

应 璐, 蒋 慧. 骆驼刺源产乳酸的嗜酸乳杆菌分离鉴定及菌种特性[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(4): 355–356.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.04.125

# 骆驼刺源产乳酸的嗜酸乳杆菌分离鉴定及菌种特性

应 璐<sup>1,2</sup>, 蒋 慧<sup>3,4</sup>

(1. 塔里木大学生命科学学院, 新疆阿拉尔 843300; 2. 新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用兵团  
重点实验室/塔里木大学, 新疆阿拉尔 843300; 3. 塔里木大学动物科技学院, 新疆阿拉尔 843300;  
4. 新疆生产建设兵团塔里木畜牧科技重点实验室/塔里木大学, 新疆阿拉尔 843300)

**摘要:**从骆驼刺青贮中分离到 1 株革兰氏阳性杆菌, 经菌落形态特征鉴定、生理生化特征鉴定及 16S rDNA 序列分析, 鉴定为嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)。

**关键词:**嗜酸乳杆菌; 生理生化特性; 16S rDNA

**中图分类号:** Q939.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)04-0355-02

青贮饲料中微生物系统主要包括乳酸菌、酵母菌、梭菌、霉菌及其他腐败细菌, 其中乳酸菌在青贮发酵中起主要作用<sup>[1]</sup>。骆驼刺(*Alhagi sparsifolia* Shap)是生长于荒漠、半荒漠地区的多年生豆科木质化草本植物, 具有耐干旱、耐盐碱、抗逆性强等优点<sup>[2]</sup>。豆科牧草蛋白质含量高, 可溶性碳水化合物含量低, 缓冲能高, 附着乳酸菌数目少, 不容易成功青贮<sup>[3-4]</sup>。结果表明, 无添加的高水分骆驼刺青贮容易成功, 且骆驼刺与苜蓿混贮能显著提高苜蓿青贮品质。近年来, 抗生素滥用现象严重, 亟须寻找安全高效的替代品<sup>[5-7]</sup>。地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌是美国食品药品监督管理局(FDA)、我国农业部批准的饲用微生物<sup>[8]</sup>。新疆维吾尔自治区特殊的地理位置、地质地貌造就了其干旱、盐碱、极端高温、极端低温等多样化的生态环境, 形成了具有独特代谢途径、遗传背景的微生物类群<sup>[9]</sup>。在长期的协同进化过程中, 微生物与其宿主形成了相互依赖、相互制约的统一整体<sup>[10]</sup>。本研究探讨新疆特殊生境微生物与其宿主骆驼刺青贮成功的关系, 旨在为合理开发利用骆驼刺资源提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

疏叶骆驼刺采集于塔里木大学校园及其周边, 青贮 3 个月, 备用。

### 1.2 方法

**1.2.1 嗜酸乳杆菌的分离纯化** 将切碎的样品用灭菌水进行 10 倍梯度的稀释, 充分振荡使其混匀, 将混匀后的材料进行倍比稀释, 稀释度分别为  $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ , 选取  $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  3 个稀释度, 取菌悬液 500  $\mu\text{L}$  涂

布于 MRS 培养基固体平板上, 每个梯度稀释液涂布 3 个平板, 37  $^{\circ}\text{C}$  厌氧培养 48 h, 单菌落革兰氏染色, 阳性单菌落分离纯化后 MRS 液体培养基 37  $^{\circ}\text{C}$  厌氧培养 24 h, 20% 灭菌甘油-18  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.2.2 嗜酸乳杆菌 16S rDNA 序列分析

**1.2.2.1 基因组 DNA 的提取** 取 1 mL 活化菌悬液, 12 000 r/min 离心 1 min, 弃上清液, 收集菌体。用细菌基因组提取试剂盒提取基因组 DNA, -20  $^{\circ}\text{C}$  保存。

