

酒窖底泥中丁酸梭菌的分离及其特性研究*

谢树贵 戴青 赵述森 梁运祥**

(农业微生物学国家重点实验室 华中农业大学生命科学技术学院 武汉 430070)

摘要 通过厌氧培养法从酒窖底泥中分离得到14个菌株,生理生化实验和16S rDNA序列分析鉴定出2株丁酸梭菌。选取丁酸梭菌菌株B1研究了其生长特性和安全性,体外研究表明其具有较强的耐酸、耐胆汁和耐抗生素能力,并能显著抑制常见肠道致病菌的生长,具有作为饲用微生态制剂应用的潜力。

关键词: 丁酸梭菌, 分离, 鉴定, 益生菌

中图分类号: Q939.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654(2007)06-1047-05

Study on Isolation of *Clostridium butyricum* from Pits Sludge and Its Characteristics*

XIE Shu-Gui DAI Qing ZHAO Shu-Miao LIANG Yun-Xiang**

(State Key Laboratory of Agriculture Microbiology, College of Life Science & Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract 14 strains were isolated from pits sludge by anaerobic cultivation, two *Clostridium butyricum* strains were identified by physiological and biochemical experiments and the sequence analysis of 16S rDNA. The physiological characteristics and security of *Clostridium butyricum* B1 were studied, *in vitro* research indicated it was tolerant against low pH, bile concentration and antibiotics and has antagonism effects against pathogens.

Key words: *Clostridium butyricum*, Isolation, Identification, Probiotics

丁酸梭菌,即酪酸梭菌,是1933年由日本千叶医科大学宫入近治博士首先发现并报告的,因此又名宫入菌。日本最初将其用作整肠剂,广泛用于肠道菌群失调、急慢性腹泻、肠易激综合症、抗生素相关性肠炎等疾病的治疗,现也将其用于畜禽饲料添加剂替代抗生素,发挥防病促长的作用。丁酸梭菌形成内生芽孢,具有耐高温、耐酸、耐胆盐、耐部分抗生素等特性,作为饲料添加剂和兽药,与非芽孢类活菌制剂相比,具有更为广阔的应用前景^[1-2]。

由于耐药性问题,抗生素在饲料中应用受到严格的限制,动物微生态制剂被认为是取代抗生素最具潜力的发展方向。丁酸梭菌产生内生芽孢,在生产加工和储藏过程中优势明显,在饲料工业中的应用前景非常诱人(孔清.浙江大学博士学位论文,2006)。近年来国内对丁酸梭菌的研究多集中在医学方面,饲料方面的研究也逐渐升温,菌种多分离自人和动物肠道,许多其它环境的潜在优良菌株还有

待发现。本研究中,作者从酒窖底泥中分离得到性状优良的丁酸梭菌,并在体外研究了其耐酸、耐胆盐、耐抗生素和拮抗致病菌特性,为丁酸梭菌的分离应用提供了一定依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 样品采集 湖北省劲牌酒业有限公司刘仁八镇基酒基地酒窖底泥。

1.1.2 菌种 猪大肠杆菌(*Escherichia coli*)K88和肠炎沙门氏菌(*Salmonella Enteritidis*)O4Hi由华中农业大学农业微生物国家重点实验室提供。

1.1.3 培养基 梭菌增殖培养基(RCM培养基):酵母浸膏3g、牛肉浸膏10g、胰蛋白胨10g、葡萄糖5g、可溶性淀粉1g、氯化钠5g、三水合乙酸钠3g、半胱氨酸盐酸盐0.5g、0.5%美蓝0.2mL、琼脂1.5g(固体培养基时用)、蒸馏水1000mL,调节pH 7.1±

* 浙江省重大科技攻关项目(No. 2004C12610)

