李宏伟,慈百全,侯明磊,等. 鸡源乳酸菌的分离鉴定及其生物学特性分析[J]. 江苏农业科学,2020,48(13):188 - 192.
doi:10.15889/j.issn.1002 - 1302.2020.13.038

鸡源乳酸菌的分离鉴定及其生物学特性分析

李宏伟, 慈百全, 侯明磊, 罗智文, 张　瑶, 林连兵, 张棋麟
(昆明理工大学生命科学与技术学院,云南昆明 650500)

摘要:从健康鸡肠道中自行分离筛选出 9 株乳酸菌株为试验菌株,通过考察菌种的生长速度、耐酸、耐胆碱、耐肠胃液,并以抑菌性能作为主要指标。通过产酸能力测定、耐酸能力测定、耐受肠胃极端环境性能测定得到 2 株乳酸菌,2 株乳酸菌上清液经牛津杯双层平板法对金黄色葡萄球菌、志贺氏菌、沙门氏菌、大肠杆菌、无乳链球菌等 5 株指示菌株进行抑菌试验,发现 2 株乳酸菌对 5 株指示菌株都具有非常明显的抑菌作用。采用 16s rDNA 分子标记对乳酸菌进行鉴定,并构建系统发育树。经分子生物学鉴定,L2 为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、L4 为短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)。

关键词:鸡源乳酸菌;耐受能力;菌株鉴定;抑菌
中图分类号: S182　　**文献标志码**: A　　**文章编号**:1002 - 1302(2020)13 - 0188 - 04

乳酸菌(lactic acid bacteria,LAB)是一类可以使碳水化合物发酵产生乳酸的革兰氏阳性细菌的总称[1];形态上常分为杆状和球状 2 类,为革兰氏阳性、兼性厌氧型细菌[2];被广泛应用于发酵食品生产中,被公认为安全的微生物,可应用于医疗、食品添加和畜牧等行业[3-5]。乳酸菌是工业上重要的细菌,这些细菌利用各种底物生产发酵食品和饮料,如牛奶、蔬菜、谷物、肉类、可可豆等。酸奶、奶酪和发酵乳制品被广泛认为是益生菌的主要来源[6-7]。益生菌被定义为“活的微生物”,在摄入一定数量的益生菌后,除固有的基本营养外,还能发挥健康益处[8-9]。益生菌的有益作用包括预防和治疗腹泻病、预防感染、管理炎症性肠病、免疫调节等疾病[2,10-11]。本研究从健康鸡肠道十二指肠黏膜中分离出优质的乳酸菌,通过对乳酸菌的耐酸、耐胆碱、耐肠胃液能力、产酸能力以及乳酸菌对大肠杆菌(*Escherichia coli*)、沙门氏菌(*Salmonella*)、志贺氏菌(*Shigella*)等革兰氏阴性菌及金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)等革兰氏阳性菌抑菌效果等指标测试评价,获得生长速率快、耐受极端环境强、抑菌作用强、抑菌谱广的优良菌株。

1　材料与方法

1.1　试验地点及时间

本试验于 2019 年 3—7 月在昆明理工大学生命科学与技术学院肠道微生物课题组内完成。

1.2　材料与试剂

1.2.1　菌种　乳酸菌从云南特有品种无量山乌骨鸡(*Gallus gallus*)健康成年鸡肠道内分离获得。沙门氏菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、志贺氏菌、无乳链球菌为昆明理工大学生命科学与技术学院噬菌体与肠道微生物课题组实验室保存。

供试鸡,购自云南南涧无量山乌骨鸡养殖场。

1.2.2　培养基与试剂　MRS 培养基:胰蛋白胨 10.00 g、牛肉粉 8.00 g、酵母粉 4.00 g、葡萄糖 20.00 g、硫酸锰 0.04 g、磷酸氢二钾 2.00 g、柠檬酸氢二铵 2.00 g、乙酸钠 5.00 g、硫酸镁 0.20 g、吐温 - 80 1.00 g、琼脂 15.00 g,加水至 1 L,采用 1 mol/L 盐酸将培养基 pH 值调至 5.8,121 ℃下灭菌 20 min。

