

猪源双歧杆菌的分离纯化及初步鉴定

文钰, 杨汝德

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东 广州 510640)

摘要: 本研究选用双歧杆菌增殖培养基, 从13 d龄和30 d龄未断奶健康仔猪肠道和粪便中分离纯化出双歧杆菌, 进行了各种生理生化鉴定实验, 对其进行了初步鉴定。

关键词: 双歧杆菌; 仔猪; 分离纯化; 鉴定

中图分类号: S816.3; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2007)04-0011-03

Isolation Purification and Identification of Bifidobacterium Pullorum from Piglets Feces

WEN Yu, YANG Ru-de

(College of Bioscience and bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: In the paper, using Bifidobacterium Pullorum multiplication medium, Bifidobacterium Pullorum was isolated and purified from the feces of the healthy piglets which were 30 days old. Their physiological and biological characteristics were also identified.

Key words: Bifidobacterium Pullorum; piglets; isolate; identify

双歧杆菌作为一种有益菌, 在医学保健和食品工业上已得到较广泛应用, 而在畜禽使用的多种微生态制剂中, 选用双歧杆菌作为生产菌种的报道甚少, 这与该菌严格厌氧、对营养要求较为苛刻以及保存期短等因素有一定关系。国内对动物源双歧杆菌的研究起步较晚, 目前也大多集中于对该菌的分离、鉴定及在体内不同肠段的数量分布上, 而按照特定要求来选育优良菌种, 研究菌株生物特性的工作开展甚少。

我国王世荣^[1]和Fuller^[2]等均指出, 作为动物益生菌选用的菌种, 必需具备耐酸、抗胆盐及肠上皮细胞具有黏附性等特点, 并且菌株最好来源于本种动物, 这样更有利于其在肠道中的定植。本研究选用双歧杆菌增殖培养基, 从13 d龄和30 d龄未断奶健康仔猪肠道和粪便中分离纯化出双歧杆菌B1、B2, 进行多种生理生化鉴定实验, 初步鉴定其为双歧杆菌属。

1 猪源双歧杆菌的分离、纯化

1.1 厌氧培养方法

菌种分离初期采用在干燥器中将烛缸法与焦性没食子酸法相结合的厌氧方法进行。

将20 g NaOH溶于100 ml水后置于干燥器内, 点燃干燥器内蜡烛后在溶液中加入3 g焦性没食子酸, 盖上涂有凡士林密封干燥器盖子, 蜡烛耗尽氧气熄灭

收稿日期: 2007-1-14

后将干燥器置培养箱中^[3]。

1.2 培养基的选择

(1) PTYG培养基^[4]

胰蛋白胨5 g, 大豆蛋白胨5 g, 酵母浸膏10 g, 葡萄糖10 g, 半胱氨酸盐酸盐1 g, 吐温801 ml, 盐溶液40 ml, 蒸馏水1000 ml。

调pH 6.8~7.0, 121 °C灭菌20 min后加硫酸新霉素30~200 µg/ml。

盐溶液制备: K₂HPO₄ 1.0 g, MgSO₄·7H₂O 0.48 g, KH₂PO₄ 1.0 g, 无水CaCl₂ 0.2 g, NaCl 2.0 g, NaHCO₃ 10.0 g, 蒸馏水1000 mL。

在300 ml蒸馏水中加入CaCl₂和MgSO₄·7H₂O直至溶解; 然后再加500 ml水, 一边搅拌一边缓慢加入其他盐类, 继续搅拌到溶解; 最后加入200 ml蒸馏水, 混合后贮存在4 °C备用。

(2) 双歧杆菌增殖培养基(本校微生物实验室提供)。

葡萄糖20 g, 胰蛋白胨5 g, 大豆蛋白胨5 g, 牛肉膏10 g, 酵母提取物10 g, 牛肉膏10 g, 低聚果糖5 g, K₂HPO₄ 2 g, L-半胱氨酸盐酸盐1 g, 蒸馏水1000 mL。

