

耐氧双歧杆菌的分离和鉴定

许本发 王艳萍 陈莹

(天津轻工业学院食品工程系 天津 300222)

摘要 从中年人粪便中分离到 136 株可疑双歧杆菌,通过耐氧力测定获得一株耐氧性菌,经属和种的系统生理生化鉴定,确认为长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)。小范围饮用实验结果表明,该菌对便秘有疗效。

关键词 双歧杆菌,分离,鉴定

自 1899 年 Tissier 从健康母乳婴儿粪便中分离到双歧杆菌后,许多微生物学工作者对双歧杆菌进行了多方面的研究。研究结果表明^[1],双歧杆菌是一类肠道有益菌,保健作用很强。例如①整肠作用,调整肠道内的 pH 值,促进肠道菌群正常化和肠道蠕动,治疗腹泻,改善便秘等;②抑制肠道内有害细菌的繁殖,抑制氨、胺、酚等有害物质的产生;③预防肠道感染,降低患病率;④在肠道内合成维生素,改善蛋白质消化吸收;⑤免疫促活作用等。研究结果还表明,双歧杆菌在健康婴儿肠道内占优势,接近纯培养的程度,幼儿中随年龄的增长,这属菌的含量相对来说有所减少,可仍处于优势菌的地位,在老人和肠道疾病患者中减少更为显著。所以人们考虑将双歧杆菌添加到食品中以补充肠道中菌量的不足。经过半个多世纪的努力,这个理想终于在 1968 年变为现实^[2]。其后,双歧杆菌在食品中的应用迅速发展起来。但因这类细菌属专性厌氧菌,对氧气非常敏感,这不仅给生产厂家在技术管理上带来困难,而且要长时间维持食品中双歧杆菌的活菌数也不易。因此,很早以前就有人^[3]进行了耐氧双歧杆菌的研究。作者在对普通双歧杆菌进行了分离鉴定^[1]之后,又对耐氧双歧杆菌的分离鉴定做了初步尝试,获得了一个在存在氧气的普通环境条件下能生长繁殖的菌株。

1 材料和方法

1.1 菌株

分离菌株编号为 TQ21-2-2,来自中年人粪便。

1.2 分离方法

用中年人粪便作为分离样品,用分离普通双歧杆菌的方法在选择性平板上于厌氧条件下进行稀释涂布分离培养,挑取大量单个可疑菌落,对经过革兰氏染色和显微镜个体形态观察初步认为是双歧杆菌者,接入少量灭菌“还原”乳培养基中,仍在厌氧条件下进行传代和扩大培养。

1.3 耐氧力试验

1.3.1 不同氧分压下平板培养试验:先将分离出的可疑双歧杆菌菌落扩大培养物分别编号,再取双歧杆菌选择性平板(直径9cm)若干个,每个平板画分成20个小区,每个小区做一个记号。然后将全部分离菌株分别接种在相应编号的小区内。此为第一批平板。以同样的方法做第二批、第三批……第十批平板。各批分别放在一个厌氧培养罐中,各罐的真空度分别抽到720、670、620、……270mm汞柱,然后均补充无氧混合气体至常压,37℃培养3天,观察生长情况。

1.3.2 大气条件下深层培养试验:取在氧分压较高的平板上生长的分离菌株扩大培养物,按10%比例接种在盛有10ml灭菌“还原乳”培养基的15×150mm试管中,于大气条件下培养。选取凝乳时间较短的菌株,并在同样条件下,连续进行多次传代培养,以提高分离菌株对氧气的适应力。前后两次传代的时间间隔未能做到一致。

1.3.3 不同含氧量条件下的培养试验:取同一瓶试验菌株培养物按相同比例接种在5瓶相同的培养基中,于5种含氧量不同的条件下进行培养,以观察试验菌株的耐氧力:①厌氧培养。厌氧培养箱中,抽真空度至负压720mm汞柱,充入N₂、CO₂、H₂混合气体至常压;②深层培养。培养液深20cm,于适宜温度下静置于空气中;③浅层培养。培养液深10cm,同样温度下静置于空气中;④薄层培养。培养液深0.5cm,其它同上;⑤摇床培养。300ml三角瓶装50ml培养液,四层纱布封口,往返式摇床,摇速50次/分,摇幅10cm。在培养期间定时取样,测定培养液中的活菌数、pH值和酸度。

1.4 鉴定方法

根据有关专著和文献^[1,5,10],参照作者曾经采用的普通双歧杆菌的鉴定方法^[4],观察试验菌在选择性平板上的菌落形态特征、菌体形态特征、革兰氏染色性状,进而进行属和种的生理特性鉴别试验,用色谱法进行代谢产物分析。

