

网络出版时间: 2015-01-15 10:00:00

网络出版地址: http://www.cnki.net

## 粪肠球菌益生特性的体外评价

鲍延娥<sup>1</sup>

收稿日期: 2014-08-15; 修回日期: 2014-10-10

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划(2012BAJ01B01)。

第一作者: 鲍延娥, 女, 硕士研究生, 从事动物营养调控研究。E-mail: bye@nwsu.edu.cn

通信作者: 高玉鹏, 教授, 硕士生导师, 主要从事动物营养调控研究。E-mail: gy@nwsu.edu.cn

董晓芳, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事家禽营养与免疫研究。E-mail: dx@nwsu.edu.cn

生物平衡,提高免疫力,调节脂肪代谢,促进动物生产以及改善畜舍环境等功能<sup>[5]</sup>。粪肠球菌(*P. faecalis*)为国家允许饲用的饲用微生物添加剂之一,是属于肠球菌属的一种兼性厌氧型乳酸菌,对环境适应力和抵抗力强,可耐受四环素、卡那霉素、庆大霉素等多种抗生素,而且其生长条件要求不严格,在pH 5~9 都能生长,在普通营养培养基上也可生长,广泛分布于自然界中<sup>[6]</sup>。粪肠球菌作为一种益生菌,在医学和食品工程领域已得到广泛应用,但在畜禽使用的微生态制剂中,以粪肠球菌作为生产菌种的报道较少。为此,本试验旨在通过研究粪肠球菌的生长特点、耐酸性、耐胆盐性和抑菌性等探讨其作为益生菌的应用前景。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株及培养基

菌株来源:粪肠球菌 EDMEE-1,购自中国科学院微生物研究所。胰酪大豆胨液体培养基(V<sub>2</sub>W):胰蛋白胨 5g,大豆胨 = 5g,氯化钠 = 5g,4G 为 100mL 灭菌水。胰酪大豆胨固体培养基(V<sub>2</sub>A):胰蛋白胨 5g,大豆胨 = 5g,氯化钠 = 5g,琼脂 5g,4G 为 100mL 灭菌水。营养肉汤培养基:蛋白胨 5g,牛肉膏 5g,氯化钠 = 5g,4G 为 100mL 灭菌水。营养琼脂培养基:蛋白胨 5g,牛肉膏 5g,氯化钠 = 5g,琼脂 5g,4G 为 100mL 灭菌水。伊红美蓝固体培养基(>MM):称取 0.1g 伊红美蓝琼脂,溶解于 100mL 蒸馏水中,100mL 灭菌水。指示菌:大肠杆菌 H<sub>7</sub>(E011)和 H<sub>10</sub>(E010),购自中国兽药监察所。

### 1.2 菌株活化

从 4℃ 冰箱中取出粪肠球菌冻干菌粉,接种于装有 5mL V<sub>2</sub>W 培养基的三角瓶(100mL)中,37℃ 振荡培养 24h。取 1mL 的培养液用生理盐水稀释至 10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup> 和 10<sup>-3</sup> 稀释度时,取 0.1mL 涂布于 V<sub>2</sub>A 平板,37℃ 培养 24h。用接种针挑取单菌落接种于装有 5mL V<sub>2</sub>W 培养基的三角瓶(100mL)中,37℃ 振荡培养 24h,得发酵种子液。将粪肠球菌发酵液以 1:10 的接种量接种于装有 5mL V<sub>2</sub>W

管和试验管中取出1个试管,梯度稀释后进行>MW平板计数。

## 1.1 结果与分析

### 2.1.1 粪肠球菌生长曲线及发酵液 pH 变化

由图#可知,在接种! 2内,H<sub>2</sub>值变化较小,菌株处于生长延迟期,培养! 2后,H<sub>2</sub>值几乎呈直线上升,生长进入对数期,培养02生长达到高峰,以后没有出现下降的趋势,生长进入稳定期。这与图!中所示的随着培养时间的延长,发酵液4G的变化趋势相符,即粪肠球菌生长的前! 2,发酵液4G变化较小,~02,4G迅速上升,02之后,4G上升减缓,基本趋于稳定。