LB 培养基:胰蛋白胨 10 g、酵母粉 5 g、氯化钠 10 g、琼脂 15 g,加水至 1 L,121 ℃下灭菌 20 min。

其他生化试剂:结晶紫、碘液、乙醇、盐酸、胰蛋白酶、胃蛋白酶、猪胆盐等所有生化试剂,均购置于上海源叶生物科技有限公司。

收稿日期:2019 - 08 - 24
基金项目:国家自然科学基金(编号:31760042、31960286);云南省教育厅科学研究基金(编号:2019J0050)。
作者简介:李宏伟(1993—),男,内蒙古赤峰人,硕士研究生,主要研究方向为肠道微生物及其高密度发酵。E - mail:lihongwei667@163.com。
通信作者:张棋麟,副教授,研究方向为生态基因组学。E - mail:zhangqilin88888@126.com。

1.3　主要设备仪器

落地式超净工作台[邦西仪器科技(上海)有限公司]、酸碱度 pH 测定计(上海佑科仪器表有限公司)、紫外分光光度计(上海佑科仪器表有限公司)、立式高压蒸汽灭菌锅(上海申安医疗器械有限公司)、台式高速离心机(四川蜀科仪器有限公司)、恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司)、恒温摇床(上海一恒科学仪器有限公司)、电热鼓风干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司)、超低温冰箱(日本三洋电器股份有限公司)。

1.4　方法

1.4.1　鸡肠道中乳酸菌的分离和纯化　取健康鸡肠道,采用无菌生理盐水清洗鸡肠道并刮去肠道内容物,在肠黏膜表层不同位置刮取黏液,置于液体 MRS 培养基中,37 ℃下培养 12 h[12]。将菌液取 100 μL 涂布于 MRS 固体培养基平板上(含 5% $CaCO_3$),37 ℃下培养 24 h[13]。挑取生长最为旺盛且具有透明溶钙圈的单菌落继续在 MRS 固体培养基上进行分离纯化,将产生溶钙圈的菌落进行革兰氏染色试验,革兰氏染色阳性菌株初步定为乳酸菌,将上述菌株用含有 15% 甘油的 MRS 培养基保存于 -80 ℃。

1.4.2　菌株产酸分析　将上述纯化后的菌株,取 200 μL 接种于 5 mL MRS 培养基中,37 ℃、150 r/min 下培养 24 h,使用分光光度计检测乳酸菌在 600 nm 处的吸光度,并使用 pH 计检测其 pH 值。

1.4.3　强酸耐受性试验　选取产酸能力强的菌株,37 ℃下培养 24 h,4 ℃、8 000 r/min 离心 10 min,取沉淀,将沉淀重悬于 pH 值为 2.5 的 MRS 液体培养基中,37 ℃、150r/min 恒温培养 3h,分别在 0、3 h 取样,以稀释涂布平板法测定菌株浓度[14]。

1.4.4　胆盐耐受性试验　将耐酸菌株接种于含 0.3% 猪胆盐的 MRS 中,37 ℃、150 r/min 恒温培养,于 0、4、8 h 各取样 1 次,采用酶标仪检测其吸光度 D 值[15-16]。

1.4.5　人工胃肠液耐受性试验　将磷酸盐缓冲液(PBS)灭菌后,调至 pH 值为 2.5,加入 0.3% 过滤除菌后的胃蛋白酶,制成模拟人工胃液;将 PBS 灭菌后,调至 pH 值为 6.8,加入 0.1% 的胰蛋白酶和 0.3% 的猪胆盐,制成模拟人工肠液[16]。

将活化 3 代的菌液在 4 ℃、8 000 r/min 下离心 10 min,收集菌体,用上述模拟人工胃液将菌体重新震荡悬浮,在 37 ℃、150 r/min 下培养 3 h。然后将处理后的乳酸菌按照 2% 接种量接入至人工肠液中,在 37 ℃、150 r/min 下培养,分别于 0、4、8 h 取样,利用酶标仪检测其吸光度 D 值。

1.4.6　抑菌试验　将耐酸、耐胆汁的供试菌株接种于 MRS 液体培养基中培养 24 h,离心取上清液,并用 0.2 μm 的过滤膜除菌,制得供试菌株无细胞培养液。

采用牛津杯法测定供试菌株的抑菌效果,利用牛津杯双层平板法将 5 株指示菌株分别混合于上层 MRS 软琼脂培养基中。待凝固后,采用镊子将无菌牛津杯置于无菌培养皿中,吸取供试菌株无细胞培养液 200 μL 于牛津杯中,先于 4 ℃下放置 4 ~ 5 h,使培养液完全扩散,在 37 ℃下培养 24 h,用游标卡尺测量抑菌圈直径[17],试验独立重复 3 次。