调pH 7.0, 121 °C下灭菌20 min, 趁热加入硫酸新霉素30~200 µg/ml。

(3) PTYG改良培养基

在1 L的PTYG培养基加10 g牛肉浸膏和5 g低

聚果糖后调 pH 至 7.0, 115 °C 灭菌 20 min。

1.3 分离纯化方法

分别取 15 d 龄和 30 d 龄健康小猪的肠道内容物或粪便少许, 在厌氧培养箱中用镊子夹碎, 置入 50 ml 的蒸馏水 (内含玻璃珠) 中, 摇匀后分别取 5ml 接入 PTYG 培养基的三角瓶中, 37.5 °C 厌氧培养 24~48 h。

双歧杆菌为革兰氏阳性菌, 不形成芽孢, 不运动, 不抗酸, 厌氧, 在有氧条件下不能在平皿培养基上生长, 最适生长于 37~41 °C, 最低为 25~28 °C, 最高为 43~45 °C, 初始生长最适 pH 值为 6.5~7.0^[5]。双歧杆菌经 48~73 h 培养后多数形成直径为 0.5~1 mm、凸起、边缘整齐、乳白色或灰白色不透明的菌落, 菌体宽约 0.5 μm, 长度在 1~6 μm 之间, 有弯曲和分叉现象, 形成双歧杆菌特有的“V”或“Y”结构^[6]。挑选平板上菌落较小、光滑、凸圆、边缘整齐、白色或乳白色不透明、质地柔软的特征菌落, 进行革兰氏染色, 挑选革兰氏阳性和显微镜下具有双歧杆菌形态特征, 如菌体形状不太规则, 呈弧形、两端大小不一、V 形或 Y 形的菌落, 接液体培养基试管中培养, 再挑螺旋生长于试管底部的菌株涂平板 (每板 100 μl 菌液), 进行需氧与厌氧、pH 4.3 与 pH 7.0 条件下培养, 选取只在厌氧和 pH 7.0 条件下培养生长的菌落。

2 猪源双歧杆菌的初步鉴定

2.1 猪源双歧杆菌的初步鉴定

2.1.1 形态学鉴定

取典型菌落和菌液制片, 革兰氏染色, 用荧光生物显微镜观察菌体形态、拍照。

2.1.2 猪源双歧杆菌的生理生化鉴定^[7-9]

将待测菌株做系列生理生化鉴定, 如接触酶试验、M-R 甲基红试验、吲哚试验、脲酶试验、硫化氢产生与明胶液化试验、硝酸盐还原反应、精氨酸产氨试验、产酸产气试验和糖发酵试验。

(1) 接触酶(过氧化氢酶)试验

取生长状态良好的待测菌株菌落涂于干净的载玻片上, 在其上加 1 滴 2% H₂O₂, 观察是否产生气泡, 如有气泡产生则为阳性, 反之则为阴性。

(2) M-R 甲基红试验

实验培养基为: 蛋白胨 0.5%, 葡萄糖 0.5%, K₂HPO₄ 0.5%, pH 7.0~7.2, 分装试管, 115 °C 下灭菌 20 min。接待测菌株菌种于培养基中适温培养 2 d、4 d、9 d 后观察。观察时加入 1 滴甲基红试剂在培养基中, 红色为阳性, 黄色为阴性。

(3) 吲哚试验

将待测菌株接种于以下培养基: 脱脂牛奶 10%, 酵母膏 0.5%, 蛋白胨 1%, Cys 0.01%, Asp 0.03%, pH 7.2, 置于 37.5 °C 厌氧培养, 分别于 2 d、5 d、7 d 时检测吲哚生成情况。检测时沿管壁徐徐加入 3~5 滴吲哚试剂, 观察试剂和培养液界面有无颜色反应, 红色者为阳性, 黄色则为阴性。

(4) 脲酶试验

将待测菌株接种到营养琼脂面上培养 3~7 d 后, 于斜面内加入无菌生理盐水 4 ml, 做成菌悬液, 将其倒入相应无菌试管内, 于试管内加入一滴酚红指示剂, 调 pH 7.0, 使酚红刚转为黄色, 再往此液中加入少许结晶尿素, 若几分钟内变碱, 酚红指示剂变红, 则为阳性, 反之为阴性。