2 结果

2.1 菌落形态特征

在双歧杆菌选择性鉴别平板上,厌氧条件下37℃培养3天,菌落直径1~2mm,凸起、圆形、边齐、乳白色、不透明、有光泽、质地软(图1)。

2.2 个体形态特征

TQ21-2-2菌株在适宜培养基上培养后,菌体呈棒状、弯曲、Y字形等,分叉明显,出现双歧杆菌特有的形态(图2)。

2.3 耐氧力

2.3.1 在平板上的耐氧力:不同氧分压下平板培养试验结果表明,在真空度抽至720mm汞柱的平板上多批取粪便涂布分离培养能生长的可疑双歧杆菌菌落,在670mm汞柱培养的平板上显著减少,而在570mm汞柱平板上全部消失,在620mm汞柱平板上能生长的菌落只有少部分,而且生长的均较弱小。本试验从中选取了136个菌落,于厌氧条件下进行扩大培养,作为分离筛选的原始菌株。

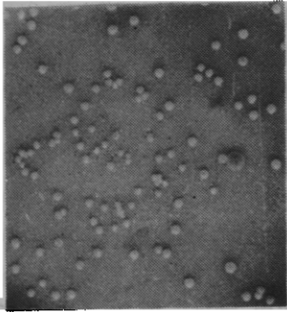


图1 TQ21-2-2菌株菌落形态(厌氧培养3天)
Fig.1 The shape of the strain TQ21-2-2 colony(cultured for 3 days)

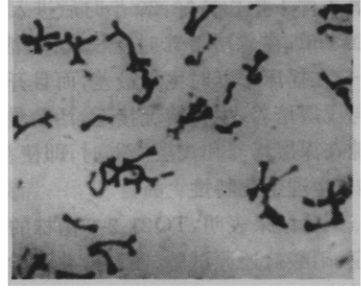


图2 TQ21-2-2菌株个体形态(1000 \times)
Fig.2 The cellular morphology of pure culture TQ21-2-2

2.3.2 在深层培养基中的耐氧力:136个原始菌株经过深层培养,72小时能凝乳的只有25株,其余菌株,有的凝乳时间超过了72小时,有的5天不凝乳。保留25株,其余全部弃去。将这25株继续传代培养,传到第五代,只余下2株。自1989年9月17日起至1990年10月16日止,共传了63代,至此只余下TQ21-2-2这一个菌株。凝乳时间从起初的72小时,缩短到18--22小时。

2.3.3 在不同含氧量条件下的耐氧力:取TQ21-2-2菌株培养物进行厌氧培养、深层培

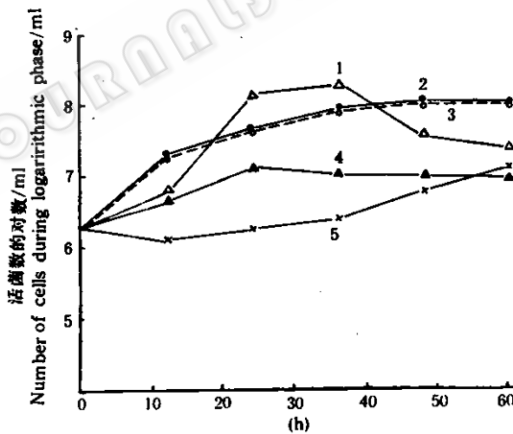


图3 TQ21-2-2菌株不同方式培养的生长曲线

Fig. 3 Growth curve of the identified strain by different cultured conditions

1. 厌氧培养;2. 深层培养;3. 浅层培养;4. 薄层培养;5. 摇床培养
1. Anaerobic culture;2. Deep culture;3. Shallow culture;
4. Thin-layered culture;5. Shaking culture

养、浅层培养、薄层培养和摇床培养,生长曲线如图3。由图3可以看出,菌株TQ21-2-2在

厌氧条件下生长良好,20小时后进入生长对数期,活菌量比其他培养方式都大,可达 2.0×10^8 /ml;在薄层培养时生长较差,活菌量只能达到 1.4×10^7 /ml,仅为厌氧培养的十分之一;在摇床培养时生长最差,而且开始培养的一段时间内,活菌量有下降的趋势;深层培养与浅层培养,生长情况接近,活菌量也比较大,20小时后也可进入对数期生长。可见该菌株在深层培养和浅层培养时,即使在有氧的条件下也是能够生长的。

2.4 生理生化特性

试验结果表明,TQ21-2-2菌株的单兰氏染色呈阳性反应,卵磷脂酶反应、过氧化氢酶反应、硝酸盐还原试验、明胶液化试验、吲哚产生试验、联苯胺反应,由葡萄糖产气试验均呈阴性,不分解鼠李糖、甘油、赤藓醇、侧金盏花醇、卫矛醇、纤维二糖、甘露醇、水杨苷、淀粉、甘露糖、糖原、菊粉、山梨醇、肌醇、七叶苷、苦杏仁苷,能分解阿拉伯糖、木糖、核糖、乳糖、松三糖、海藻糖、棉子糖、蔗糖、麦芽糖、葡萄糖、果糖、半乳糖、蜜二糖,而对山梨糖、糊精是分解迟缓。

