

## 动物饲用益生菌 LPF-2 对大肠杆菌抑制作用的培养条件优化

陈璐, 苏明星, 刘波, 黄素芳, 葛慈斌, 朱育菁  
(福建省农业科学院农业生物资源研究所, 福州 350003)

**摘要:**【研究目的】对畜禽大肠杆菌具有抑制作用的动物饲用益生菌短芽孢杆菌 LPF-2 的培养条件进行优化。【方法】以抑菌圈为指标, 从时间、温度、摇床转速和培养基 pH 值研究短芽孢杆菌 LPF-2 的最适培养条件, 以获得短芽孢杆菌 LPF-2 最佳的抑菌效果。【结果】短芽孢杆菌 LPF-2 培养 24~84 h 的抑菌圈为 10.00~13.00 mm, 在 24~39 °C 下培养的抑菌圈为 9.00~14.00 mm, 转速在 90~210 r/min 下培养的抑菌圈为 13.75~15.00 mm, pH 6.0~8.0 下培养的抑菌圈为 10.50~14.50 mm。【结论】动物益生菌短芽孢杆菌 LPF-2 的最适培养条件为培养基 pH 7.5、培养温度 30 °C、培养时间 48 h, 摇床转速在 90~210 r/min 范围内均可。

**关键词:** 培养条件; 芽孢杆菌; 大肠杆菌; 抑制; 益生菌

中图分类号: S816.7

文献标识码: A

论文编号: 2009-0616

### Optimization of Fermentation Conditions for Animal Feed Probiotics, *Brevibacillus brevis* LPF-2, Inhibiting Against *Escherichia coli*

Chen Lu, Su Mingxing, Liu Bo, Huang Sufang, Ge Cibin, Zhu Yujing

(Institute of Agricultural Bioresource Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou Fujian 350003)

**Abstract:** 【OBJECTIVE】The fermentation conditions were optimized for animal feed probiotics, *Brevibacillus brevis* LPF-2, which strongly inhibited *Escherichia coli*. 【METHOD】The best fermentation conditions for the highest inhibition of LPF-2 were studied based on time, temperature, shaking speed and medium pH value by using inhibition zones as an index. 【RESULTS】The results showed that its inhibition zones against *E. Coli* were 10.00–13.00 mm after cultured for 24–84 h, 9.00–14.00 mm at 24–39 °C, 13.75–15.00 mm at the shaking speeds of 90~210 r/min and 10.50–14.50 mm at pH values of 6.0–8.0, respectively. 【CONCLUSION】In conclusion, the best fermentation conditions for LPF-2 against *E. Coli* were as follows: pH 7.5, 30 °C, 48 h culture time and 90–210 r/min shaking speed.

**Key words:** fermentation conditions, *Brevibacillus brevis*, *Escherichia coli*, inhibition, probiotics

### 0 引言

抗生素作为饲料添加剂以来, 耐药性和药物残留给动物和人来的健康造成了严重危害, 逐渐许多国家

对其应用进行严格限制<sup>[1]</sup>。动物益生菌, 一种新型的饲料添加剂越来越受到人们关注。动物益生菌, 又称动物益生菌、促生素、利生剂、活菌制剂或微生态制剂

**基金项目:** 国家科技部科技支撑计划“华南村镇塘坝地表饮用水安全保障适用技术与示范”(2008ZX07425-002); 福建省发展和改革委员会五新项目“远程监控微生物发酵舍零排放养猪法的研究与应用”; 福建省农业科学院科技创新团队建设基金(STIF-Y03); 福建省发改委农业专项(闽发改投资[2008]762号)

**第一作者简介:** 陈璐, 女, 1982年出生, 福建泉州人, 实习研究员, 硕士研究生, 主要从事生物技术和生物防治研究。通信地址: 350003 福州市五四路247号, 福建省农科院农业生物资源研究所, Tel: 0591-87848933, 13599393541, E-mail: lucille0000@163.com。