** 通讯作者 Tel: 027-87281040, E-mail: fa-lyx@163.com

收稿日期: 2007-02-12, 修回日期: 2007-04-28

0.1, 1×10^5 Pa, 灭菌 20 min 备用。

梭菌选择性培养基(TSN 培养基): 胰蛋白胨 15 g、酵母浸粉 10 g、亚硫酸钠 1 g、枸橼酸铁 0.5 g、新生霉素 0.02 g、多粘菌素 0.05 g、琼脂 0.5 g(配固体培养基时用), pH 7.2, 1×10^5 Pa, 灭菌 20 min 备用。

产酸指示培养基、明胶液化试验、密二糖、松三糖、淀粉水解试验和石蕊牛乳试验培养基参照《伯杰细菌鉴定手册》^[2]和《常见细菌系统鉴定手册》配制^[3]。

1.2 实验方法

1.2.1 分离培养方法: 本实验中, 运用 825-A 型厌氧菌培养罐(沈阳市第五人民医院生产)来进行厌氧菌液体培养、分离和稀释平板计数。丁酸梭菌的分离: 1)取酒窖泥样品 10 g, 加入到 90 mL 无菌水中, 置 80℃水浴 10 min, 杀死非芽孢菌, 转入梭菌增殖液体培养基, 37℃厌氧培养 48h。2)将上述培养液置 80℃水浴 10 min, 转入梭菌选择性液体培养基, 37℃厌氧选择性富集培养 48h。3)梯度稀释培养液, 涂布梭菌选择性培养基平板, 置入厌氧培养罐, 37℃培养48h。4)影印好氧和厌氧培养, 除去好氧和兼性厌氧菌, 得到严格厌氧菌。5)选取培养特征、菌落形态和显微形态均符合丁酸梭菌培养特征的菌株进行生理生化鉴定和 16S rDNA 序列分析鉴定^[4-5]。

1.2.2 分离菌株生理生化实验鉴定: 明胶液化试验、密二糖、松三糖、淀粉水解试验和石蕊牛乳试验参照《伯杰细菌鉴定手册》^[2]和《常见细菌系统鉴定手册》^[3]进行。

1.2.3 分离菌株 16S rDNA 序列分析鉴定: 提取纯化细菌总 DNA, 设计 PCR 引物分别为: P0: 5'-GAGTTTGATCMTGGCTCAG-3', PC3: 5'-CTAHAGGG-TATCTAATCCT-3'。PCR 程序为: 95℃ 5 min, 94℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 1 min, 30 个循环后 72℃延伸 10 min。PCR 产物的回收纯化并测序^[4-5]。

1.2.4 丁酸梭菌生长特性测定: 1)生长温度的测定: 增强梭菌培养基接种后分别置于 4℃、20℃、30℃、37℃、41℃、45℃、65℃环境中, 观察生长情况。2)生长曲线、pH 曲线的测定: 取 25 只 RCM 液体培养基管, 同时接种 1% 菌液后置 37℃厌氧培养, 培养过程中, 每隔 2h 取出一支测定其 pH 值、 OD_{600} , 绘制生长曲线、pH 曲线。

1.2.5 菌株的安全性评价: 安全性评价采用急性毒性试验, 参照 GB 15193.3-2003 最大耐受剂量法进行。取体重在 18 g~22 g 的小鼠雌雄各 15 只, 观察 3d 后, 一日内分 3 次经口给予 0.25 g/mL 菌液 0.4 mL(相当于 15000 mg/kg 体重), 连续 14d 观察小鼠是否有中毒和死亡现象。

1.2.6 耐药性实验: 接种 1% 菌液于常用浓度抗生素 RCM 培养基中, 置 37℃厌氧培养 24h, 观察生长情况。

1.2.7 耐酸性实验: 取 0.2 mL 离心洗涤菌悬液接种于含有 2 mL 无菌磷酸缓冲液的 pH 1.0、pH 2.0、pH 3.0 厌氧试管中, 置 37℃培养箱中, 分别于 0h、1h、2h、3h 进行活菌计数, 计算存活率^[6-8]。

