

健康犬肠道乳酸杆菌某些生物学特性的研究^{*}

李太元¹, 刘伟铭², 金鑫¹, 许广波¹, 李艳茹¹, 全海志¹, 田广燕¹, 王浩然¹

(1. 延边大学农学院, 龙井 133400; 2. 吉林大学实验动物中心, 长春 130021)

摘要: 从健康犬的肠道中分离并鉴定出 5 株乳酸杆菌, 其中嗜酸乳杆菌 3 株、肠乳杆菌 1 株、发酵乳杆菌 1 株。根据其耐胆盐、生长表现等特性选择 2 株嗜酸乳杆菌(D1-3、D4-3), 作进一步的耐酸性、粘附性、抑菌作用等生物学特性试验。结果表明: D1-3 和 D4-3 菌株能耐受高达 6.0 g/L 的胆盐以及 pH 值低至 2.0 的酸性环境, 对犬肠粘膜上皮细胞有良好的粘附性, 其代谢产物对常见致病菌有较好的抑制作用, 对小白鼠无毒性。

关键词: 犬; 乳酸杆菌; 生物学特性

中图分类号: S852.61

文献标识码: A

文章编号: 1000-5684(2005)06-0667-04

Study of Certain Biological Characteristics of Lactobacillus in Intestines of Healthy Canine

LI Tai-yuan¹, LIU Wei-ming², JIN Xin¹, XU Guang-bo¹, LI Yan-ru¹, QUAN Hai-zhi¹, et al.

(1. Agricultural College of Yanbian University, Longjing 133400, China; 2. Center of Laboratory Animals, Jilin University, Changchun 130021, China)

Abstract: Five strains of lactobacillus were isolated and identified from the intestinal tracts of healthy dogs, in which three strains are lactobacillus, one strain is lactobacillus fermenti, and one strain is lactobacillus. Two strains of lactobacillus acidophilus, D1-3 and D4-3, were selected according to their biological characteristic tests such as their tolerance to bile salts and growth performance, and their acid tolerance, adhesive ability and bacteriostasi were further tested. The results revealed that these strains can endure bile salts of 6.0 g/L and acid environment of hydrogen ion concentration(pH) intestinal mucosa, the metabolic products of which have good inhibitory effect to pathogenic bacteria, and have no toxicity to Kunming mice.

Key words: canine; lactobacillus; biological characteristic

益生菌(probiotic)是一种能够参与调节动物肠道微生态平衡的微生物活菌制剂,因其无毒性、无残留、不产生耐药性,具有防治疾病、提高动物生产性能和适合绿色环保要求等优点^[1],在动物饲养业中得到广泛的应用。Fuller 指出,益生菌菌株应具备生长速度快、具有良好的吸附于肠道上皮细胞的特性、对胃肠道内的抑制因素具有抵抗

能力、能够产生抗菌物质等特点^[2]。菌株的选择是益生菌成败的关键,而粘附性能的强弱,对于菌株能否很好地定植于肠道上皮细胞表面,从而形成细菌生物膜,抵抗外来致病菌的定居和感染具有重要意义^[3]。乳酸菌是动物肠道中的优势菌群之一,其对动物的有益作用已被许多研究结果所证实^[2]。目前国内对动物消化道乳酸菌的研究报

* 基金项目: 吉林省科技厅“九五”重点资助项目(20010208-1)

作者简介: 李太元(1962-),男,硕士,副教授,研究方向:动物微生态制剂开发与利用。

收稿日期: 2005-02-28

道较少,尤其对犬源乳酸菌的分离、鉴定及生物学特性方面的研究未见报道。近年来,犬病发病率的上升已成为养犬业规模化饲养的制约因素之一,大量使用抗生素又会导致药物残留和抗药性的产生。因此,本研究依据微生态制剂的作用机制及特点,从健康犬肠道中分离乳酸杆菌并对某些生物学特性进行了研究,其结果可为应用生态学防治犬的疾病及益生菌添加剂的开发与应用提供依据,同时对无公害绿色畜产品生产具有一定的实践意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验动物选择健康的本地土种4月龄仔犬15只;昆明小白鼠,体重18~22g(3~4周龄),由延边大学医学院实验动物室提供。

1.2 培养基

MRS培养基、SL培养基、牛乳培养基、葡萄糖酵母膏蛋白胨培养基(PYG)等均按文献[4]配制。

1.3 菌种

金黄色葡萄球菌(C_{56000})、马流产沙门氏杆菌(C77-1)、大肠杆菌(K_{99})均购于中国兽药监察所;嗜水气单胞菌、酵母由延边大学农学院微生物实验室保存菌种。