**通讯作者:** 刘波, 男, 1957年生, 福建惠安人, 研究员, 博士, 主要从事生物技术和生物防治研究。通信地址: 350003 福州市五四路247号, 福建省农业科学院。Tel: 0591-87848933, E-mail: fzliubo@163.com

收稿日期: 2009-03-24, 修回日期: 2009-5-18。

等,是指摄入动物体内、参与肠内微生物平衡的活性微生物培养物<sup>[1-2]</sup>。益生菌能够通过直接增强动物对肠内有害微生物群落的抑制作用;或者通过增强非特异性免疫功能来预防疾病,并间接起到促进动物生长和提高饲料转化率的作用<sup>[3-4]</sup>。并且益生菌具有无毒、无抗药性、无残留、无副作用的特点。众多试验证实了益生菌具有促进增重、提高饲料转化效率、改善畜禽机体免疫功能、降低死亡率及改善环境等效果<sup>[4-7]</sup>。目前使用的益生菌主要是芽孢杆菌、乳酸杆菌、粪链球菌等单一菌种或复合菌种的制剂<sup>[5-8]</sup>。但是大部分菌属的益生菌不耐受饲料加工和长期存放,而芽孢杆菌的孢子形式可耐受饲料加工、储藏及动物胃内酸性环境,并能在动物肠道萌发为具新陈代谢作用的营养细胞<sup>[9]</sup>。因此,芽孢杆菌益生菌用作防治畜禽腹泻制剂和饲用添加剂有广阔前景。笔者所在实验室筛选获得了一株高效的动物益生菌短短芽孢杆菌 LPF-2 (*Brevibacillus brevis* LPF-2),初步研究表明该菌株毒性低,对畜禽肠道中有害大肠杆菌具备较强的拮抗作用,能促进猪和鸡的生长,可作为动物饲用益生菌,应用于微生物发酵床零排放养猪法。为实现进一步的规模化发酵,试验中测定了不同培养条件下获得的短短芽孢杆菌 LPF-2 发酵液对大肠杆菌 K88 菌株的抑制作用,了解该菌在何种条件下可获得最好的抑制能力,以确定该菌的最适培养条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

动物病原菌: 畜禽致病性大肠杆菌 (*Escherichia coli*) K88 菌株(中国兽药监察所提供)。动物益生菌: 短短芽孢杆菌 LPF-2 菌株 (*B. brevis* LPF-2) 由福建省农业科学院农业生物资源研究所农业微生物研究中心提供。

益生菌摇瓶振荡培养和抑菌圈试验用牛肉膏-蛋白胨(NA)培养基: 0.3%牛肉膏+1%葡萄糖+0.1%酵母粉+0.5%蛋白胨, pH 7.2~7.4, 抑菌圈下层培养基加入 1.8%琼脂, 上层培养基加入 0.9%琼脂。大肠杆菌培养用改良 LB 培养基: 0.5%NaCl+1%蛋白胨+0.5%酵母粉, pH 7.0~7.2。

### 1.2 试验方法

1.2.1 大肠杆菌最适培养时间的确定 将大肠杆菌 K88 菌株接入改良 LB 液体培养基(培养基装量为 25 ml/250 ml 三角瓶), 接种量为 1%, 置 37 °C、150 r/min 恒温摇床振荡培养。每隔 1 h 取一次样, 用 UV-2550 紫外分光光度计测定 OD<sub>600</sub> 值, 达到生长稳定期后结束取样。重复 3 次。以 OD<sub>600</sub> 值为纵坐标, 生长时间为横坐标, 做生长曲线。最终确定大肠杆菌生长稳定期的时间段

为此次研究的最佳培养时间。

1.2.2 动物益生菌对大肠杆菌的抑制试验 接种芽孢杆菌于 NA 液体培养基中(培养基装量为 25 ml/250 ml 三角瓶), 接种量为 1%, 在 30 °C、170 r/min 下培养, 用血球计数板计算培养液的菌体浓度。将大肠杆菌 K88 菌株接入改良 LB 液体培养基(培养基装量为 25 ml/250 ml 三角瓶), 接种量为 1%, 置 37 °C、150 r/min 恒温摇床振荡培养, 直至 1.2.1 试验中确定的时间, 用血球计数板计算培养液的菌体浓度。