**1.2.2.2 16S rDNA PCR 扩增** 将上述制备的细菌基因组 DNA 作为 PCR 扩增的模板, 采用 16S rDNA 通用引物 27F: 5'-AGA GTT GAT CCT GGC TCA G-3' 和 1492R: 5'-TAC G-GCT ACC TGT TAC GACT T-3' 对 16S rDNA 细菌 DNA 进行扩增。PCR 反应体系 (25  $\mu\text{L}$ ): 10  $\times$  PCR buffer ( $\text{Mg}^{2+}$  Plus) 2.5  $\mu\text{L}$ , dNTP (2.5 mmol/L) 2.0  $\mu\text{L}$ , 正向、反向引物 (2.5 mmol/L) 各 0.5  $\mu\text{L}$ , *rTaq* (5 U/ $\mu\text{L}$ ) 酶 0.3  $\mu\text{L}$ , 模板 1  $\mu\text{L}$ , 重蒸水 18.2  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序: 95  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  45 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  45 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  90 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。

**1.2.2.3 扩增产物测序、序列分析** 使用上海生工生物工程技术服务有限公司的胶回收试剂盒进行 16S rDNA 扩增产物 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 按说明书回收、纯化目的片段。纯度检测后, 委托上海生工生物工程技术服务有限公司进行测序, 测序结果在 NCBI 中进行 Blast 同源比对, 鉴定细菌种类。采用 DNASTar 软件→Align→One Pair→By Wilbuer-Lipman Method 方法比对此菌株与杆菌的模式菌株 16S rDNA 的同源性。

**1.2.3 嗜酸乳杆菌的生理生化特性鉴定** 在 16S rDNA 序列分析基础上进行碳源同化试验、氮源同化试验、产乳酸试验、明胶液化试验、淀粉水解试验、耐盐试验、耐酸试验、温度生长试验<sup>[11-12]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌落、细胞形态特征

从青贮 3 个月的疏叶骆驼刺中分离得到 1 株革兰氏染色阳性细菌, 命名为 M1。菌体杆状, 单个、成对或短链形式, 无芽孢, 无荚膜, 无鞭毛。不规则的乳白色圆形菌落, 直径 1~2 mm, 中央略凸, 具光泽, 表面光滑。

收稿日期: 2014-06-03

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 30960259、31260562); 大学生创新创业项目 (编号: 20131075003)。

作者简介: 应 璐 (1978—), 女, 重庆人, 硕士, 讲师, 主要从事微生物教学、科研工作。E-mail: yl\_tlm@163.com。

通信作者: 蒋 慧, 博士, 教授, 主要从事动物营养及饲料的教学、科研工作。E-mail: jianghui308@126.com。

2.2 16S rDNA 序列分析

对菌株 M1 进行 16S rDNA 测序,序列 1 530 bp,结果见图 1。该序列与 GenBank 数据库中已收录序列进行 Blast 比对,初步确

定其为嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)。采用 DNA Star 软件分析该序列与嗜酸乳杆菌的模式菌株 ATCC 4356 (NCBI 登录号:AY773947)16S rDNA 基因序列相似性达 99.7%。

5'-AGAGTTTGATCTCGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCATAACATGCAAGTCGAGCGAGCTGAACCAACAGATTTCAC TTCCGGTGATGACGTTGGGAACGCGAGCGCGGATGGGTGAGTAACACGTGGGGAACCTGCCCCATAGTCTGGGATACCACTTG GAAACAGGTGCTAATAACCGGATAAAGAAAGCAGATCGCATGATCAGCTTATAAAAAGCGCGCGTAAGCTGTCGCTATGGGATGGC CCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAACGCGCCTACCAAGGCAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACA TTGGGACTGAGACACGCCCCAACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAAC GCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTGGTGAAAGAAGGATAGAGGTAGTAAGTGGCCTTTATTTGA CGGTAATCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATT GGGCGTAAAGCGAGCGCAGCGGAAGAATAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGTGCATCGGAAACTGTTT TTCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGGAAGAACACCAAGTGGCGAA GGCGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCCG TAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGGAGGTTTCCGCCTCTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGA CCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGA ACCTTACCAGGTCTTGACATCTAGTGCAATCCGTAGAGATACGGAGTTCCCTTCGGGACACTAAGACAGGTGGTGCATGGCTG TCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCATTAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCA CTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACA CGTGCTACAATGGACAGTACAACGAGGAGCAAGCCTGCGAAGGCAAGCGAATCTCTTAAAGCTGTTCTCAGTTTCGGACTGCAG TCTGCAACTCGACTGCACGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACA CACCGCCGTCACACCATGGGAGTCTGCAATGCCAAAGCCGGTGGCCTAACCTTCGGGAAGGAGCCGTCTAAGGCAGGGCAG ATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACCGTA-3'