1.4 试验方法

1.4.1 乳酸菌分离与鉴定 选择健康的仔犬,剖杀后无菌剪开肠管,用无菌棉拭子蘸取肠黏膜黏液,在SL琼脂培养基和MRS琼脂培养基上划线接种,立即置于厌氧培养箱中,37℃厌氧培养48h。挑取疑似乳酸杆菌的白色菌落,纯化保存。按文献[5]从形态、生理特性、代谢产物等方面进行鉴定。

1.4.2 生物学特性检测 (1)胆盐耐受试验。参照文献[6]方法进行。将不同菌株的24h MRS液体培养液以3000 r/min离心20 min,去上清液,以无菌磷酸缓冲液(PBS, pH 7.2)洗涤菌体3次,用PBS配成菌浓度为 10^9 cfu/mL菌悬液。取1 mL菌液,与预先冷却至45℃的MRS琼脂培养基混合倾注平皿,MRS培养基中分别含有牛胆盐1.0,2.0,3.0,4.0,5.0,6.0,7.0,8.0,9.0,10.0 g/L,以不加胆盐为空白对照。37℃培养48h,观察生长情况。

(2)耐酸试验。用肉汤培养基将乳酸杆菌制

成 10^9 cfu/mL菌悬液,并调节pH值分别为2.0,3.0,4.0,在37℃保温处理1,2,3 h。分别取各保温处理液,用MRS琼脂培养基进行菌落计数,pH 6.0的菌悬液作为对照,计算出细菌存活率。

(3)肠黏膜上皮细胞粘附性检查。参照文献[7]方法,选择出生后未吮母乳的新生幼犬,以无菌操作方法取小肠,剪开后用PBS(磷酸缓冲液,pH 7.2)液冲掉内容物,浸于PBS中,4℃放置30 min,使表面黏液松散。再用PBS液洗涤几次,用载玻片边缘将肠黏膜上皮细胞轻轻刮下,悬浮于PBS液中,涂片后,革兰氏染色镜检,无菌备用。将乳酸杆菌用PBS液制成 10^{10} cfu/mL的菌悬液,取1 mL菌悬液与1 mL肠上皮细胞悬液在试管中混合,在37℃下20 r/min振荡30 min。涂片后革兰氏染色,在显微镜下观察菌体的粘附情况。

(4)抑菌试验。参照文献[8],采用扩散法。将受试菌悬液(10^{10} cfu/mL) 0.1 mL均匀涂布于PYG琼脂平板培养基上,琼脂上打孔(孔径6 mm)并封底。将乳酸菌37℃培养36 h,PYG肉汤培养物过滤除菌液,取50 μL加入孔中,同时设pH 3.5乳酸水溶液和PYG肉汤为对照。置37℃培养24 h,测定抑菌圈直径。

(5)毒性试验。取体重18~22 g昆明小鼠30只。按雌雄随机分成3组(每组雌雄各半),分别为D1-3菌株试验组、D4-3菌株试验组和MRS液体培养基空白对照组。将乳酸杆菌按 5×10^{11} cfu/kg分别灌服小白鼠,每日1次,连续5 d。对照组口服MRS液体培养基。各组小鼠观察12 d,每日记录临床表现,并剖检观察内脏、其它组织器官和血液有无病理变化。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌分离与鉴定

采用选择培养基SL,从15份犬的肠道样品中共分离并鉴定出18株乳酸杆菌。这些菌株在MRS琼脂平板上均形成白色、圆形、边缘整齐的光滑型隆起菌落。经革兰氏染色镜检,呈革兰氏阳性,大小为(0.7~0.9) μm × (2.0~4.5) μm,无芽孢杆菌,菌体单个或成双,少数短链状。根据生长情况及耐胆盐、产乳酸能力等情况优选出5株乳酸杆菌,分别为D1-3、D2-1、D4-3、D6-2、D19-6(表1)。

表 1 生化特性鉴定结果

Table 1. Results of biological characteristic identification

项目 Item	D1 - 3	D2 - 1	D4 - 3	D6 - 2	D19 - 6
木糖 Xylose	-	-	-	-	-
海藻糖 Fucose	+	-	+	+	+
蔗糖 Sucrose	+	+	+	+	+
山梨醇 Sorbitol	-	-	-	-	-
水杨苷 Salicin	+	-	+	+	+
核糖 Ribose	-	+	-	-	+
鼠李糖 Rhamnose	-	-	-	-	-
棉籽糖 Raffinose	+	+	+	+	+
密二糖 Melibiose	+	+	+	+	+
松三糖 Melezitose	-	-	-	-	-
甘露糖 Mannose	+	+	+	+	+
甘露醇 Mannitol	-	+	-	-	-
麦芽糖 Maltose	+	+	+	+	+
乳糖 Lactose	+	+	+	+	-
葡萄糖 Dextrose	+	+	+	+	+
半乳糖 Galactose	+	+	+	+	+
果糖 levulose	+	+	+	+	+
七叶树苷 Esculin	+	-	+	+	-
纤维素二糖 Cellobiose	+	+	+	+	-
阿拉伯糖 Arabinose	-	-	-	-	-
苦杏仁苷 Laetrile	+	-	+	+	-
鉴定结果 Result	嗜酸乳 杆菌	肠乳杆菌	嗜酸乳 杆菌	嗜酸乳 杆菌	发酵乳 杆菌