用抑菌圈测定短短芽孢杆菌 LPF-2 菌株对大肠杆菌 K88 的抑制作用。抑菌圈测定方法为: 吸取 K88 菌株发酵液 1.0 ml, 加入到融化并冷却到 50 °C 的 6 ml 0.9%NA 培养基内, 混匀后作为上层培养基, 倾覆在预先已凝固的 NA 下层培养基上。待上层培养基凝固后, 在每块平板上放置 4 个牛津杯(直径: 内 0.6 cm、外 0.8 cm, 高 1.0 cm), 分别向每个牛津杯内加入无菌水及各菌株培养液各 200 μL, 置于 37 °C 培养箱暗培。选定对 K88 菌株无抑制作用的枯草芽孢杆菌 NH-BS-2000 菌株为对照菌株, 无菌水为空白对照, 重复 3 次。24 h 后观察生长情况, 并测量抑菌圈的直径。

1.2.3 不同培养条件下, 动物益生菌对大肠杆菌抑制作用的影响 预培养得到短短芽孢杆菌 LPF-2 菌株和枯草芽孢杆菌 NH-BS-2000 菌株的种子液, 转接于 NA 液体培养基中(培养基装量为 25 ml/250 ml 三角瓶), 接种量为 1%, 摇床振荡培养。具体培养条件试验如下: (1) 培养时间梯度: 24、36、48、60、72、84 h, 在 30 °C、150 r/min 下培养。(2) 培养温度梯度: 24、27、30、33、36、39 °C, 在 150 r/min 下培养 48 h。(3) 培养摇床转速梯度: 90、120、150、180、210 r/min, 在 30 °C 下培养 48 h。(4) 培养基 pH 值梯度: 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0, 在 30 °C、150 r/min 下培养 48 h。

不同条件下培养得到的短短芽孢杆菌 LPF-2 发酵液 8000 r/min 离心 20 min, 取上清液过滤除菌, 获得无菌发酵滤液。将大肠杆菌 K88 接入改良 LB 液体培养基(培养基装量为 25 ml/250 ml 三角瓶), 接种量为 1%, 置 37 °C、150 r/min 恒温摇床振荡培养, 直至 1.2.1 试验中确定的时间。然后用 1.2.2 所述抑菌圈法测定不同培养条件下短短芽孢杆菌 LPF-2 对大肠杆菌 K88 的抑制作用。

## 2 结果与分析

2.1 大肠杆菌最适培养时间确定和动物益生菌短短芽孢杆菌 LPF-2 的抑菌作用

大肠杆菌 K88 菌株的生长曲线如图 1 所示。当 K88 菌株培养到 6 h, 进入了生长稳定期, 因此以 6 h 为

这次试验中大肠杆菌K88菌株的最适培养时间。

试验结果表明,只有动物益生菌短短芽孢杆菌LPF-2菌株对大肠杆菌K88能形成明显的抑菌圈,对照菌株枯草芽孢杆菌NH-BS-2000和无菌水则没有抑菌圈,LPF-2菌株的抑菌圈直径为25 mm,表明其对大肠杆菌K88具有较高的抑菌作用(见图2)。