代谢产物分析结果表明,TQ21-2-2菌株产生乙酸和乳酸,不产生甲酸(没测出)、丙酸、丁酸等挥发性脂肪酸。

根据以上试验结果可得到两点结论:其一,TQ21-2-2菌株的特征与双歧杆菌属和长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)的特征^[1,5,10]相符,因此,菌株TQ21-2-2可鉴定为长双歧杆菌;其二,TQ21-2-2菌株在有氧存在的普通空气环境中,于深层培养或浅层培养的条件下可以正常生长,因此,TQ21-2-2菌株是耐氧性双歧杆菌。

3 讨论

有关耐氧双歧杆菌的研究,自60年代已有报道^[10]。de Vries(1965)认为,耐氧性的双歧杆菌变种在自然界中是客观存在的。他根据这些菌的生长情况,将其分为三个类型:一型耐氧性最强,即使从厌氧培养转为振荡培养也生长良好,这类菌有较弱的过氧化氢酶活性,能将处在有氧状态下产生的过氧化氢加以分解;二型耐氧性较弱,当从厌氧培养转为好氧培养时,增殖速度减慢,原因系由过氧化氢积累造成。过氧化氢对碳水化合物代谢系统中的果糖-6-磷酸磷酸酮酶活性,有不可逆的阻害作用。当添加过氧化氢酶时,增殖情况可获得改善;三型耐氧性最差,当从厌氧培养转为好氧培养时立即停止生长,即使添加过氧化氢酶也不能改善生长情况,但若添加胱氨酸或抗坏血酸,降低基质的氧化还原电位,有促进生长的作用。根据de Vries的观点,TQ21-2-2菌株与他的二型耐氧性双歧杆菌相近,原因是:①在氧分压高的环境中,例如平板表面培养、摇床培养等均不见生长,或生长极其微弱,生长时间过长;②作者曾在胱氨酸浓度不同的正常基质中观察TQ21-2-2菌株的生长情况,均未见到生长情况得到改善的迹象;③从厌氧培养转入有氧条件下培养,虽然能生长,但速度变慢,活菌量变少;④在有氧环境中长时间之内进行多次传代培养后,大大缩短了凝乳时间,提高了生长速度,这是经过驯化培养提高了该菌株对氧气的适应力和耐受力的结果。

为了观察TQ21-2-2菌株的应用效果和保健作用,曾在少量试验者中进行了饮用试验,结果是使饮用者粪便中双歧杆菌检出量提高了2.7--9.8倍,便秘全部得以解除。

本试验采用了单个菌落分离、耐氧菌落筛选、抗氧能力驯化、菌株特性鉴定和保健作

用观察等五个步骤前后接合,穿插进行、相互补充的实验方案。各试验步骤的结果均表明: TQ21-2-2 菌株是一耐氧性双歧杆菌,但由于试验中加入了抗氧能力的驯化,所以 TQ21-2-2 菌株与在自然界(指粪便)中的状态已有所不同。

致谢 中国科学院微生物研究所进行菌株的代谢产物分析;本院中心实验室倪丽琴拍摄相片;乳品02班全体学生、培训中心工业发酵班杜成清、王卫,食品专业87级蔡颖、宋永祚、88级崔志强、杨冬波等参加了部分工作,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 本門通,光岡知足共編,ヒフイヌス菌,東京:株式会社ヤクルト,1978,97-184.
- [2] 津郷友吉,中西武雄,大塚友三編,乳業ハンドブック,東京:創倉書店,1973,187-189.
- [3] Mayer J B et al, Z. *Kinderheilk*, 1964, **91**:222.
- [4] 许本发,等,中国乳品工业,1987, **12**(3):191-197.
- [5] 光岡知足,腸内菌の世界,東京:業文社,1980,103.
- [6] Vittorio S, Ed, Peter H A S et al, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, London: The Williams & Wilkins Co., 1986, 1418-1434.
- [7] 光岡知足,乳技協資料,1983, **32**(6):15-25.
- [8] Morrison R, Ed, Buchanan R E, Gibbons N E, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Baltimore: The Williams & Wilkins Co., 1974, 926-935.
- [9] 石田資作, ジャパンフードサイエンス, 1981, (1):21-29.
- [10] 馬田三夫, *New Food Industry*, 1982, **24**(1):63-70.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF AN OXYGEN-TOLERANT STRAIN OF *BIFIDOBACTERIUM* FROM HUMAN FECES

Xu Benfa Wang Yanping Chen Ying

(Tianjin Institute of Light Industry, Food Engineering Department, Tianjin 300222)

Abstract This paper reports 136 strains suspected to be species of the genus *Bifidobacterium* isolated from adult human feces. Through detection of the ability to tolerate molecular oxygen in cultural environments, we obtained an oxygen-resistant strain TQ21-2-2 according to the Bergy's manual. It was identified as *Bifidobacterium longum*. A limited number of drinking the beverage, the experiment also using this strain in milk as a starter revealed that this strain has been found useful for treating cases with constipation.

Key words *Bifidobacterium*, Isolation, Identification