#### 2\*2! 耐酸性

由表#可知,粪肠球菌经人工胃液中处理# 2后,4G! 和4G\$处理组活菌数均极显著降低

(9#" \*#),4G/ 处理组活菌数虽低于对照组,但没有显著变化(9\$" \*#);随着处理时间的延长,各处理组活菌数均呈现极显著下降的趋势(9#" \*#),处理\$ 2后4G! 处理组活菌数的常用对数值降低至=\*/\$(! \*+g#<sup>#</sup> E' S/9\),4G\$ 和4G/ 处理组活菌数的常用对数值分别降低至+\*#个(#\* \$g#<sup>#</sup> E' S/9\和+\*+/(=\*&g#<sup>#</sup> E' S/9\))。

#### 2\*3! 耐胆盐性

由表!可知,粪肠球菌经质量分数为" \* [和' \$[的胆盐处理! 2内,活菌数均呈现极显著降低的趋势(9#" \*#),处理\$ 2后活菌数降低幅度减小,与处理! 2后的活菌数的无显著差异(9\$" \*#),活菌数的常用对数值分别为&\*#&(#\* &g#<sup>#</sup> E' S/9\和&\*#/(#\* \$+ g#<sup>#</sup> E' S/9\))。

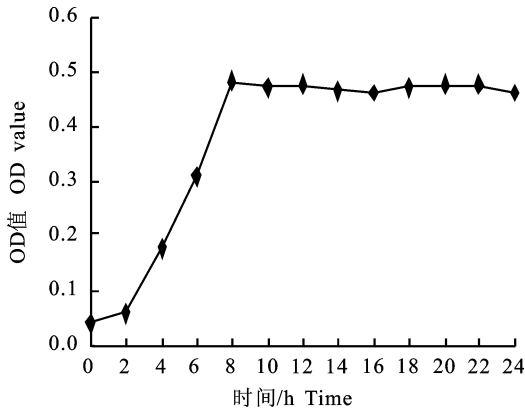


图 1! 粪肠球菌的生长曲线

Fig. 1! The growth curve of *E. faecalis*

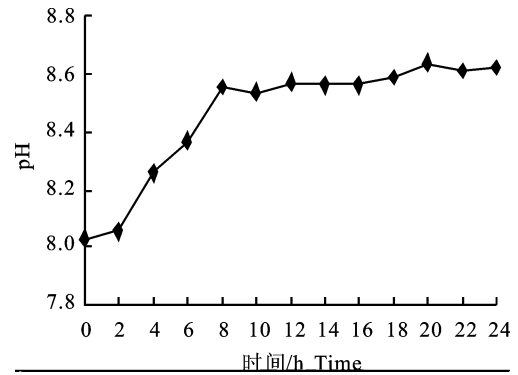


图 2! 粪肠球菌生长的 pH 变化

Fig. 2! The pH variation of *E. faecalis*

表 1! 粪肠球菌在不同 pH 下人工胃液中的活菌数密度的常用对数值(%±s)

!!! Table 1! The viable counts of *E. faecalis* in artificial gastric juice with different pH

项目 P339	时间/2! \j 98			
	"!	#	!!	\$
4G!!	O*\$h" *! A!	+! Oh" *# WQ	=*#h" *= E6	=*/\$h" *# _'
4G\$	O*\$h" *! A!	O* Oh" *! WQ	+ \$Oh" *# E6	+*#h" */ _'
4G/!	O*\$h" *! A!	O*\$h" *# A!	+*! h" */ WQ	+*/

2.4.1 体外抑菌性

由表3可知,大肠杆菌 H<sub>10</sub> 单独培养和与粪肠球菌混合培养的前 0.2, 活菌数无显著差异 (P > 0.05), 其常用对数值分别增加至 1.2 (1.2 = lg 10<sup>1.2</sup> × 10<sup>8</sup> CFU/ml) 和 0.4 (0.4 = lg 10<sup>0.4</sup> × 10<sup>8</sup> CFU/ml), 培养至 2 时, 单独培养的活菌数极显著高于混合培养的活菌数 (P < 0.001), 培养至 4 时, 单独培养与混合培养的活菌数无显著差异 (P > 0.05), 均呈现上升的趋势, 但混合培养的活

