

网络出版时间:2013-11-22

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1220.S.20131122.1048.012.html>

## 粪肠球菌益生特性的体外评价

鲍延娥<sup>1,2</sup>,董晓芳<sup>2</sup>,佟建明<sup>2</sup>,高玉鹏<sup>1</sup>,刘炎<sup>1,2</sup>

(1.西北农林科技大学 动物科技学院,陕西杨凌 712100;2.中国农业科学院 北京畜牧兽医研究所,北京 100193)

**摘要** 通过体外法研究粪肠球菌的生长特点、耐酸性、耐胆盐性和抑菌性等,以评价其益生效果。结果表明:①粪肠球菌在培养2 h后进入对数期,8 h到达稳定期;②经pH 2、3、4的人工胃液处理3 h后,粪肠球菌极显著降低至 $2.71 \times 10^5$ 、 $1.03 \times 10^7$ 和 $5.65 \times 10^7$  CFU/mL( $P < 0.01$ );③粪肠球菌经含质量分数为0.2%和0.3%的胆盐溶液处理3 h后,极显著降低至 $1.46 \times 10^6$ 和 $1.37 \times 10^6$  CFU/mL( $P < 0.01$ );④粪肠球菌对大肠杆菌O<sub>1</sub>和O<sub>78</sub>均在混合培养至10 h时表现极显著的抑制作用( $P < 0.01$ )。可见,粪肠球菌生长繁殖速度快,能耐受胃肠道环境,对大肠杆菌O<sub>1</sub>和O<sub>78</sub>有一定的抑制作用,适合作为微生态制剂的生产菌种。

**关键词** 粪肠球菌;耐受性;益生性

中图分类号 S816.7

文献标志码 A

文章编号 1004-1389(2013)11-0202-06

## Evaluation of Probiotic Characteristics of *Enterococcus faecalis* in Vitro

BAO Yan'e<sup>1,2</sup>, DONG Xiaofang<sup>2</sup>, TONG Jianming<sup>2</sup>, GAO Yupeng<sup>1</sup> and LIU Yan<sup>1,2</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling Shaanxi 712100, China;

2. Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

**Abstract** The experiment was conducted to study the growth characteristics, tolerance to acid and bile and antibacterial activity of *Enterococcus faecalis* and evaluate its probiotic characteristics *in vitro*. The results showed as follows: ①The growth of *E. faecalis* entered logarithmic phase after 2 hours culture and reached the stable stage at 8 hours. ②The bacteria viable counts significantly reduced to  $2.71 \times 10^5$  CFU/mL,  $1.03 \times 10^7$  CFU/mL and  $5.65 \times 10^7$  CFU/mL ( $P < 0.01$ ) when the *E. faecalis* sustained in artificial gastric juice for three hours under pH 2, 3 and 4, respectively. ③The viable counts significantly reduced to  $1.46 \times 10^6$  and  $1.37 \times 10^6$  CFU/mL ( $P < 0.01$ ) when *E. faecalis* cultured in 0.2% and 0.3% bile salt medium for 3 hours, respectively. ④*E. faecalis* could significantly inhibit the growth of *Escherichia coli* O<sub>1</sub> and O<sub>78</sub> at 10 hours in mixed culture ( $P < 0.01$ ). It was concluded that *E. faecalis* could be fast growing and could survive in the gastrointestinal tract and inhibit the growth of *Escherichia coli* to some extent which was appropriate for a production strains of probiotics.