2.2 胆盐耐受性

试验结果表明,5株乳酸杆菌均具有一定程度的耐盐特性,但耐盐程度有差异。在胆盐浓度 1.0~3.0 g/L 时,与空白对照组相比较,5株乳酸杆菌均生长良好。其中 D1 - 3 和 D4 - 3 菌株在胆盐浓度为 6.0 g/L 时仍生长良好,当盐浓度为 7.0 g/L 以上时生长明显受到抑制,甚至不能生长。说明 D1 - 3 和 D4 - 3 菌株是胆盐耐受能力比较强的乳酸杆菌。因此,选这 2 种菌株进行耐酸性、粘附性、抑菌作用、毒性等试验。

2.3 对酸的抵抗能力

乳酸杆菌 D1 - 3 和 D4 - 3 在不同 pH 值条件下以及不同处理时间的耐受能力见表 2。从表 2 可以看出,pH 值 3.0 和 4.0 时,1,2,3 h 3 个处理的活菌数与对照相差不大,存活率 96% 以上,说明 D1 - 3 和 D4 - 3 菌株能耐受 pH 值 3.0 和 4.0 的环境。pH 值为 2.0 时,1 h 时处理组 D1 - 3 和 D4 - 3 的存活率分别为 89% 和 86%,2,3 h 存活率明显降低,最低达 37%。说明 pH 值为 2.0 的酸性环境对 D1 - 3 和 D4 - 3 2 种菌株有比较强的抑制作用。由于动物特别是幼龄动物胃肠内的 pH 值一般为 3~5,因此,D1 - 3 和 D4 - 3 2 种菌株完全能适应动物胃肠道环境,作为微生态制剂用菌种具有较好的潜力。

2.4 肠道粘附性

在乳酸杆菌粘附性的显微观察中可见,D1 - 3 和 D4 - 3 菌株呈丛状聚集于上皮细胞表面,而细胞间菌体很少。这表明 D1 - 3 和 D4 - 3 2 种菌株对犬肠黏膜上皮细胞有良好的粘附作用。

表 2 不同 pH 值和处理时间 D1 - 3、D4 - 3 存活率

Table 2. Livability of strains D1 - 3 and D4 - 3 treated with different pH value and time %

菌株 Strain	pH 2.0			pH 3.0			pH 4.0		
	1 h	2 h	3 h	1 h	2 h	3 h	1 h	2 h	3 h
D1 - 3	89	51	38	99	97	98	100	99	97
D4 - 3	85	50	37	99	96	98	100	98	97

2.5 抑菌作用

由表 3 可以看出,菌株 D1 - 3 和 D4 - 3 对金黄色葡萄球菌、沙门氏细菌、假单胞菌均具有明显的抑制作用,对大肠杆菌也表现出抑制作用。对酵母菌没有抑制作用。pH 3.5 乳酸水溶液和 PYG 肉汤都不产生抑菌圈。图 1 显示的是 D1 - 3、D4 - 3、PYG 肉汤以及乳酸水溶液对沙门氏杆

菌的抑菌结果。

2.6 毒性试验

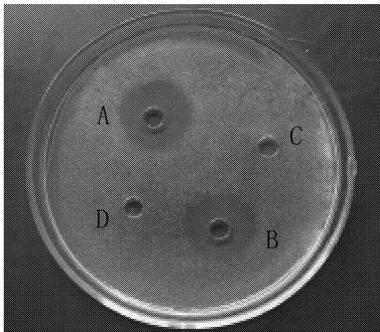
毒性试验组动物在观察期内体温、精神状态及食欲变化等临床表现均正常,观察期结束后均健康存活,无任何不良反应。剖检观察心、肺、胃、肠、肝、脾、肾等组织器官均正常,无明显病理变化,表明菌株 D1 - 3 和 D4 - 3 经口服对小白鼠均

无毒性作用。

表3 抑菌试验结果

Table 3. Results of bacteriostasis test mm

试验菌 Tested strain	抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone		特征 Characteristic
	D1 - 3	D4 - 3	
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus</i>	18.21	19.11	清晰
嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	19.10	19.22	清晰
沙门氏细菌 <i>Salmonella</i>	18.13	18.61	清晰
大肠杆菌 <i>E. coliform</i>	11.21	10.12	模糊
酵母菌 Yeast	0	0	