## 2.2 培养时间对短短芽孢杆菌LPF-2抑菌能力的影响

试验结果见图3。培养了24~84 h的短短芽孢杆菌LPF-2菌株的无菌发酵滤液在含有大肠杆菌K88菌株发酵液的NA平板上均能产生明显的抑菌圈,为

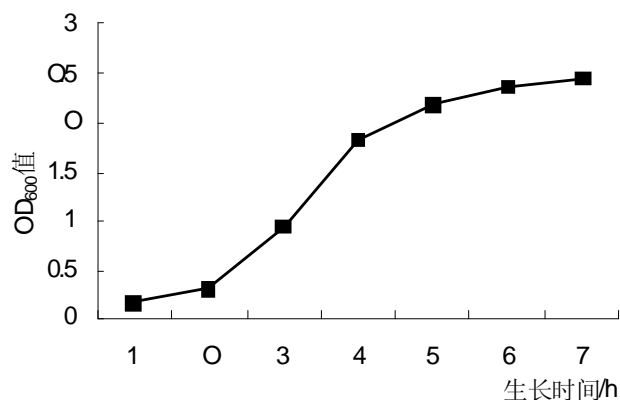


图1 大肠杆菌K88菌株生长曲线

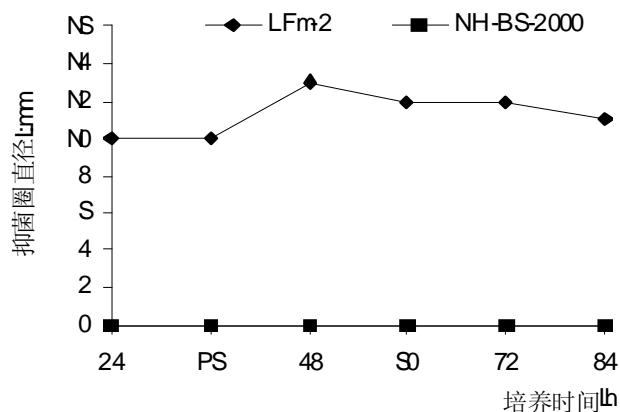


图3 两菌株培养不同时间的抑菌圈

## 2.4 摇床转速对短短芽孢杆菌LPF-2抑菌能力的影响

试验结果见图5。采用不同摇床转速培养的短短芽孢杆菌LPF-2菌株在含有大肠杆菌K88菌株发酵液的NA平板上都能产生明显的抑菌圈,为13.75~15.00 mm,差异不显著。而对照菌株枯草芽孢杆菌NH-BS-2000和无菌水对大肠杆菌K88均无抑菌圈。

## 2.5 培养基pH值对短短芽孢杆菌LPF-2抑菌能力的影响

在含有大肠杆菌K88菌株发酵液的NA平板上,短短芽孢杆菌LPF-2菌株都能产生明显的抑菌圈,为10.50~14.50 mm,其中在pH 7.5的培养基里培养的

10.00~13.00 mm,其中培养48 h的LPF-2菌株产生的抑菌圈最大。而对照菌株枯草芽孢杆菌NH-BS-2000和无菌水均无抑菌圈。

## 2.3 培养温度对短短芽孢杆菌LPF-2抑菌能力的影响

在含有大肠杆菌K88菌株发酵液的NA平板上,不同温度培养获得的短短芽孢杆菌LPF-2菌株无菌发酵滤液均能产生明显的抑菌圈,为9.00~14.00 mm。其中在30℃下培养的LPF-2菌株产生的抑菌圈最大。而对照菌株枯草芽孢杆菌NH-BS-2000和无菌水对大肠杆菌K88均无抑菌圈(见图4)。

