

益生乳杆菌的筛选及特性研究

禹慧明 林 勇

(广东省农业科学院畜牧研究所 广州 510640)

摘要: 根据对优良益生菌的要求, 从健康乳猪肠道中分离筛选到 13 株乳杆菌, 其中嗜酸乳杆菌 3 株、干酪乳杆菌 1 株、链状乳杆菌 1 株、发酵乳杆菌 8 株。所选菌株能耐受 1.0% 的牛胆盐, 对 pH3.0 的酸度有较强的抵抗力, 并能抑制常见致病菌, 对小白鼠安全无毒, 是制备益生素的优良菌种。

关键词: 乳杆菌, 筛选, 特性

中图分类号: Q939.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2002) 01-0053-04

SCREENING OF PROBIOTIC LACTOBACILLUS AND THEIR CHARACTERISTIC

YU Hui-Ming LIN Yong

(Institute of Animal Science, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640)

Abstract: According to the requirements of probiotics, we have separated 13 strains of *Lactobacillus* from the content in gut of lactating piglet. Among them 3 strains are *L. acidophilus*, one is *L. casei*, one is *L. cateniforme* and 8 strains are *L. fermentum*. They can resist 1.0% bile salt and the acidity of pH3.0, can inhibit pathogenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. They are safe and non-toxic to mice.

Key words: *Lactobacillus*, Screening, Characteristic

在长期历史进化过程中, 正常微生物与其宿主建立了动态的微生态平衡关系, 这种平衡受到微生物、宿主及环境的相互关系的影响。肠道正常微生物群可影响宿主的生长发育、消化吸收、免疫及生老病死等方面。当菌群失调时, 微生态平衡被破坏, 导致宿主发生疾病, 正常微生物的活菌制剂能帮助调整恢复或维持微生态平衡、防治疾病、增进宿主健康, 已引起人们的关注。

活菌制剂应用于食品, 已有悠久的历史, 用于人类疾病的治疗已进入临床应用阶段^[1], 将活菌制剂应用于畜牧生产, 近年也有大量报道^[2-7], 这些活菌制剂能提高畜禽生产性能, 预防疾病, 减少抗生素及药物的使用, 是可持续发展的环保型畜禽用添加剂。

活菌制剂有较强的宿主专一性, 各种动物专用的制剂不断涌现, 本文的目的是从仔猪肠道中分离有益的乳杆菌, 研制能应用于养猪生产的优质高效的活菌制剂。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物: 17 日龄大约克 × 长白二元杂乳猪; 18 ~ 22g 昆明小白鼠。

1.1.2 培养基: LBS: 胰蛋白胨 10g, 酵母膏 5g, KH_2PO_4 6g, 柠檬酸铵 2g, 葡萄糖 20g,

司本-80 1g, 乙酸钠 25g, 硫酸镁 0.58g, 硫酸锰 0.12g, 硫酸铁 0.03g, 琼脂 15g, 水 1000mL。MRS: 胰蛋白胨 10g, 牛肉膏 10g, 酵母膏 5g, 柠檬酸铵 2g, 葡萄糖 20g, KH_2PO_4 2g, 乙酸钠 5g, 吐温-80 1g, 硫酸镁 0.5g, 硫酸锰 0.2g, 水 1000mL, pH6 ~ 6.5。TSB: 胰蛋白胨 17g, 大豆胨 3g, 葡萄糖 2.5g, NaCl 5g, K_2HPO_4 2.5g, 水 1000mL。

1.2 菌种分离

屠宰健康乳猪, 分别取胃、十二指肠、空肠、回肠、盲肠和结肠内容物一定量于 50mL 厌氧稀释液中, 搅拌、作 10 倍系列稀释, 分别取 3 个适宜稀释度各 0.1mL 涂布 LBS 平板, 37℃ ~ 38℃, 厌氧罐培养。

1.3 形态观察

从平板上挑取各种类型菌落进行革兰氏染色镜检, 对具有典型乳杆菌形态特征的菌落进一步筛选。

1.4 耐酸试验

将初步挑选的乳杆菌各菌株的 24h 培养物于 2000r/min 离心 10min, 菌体分别悬浮于 pH3.0 和 pH2.5 的 MRS 液中, 37℃ 培养 3h, 测定细菌存活率。

1.5 耐受胆盐试验

将各菌株的 24h 培养物于 2000r/min 离心 10min, 菌体分别悬浮于含牛胆盐 0.2% ~ 1.0% 的 MRS 液中, 37℃ 50r/min 培养 3h, 测定细菌存活率。

1.6 抑菌试验

将致病性大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的 20h 培养物分别涂布于 TSB 平板上, 用直径 4mm ~ 6mm 无菌打孔器打孔, 琼脂封底; 各株乳杆菌的 28h 培养物在 4000r/min, 10min 离心, 吸取上清液每孔加入 60μL, 同时设 pH3.5 的醋酸、乳酸和未接种乳杆菌的培养液作对照。于 37℃ 培养 18h, 测抑菌圈直径。