**Key words** *Enterococcus faecalis*; Tolerance; Probiotic characteristics

益生菌来源于希腊语“益生”<sup>[1]</sup>,是一种通过调节肠道微生物菌群平衡来对宿主产生有益作用

的饲用微生物<sup>[2]</sup>。近年来,益生菌在动物生产中的应用越来越受到重视,其具有改善动物肠道微

收稿日期:2013-04-10 修回日期:2013-06-20

基金项目:“十二五”国家科技支撑计划(2011BAD26B02-3)。

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: baoyane2512@126.com

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: gaoyupeng112@sina.com

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: xiaofangd1124@sina.com

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>[3-5]</sup>。粪肠球菌(*Enterococcus 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10~45℃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>[6-7]</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 CGMCC1.2135,购自中国科学院微生物研究所。胰酪-大豆胨液体培养基(TSB):胰蛋白胨 15 g/L,大豆胨 5 g/L,氯化钠 5 g/L,pH 为 7.3,121℃灭菌 30 min。胰酪-大豆胨固体培养基(TSA):胰蛋白胨 15 g/L,大豆胨 5 g/L,氯化钠 5 g/L,琼脂 13 g/L,pH 为 7.3,121℃灭菌 30 min。营养肉汤培养基:蛋白胨 10 g/L,牛肉膏 3 g/L,氯化钠 5 g/L,pH 7.0,121℃灭菌 30 min。营养琼脂培养基:蛋白胨 10 g/L,牛肉膏 3 g/L,氯化钠 5 g/L,琼脂 13 g/L,pH 7.0,121℃灭菌 30 min。伊红美蓝固体培养基(EMB):称取 37.5 g 伊红美蓝琼脂,溶解于 1 L 蒸馏水中,121℃灭菌 30 min。指示菌:大肠杆菌 O<sub>1</sub>(C84010)和 O<sub>78</sub>(C84008),购自中国兽药监察所。

### 1.2 菌株活化

从-20℃冰箱中取出粪肠球菌冻干菌粉,接种于装有 50 mL TSB 培养基的三角瓶(250 mL)中,37℃,160 r/min 培养 24 h。取 0.5 mL 的培养液用生理盐水稀释至 10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup>和 10<sup>-7</sup>稀释度时,取 0.1 mL 涂布于 TSA 平板,37℃培养 24 h。用接种针挑取单菌落接种于装有 50 mL TSB 培养基的三角瓶(250 mL)中,37℃,160 r/min 培养 24 h,得发酵种子液。将粪肠球菌发酵液以 2% 的接种量接种于装有 50 mL TSB 培养基的三角瓶(250 mL)中,37℃培养 16 h,梯度稀释后平板计数,粪肠球菌为 10<sup>10</sup> CFU/mL,4 500 r/min 离

心 15 min,去上清液,以无菌生理盐水洗涤菌体 2 次并进行稀释,最后得到 10<sup>9</sup> CFU/mL 的菌悬液。

### 1.3 粪肠球菌生长曲线及发酵液 pH 变化

将粪肠球菌发酵液以  $w=2\%$  的接种量接种于装有 50 mL TSB 培养基的三角瓶(250 mL)中,37℃,160 r/min 培养 24 h,从 0 h 开始每 2 h 取 2 个三角瓶,4℃保存。最后测定每瓶的 pH 和 600 nm 下的 OD 值。以时间为横坐标,OD 值和 pH 值为纵坐标,分别绘制粪肠球菌在 24 h 内的生长曲线。

### 1.4 耐酸性

pH 2、3、4 酸液的配制: $w=10\%$  的盐酸以蒸馏水稀释,调 pH 至 2、3、4,每 100 mL 酸中加入 1 g 胃蛋白酶,充分溶解,0.2 μm 滤膜过滤,除菌,备用。

取粪肠球菌 10<sup>9</sup> CFU/mL 菌悬液 1 mL,加入装有 9 mL pH 为 2、3、4 酸液的试管中,37℃,160 r/min 培养 3 h。每 1 h 各取 2 个试管,梯度稀释后进行 TSA 平板计数。

### 1.5 耐胆盐性

质量分数为 0.2% 和 0.3% 胆盐溶液的配制:取 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6.8 g,溶解于 500 mL 蒸馏水中,用体积分数为 0.4% 的 NaOH 调 pH 至 6.8,加水至 1 000 mL,然后加入 2 g 禽胆盐,充分溶解后以 0.2 μm 滤膜过滤,除菌,即为 0.2% 的胆盐溶液;若加入 3 g 禽胆盐,则为 0.3% 的胆盐溶液。取粪肠球菌 10<sup>9</sup> CFU/mL 菌悬液 1 mL,加入装有 9 mL 质量分数为 0.2% 和 0.3% 胆盐的溶液,以不含胆盐的溶液为对照组,37℃,160 r/min 培养 3 h。每 1 h 各取 2 个试管,梯度稀释后进行 TSA 平板计数。