1.2.8 耐胆汁实验: 取 0.2 mL 离心洗涤菌悬液接种于含 0.1%、0.3%、0.5% 猪胆盐的 2 mL RCM 液体培养基中。置 37℃培养箱中, 分别于 0h、1h、2h、3h 进行活菌计数, 计算存活率^[6-8]。

1.2.9 肠道致病菌体外拮抗实验: 致病菌的单独培养: 将 0.1 mL 活化好的致病菌菌悬液转接入 9.9 mL RCM 液体培养基, 置 37℃静止培养, 分别在 0h、4h、8h、12h、16h、20h、24h、36h、48h 取菌液测活菌数和 pH 值。

丁酸梭菌和致病菌混合培养: 活化好的丁酸梭菌和致病菌菌液均稀释到 10^4 cfu/mL ~ 10^5 cfu/mL, 各取 0.1 mL 接种到 9.8 mL RCM 液体培养基中, 置 37℃静止培养。分别在 0h、4h、8h、12h、16h、20h、24h、36h、48h 取样测活菌数和 pH 值, 并与单独培养相比较^[9-10]。

2 结果

2.1 丁酸梭菌的分离培养与鉴定

2.1.1 酒窖底泥中丁酸梭菌的分离培养: 实验通过稀释涂平板法分离培养后共挑取 14 株单菌落, 其培养特征和显微形态见表 1。根据《伯杰细菌鉴定手册》, 丁酸梭菌为严格厌氧杆菌, 内生孢子卵圆, 偏心或次端生, 培养过程中发酵产酸产气^[2], 菌株 B1、B3、C2、C4 符合条件, 进行后续生理生化鉴定实验。

2.1.2 分离菌株的生理生化鉴定: 对得到的 4 株细菌进行生理生化实验鉴定(表 2)。菌株 B1、B3 为丁酸梭状芽孢杆菌。

表1 分离菌种的培养特征和显微形态

菌株编号	产气	产酸	形态(24h)	形态(48h)	好氧培养
A1	+	+	杆状、无芽孢	杆状、无芽孢	-
A2	+	+	杆状、无芽孢	杆状、无芽孢	-
A3	+	+	杆状、无芽孢	杆状、无芽孢	-
B1*	+	+	杆状、次端生芽孢	杆状、无芽孢	-
B2	+	+	杆状、端生芽孢	杆状、端生芽孢	+
B3*	+	+	杆状、次端生芽孢	均为次端生芽孢	-
C1	+	+	杆状、端生芽孢	均为芽孢	+
C2*	+	+	杆状、次端生芽孢	杆状、次端生芽孢	-
C3	+	+	杆状、无芽孢	杆状、无芽孢	-
C4*	+	+	杆状、次端生芽孢	杆状、次端生芽孢	-
C5	+	+	杆状、无芽孢	杆状、无芽孢	-
C6	+	+	短杆状、无芽孢	短杆状、无芽孢	-
C7	+	+	短杆状、无芽孢	杆状、无芽孢	-
C8	+	+	杆状、无芽孢	杆状、无芽孢	-

注：+ 实验结果阳性，- 实验结果阴性，* 实验结果与要求相符，进行后续实验。

表2 分离菌种的生理生化鉴定实验结果

菌株编号	明胶液化	淀粉分解	蜜二糖分解	松三糖分解	石蕊牛乳实验
B1*	-	+	+	-	还原石蕊,凝固牛乳,凝块碎裂不消化
B3*	-	+	+	-	还原石蕊,凝固牛乳,凝块碎裂不消化
C2	+	+	-	-	/
C4	+	+	-	-	/

