

兔胃肠道中双歧杆菌的初步研究*

牛钟相 朱瑞良 常维山 唐珂心 徐海花

(山东农业大学动物科技学院 泰安 271018)

双歧杆菌 (*Bifidobacterium*) 是兔体及其它某些哺乳动物的重要生理细菌, 在微生态学上属于原籍菌群 (autochthonous flora)。它是一属革兰氏阳性、无芽胞、无荚膜、无鞭毛、多形性厌氧杆菌。该菌对人、畜无害而有利, 是动物肠道内的优势菌, 能合成动物体必需的营养物质, 调节机体代谢, 能拮抗多种肠道病原微生物, 有抗感染作用, 增强机体免疫力, 有调节肠道菌群平衡等作用。但对兔肠道双歧杆菌的分布情况等方面的报道甚少。本文报道应用微生态学研究方法, 对此菌进行定量、定性及其他生物学方面内容的系统研究结果, 为进一步开展生态制剂的研制与应用研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验兔: 2.5~3.0kg 健康哈白兔 10 只, 购自山东农业大学教学实习牧场。

1.1.2 厌氧培养装置: 本室自行设计安装。

1.1.3 BS 培养基: 按文献[1]方法制备。

1.1.4 稀释液: 按文献[1]方法制备。

1.1.5 生化试验用培养基: 按文献[1]方法制备。

1.2 方法

1.2.1 样品的采集及稀释: 将兔子麻醉或击昏, 固定四肢, 剖腹取出胃肠。无菌取胃、十二指肠、空肠、盲肠内容物各 0.5g 分别放入装有 4.5ml 无菌稀释液的小瓶内, 充分摇匀后取 0.5ml 注入第二瓶, 如此连续稀释至第 7 瓶, 即得 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 及 10^{-7} 稀释度。

1.2.2 滴种: 将稀释的各检样从高稀释度用特定滴管滴种于两个 BS 培养基平板表面上, 每个平板滴 3 个稀释度, 每个稀释度各滴种 3 滴。

1.2.3 培养: 将滴种的各个平皿放入厌氧培养罐内, 抽气, 然后按 N_2 60%、 CO_2 20%、 H_2 20% 的量充气, 放 38℃ 温箱内培养 72h。

1.2.4 菌落观察、计数: 菌落数计数公式为: 稀释度的平均菌落数 $\times 47$ (特定滴管滴数 / ml 稀释液) $\times$ 稀释倍数。

1.2.5 双歧杆菌的生物学特性鉴定: 染色镜检: 将分离纯化的双歧杆菌涂片, 进行革兰氏染色、鞭毛染色和抗酸染色, 镜检, 观察其形态、结构。生化试验: 将纯化的兔双歧杆菌接种于生化用培养基中, 进行厌氧培养 (培养条件同上), 记录结果。兔双歧杆菌的超微结构观察: 将不同培养时间的兔双歧杆菌的 PYG 液体培养物分别离心, 取沉淀物进行包埋, 做超薄切片, 染色后用电子显微镜观察其超微结构。保藏试验: 取兔双歧杆菌的 PYG 培养液试管三支, 其中一支放厌氧培养罐内于 4℃ 冰箱中保藏, 一支放室温保

* 山东省自然科学基金委资助项目。

本文于 1995 年 3 月 29 日收到。

藏,另一支放液氮中保藏。开始时每 15d 取各管菌传代一次(用 BS 平板),以后每隔 30d 传代一次,观察兔双歧杆菌在各种保藏环境下的存活时间。G+C mol%测定:将双歧杆菌从 BS 琼脂平板上洗下,4000r/min 离心 30min,弃上清液,用 SE 液重悬菌体,用溶菌酶和 SDS 裂解菌体,用饱和酚-乙醇提取 DNA。将提纯的 DNA 溶于 0.1%SSC 液中适当稀释后,用 871 型测定仪测 DNA 中 G+C 含量(Tm)。药敏试验:采用纸片法。抑菌试验:用试管培养和平板菌落计数法,将兔双歧杆菌对致病性大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的抑菌能力进行了试验。

2 结果

2.1 兔胃肠道双歧杆菌的计数

健康成年兔胃、空肠、直肠中的兔双歧杆菌的对数均值分别为 4.89 ± 0.52 、 6.20 ± 0.39 和 6.81 ± 0.54 ,十二指肠中未分离出该菌,可能与胆汁等消化液的抑菌作用有关。

2.2 兔双歧杆菌的染色及形态特性

经染色、镜检,该菌为革兰氏阳性无芽胞杆菌;抗酸染色为阴性;鞭毛染色、镜检未发现鞭毛。本菌为多形性,长短不一,有的还形成分叉。

2.3 生化特性

经用各种生化培养基试验,结果发现,该菌能分解葡萄糖、麦芽糖、阿拉伯糖、七叶苷和赖氨酸;不分解利用乳糖、棉籽糖、鼠李糖、木糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇和侧金盏花醇;不产生 H_2S 、胺基质和尿素酶,不利用鸟氨酸。