### 1.6 体外抑菌性

将活化的大肠杆菌 O<sub>1</sub>、O<sub>78</sub> 接种于营养肉汤培养基中,梯度稀释后进行营养琼脂平板计数,用无菌生理盐水调整菌悬液使活菌数密度为 10<sup>9</sup> CFU/mL。

将粪肠球菌菌悬液(10<sup>9</sup> CFU/mL)作为 A 管,大肠杆菌 O<sub>1</sub> 作为 B 管,大肠杆菌 O<sub>78</sub> 作为 C 管,分别从 B 管和 C 管中各取 1 mL 加入装有 10 mL 营养肉汤的试管中单独培养,为对照管。然后从 A 管、B 管和 C 管中各取 1 mL 加入装有 10 mL 营养肉汤的试管中,进行 A 管和 B 管以及 A 管和 C 管的混合培养,为试验组,37℃,160 r/min 培养 12 h,从 0 h 开始每 2 h 从各对照

管和试验管中取出 2 个试管,梯度稀释后进行 EMB 平板计数。

## 2 结果与分析

### 2.1 粪肠球菌生长曲线及发酵液 pH 变化

由图 1 可知,在接种 2 h 内,OD 值变化较小,菌株处于生长延迟期,培养 2 h 后,OD 值几乎呈直线上升,生长进入对数期,培养 8 h 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 2 中所示的随着培养时间的延长,发酵液 pH 的变化趋势相符,即粪肠球菌生长的前 2 h,发酵液 pH 变化较小,2~8 h,pH 迅速上升,8 h 之后,pH 上升减缓,基本趋于稳定。

### 2.2 耐酸性

由表 1 可知,粪肠球菌经人工胃液中处理 1 h 后,pH2 和 pH3 处理组活菌数均极显著降低

( $P < 0.01$ ),pH 4 处理组活菌数虽低于对照组,但没有显著变化( $P > 0.05$ );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( $P < 0.01$ ),处理 3 h 后 pH 2 处理组活菌数的常用对数值降低至 5.43( $2.71 \times 10^5$  CFU/mL),pH 3 和 pH 4 处理组活菌数的常用对数值分别降低至 7.01 个( $1.03 \times 10^7$  CFU/mL)和 7.74( $5.65 \times 10^7$  CFU/mL)。

### 2.3 耐胆盐性

由表 2 可知,粪肠球菌经质量分数为 0.2% 和 0.3% 的胆盐处理 2 h 内,活菌数均呈现极显著降低的趋势( $P < 0.01$ ),处理 3 h 后活菌数降低幅度减小,与处理 2 h 后的活菌数的无显著差异( $P > 0.05$ ),活菌数的常用对数值分别为 6.16 ( $1.46 \times 10^6$  CFU/mL) 和 6.14 ( $1.37 \times 10^6$  CFU/mL)。

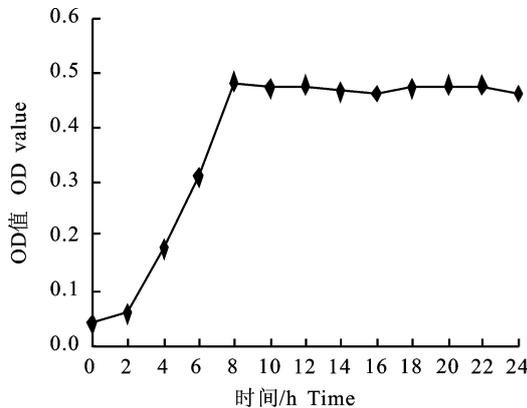


图 1 粪肠球菌的生长曲线

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

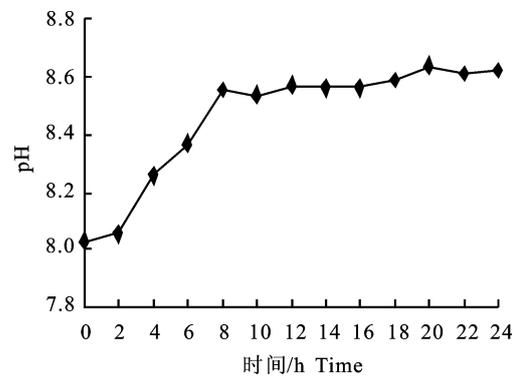


图 2 粪肠球菌生长的 pH 变化

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( $\bar{x} \pm s$ )