(5) 硫化氢生成实验与明胶液化试验

培养基: 牛肉膏 0.75%, 蛋白胨 2.5%, NaCl 0.5%, 明胶 10~12 g, 10% FeSO₄·7H₂O 0.5ml, 蒸馏水 100ml, pH 7.0, 113~115 °C 高压蒸汽灭菌 15~20 min, 在明胶尚未凝结时, 加入新制备的 FeSO₄·7H₂O, 用无菌试管分装, 培养基高度为 4~5 cm, 立即置冷水中冷却凝固。将双歧杆菌待测菌株穿刺接种并以凡士林封口, 20 °C 厌氧培养, 1 支不接种的试管作空白对照。培养 2 d、7 d、10 d、14 d 和 30 d 的试管, 于 20 °C 下观察双歧杆菌的生长情况和明胶是否融化。如双歧杆菌已经生长, 明胶表面无凹陷, 且为稳定的凝块, 则为明胶水解阴性, 若明胶凝块部分或者全部在 20 °C 以下变为可流通的液体, 则明胶水解阳性。一周后培养基变黑者为产 H₂S 试验阳性, 不变者为阴性。

(6) 硝酸盐还原反应

将双歧杆菌待测菌株接种于以下培养基: KNO₃ 0.02%, 蛋白胨 0.5%, 牛奶 10%, 酵母膏 0.03%, Asp 0.04%, Cys 0.01%, 调节 pH 至 6.8, 置于 37 °C 厌氧培养, 在 3 d 和 5 d 时进行检测。检测时取培养液约 0.5 mL 于干净试管中, 先后加入格里斯试剂甲液、乙液各 2 滴, 如无红色出现, 则加 1~2 滴二苯胺试剂, 若出现蓝色 (阴性), 此菌株进行下一步检测, 同时对培养液进行镜检, 菌生长良好, 且空白对照管加入格里斯试剂无红色出现时, 以上检测结果有效。

(7) 精氨酸产氨试验

接种待测菌株于含精氨酸的培养基中, 同时接种于不含精氨酸的培养基作为对照。置室温培养 1~3d。检测时取已生长好的培养液少许置于比色盘内, 加奈氏试剂数滴, 直至产氨时出现橙黄或者黄褐色沉淀。

(8) 产酸产气试验

在 1 L PY 基础培养基内加入 30 g 葡萄糖和 0.5 ml

吐温 80, 加入 1.6 g/100 mL 的溴甲酚紫 1.4 ml 做指示剂, 再加入 6 g 琼脂做成软琼脂柱。分装试管, 高度大约 4~5 cm。置于 112 °C 灭菌 20~30 min。用较大量生长旺盛的双歧杆菌菌种进行穿刺接种, 混匀后在上面加盖一层约 7 mm 的 2% 琼脂, 1 支不接种的试管设为空白对照, 置于 30 °C 培养。培养基中指示剂变黄表示产酸; 软琼脂柱内产生气泡或者出现将 20% 琼脂层向上顶的现象, 表示产气。

(9) 糖发酵试验

利用生化鉴定管对双歧杆菌进行 16 种糖的发酵反应实验。16 种糖分别是木糖、纤维二糖、D-核糖、半乳糖、果糖、乳糖、麦芽糖、淀粉、糊精、鼠李糖、甘露醇、葡萄糖、山梨醇、蔗糖、水杨素、阿拉伯糖。具体操作方法: 挑取双歧杆菌待测菌株新鲜菌苔接种与普通肉汤中 37 °C 培养 18~24 h 后, 取 0.08 ml 的肉汤培养基加入到每种微量生化管内, 将已接种的生化管套上相配套的无菌塑料帽, 直立于塑料短架内, 37.5 °C 培养箱中培养, 24 h 后观察结果。