该菌的 G+C mol% 为 66.8(Tm)。

根据以上生物学特性,确定该菌为兔双歧杆菌。

2.4 兔双歧杆菌的超微结构

对厌氧培养(用 PYG 液体培养基 48h)的兔双歧杆菌用电镜进行超微观察,发现该菌具有糖被、细胞壁、胞膜、胞质及内容物等完整的细胞结构。菌体两端钝圆,最长为 $40\mu m$,最宽为 $1\mu m$,并有许多处在裂殖过程中的细菌。另外,对培养 96h 以上的老龄菌观察发现无糖被,胞壁不完整,且有分叉杆菌存在。

2.5 保藏试验

用不同方法保藏,该菌的存活时间是:室温 7d,4℃ 冰箱 15d,液氮 180d 以上。

2.6 药敏试验

该菌对氯霉素、麦迪霉素、红霉素、先锋霉素、链霉素、氨苄青霉素和羧苄青霉素高度敏感;对新霉素、四环素、氧哌嗪青霉素、卡那霉素、万古霉素及青霉素中、低度敏感;对多粘菌素、妥布霉素、丁胺卡那霉素、苯唑青霉素和磺胺不敏感。

2.7 抑菌试验

试验结果表明,兔双歧杆菌对致病性大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等在 24h 具有强的杀灭作用。

3 讨论和分析

兔双歧杆菌在成年兔胃、肠道中具有一定数量,也是一种正常菌,兔在发生腹泻病时,该菌的数量会明显减少。本试验结果证明,该菌在兔的直肠内数量最高,空肠次之,胃内最少,十二指肠内未发现本菌存在。此种分布情况与其它动物胃肠内双歧杆菌的分布情况相似,但兔体内双歧杆菌含量较高,可能与兔的食粪生理习性有关。由于胃内 pH 值较低,所分离的胃内的兔双歧杆菌可能大部分属于腔菌群。十二指肠段本菌不能生存的原因,可能与此段的胆汁等大量消化液的杀菌作用有关。随着肠段的

后移,此菌越来越多,且多为膜菌群。探明本菌在胃肠内的分布规律,对了解本菌对兔体的抗菌作用、营养作用等生理功能具有重要意义,可为开发利用本菌作为优势菌株研制微生态制剂提供理论依据。

通过对本菌进行染色特性试验、形态结构观察、生化试验等一系列生物学特性检测,证明本菌为兔双歧杆菌。另外,由于本菌对厌氧等条件要求比较苛刻,所以对保存本菌菌种造成了困难。经多次试验,终于找到了用液氮保存该菌的好方法,为今后开发利用本菌提供了保证。

通过药敏试验证明,兔双歧杆菌对链霉素、红霉素、先锋霉素、氯霉素等多种抗生素均敏感。本结果表明,在采用本菌作为微生态制剂防治兔疾病时,禁止同时用敏感药物,只能应用非敏感药物,否则会影响本菌制剂的作用效果。

关于兔双歧杆菌的研究内容,在国内尚未见报道。

参 考 文 献

- [1] 熊德鑫.厌氧菌分离和鉴定方法.南昌:江西科学技术出版社,1986.18~28.
- [2] 魏 曦,康 白.正常菌群与健康.上海:上海科学技术出版社,1985.243~247.
- [3] 康 白.微生物学.大连:大连出版社,1988.374~383.
- [4] 何明清.动物微生物学.北京:中国农业出版社,1994.146.
- [5] 蒋寒青,康 白.中国微生物学杂志,1994,6(3):29~31.
- [6] Peper H A S. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore / London: Williams and Wikins Press. 1986. 1418.
- [7] Yamamoto T. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58(12): 4076.

PRELIMINARY RESEARCH ON *BIFIDOBACTERIUM CUNICULI* IN STOMACH AND INTESTINES OF RABBITS

Niu Zhongxiang Zhu Ruiliang Chang Weishan Tang Kexin Xu Haihua

(Shandong Agricultural University, Taian 271018)

Abstract The distribution of *Bifidobacterium* in stomach and intestines of ten health rabbits were studied by microecological methods. The results showed that *Bifidobacterium* exist in stomach, small intestine and large intestine, the amount highest in large intestine, second in jejunum and no finnd in duodenum. Being isolated, purified and biologically identified, the bacteria was identified as *Bifidobacterium cuniculi*, whose other biological characteristics also was studied.

Key words Stomach and intestines of rabbits, *Bifidobacterium cuniculi*, Biological characteristics