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

| 项目<br>Item | 时间/h Time    |              |              |              |
|------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|            | 0            | 1            | 2            | 3            |
| pH 2       | 8.36±0.02 Aa | 7.28±0.01 Bb | 5.71±0.05 Cc | 5.43±0.01 Dd |
| pH 3       | 8.36±0.02 Aa | 8.08±0.02 Bb | 7.38±0.01 Cc | 7.01±0.04 Dd |
| pH 4       | 8.36±0.02 Aa | 8.31±0.01 Aa | 7.92±0.04 Bb | 7.74±0.02 Cc |

注:同行相同小写字母表示差异不显著( $P > 0.05$ ),不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ );不同大写字母表示差异极显著( $P < 0.01$ )。表 2 同。

Note: In the same row, values with the same or no letter superscripts mean no significant difference ( $P > 0.05$ ), while with different lowercase letter superscripts mean significant difference ( $P < 0.05$ ), and with different capital letter superscripts mean significant difference ( $P < 0.01$ ). The same as below.

表 2 粪肠球菌在不同质量分数胆盐中的活菌数密度的常用对数值( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 The viable counts of *E. faecalis* in the bile salt with different concentrations

| w(胆盐)/%<br>Mass fraction<br>of bile salt | 时间/h Time    |              |              |              |
|--|--------------|--------------|--------------|--------------|
|  | 0            | 1            | 2            | 3            |
| 0.2                                      | 8.36±0.02 Aa | 6.52±0.02 Bb | 6.25±0.03 Cc | 6.16±0.03 Cc |
| 0.3                                      | 8.36±0.02 Aa | 6.34±0.02 Bb | 6.15±0.03 Cc | 6.14±0.02 Cc |

## 2.4 体外抑菌性

由表 3 可知,大肠杆菌 O<sub>1</sub> 单独培养和与粪肠球菌混合培养的前 8 h,活菌数无显著差异 ( $P>0.05$ ),其常用对数值分别增加至 9.05( $1.25 \times 10^9$  CFU/mL)和 8.78( $6.20 \times 10^8$  CFU/mL),培养至 10 h 时,单独培养的活菌数极显著高于混合培养的活菌数 ( $P<0.01$ ),培养至 12 h 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  $10^8$  CFU/mL 水平。

由表 4 可知,大肠杆菌 O<sub>78</sub> 单独培养和与粪肠球菌混合培养的前 8 h,活菌数无显著差异 ( $P>0.05$ ),均增加至  $10^8$  CFU/mL,培养至 10 h 时,单独培养的活菌数极显著高于混合培养的活菌数 ( $P<0.01$ ),其常用对数值分别为 9.07( $1.17 \times 10^9$  CFU/mL)和 8.96( $9.1 \times 10^8$  CFU/mL);培养至 12 h 时,单独培养的活菌数常用对数值较高于混合培养的高 0.63 ( $P<0.01$ )。

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 ( $\bar{x} \pm s$ )

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

| 项目<br>Item                 | 时间/h Time |           |           |           |           |              |           |
|----------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------------|-----------|
|                            | 0         | 2         | 4         | 6         | 8         | 10           | 12        |
| 单独培养<br>Individual culture | 8.31±0.01 | 8.37±0.01 | 8.57±0.06 | 8.69±0.04 | 9.05±0.02 | 9.00±0.03 Aa | 9.11±0.02 |
| 混合培养<br>Mixed culture      | 8.31±0.01 | 8.42±0.01 | 8.68±0.06 | 8.79±0.01 | 8.78±0.07 | 8.77±0.02 Bb | 8.98±0.04 |

注:同列不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ ),不同大写字母表示差异极显著 ( $P<0.01$ )。表 4 同。

Note: In the same column with different lowercase letter superscripts mean significant difference ( $P<0.05$ ), and with different capital letter superscripts mean significant difference ( $P<0.01$ ). The same as below.