注：+ 实验结果阳性，- 实验结果阴性，/ 未进行实验，* 该菌株生理生化鉴定为丁酸梭菌。

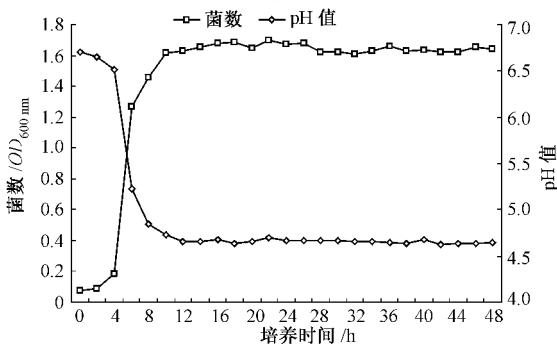


图1 菌株 B1 的生长曲线和 pH 曲线

2.3 丁酸梭菌的安全性评价

在急性毒性试验中,所有小鼠均未出现中毒和死亡现象。说明丁酸梭菌 B1 急性毒性试验最大耐受剂量 MTD > 15000 mg/kg,根据分级标准,该菌株为无毒物质。

2.1.3 分离菌株 16S rDNA 序列分析鉴定:将得到的 4 组序列在 NCBI 数据库中进行 16S rDNA 序列同源性分析,菌株 B1、B3 与 *C. butyricum* 的同源性分别达 100%、99%,均属于梭菌属群 I 丁酸梭菌种。

2.2 丁酸梭菌的生长特性

分离时发现菌株 B1 的生长速度显著快于 B3,应用潜力更大,选取 B1 进行后续实验。

2.2.1 生长温度:菌株 B1 在 20℃ ~ 41℃ 范围内生长,最适生长温度 30℃ ~ 37℃,其中 37℃ 生长最佳。

2.2.2 菌株 B1 的生长曲线和 pH 曲线:菌株 B1 在 RCM 培养基中生长良好,生长曲线和 pH 曲线见图 1,可知菌株 B1 在 RCM 培养基中 3h ~ 4h 进入对数生长期,菌数急剧上升,代谢产生酸性物质使培养基 pH 值也随之急速下降,对数生长期维持约 8h 后进入稳定期,此后菌数不再增加,pH 值稳定在 4.6 ~ 4.7。

2.4 耐药性实验

实验结果见表 3,结果表明菌株 B1 对氨基青霉素、硫酸链霉素、红霉素、氯霉素敏感,对庆大霉素、卡那霉素耐受能力较强,可以在临床上与其并用。

表3 丁酸梭菌 B1 耐抗生素实验结果

抗生素名称(浓度)	生长情况	抗生素名称(浓度)	生长情况
氨基青霉素(10 μg/mL)	-	氯霉素(10 μg/mL)	-
硫酸链霉素(10 μg/mL)	-	庆大霉素(10 μg/mL)	++
硫酸链霉素(25 μg/mL)	-	卡那霉素(15 μg/mL)	++
红霉素(15 μg/mL)	-	卡那霉素(30 μg/mL)	+
红霉素(30 μg/mL)	-		

注：“++”生长良好，“+”生长微弱，“-”不生长。

2.5 耐酸性实验

饲料经口进入动物体内的第一道屏障是酸性较强的胃液,成年猪胃内的正常 pH 值 2 ~ 3.5,仔猪因胃内盐酸分泌不足,其 pH 值在 3 ~ 5^[6-7]。因此外源的益生菌要想在肠道中发挥作用,必须先经受胃中酸性环境的考验。表 4 为丁酸梭菌 B1 耐酸性实验

结果。从表中可以看出该菌株耐酸性能极好,在 pH 为 2~3 时几乎不受影响。

表 4 丁酸梭菌 B1 对低 pH 值的耐受实验结果

耐受时间(h)	pH 值(log CFU/mL) 存活率)		
	1.0	2.0	3.0
0h	7.48(100%)	7.48(100%)	7.48(100%)
1h	7.26(60%)	7.46(96.7%)	7.47(98.3%)
2h	7.11(43.3%)	7.46(96.7%)	7.46(96.7%)
3h	6.99(32.7%)	7.45(93.3%)	7.46(96.7%)