图 1 菌株 M1 的 16S rDNA 序列

2.3 生理生化特征

根据 16S rDNA 序列分析结果对 M1 菌株进行了生理生化鉴定。由表 1 可知,M1 菌株可以同化碳源 α-D-葡萄糖、纤维二糖、D-半乳糖、D-果糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖,不能同化碳源龙胆二糖、L-山梨糖、L-鼠李糖、麦芽三糖、D-松三糖、麦芽糖醇、D-甘露醇、D-甘露糖、D-木糖、丙三醇、山

梨醇、木糖醇、松二糖,可以同化氮源 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、KNO<sub>3</sub>。由表 2 可知,M1 菌株的产乳酸试验、明胶液化试验、淀粉水解试验、接触酶试验均呈阳性;15~35℃均能生长,45℃停止生长;弱酸性到中性条件下均能生长,强酸性条件下停止生长;2%~10% NaCl 条件下均能正常生长,12% NaCl 停止生长。

表 1 菌株 M1 的碳源、氮源同化试验结果

碳源同化						氮源同化	
项目	结果	项目	结果	项目	结果	项目	结果
α-D-葡萄糖	+	L-鼠李糖	-	麦芽糖醇	-	丙三醇	-
龙胆二糖	-	D-果糖	+	乳糖	+	山梨醇	-
纤维二糖	+	蔗糖	+	D-甘露醇	-	木糖醇	-
D-半乳糖	+	麦芽三糖	-	D-甘露糖	-	麦芽糖	+
L-山梨糖	-	D-松三糖	-	D-木糖	-	松二糖	-

注:“+”表示阳性反应,“-”表示阴性反应,下表同。

表 2 菌株的生理生化试验结果

项目	结果	项目	结果	项目	结果
5℃	+	pH 值为 2	-	2% NaCl	+
25℃	+	pH 值为 3	-	4% NaCl	+
35℃	+	pH 值为 4	+	6% NaCl	+
45℃	-	pH 值为 5	+	8% NaCl	+
产乳酸试验	+	pH 值为 6	+	10% NaCl	+
接触酶试验	+	pH 值为 7	+	12% NaCl	-
明胶液化试验	+	淀粉水解试验	+		

3 结论

从骆驼刺青贮中分离到 1 株革兰氏阳性杆菌,经菌落形态特征鉴定、生理生化特征鉴定及 16S rDNA 序列分析,鉴定为嗜酸乳杆菌。

参考文献:

[1] 张秀芬. 饲草饲料加工与贮藏[M]. 北京:农业出版社,1992.  
[2] 曾凡江,张希明,李小明. 骆驼刺植被及其资源保护与开发的意义[J]. 干旱区地理,2002,25(3):286-288.  
[3] 张金霞,乔红霞,刘雨田. 水分和添加剂对紫花苜蓿青贮品质的

影响[J]. 草业科学,2014,31(4):766-770.  
[4] 许庆方. 影响苜蓿青贮品质的主要因素及苜蓿青贮在奶牛日粮中应用效果的研究[D]. 北京:中国农业大学,2005.  
[5] 程锦泉,刘少础. 超级细菌的警示与滥用抗生素潜在公共卫生问题[J]. 中国公共卫生,2010,26(12):1521-1522.  
[6] 冯晶晶,王小万,靖端锋. 控制抗生素滥用的国际经验及启示[J]. 中国抗生素杂志,2014,39(1):14-18.  
[7] 李燕荣,兰邹然,姜平. 新型抗生素替代品研究进展[J]. 当代畜牧,2014(9):54-56.  
[8] 赵述森. 猪源益生菌孢杆菌的分离筛选与应用研究[D]. 武汉:华中农业大学,2009.  
[9] 唐永红,曹庸,卢成瑛,等. 特殊生境微生物及其活性代谢产物研究进展[J]. 微生物学通报,2006,33(4):163-166.  
[10] Jensen M S, Jensen S K, Jakobsen K. Development of digestive enzymes in pigs with emphasis on lipolytic activity in the stomach and pancreas[J]. Journal of Animal Science,1997,75(2):437-445.  
[11] 布坎南 R E,吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8 版. 北京:科学出版社,1984.  
[12] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001:379-380.