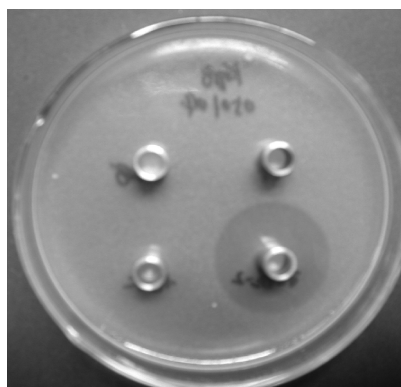


图2 菌株LPF-2(右下角)对大肠杆菌K88菌株产生的抑菌圈

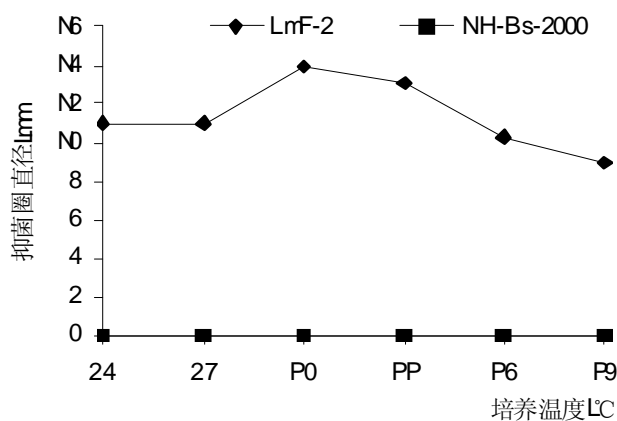


图4 两菌株不同温度下培养的抑菌圈

LPF-2菌株产生的抑菌圈最大。而对照菌株枯草芽孢杆菌NH-BS-2000对大肠杆菌K88都没有产生明显的抑菌圈(见图6)。

## 3 讨论

研究用于益生菌的芽孢杆菌,报道较多的有纳豆芽孢杆菌<sup>[10]</sup>、蜡样芽孢杆菌<sup>[11]</sup>、枯草芽孢杆菌<sup>[12]</sup>、地衣芽孢杆菌<sup>[13]</sup>等。笔者所在研究室经研究发现LPF-2菌株对畜禽致病大肠杆菌具有较强的抑制作用,并且能促进畜禽生长,同时毒性低,适合作为动物益生菌工程菌株。动物益生菌LPF-2为短短芽孢杆菌(*B. brevis*),短短芽孢杆菌作为益生菌的研究报道在中国少见,只有



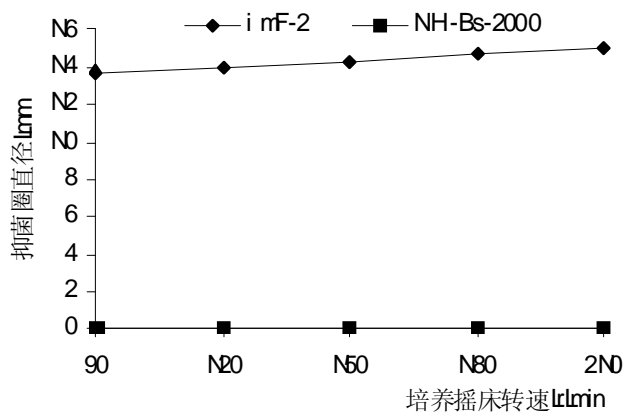


图5 两菌株不同摇床转速下培养的抑菌圈

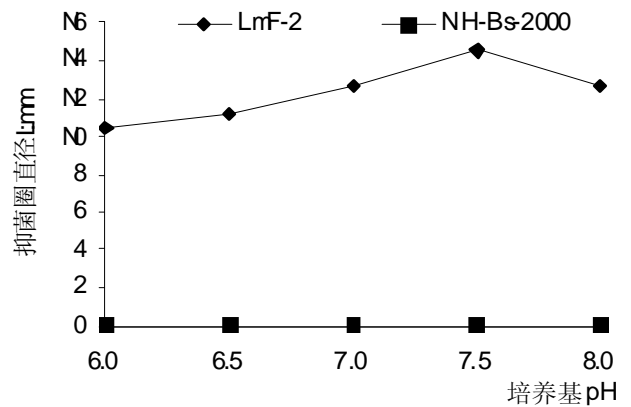


图6 两菌株在不同pH值下培养的抑菌圈

陈凯等<sup>[14]</sup>人在对短短芽孢杆菌 XDH 菌株发酵培养基配方的研究中有提及。

益生菌产品的质量和使用效果是益生菌研发的关键问题,而体外抑制试验和培养条件是动物临床试验和发酵工艺技术的研究基础。培养条件主要包括培养时间、温度、培养基 pH 值、摇床转速<sup>[15]</sup>。在试验中,当 LPF-2 菌株培养时间长至 84 h 时,它对大肠杆菌 K88 菌株产生的抑菌圈仍较大,为 11.00 mm,其抑菌能力能够维持较长一段时间。36 °C 培养的芽孢杆菌 LPF-2 产生的抑菌圈还能达到 10.25 mm,这说明 LPF-2 菌株在适宜大肠杆菌 K88 生长的温度条件下对它的抑制能力还是很强的。并且在 pH 6.0 偏酸的培养基里培养,短短芽孢杆菌 LPF-2 产生的抑菌作用仍然较强,抑菌圈为 10.5 mm。因此,LPF-2 菌株在畜禽肠道偏酸环境下还能对大肠杆菌产生较强抑制作用。总体来看,与培养时间条件及培养温度条件相比较,在 90~210 r/min 范围内,培养摇床转速快慢对 LPF-2 菌株的抑菌能力没有太大影响。