2.6 耐胆汁实验

猪小肠中的胆汁质量分数在 0.03% ~ 0.3% 范围内波动,而益生菌要到达并定植于猪肠道,必须对胆盐有一定的耐受性^[7]。表 5 为菌株 B1 耐胆汁实验结果,表明该菌株耐胆汁能力较强,在 0.3% 以下的胆盐中 20h 存活 66.5% 以上,在 0.1% 以下胆盐中几乎不受影响。

表 5 丁酸梭菌 B1 对不同胆盐浓度的耐受情况

耐受时间(h)	猪胆盐浓度(log CFU/mL) 存活率)		
	0.1%	0.3%	0.5%
0h	7.48(100%)	7.48(100%)	7.48(100%)
1h	7.46(96.1%)	7.41(85.7%)	7.36(76.7%)
3h	7.44(91.8%)	7.37(78.6%)	6.99(32.7%)
20h	7.45(94%)	7.30(66.5%)	6.86(24.3%)

2.7 肠道致病菌体外拮抗实验

丁酸梭菌 B1 与致病菌混合培养时,由第 24 小时开始,大肠杆菌 K88 菌数显著低于单独培养,而沙门氏菌 O4Hi 在第 12 小时时即显著低于单独培养。到 48h 时,菌数差异均达 2 个数量级,说明丁酸梭菌对这些致病菌有显著抑制作用。实验结果见图 2、图 3。

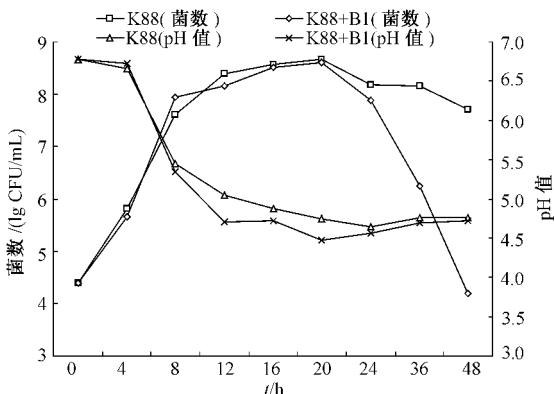


图 2 丁酸梭菌 B1 对大肠杆菌 K88 的抑制作用

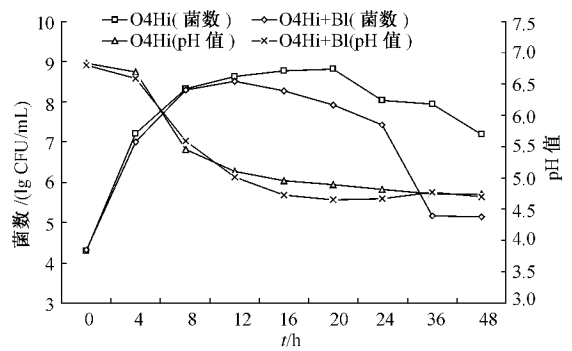


图 3 丁酸梭菌 B1 对沙门氏菌 O4Hi 的抑制作用

3 讨论

目前国内外用于益生菌的丁酸梭菌多以动物肠道为分离源。多年来畅销日本的用于整肠药物的丁酸梭菌 MIYAIRI 588 是由 Kingi Miyairi 博士从人的粪便中分离得到的(孔青,浙江大学博士学位论文,2006)。赵建新等 2002 年从 32 位健康人的粪便中分离到 4 株丁酸梭菌^[5]。由粪便中分离的丁酸梭菌肠道适应性较好。吴衍庸在对泸州老窖微生物群落的研究中发现酒窖窖泥中富集了大量的厌氧芽孢杆菌、甲烷菌、丁酸菌和乳酸菌,特别是梭状芽孢杆菌^[11]。本实验从大冶劲酒酒窖底泥中分离的 14 株菌种中有 4 株在 RCM 培养基中厌氧生长产芽孢,其中 2 株鉴定为丁酸梭菌。说明酒窖底泥中含有较多梭状芽孢杆菌。而且酒窖底泥中菌株已经经受了长期筛选,对酸、热等逆境的抗性较强,有利于生产和保藏。酒窖发酵生产白酒是中国特有的生产方式,在我国分布极为广泛,对窖泥微生物资源的深入研究,极有可能开发出具有良好应用价值的益生菌。