表 4 粪肠球菌对大肠杆菌 O<sub>78</sub> 活菌数密度常用对数值的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 4 Effects of *E. faecalis* on growth of *E. coli* O<sub>78</sub>

| 项目<br>Item                 | 时间/h Time |           |           |           |           |              |              |
|----------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------------|--------------|
|                            | 0         | 2         | 4         | 6         | 8         | 10           | 12           |
| 单独培养<br>Individual culture | 8.01±0.02 | 8.37±0.02 | 8.70±0.04 | 8.73±0.03 | 9.00±0.01 | 9.07±0.02 Aa | 9.63±0.06 Aa |
| 混合培养<br>Mixed culture      | 8.01±0.02 | 8.34±0.01 | 8.65±0.01 | 8.69±0.01 | 8.99±0.04 | 8.96±0.01 Bb | 9.00±0.02 Bb |

## 3 讨论

### 3.1 粪肠球菌生长曲线及发酵液 pH 的变化

微生物生长曲线一般要经过延迟期、对数期、稳定期和衰亡期 4 个阶段。本试验用胰酪-大豆胨培养基培养粪肠球菌,结果显示粪肠球菌在培养 2 h 后进入对数期,8 h 达到稳定期,与以往研究结果有所差异。李春等<sup>[8]</sup>将粪肠球菌 A30 和 A31 分别接种于各自优化的增菌培养基中,发现 A30 和 A31 分别在培养 10 h 和 16 h 后进入对数期,活菌数达到  $10^9$  CFU/mL。任晓燕等<sup>[9]</sup>用改良的营养肉汤来培养粪肠球菌,发现其在培养 6 h 后进入对数期,16 h 到达稳定期,18 h 后进入衰亡期。侯璐<sup>[7]</sup>研究表明,粪肠球菌在 MRS 培养基中培养 4 h 后进入对数期,8 h 到达稳定期,18 h 后进入衰亡期。刘艳<sup>[10]</sup>用优化后的 MRS 培养基来培养粪肠球菌 FQ15,发现 FQ15 首先利用培养基中的糖元在 2 h 时进入对数期,7 h 达到

稳定期,8~11 h 进入衰亡期,11 h 后又开始利用培养基中的低级脂肪酸继续生长。以上试验结果显示,粪肠球菌的生长特点存在差异,这可能与菌株来源、接种量、培养基以及测定方法等有关,需要进一步研究。益生菌能够定植于肠道上皮并迅速繁殖,形成优势菌群是其发生益生作用的关键。本试验结果显示粪肠球菌于培养 2 h 后就进入对数期,在 8 h 时活菌数最高,稳定性好。说明粪肠球菌适合于微生态制剂的生产菌种。

### 3.2 耐酸特性

耐受胃内低酸环境是益生菌抵达肠道发挥其作用的第一道屏障<sup>[11]</sup>。关于粪肠球菌对低酸环境的耐受性已有一些报道。刘艳<sup>[10]</sup>发现粪肠球菌 FQ15 在 pH 2.5、3.0、3.5 的 MRS 培养基中培养 3 h 后,活菌数密度降低幅度不足一个数量级,仍在  $10^7$  CFU/mL 以上,其中在 pH 2.5 酸性环境中处理 3 h 活菌数密度逐渐减少,在 pH 3.0 和 pH 3.5 的酸性环境中活菌数密度从 1 h 后分别

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>[7]</sup>用人工胃液来评价粪肠球菌的耐酸性,发现其在 pH 2.0 和 pH 3.0 的环境中处理 2 h 后存活率高达 86.1% 和 91.3%,活菌数密度均达到  $10^9$  CFU/mL,对 pH 2.0 和 pH 3.0 的低酸环境表现出良好的耐受性。本试验中粪肠球菌经 pH 2、3、4 的人工胃液处理 3 h 后,活菌数密度均分别极显著降低至  $2.71 \times 10^5$ 、 $1.03 \times 10^7$  和  $5.65 \times 10^7$  CFU/mL。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 2.0~3.5,食物在胃内停留 1~2 h<sup>[12]</sup>,当动物进食后,一方面会在短时间内引起胃内 pH 上升<sup>[13]</sup>,另一方面食糜对益生菌的保护作用会使其受到胃内不利环境的损害程度减小<sup>[14-15]</sup>,因此,该粪肠球菌菌株能够耐受胃内低酸环境,可以通过胃进入肠道。