1.4.7　数据统计分析　每个试验独立重复 3 次,取其平均值并计算标准差。采用 Microsoft Excel 2007 及 IBM SPSS 22.0 软件对数据进行分析作图。

2　乳酸菌菌株的鉴定

2.1　乳酸菌基因组总 DNA 提取

采用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法提取乳酸菌的基因组总 DNA。

2.2　乳酸菌 16S rDNA 的 PCR 扩增、测序与同源性分析

以乳酸菌菌株基因组 DNA 为模板,利用扩增细菌 16S rDNA 的通用引物 27F(5′ - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3′)和 1492R(5′ - TACGGATACCTTGTTACGACTT - 3′),对乳酸菌的 16S rDNA 进行 PCR 扩增。PCR 扩增程序:94 ℃ 预变性 5 min;然后 94 ℃ 变性 30 s、52 ℃退火 30 s、72 ℃延伸 50 s,35 个循环;72 ℃延伸 10 min。PCR 产物大小经过琼脂糖凝胶电泳检测验证后,将目标条带进行纯化,然后送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行 PCR 产物的 Sanger 测序[18-19]。

将乳酸菌序列提交至美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Informmion, NCBI)网站的 GenBank 数据库,采用 BLAST 在线服务器(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)将其与细菌数据库进行比对,通过比对得分最高的已知乳酸菌种类确定种名。

3　结果与分析

3.1　分离菌株的生长曲线及产酸能力比较

通过含有碳酸钙的 MRS 培养基对鸡肠道中的

乳酸菌进行筛选,经 37 ℃恒温培养箱培养 24 h,挑选生长旺盛、溶钙圈明显的菌落。将上述菌落继续在 MRS 固体培养基平板上进行平板划线分离,得到纯化后具有溶钙圈的革兰氏阳性菌疑似乳酸菌 9 株,对 9 株疑似乳酸菌菌株编号为 L1 ~ L9(表 1)。

表 1　不同菌株的 *D* 值和最终 pH 值

菌株	*D* 值	pH 值
L1	0.672 ±0.003	4.85 ±0.02
L2	0.986 ±0.002	3.52 ±0.03
L3	0.720 ±0.001	3.76 ±0.01
L4	1.125 ±0.003	3.79 ±0.03
L5	0.711 ±0.003	4.95 ±0.02
L6	0.896 ±0.002	4.02 ±0.05
L7	0.882 ±0.003	4.86 ±0.02
L8	0.689 ±0.004	4.18 ±0.03
L9	0.752 ±0.005	4.46 ±0.02

3.2　强酸耐受性比较

选取产酸能力最强的菌株,进行强酸耐受性试验,得到 4 株产酸能力强的菌株,于 pH 值为 2.5 的强酸 MRS 培养基中 37 ℃恒温摇床培养 3 h,使用稀释涂布平板法检测活菌数,见表 2。

由表 2 可知,4 株产酸能力比较强的菌株对酸的耐受能力不同,其中 L2、L4 对酸的耐受能力达到 100%,L3 耐受力为 24.5%,L6 耐受力为 19%。选择 L2、L4 进行下步试验。

表 2　乳酸菌强酸性耐受性比较

菌株	活菌数(CFU/mL)	
	0 h	3 h
L2	7.00×10^7	7.00×10^7
L3	6.00×10^7	1.47×10^7
L4	3.78×10^7	3.80×10^7
L6	4.20×10^7	8.27×10^6

3.3　胆盐耐受性比较

将产酸能力较强的 2 株乳酸菌 L2、L4 取 200 μL 接种于 5 mL 含有 0.3% 猪胆盐的 MRS 液体培养基中,于 37 ℃、150 r/min 下培养 8 h,吸光度检测结果见表 3。由表 3 可知,2 株乳酸菌受 0.3% 胆盐胁迫,仍能够保持良好的生长状态,L2 的胆盐耐受能力显著低于 L4 的耐受力。

表 3　乳酸菌胆盐耐受性比较

菌株	胆盐浓度(%)	*D* 值		
		0 h	4 h	8 h
L2	0.3	0.011 ±0.002	0.033 ±0.003	0.250 ±0.001
L4	0.3	0.012 ±0.003	0.112 ±0.003	0.432 ±0.003

3.4　乳酸菌抑菌试验

通过牛津杯平板法对 2 株乳酸菌进行抑菌能力检测,由表 4 可知,2 株菌株对 5 株指示菌株的抑菌圈平均直径均在 18 mm 以上,说明 2 株乳酸菌对以金黄色葡萄球菌为代表的革兰氏阳性菌、以大肠杆菌为代表的革兰氏阴性菌都具有非常明显的抑菌效果。