3 结果与讨论

3.1 猪源双歧杆菌的分离纯化结果

从 15 d 龄和 30 d 龄健康小猪肠道内容物和粪便中分离得到 2 株待选菌株 (B1, B2)。对于猪源双歧杆菌, 通过菌落及菌体形态可以看出, 猪源双歧杆菌菌落微小, 光滑, 乳白色, 呈半透明或不透明, 边缘整齐, 凸起。菌体革兰氏染色呈阳性, 较小并呈多态性, 菌体不规则, 有弯曲呈弧形、两端大小不一的, 也有菌体较短的, “V”字形和“Y”字形少见。实验中 B1 生长状况更好, 故将其用于鉴定研究。

待测菌株 B1 革兰氏染色阳性, 显微镜下的菌体形态图见图 1, 无芽孢, 不规则, 较小并呈多态性。

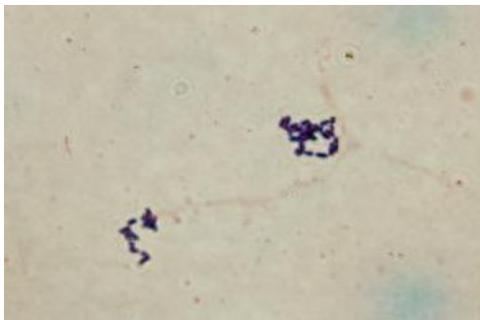


图 1 B1 菌体形态 (×1000 倍)

3.2 猪源双歧杆菌的生理生化特性鉴定结果

待测菌株不产生过氧化氢酶, M-R 甲基红试验阳性, 不产生吲哚, 脲酶试验阴性 (不分解尿素), 不产生硫化氢, 不液化明胶, 不还原硝酸盐, 精氨酸产

氨试验阴性, 发酵葡萄糖产酸不产气, 符合双歧杆菌特性, 鉴定结果见表 1。双歧杆菌糖发酵实验结果与双歧杆菌属内种的生理生化特征表中球双歧杆菌特性 (见表 2) 符合, 初步判断其为球双歧杆菌属。

表 1 双歧杆菌糖发酵实验结果

菌株	B1	B2	菌株	B1	B2
木糖	-	-	蔗糖	+	+
纤维二糖	-	-	水杨素	-	-
D核糖	+	+	阿拉伯糖	-	-
半乳糖	+	+	接触酶实验	-	-
果糖	+	+	甲基红实验	+	+
乳糖	+	+	吲哚实验	-	-
麦芽糖	+	+	脲酶试验	-	-
淀粉	-	-	硫化氢生成实验	-	-
糊精	-	-	明胶液化试验	-	-
鼠李糖	-	-	硝酸盐还原反应	-	-
甘露醇	+	+	精氨酸产氨试验	-	+
葡萄糖	+	+	葡萄糖产酸试验	+	+
山梨醇	+	+	葡萄糖产气实验	-	-

表 2 球双歧杆菌的生理生化特征表

D核糖	阿拉伯糖	乳糖	纤维二糖	山梨醇	淀粉	麦芽糖
+	-	+	D	D	-	+
木糖	果糖	半乳糖	蔗糖	甘露醇	水杨苷	
-	+	+	+	d	+	

注: +为阳性反应; -为阴性反应; d为某些菌株阳性。

参考文献

[1] 王世荣. 益生菌研究进展[J]. 中国微生态学杂志, 1990, 2(2): 82-86

[2] Fuller F.A review-probiotics in man and animals[J]. Journal of Applied Bacteriology, 1989, 66: 365-378

[3] 杨汝德, 罗立新, 唐旭蔚. 微生物学实验[M]. 广州: 华南理工大学出版社

[4] 冬秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册 (第 1 版) [M]. 北京: 科学出版社. 2001

[5] 杨汝德. 现代工业微生物学教程[M]. 高等教育出版社, 2006

[6] 王建设, 王永坤, 朱国强. 猪源双歧杆菌筛选及生物特性参数测定[J]. 扬州大学学报(自然科学版), 2000, 3(3): 23-27

[7] 凌代文, 东秀珠. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998

[8] 雷孝等. 双歧杆菌的分离与鉴定[J]. 湖南农学院学报. 1995, (2): 169-171

[9] 和文祥等. 双歧杆菌的分离、纯化与鉴定[J]. 西北农业学报. 1999, (8): 97-101