菌数仍处于 10<sup>8</sup> CFU/ml 水平。

由表4可知,大肠杆菌 H<sub>10</sub> 单独培养和与粪肠球菌混合培养的前 0.2, 活菌数无显著差异 (P > 0.05), 均增加至 10<sup>8</sup> CFU/ml, 培养至 2 时, 单独培养的活菌数极显著高于混合培养的活菌数 (P < 0.001), 其常用对数值分别为 1.2 (1.2 = lg 10<sup>1.2</sup> × 10<sup>8</sup> CFU/ml) 和 0.4 (0.4 = lg 10<sup>0.4</sup> × 10<sup>8</sup> CFU/ml); 培养至 4 时, 单独培养的活菌数常用对数值高于混合培养的高 0.4 (P < 0.05)。

表 3: 粪肠球菌对大肠杆菌 O<sub>1</sub> 活菌数密度常用对数值的影响 (x ± s)

Table 3: Effects of *E. faecalis* on growth of *E. coli* O<sub>1</sub>

项目 P39	时间/21 月 98						
	0	1	2	4	8	16	32
单独培养 P: 10 <sup>8</sup> CFU/ml	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1

呈现上升和稳定的趋势,对酸性环境有较强的抵抗力。侯璐<sup>[4]</sup>用人工胃液来评价粪肠球菌的耐酸性,发现其在 4G! \* 和 4G\$\* 的环境中处理 2 后存活率高达 98% 和 100%,活菌数密度均达到  $10^8$  CFU/g,对 4G! \* 和 4G\$\* 的低酸环境表现出良好的耐受性。本试验中粪肠球菌经 4G! \* 的人工胃液处理 2 后,活菌数密度均分别极显著降低至  $10^4$  CFU/g 和  $10^5$  CFU/g。以上结果存在差异可能是由于粪肠球菌的来源与生理阶段不同导致其对低酸环境的耐受性有一定差别。动物胃内 pH 一般波动在 1~3,食物在胃内停留 1~2 h,当动物进食后,一方面会在短时间内引起胃内 pH

④

[=]! aSIJ8K(徐! 鹏),\_HCD!a:(Q. K(董晓芳),VHCD!):. %  
 9. K(佟建明)\*M6Q;!' 8B!A')3TB : M, (R' @ 6(-  
 :.'!P3!Z88R2A' T. 6 [L]\*E2. 88L@R::!(QA)9;  
 C@93. (动物营养学报)!'"# !/O :#S1+##/'\$\*  
 [&]! FGHS!V. K). (周庭银),FGAH!C@ (赵! 虎)\*\_: K (-  
 :.'!);@33(.!(Q6).6;! 96Q:(K? [M]\*<2. K2):  
 <2. K2)!<8306!cV82)6;!J@)-2R !'"#:\$/%8&).  
 E2. 88\*  
 [+!]! GHS!\@ (侯! 璐)\*V23-30?!(Q62R688-36!(QP.#8%  
 ", ""/D\$"\$'A1Q94K!:'!)3!8883!(. !KR 5324BR9%  
 :. 68.'!)99@)3!(Q4K88 [L]\*G(223P. 8RIM. K(:  
 AK@63PB.S.)TBR)3(内蒙古农业大学)!'"# !1). !E2%  
 . 88532>. K)-2: O3R6)\*  
 [O]! VPE2@ (李! 春),FGACD!\_: (张! 丹),FGACD!\_: 58  
 (张兰威),\*#9 \*30?(. !KR 5. K6.' )3(. -(Q35!62: 8%  
 3R; PB @. KIP.#&," ""/D\$"\$'/[L]\*M' 8R!' (('!<4%  
 868.' !V82 (: (K? (现代食品科技)!'"# =!#(/)!O\$'  
 ). !E2. 88532>. K)-2: O3R6)\*  
 [1]! Z>C!a:(?. (任晓燕),<GAC!DB!b):. K(刺根强),FGHS  
 a:(周! 霞)\*V2B 98@R3(.!(Q8 3R66@!O6@9'-  
 KR 5326R8 [L]1@R::!(QA)9;!<48 68.' !^888.: R  
 MB)6. 8 畜牧兽医杂志)!'"# =!#(/&):#'#'(). !E2. 88  
 532>. K)-2: O3R6)\*  
 [#]! VPS!B. (刘! 艳)\*JPB)9.: R!<30)8!(. !38W)(K)6:  
 '@ 6(-!(QH 8' @ 6(-.: !JRO(36!<R). [L]\*:):. :  
 \_:):. !V82 (: (K?S.)TBR)3(大连工业大学)!'"# O:A  
 //). !E2. 88532>. K)-2: O3R6)\*  
 [##]! 68R7-(. !A.Y2: 8 !A!Y!\_E(. 5 ?!J!\^\*: 6Q6;@  
 6(. )J3(.!(Q38K-R). 33.: !R6(Q96: QBRP8  
 9(T:!(Q38. (. -888. K-3 9. 62R8)(. [L]\*M)6Q>6:  
 68; 32)- #111 ##:1&11\*  
 [#]! B@W.V-8 !G!B^\*: 6Q6;@!68-). !38R003')K83TB  
 3R68.' !38Q6R!: 688. K38R')-3023(. [L]1A44