表 4　乳酸菌无细胞上清液抑制致病菌的试验结果

菌株	革兰氏阴性菌(mm)			革兰氏阳性菌(mm)	
	大肠杆菌	沙门氏菌	志贺氏菌	金黄色葡萄球菌	无乳链球菌
L2	22 ±0.25	21 ±0.23	26 ±0.10	28 ±0.36	23 ±0.20
L4	19 ±0.15	20 ±0.30	25 ±0.28	30 ±0.20	25 ±0.30

乳酸菌对致病菌的最低抑菌浓度可以在一定程度上反映金黄色葡萄球菌对乳酸菌的敏感性,也反映了乳酸菌对金黄色葡萄球菌的抑制作用。抑制浓度越低,乳酸菌对金黄色葡萄球菌的抑制作用越明显。由图 1、图 2 可知,虽然接种 5% 乳酸菌无细胞上清液对金黄色葡萄球菌有一定抑制作用,但效果不明显。而接种 10% 以上的乳酸菌无细胞上清液对金黄色葡萄球菌的抑制作用几乎达到 100%。结果表明,一定量的乳酸菌无细胞培养物可以抑制金黄色葡萄球菌的生长。所得数据可为未来工业应用中添加乳酸菌质量浓度的选择提供直接参考。

3.5　耐人工肠胃液比较

由表 5 可知,2 株乳酸菌经人工胃液处理 3 h 后,活菌数无明显差异。将 2 株经人工胃液处理后的乳酸菌转接至人工肠液中,发现 2 株乳酸菌均不受人工肠液影响,能够正常生长,由此推断 2 株乳酸菌不但能够耐受人工胃液,而且能够在肠液中生长,具备良好的肠胃液耐受能力。

4　菌种鉴定

结果表明,菌株 L2 16S rDNA 基因序列与植物乳杆菌(*L. plantarum*)均有高于 99% 的同源性,确定L2菌株为植物乳杆菌。L4 16S rDNA基因序列

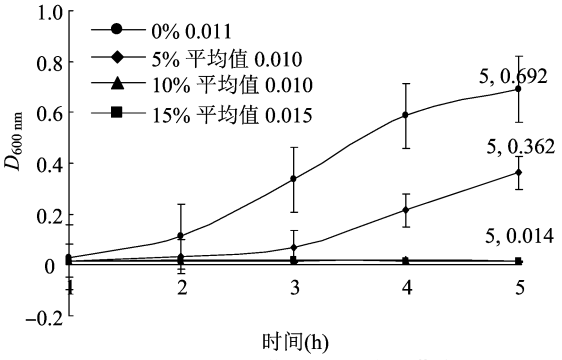

图1　不同浓度 L2 无细胞培养物对金黄色葡萄球菌生长的影响

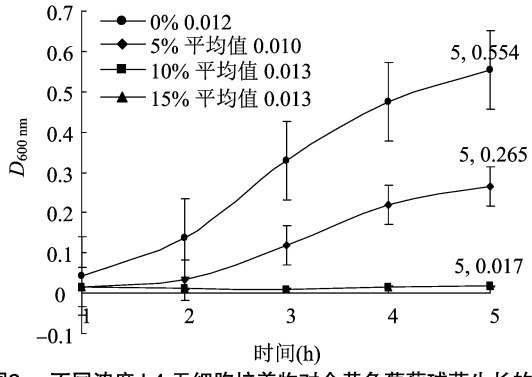

图2　不同浓度 L4 无细胞培养物对金黄色葡萄球菌生长的影响

表 5　2 株乳酸菌耐受人工肠胃液试验结果比较

菌株	人工胃液处理活菌数(CFU/mL)		人工肠液处理活菌数(D 值)		
	0 h	3 h	0 h	4 h	8 h
L2	6.28×10^7	6.01×10^7	0.011 ±0.003	0.032 ±0.002	0.194 ±0.004
L4	6.93×10^7	6.86×10^7	0.012 ±0.002	0.136 ±0.004	0.476 ±0.005