1.7 菌种鉴定

由广州医学院附一医院采用美国 Becton Dickinson 公司的 Sceptor pette System 半自动细菌鉴定仪进行鉴定。

1.8 耐高温试验

取受试菌的 24h 培养液 5mL 于试管中, 置于 60℃ 处理, 分别于热处理之前、处理 40min 和 70min 时取样测定活菌数, 计算存活率。

1.9 安全性试验

18 ~ 22g 昆明种小白鼠, 由第一军医大学试验动物中心提供。每组 16 只, 雌雄各半、分笼饲养。试验前, 小白鼠禁食 4 ~ 6h, 试验组分别用各菌株的 MRS 培养液 (培养 24h, 活菌数 $0.5 \sim 5 \times 10^9$ cfu/mL) 灌胃, 0.7 ~ 0.8mL/只。空白对照组不作任何处理, 培养基对照组用未接种的 MRS 液灌胃。两个重复。记录小白鼠在两周内的生长和死亡情况。

2 结果

2.1 菌种分离、筛选、鉴定

在 LBS 平板上乳杆菌培养 48 ~ 72h 形成直径 0.5mm ~ 2mm, 白色、圆形, 表面光滑湿润、边缘整齐、凸起的菌落。革兰氏染色阳性, 菌体杆状, 多排列成长短不一的

链状，也有单个分散排列。从消化道内容物中共分离到 96 株具上述特征的细菌。再经对酸和胆盐的耐受性、对病原菌的抑制作用等特性筛选，得到 15 株具优良特性的细菌。经鉴定有 13 株是乳杆菌，其中干酪乳杆菌和链状乳杆菌各 1 株，嗜酸乳杆菌 3 株，发酵乳杆菌 8 株。

2.2 耐酸性

筛选前，乳杆菌在 pH2.5、3.0 的 MRS 液中培养 3h 的存活率分别为 1.21% 和 1.83%；经耐酸性筛选后 4 株乳杆菌在 pH2.5 和 pH3.0 的 MRS 液中培养 3h，存活率分别达 30% 和 80% 以上，表明它们对酸性环境有较强的抵抗力。

2.3 对胆盐的耐受性

胆盐对乳杆菌的生长有抑制作用，但所选乳杆菌在含牛胆盐 1.0% 的 MRS 液中都能存活，存活率 80% ~ 100%，表明它们对胆盐也有较强的耐受力。

2.4 抑制病原菌试验

菌株 99001 ~ 99005 对大肠杆菌的抑菌圈直径在 18mm ~ 22mm，对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径在 9mm ~ 11mm，表明它们对病原菌、尤其是革兰氏阴性菌有较强的抑制作用。

2.5 耐高温试验

菌株 99001 和 99003 经 60℃ 处理 40min 和 70min，二菌株存活率都分别达到 75% (40min) 和 55% (70min)，说明两者有较强的耐高温能力。

2.6 菌种安全性试验

用菌株 99001 ~ 99005 的 MRS 培养液灌胃小白鼠，在两周内的生长及死亡情况见表 1，结果表明所试菌株对小白鼠安全无毒。

表 1 乳杆菌培养液灌胃后小白鼠的生长及死亡记录表

组别	空白对照	MRS 对照	99001	99002	99003	99004	99005
雌、雄动物数	8 + 8	8 + 8	8 + 8	8 + 8	8 + 8	8 + 8	8 + 8
雌性死亡数	0	1	1	0	0	0	0
雌性生长状况	良好	良好	良好	良好	良好	良好	良好
雄性死亡数	0	2	2	2	0	0	1
雄性生长状况	良好	良好	良好	良好	良好	良好	良好

3 讨论

由于动物消化道中存在胃酸和胆盐环境，能够抵抗较强的酸性环境和较高浓度的胆盐是益生菌能在肠道中存活和正常发挥作用的先决条件^[8,9]，所选菌株在 pH3.0 或含 1.0% 胆盐的环境中有 80% 以上的存活率，可保证益生菌中有足够的活菌能顺利通过胃、十二指肠到达小肠发挥作用。且所选菌株对病原菌、尤其是革兰氏阴性菌有较强的抑制作用，对动物安全无毒。具备了优良的益生菌菌株的条件，我们将进行进一步的研究，并将其应用到生产实践中，以检验其应用效果。

所选菌株对 60℃ 高温有较强的耐受力，仍达不到饲料制粒高温的要求，但对于益生菌的后处理加工条件的选择有指导意义。

参考文献

[1] 田 静. 中国微生态学杂志, 1999, 11 (2): 126.

- [2] Tawfeek M I, Marai I F. International conference on animal, poultry & rabbit production and health, Dokki, Cairo, Egypt Sept. 1997, 71 ~ 90.
- [3] Fuller R. Probiotics 2: applications and practical aspects, Chapman & Hall Ltd, London, UK, 1997.
- [4] 王梦亮, 郭小青, 梁生康, 等, 中国微生态学杂志, 1999, 11 (3): 146 ~ 147.
- [5] 邢 军, 常秀程, 徐俊才, 等, 中国饲料, 1999, 5: 11 ~ 12.
- [6] 胥清富. 中国畜牧杂志, 1999, 35 (5): 12 ~ 13.
- [7] 孙建义, 许梓荣, 陆国林, 等. 中国微生态学杂志, 1999, 11 (2): 83 ~ 85.
- [8] 王世荣. 中国微生态学杂志, 1990, (2): 82 ~ 86.
- [9] Fuller R. Journal of Applied Bacteriology, 1989, 66: 365 ~ 378.