### 3.3 耐胆盐特性

胆盐具有抑菌作用,能够通过形成高渗透压环境使细菌质壁分离而抑制其生长或致其死亡<sup>[16]</sup>,益生菌能否耐受小肠中的胆盐是其在消化道中存活和发挥益生作用的关键<sup>[17]</sup>。刘艳<sup>[10]</sup><sup>[43]</sup>报道,粪肠球菌 FQ15 在含质量分数为 0.1%~0.7% 胆盐的 MRS 培养基中均可生长,从质量分数为 0.8% 的胆盐开始其生长会受到抑制。侯璐<sup>[8]</sup>研究发现,粪肠球菌在质量分数为 0.2% 和 0.3% 胆盐的 MRS 培养基中处理 3 h 后,活菌数密度从  $10^9$  CFU/mL 分别降低至  $10^7$  和  $10^6$  CFU/mL,而且在培养 6 h 后活菌数仍处于该数量级,说明粪肠球菌对胆盐有一定的耐受性,与本试验研究结果相近。本试验中粪肠球菌经质量分数为 0.2% 和 0.3% 的胆盐处理 3 h 后活菌数密度分别为  $1.46 \times 10^6$  和  $1.37 \times 10^6$  CFU/mL,达到益生菌发挥作用的最低临界值( $10^6$  CFU/mL)。说明粪肠球菌能够耐受胆盐形成的高渗环境。

### 3.4 体外抑菌特性

粪肠球菌抑制有害菌的生长在一些研究中已有相关报道。沈中艳<sup>[18]</sup>从健康猪粪便中分离得到的粪肠球菌对大肠杆菌 O<sub>139</sub>、C83905、C83524、C83529 和伤寒沙门氏菌 O4Hi 以及金黄色葡萄球菌的抑菌环直径均在 10 mm 以上,对金黄色葡萄球菌抑菌环直径甚至达到 17 mm。刘艳<sup>[10]</sup><sup>[46-47]</sup>发现粪肠球菌 FQ15 与大肠杆菌 O<sub>139</sub>、金黄色葡萄球菌混合培养 48 h 时的活菌数密度与其单独

培养时相一致,而大肠杆菌 O<sub>139</sub> 和金黄色葡萄球菌则均在混合培养 24 h 后活菌数密度开始显著下降,甚至在培养至 48 h 和 36 h 时被彻底清除。易维学<sup>[19]</sup>也通过细菌的混合培养来评价粪肠球菌的抑菌作用,却发现粪肠球菌对与其混合培养的大肠杆菌 O<sub>54</sub> 和霍乱沙门氏菌 A<sub>72</sub> 的抑制作用在混合培养 6 h 后已经表现出来,且在 96 h 时仍有一定数量的大肠杆菌 O<sub>54</sub> 和霍乱沙门氏菌 A<sub>72</sub> 存活,并未被彻底清除。另外,王锂韞等<sup>[20]</sup>从酸马奶酒中分离出的 12 株粪肠球菌对金黄色葡萄球菌 B-250 和大肠杆菌 ATCC 10536 均无抑制作用,有 6 株对单核细胞增生性李斯特菌有不同程度的抑制作用,抑菌环直径为 10~24 mm。本试验结果显示,粪肠球菌在与大肠杆菌 O<sub>1</sub> 和 O<sub>78</sub> 混合培养至 10 h 表现出极显著的抑制作用,而该粪肠球菌在培养 8 h 后生长达到高峰,说明只有当粪肠球菌达到较大的菌量时,才会对大肠杆菌 O<sub>1</sub> 和 O<sub>78</sub> 产生一定的抑制作用。综上所述,粪肠球菌对有害菌的抑制作用存在差异。可能有下列几种原因:菌株来源不同或菌株生理阶段不同导致其特性有一定差别;菌株发酵液浓度不同造成抑菌作用的强弱不同;指示菌的来源不同也会导致结果不一致。

## 4 结论

粪肠球菌生长繁殖速度快,能耐受胃肠道环境,对大肠杆菌 O<sub>1</sub> 和 O<sub>78</sub> 有一定的抑制作用,适合作为微生态制剂的生产菌种。

### Reference (参考文献):

- [1] Gibson G R, Fuller R. Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use[J]. The Journal of Nutrition, 2000, 130(2): 391-395.
- [2] Roberfroid M B. Prebiotics and probiotics; are they functional foods[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 2000, 71(6): 1682-1687.
- [3] Kabir S M L, Rahman M M, Rahman M B, et al. The dynamics of probiotics on growth performance and immune response in broilers[J]. Int J Poult Sci, 2004, 3(5): 361-364.
- [4] Nayebpor M, Farhomand P, Hashemi A. Effects of different levels of direct fed microbial (*Primalac*) on growth performance and humoral immune response in broiler chickens [J]. J Anim Vet Adv, 2007, 6: 1308-1313.