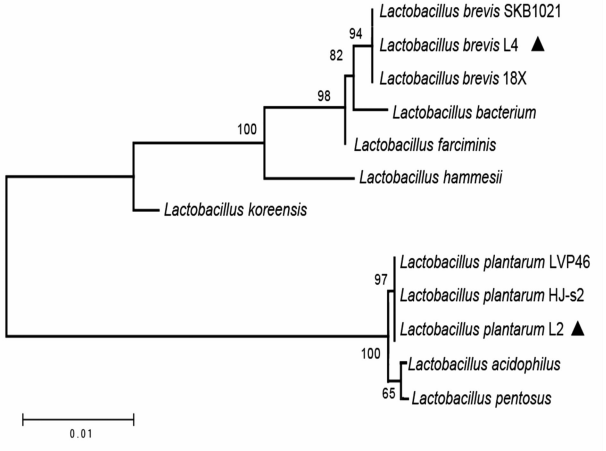

图3　基于 16S rDNA 序列构建的乳酸菌 L2 和 L4 的系统进化树

与短乳杆菌(*L. brevis*)均有高于 99% 的同源性,确定 L4 菌株为短乳杆菌。

5　结论与讨论

乳杆菌广泛应用于发酵食品生产中,如发酵蔬菜、发酵肉类等。本研究从鸡十二指肠黏膜上分离得到的 2 株乳杆菌,较分离于自然环境下的乳杆菌更易于定殖在动物肠道内,维持肠道菌群平衡,经 16S rDNA 鉴定属于植物乳杆菌和短乳杆菌。本研究中的 2 株乳杆菌,产酸、耐酸性能较为突出,均能在 pH 值 =2.5 的培养基中生存,这说明 2 株乳杆菌能够通过胃达到肠道,这为其发挥益生性能起到了先决作用。2 株乳酸菌在含 0.3% 胆碱培养基中能够生存并繁殖,满足了优良益生菌的特性。此外,2 株乳杆菌对革兰氏阳性菌与革兰氏阴性菌都具有良好的抑菌效果。由此可知,2 株乳酸菌对动物肠道及食品中的有害细菌具有广谱抑菌作用,这对发酵肉制品、蔬菜等食品生产和贮存具有重要意义。

参考文献:

[1]钱　洋. 乳酸菌对食品中常见霉菌的抑制和黄曲霉素的去除[D]. 济南:山东大学,2012.

[2]温晓庆. 乳酸菌及有效成分抗肿瘤作用与机制探讨[J]. 北京农业,2008(12):41 -43.

[3]Holzapfel W H,Schillinger U. Introduction to pre and probiotics[J]. Food Research International,2002,35(2):109 -116.

[4]吕常江,胡　升,黄　俊,等. 用于功能性乳制品制备的可控性乳酸菌裂解系统构建[C]//2015 年中国化工学会年会论文集. 北京:中国化工学会,2015.

[5]杨尚娇. 新疆地区干酪中产细菌素乳酸菌的筛选、系统发育及其抑菌活性研究[D]. 石河子:石河子大学,2015.

[6]周晓丹,张　昊,郭慧媛,等. 发酵乳制品中益生菌生存能力影响因素的研究进展[J]. 中国乳业,2013(4):46 -50.

[7]Martín R,Chain F,Miquel S,et al. Using murine colitis models to analyze probiotics - host interactions[J]. FEMS Microbiology Reviews,2017,41(Supp1):S49 -S70.

[8]Doyle M P. Food microbiology:fundamentals and frontiers[M]. 3rd ed. Washington,D. C.:AMS Press,2007.

[9]Kovachev S. Defence factors of vaginal lactobacilli[J]. Critical Reviews in Microbiology,2017,44(1):31 -39.

[10]卢丽莉. 益生菌治疗小儿抗生素相关性腹泻随机对照研究的 meta 分析[J]. 临床儿科杂志,2010,28(11):1083 -1085.

[11]李　龙,刘锁珠,王宏辉. 藏鸡源乳酸菌菌株的分离、鉴定与筛选[J]. 饲料研究,2013(8):13 -15.

[12]刘国荣,周　康,李平兰,等. 传统干酪中一株产Ⅱa 类细菌素乳酸菌的分离与鉴定[J]. 食品科学,2007,28(5):185 -190.