在分离菌株鉴定上,通过厌氧条件下产芽孢确定为梭菌属,进一步通过芽孢位置和明胶液化实验可以鉴定到群,在群内通过淀粉、密二糖、松三糖实验鉴定到种^[5]。最后通过 16S rDNA 同源性的系统学分析验证了上述鉴定结论。

动物微生态制剂必须具备耐受胃肠转运的能力。黄俊等对 1 株饲用丁酸梭菌的耐酸耐胆盐实验发现该菌在 pH 3.0 的培养基中 3h 存活率为 90%,在 1.5% 猪胆盐培养基中 3h 存活率达 95%^[12]。孔青等研究丁酸梭菌 ZJUCB 发现在 pH 2.0 培养基中 3h 存活率为 25.1%,在 0.3% 猪胆盐培养基中处理 3h 存活率为 72.4%(孔青,浙江大学博士学位论文,2006)。本文中丁酸梭菌 B1 在 pH 2.0 的磷酸缓冲

液中处理 3h 存活率为 93.3% ;在 0.3% 猪胆盐中处理 3h 存活率为 78.6% ;说明菌株 B1 较其它分离菌株更能耐受酸性环境 ,而对胆盐的耐受能力与其它菌株相似 ,可能是菌株适应窖泥酸性环境的结果。

菌株 B1 在培养基中 3h ~ 4h 即进入对数生长期 ,具有在肠道中快速繁殖的能力 ,可以很快发挥其益生作用。丁酸梭菌 B1 对庆大霉素、卡那霉素耐受能力较强 ,临床上可以与其同时使用。体外抑菌实验表明 ,丁酸梭菌 B1 与大肠杆菌 K88 和沙门氏菌 O4Hi 共培养 48h ,致病菌菌数比单独培养时降低约 2 个数量级 ,显示出强烈的抑制有害菌的作用。综上所述 ,丁酸梭菌 B1 具有良好的益生作用 ,有作为饲用微生态制剂应用的潜力。

参考文献

[1] Sanders M E. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety ,

2003 2 :101 ~ 110.

- [2] R E 布坎南.伯杰细菌鉴定手册(第九版).1995 ,pp.776 ~ 780.
- [3] 东秀珠 ,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册.北京 :科学出版社 ,2001 ,pp.358 ~ 364.
- [4] Chen W M ,Tseng Z J , Lee K SH , *et al.* International Journal of Hydrogen Energy 2005 30(10):1063 ~ 1070.
- [5] 赵建新 ,张 灏 ,田丰伟.无锡轻工业大学学报 2001 21(6) :597 ~ 612.
- [6] Park S C ,Hwang M H ,Kim Y H , *et al.* World Journal of Microbiology & Biotechnology 2006 22 :35 ~ 37.
- [7] 吴慧芬 ,毛胜永 ,姚 文 ,等.华中农业大学学报 2005 24(3) :265 ~ 268.
- [8] 禹惠明 ,林 勇.微生物学通报 2002 29(1) :53 ~ 56.
- [9] 陆 俭 ,张雪平 ,孟悠琦.微生物学通报 2000 27(5) :338 ~ 341.
- [10] 张树波 ,崔云龙 ,吴顺娥.中国新药杂志 2002 11(4) :322 ~ 324.
- [11] 吴衍庸.酿酒科技 2005 10 :110 ~ 112.
- [12] 黄 俊 ,韩铭海 ,余晓斌.饲料工业 2004 25(2) :22 ~ 25.