W688(: #11\$ +=! &1% +=\*  
 [#\$]! G; !ML\*Z:(8(QK@O688!): !2@9. !3X)6:(K?:.' !J@%  
 2...: 8:(K? [M]\*O85?(R7:1); 7). -!P 3R98 88-#11=\*  
 [#/]! Y(-!W.<@7(T)6L.D(PB!L.\*#A9 \*>O88(Q4R368R!(.  
 338T): Q)3!(QO5#85"))(1\$"- , @)(A M! ).!-)9@: %  
 3B!K-R). 33.: !6.' )3(. -[L]\* (( ' !V82 (: !W(362 %  
 (: !'"# :\$O:# ## +\*  
 [#=]! E2R88- !! J.Y8 ?!J!M.M(PB)\.E(:). -!L!Y\*\_88(4%  
 983.: !: 44)63(.!(Q.!). !T)R!9882' (: (K? 3! 888:  
 9. 833R.-)33; 8R. 68(Q433.: ?!4R(Q34O5#85%  
 ""))(A:.' !+D-, 85#&(7-468!). !38 @48R 2@9.  
 K-R). 33.: !R68 [L]1A44!M)6Q:( #110.O' +=1%  
 +80\*  
 [#&]! !):): 9!ZIE,<2 5; 3RZ.Y8R!R' P!T)T!888(QO 8  
 -:;3!:' !62: 83R 9. 8 (!). 33.: !: : 8RQ6O688:  
 [L]\*D-3R(83R:(K? #1+=&1! ):/O\$\*  
 [#+]! V@9(: !>. E)33' 8!Z.J; ? 8M.\*#A9 \*N@): --?R:  
 :. 68688!QR 4R(Q34O688) [L]\*A9L!E). !O@R:  
 !'"# +=:\$O8\$! \*  
 [#O]! <G>QF2. K?. (沈中艳)\*688. K(QUR(Q38\ 686  
 A9!W688!Q9J)K!:' !<30?(. ! 8R9833(. !E(. ' )%  
 3(. [L]\*! @2. :G@. KLR. K!AK@63PB.S.)TBR)3(华  
 中农业大学)!'"# +!O). !E2. 88532>. K)-2: O3R6)\*  
 [#1]! BP! 9X@8 易维学)\*30?(. !38>T; @3(.!(Q' 88!P %  
 #&," ""/D\$"\$'/A:.' !W6; @!<@3)-!. !)R [L]\*! @%  
 2. :G@. KLR. K!AK@63PB.S.)TBR)3(华中农业大  
 学)!'"# :\$%\$1). !E2. 88532>. K)-2: O3R6)\*  
 [!"]! !ACD\)?@ (王锂辑),G>!B. 8K(贺银凤),VPR<2(?%  
 ). K(李少英),\*#9 \*30?(. !:.. 30688: !Q(6896;  
 62R688J3(.!(QP.#8," ""/D\$"\$'/A). !38 7@9--  
 [L]\* (('!<48 68.' !V82 (: (K? (食品科技)!'"# &:#  
 #=#+). !E2. 88532>. K)-2: O3R6)\*