胡宗文,杨　娟,苗春辉,等. 西方蜜蜂群势与气候的周年变化及相关性分析[J]. 江苏农业科学,2020,48(13):192 – 196.
doi:10.15889/j. issn. 1002 – 1302. 2020. 13. 039

西方蜜蜂群势与气候的周年变化及相关性分析

胡宗文, 杨　娟, 苗春辉, 黄新球, 周春涛
(云南省农业科学研究院蚕桑蜜蜂研究所,云南蒙自 661101)

摘要:为研究西方蜜蜂群势因子与气候的周年变化及相关性,采用 Vantage Pro 2 气象仪记录气候变化,以测子框测定群势、蜜、粉存储量,记录工蜂浆和携螨量,作周年统计和相关性分析。结果表明,群势在 3 月、7 月、10 月出现峰值,分别为(6.943 ±0.245)、(7.306 ±0.162)、(8.076 ±0.099)脾,工蜂携螨量在 3 月、8 月和 11 月出现峰值,分别为(14.076 ±1.116)、(16.950 ±0.943)、(16.230 ±1.085)只;工蜂浆在 2 月分泌量最高,为(93.286 ±0.030) mg;温度(22.607%)和工蜂浆(21.259%)是构成蜂群影响的主要成分;气候因子对蜂群表现出显著或极显著的相关性,其中温度对群势(r =0.170)和蜂螨(r =0.160)有极显著正相关,湿度与蜂群采粉(r =0.15)有极显著正相关,而工蜂浆的分泌量与温度(r = –0.327)、湿度(r = –0.351)表现出极显著负相关。说明蜂群自身节律性可以适应气候的变化,这对蜜蜂资源的发掘、生物多样性的保存具有深远意义。

关键词:西方蜜蜂;工蜂浆;气候;周年变化;相关性
中图分类号: S891　　**文献标志码:** A　　**文章编号:**1002 – 1302(2020)13 – 0192 – 05

随着气候与环境的变化,蜂群尤其是野生蜂群的数量,在全球范围内发生了变化[1]。自 2006 年蜂群崩溃综合症(colony collapse disorder,CCD)被报道以来,仅 Nature 杂志关注蜂群损失程度的文章已达 539 篇。蜂类与植物的相互作用——传粉效应,促使许多植物进化成为了专一依赖性虫媒传粉植物[2],因此蜂群的变化引起了人们极大的关注。西方蜜蜂是世界上人工饲养量巨大的蜂种之一,工蜂的数量及健康状况直接表现在蜂群势的强弱上。有研究表明,气候[3]、寄生虫[4]、病毒[5]、病原体[6]、甲虫[7]、长期的低毒环境[7]、管理方式都会引起西方蜜蜂群体及个体在行为、生理上产生影响,因此了解和掌握当地蜂群的群势变化规律对于掌握授粉力量有重要意义。在我国西方蜜蜂群势的周年变化与气候因子间的相关性还未见报道,本研究跟踪定地饲养蜂群的周年状况,以探究气候与西方蜜蜂内部因子间的相关性。

1　材料与方法

1.1　材料

蜂群:6 群西方蜜蜂群,常年饲养于国家蜂产业体系红河试验站西方蜜蜂场,供观察蜂群遗传背景清晰。

群势测定工具:测子框、镊子、移虫针、1.5 mL 离心管、电子天平、双甲脒针剂。

气候因子测定:气象观测仪(美国 Davis 公司生产的 Vantage Pro 2 气象仪)。

收稿日期:2019 – 06 – 27
基金项目:云南蚕桑蜜蜂研究专项(编号:2018CF07)。
作者简介:胡宗文(1987—),男,云南曲靖人,硕士,主要从事蜜蜂生物学研究。E – mail:hzongwn@163. com。

[13]张德珍,潘道东,戴传超. 一株降胆固醇乳酸菌的鉴定及其在模拟胃肠环境中抗性的研究[J]. 食品科学,2004(11):281 – 284.
[14]徐丽丹,邹积宏,袁杰利. 一株降血压功能乳酸菌在模拟胃肠环境中抗性的研究[J]. 中国微生态学杂志,2011,23(2):112 – 114.
[15]张　明,李新胜,马　超,等. 发酵黑木耳酱菜益生乳酸菌菌株的筛选[J]. 中国食品学报,2018,18(11):103 – 108.
[16]黄宝莹,佘之蕴,苏妙仪,等. 食品添加剂对两种乳酸菌的抑菌作用[J]. 中国乳品工业,2015,43(8):16 – 18.
[17]叶　陵,李　勇,王蓉蓉,等. 剁辣椒中优良乳酸菌的分离鉴定及其生物学特性分析[J]. 食品科学,2018,39(10):112 – 117.
[18]陈　曦,周　彤,许随根,等. 贵州酸肉中具有高亚硝酸盐降解和耐受能力乳酸菌的筛选与鉴定[J]. 中国食品学报,2018,18(2):256 – 264.
[19]Tamura K,Stecher G,Peterson D. MEGA6:molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. Molecular Biology and Evolution,2013,30(12):2725 – 2729.