 菌体及芽孢形态特征 在固体平板培养下，每 12 h 作 1 次革兰氏染色，发现在 24 h 时形成未脱落的芽孢，到 48 h 芽孢已大部分脱落。菌体及芽孢形态见表 2。

表 2 02、03 和 09 号菌株的菌体及芽孢形态

菌号	菌体形态	菌体大小 (μm)	芽孢大小 (μm)	芽孢形状	芽孢位置
02	链状杆菌	1.0 × 3.0	1.0 × 1.8	椭圆形	中心或稍偏一端
03	链状杆菌	1.0 × 3.0	1.0 × 1.6	椭圆形	中心或稍偏一端
09	链状杆菌	1.0 × 3.0	1.6 × 1.6	椭圆形	中心或稍偏一端

2.2 各温度下生长情况

采用浅层液体发酵 (150 mL 三角瓶装培养基 20 mL)，于 37℃、40℃、45℃ 和 50℃ 下培养，每 24 h 用血球计数板计数一次，其结果见表 3。

表 3 02、03 和 09 号菌株在各温度下的生长量 (个 /mL)

菌号 Strain	时间 Time (h)	T (℃)			
		37	40	45	50
02	24	2.8 × 10 ⁸	2.9 × 10 ⁷	1.4 × 10 ⁷	1.1 × 10 ⁷
	48	9.6 × 10 ⁸	1.1 × 10 ⁹	2.7 × 10 ⁷	6 × 10 ⁷
	72	3.1 × 10 ¹³	1.6 × 10 ⁹	6.4 × 10 ⁷	6.2 × 10 ⁷
03	24	1.6 × 10 ⁸	4.2 × 10 ⁷	2.9 × 10 ⁷	1.8 × 10 ⁷
	48	1.8 × 10 ¹⁰	1.2 × 10 ⁹	7.2 × 10 ⁷	1.9 × 10 ⁷
	72	6.4 × 10 ¹³	1.4 × 10 ⁹	9.1 × 10 ⁷	2.3 × 10 ⁷
09	24	4.0 × 10 ⁸	5.4 × 10 ⁷	1.4 × 10 ⁷	3.0 × 10 ⁷
	48	1.0 × 10 ⁹	2.1 × 10 ⁸	3.6 × 10 ⁷	1.2 × 10 ⁸
	72	7.8 × 10 ¹¹	8.6 × 10 ⁹	5.1 × 10 ⁷	2.3 × 10 ⁸