- [5] XU Peng(徐鹏), DONG Xiaofang(董晓芳), TONG Jianming(佟建明). Microbial Feed Additives: Major Functions and Its Research Advances[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition(动物营养学报), 2012, 24(8): 1397-1403.
- [6] ZHOU Tingyin(周庭银), ZHAO Hu(赵虎). Diagnosis and illustration of clinical microbiology[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 2001: 34-36 (in Chinese).
- [7] HOU Lu(侯璐). The study of characteristics of *Enterococcus faecalis* from pigs and its effects on growth performance and immunity of piglets[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agriculture University(内蒙古农业大学), 2010: 29 (in Chinese with English abstract).
- [8] LI Chun(李春), ZHANG Dan(张丹), ZHANG Lanwei(张兰威), et al. Study on growing conditions of two cholesterol-reducing *Enterococcus faecalis* [J]. Modern Food Science and Technology(现代食品科技), 2005, 21(4): 28-30 (in Chinese with English abstract).
- [9] REN Xiaoyan(任晓燕), SHAN Genqiang(剡根强), ZHOU Xia(周霞). The mesuration of enterococcus faecium's growth curve[J]. Journal of Animal Science and Veterinary Medicine(畜牧兽医杂志), 2005, 24(6): 10-11 (in Chinese with English abstract).
- [10] LIU Yan(刘艳). Preliminary Studies on the Biological Functions of One Functional Probiotics Strain[D]. Dalian: Dalian Technology University(大连工业大学), 2008: 42, 44 (in Chinese with English abstract).
- [11] Henriksson A, Khaled A K D, Conway P L. Lactobacillus colonization of the gastrointestinal tract of mice after removal of the nonsecreting stomach region[J]. Microb Ecol Health Dis, 1999, 11: 96-99.
- [12] Yu B, Tsen H Y. Lactobacillus cells in the rabbit digestive tract and the factors affecting their distribution[J]. J Appl Bacteriol, 1993, 75: 269-275.
- [13] Hill M J. Role of gut bacteria in human toxicology and Puhannaeology[M]. New York: Wilkins Interseience, 1995.
- [14] Kos B, Suskovic J, Goreta J, et al. Effect of protectors on the viability of *Lactobacillus acidophilus* M92 in simulated gastrointestinal conditions[J]. Food Technol Biotechnol, 2000, 38: 121-127.
- [15] Charteris W P, Kelly P M, Morelli L, Collins J K. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract[J]. J Appl Microbiol, 1998, 84: 759-768.
- [16] Williams R C, Showalter R, Kern Jr F. In vivo effect of bile salts and cholestyramine on intestinal anaerobic bacteria[J]. Gastroenterology, 1975, 69(2): 483.
- [17] Tuomola E, Crittenden R, Playne M, et al. Quality assurance criteria for probiotic bacteria[J]. Am J Clin Nutr, 2001, 73: 386-392.
- [18] SHEN Zhongyan(沈中艳). Screening of Probiotic Lactic Acid Bacteria from Pigs and Study on Fermentation Condition [D]. Wuhan: Huangzhong Agriculture University(华中农业大学), 2007: 28 (in Chinese with English abstract).
- [19] YI Weixue(易维学). Study on the Evaluation of Feed *Enterococcus faecalis* and *Bacillus Subtilis* in Vitro[D]. Wuhan: Huangzhong Agriculture University(华中农业大学), 2010: 37-39 (in Chinese with English abstract).
- [20] WANG Liyun(王锂镭), HE Yinfeng(贺银凤), LI Shaoying(李少英), et al. Study on antibacterial biochemical characterization of *Enterococcus faecalis* in the koumiss [J]. Food Science and Technology(食品科技), 2006, 12: 15-17 (in Chinese with English abstract).