A. D1 - 3 菌株 Strains D1 - 3; B. D4 - 3 菌株 Strains D4 - 3;
C. PYG肉汤 PYG; D. 乳酸水溶液 Lactic acid solution (pH 3.5)

图1 乳酸杆菌 D1 - 3 和 D4 - 3 菌株对沙门氏杆菌的抑菌结果

Fig. 1. Results of Salmonella inhibition zone affected by lactobacillus D1 - 3 and D4 - 3

3 讨论

作为优良益生菌菌株必须具有粘附性,才能在肠道中长期生存并发挥作用,粘附是定植的第一步,不能粘附于肠上皮细胞表面的细菌,只能是过路菌,不能在肠道内定植^[9]。乳酸菌通过粘附素与肠黏膜细胞紧密结合,在肠黏膜表面定植占位,形成生理屏障,在维持肠道正常菌群的平衡、抵御外来病原菌的侵入等方面发挥重要的作用。粘附性试验结果表明,D1 - 3 和 D4 - 3 2 种菌株对犬肠上皮细胞表面有良好的粘附性。Savage^[6]发现乳酸菌对消化道上皮细胞的粘附性有动物种类的特异性。因此,在选育益生菌生产菌的过程中,应该采用来源于本动物的乳酸菌,并且进一步筛选具有良好粘附性的菌株。

动物胃中的 pH 值为 2.0 ~ 6.0,口服是益生菌进入肠道的主要途径,因此,益生菌菌株必须有

良好的耐酸能力,才能通过高酸性的胃环境到达肠道发挥作用。本试验结果表明,乳酸杆菌 D1 - 3 和 D4 - 3 具有很高的耐酸性。胃肠道环境对细菌的抑制因素除了 pH 值以外,还有胆汁中所含的胆盐。D1 - 3 和 D4 - 3 2 种菌株在胆盐浓度为 6.0 g/L 时仍生长良好,这与王传彬等^[7]所报道的菌株相比,胆盐耐受能力更强。因此,D1 - 3 和 D4 - 3 2 种菌株完全能适应动物胃肠道环境,作为微生态制剂用菌种具有较好的潜力。

据文献报道^[8-10],乳酸菌抑制病原菌的作用是通过产生有机酸、H₂O₂、细菌素等来实现的。本试验结果表明,乳酸菌 D1 - 3 和 D4 - 3 2 菌株的培养物对金黄色葡萄球菌、沙门氏细菌、假单胞菌均具有明显的抑制作用,但对酵母菌没有抑制作用,而 pH 3.5 的乳酸水溶液几乎不产生抑菌圈,这与王传彬等的报道相似^[7]。这说明乳酸菌的抑菌作用主要取决于乳酸以外的其它抑菌物质,有待于进一步研究。此外,乳酸菌不同菌株的抑菌谱并不一致,因此,我们认为益生菌生产时,应选用多种抑菌谱互补的菌株配合使用,以获得较好的抑菌效果。

关于乳酸杆菌 D1 - 3 和 D4 - 3 菌株的临床应用效果有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 王世荣. 益生菌研究进展[J]. 中国微生态学杂志, 1990 (2): 80-86.
- [2] Fuller R. 益生菌的作用及其在生产中的应用[J]. 国外畜牧科技, 1992, 19(5): 38-39.
- [3] 康白. 对回春生产菌种 MD8504 菌种的研究[J]. 中国微生态学杂志, 1994, 6(1): 1-6.
- [4] 凌代文. 乳酸细菌分离鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 87-88.
- [5] Sneath P H A, Jones D. The genus Brochothrix[A]. In: Sneath P H A, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [C]. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986, 2: 1249-1253.
- [6] 方祥, 胡文锋, 张辉华. 乳酸菌的分离、鉴定及其生长特性[J]. 中国微生态学杂志, 2000, 12(5): 262-264.
- [7] 王传彬, 王永坤, 周国强. 动物源乳酸菌筛选及生物特性参数测定[J]. 江苏农学院学报, 1997, 18(1): 1-5.
- [8] 王世荣. 乳酸菌代谢产物对常见致病菌的体外抑菌试验[J]. 中国微生态学杂志, 1990, 2(2): 38-40.
- [9] 王建国, 王永坤. 益生菌必备条件及其功效评价[J]. 中国家禽, 2002, 24(2): 4-9.
- [10] 楚渠, 彭云武. 益生菌菌种特性及主要作用[J]. 陕西农业科技, 2004 (1): 65-66.