#### 4 结论

综上所述,在对大肠杆菌 K88 的体外抑制试验中,当动物益生菌短短芽孢杆菌 LPF-2 培养条件为培养基 pH 7.5、培养温度 30 °C、培养时间 48 h,摇床转速在 90~210 r/min 范围内,能使 LPF-2 发挥最佳的抑制效果。在以后的工业化菌剂研究中,可以此培养条件为基础对发酵工艺条件进行优化。另外,该研究中培养基 pH 6.0 和培养温度 36 °C 下培养的动物益生菌短短芽孢杆菌 LPF-2 对大肠杆菌 K88 仍能产生较强的抑制作用,这为其动物试验提供了参数。

#### 参考文献

- [1] 刘襄河,周艳萍,燕华. 益生菌的研究进展及其在动物养殖中的应用现状[J]. 河北渔业, 2007(11): 8-11, 21.
- [2] 罗慧,杨勇,于洪意. 益生菌作用机理及其在现代畜牧生产中的应用[J]. 中国畜牧兽医, 2008, 35(3): 17-20.
- [3] 姚建国,林久军. 化学益生菌和益生菌在动物营养中的应用[J]. 畜禽业, 2000(4): 38-41.
- [4] 郭鹏飞,李文辉,柴静. 益生菌在反刍动物上的应用研究进展[J]. 动物科学与动物医学, 2004, 21(1): 43-45.
- [5] 刘勇. 微生态制剂及其在肉鸡生产中的应用[J]. 山东饲料, 2005(5): 9-10.
- [6] 王冉,邵春荣,胡来根,等. 益生菌在肉鸡生产中替代抗生素的试验[J]. 饲料研究, 2002(4): 15-17.
- [7] 任善茂,陶勇,张牧. 化学益生菌在猪生产中的应用潜力[J]. 国外畜牧科技, 2002, 29(1): 20-25.
- [8] Himanen J P, Pyhala L, Olander R M. Biological activities of lipoteichoic acid and peptidoglycan-teichoic acid of *Bacillus subtilis* 168 (Marburg)[J]. J Gen Microbiol, 1993, 139: 2659-2665.
- [9] 陈旭东,马秋刚,计成,等. 芽孢杆菌和果寡糖在仔猪营养中的应用[J]. 中国饲料, 2004(3): 24-26.
- [10] 邓露芳,王加启,卜登攀,等. 纳豆芽孢杆菌作为益生菌饲用的研究现状[J]. 中国畜牧兽医, 2007, 34(10): 5-8.
- [11] 侯雨文,韩春燕. 蜡样芽孢杆菌对大肠杆菌的体外抑制研究[J]. 河南畜牧兽医, 2007, 28(4): 10-11.
- [12] 陈天游,董思国,田万红,等. 枯草芽孢杆菌活菌体外拮抗 6 种肠道致病菌的研究[J]. 微生物学杂志, 2004, 24(5): 74-76.
- [13] 张大伟,郝永任,楚杰,等. 益生菌地衣芽孢杆菌的作用机理及应用研究[J]. 山东饲料, 2004(10): 27-28.
- [14] 陈凯,薛东红,夏尚远,等. 短短芽孢杆菌 (*Brevibacillus brevis*) XDH 菌株发酵培养基配方的研究[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2006, 37(2): 190-195.
- [15] 陈世琼,李平兰,郑海涛,等. 培养条件对二株猪源产细菌素乳酸菌抑菌活性的影响[J]. 中国乳品工业, 2001, 29(5): 24-26.