

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (4) :433 - 441; 4 April 2014
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.04.010

适用于分离人肠道中双歧杆菌的选择性培养基

霍冬雪, 张家超, 白娜, 黄卫强, 张和平*

内蒙古农业大学, 乳品生物技术与工程教育部重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010018

摘要: 【目的】比较并评价 5 种双歧杆菌选择性培养基对人源双歧杆菌的分离效果, 试图筛选出一种适用于人肠道中双歧杆菌分离培养的选择性培养基。【方法】采集 6 份健康人粪便样品稀释涂布于 5 种选择性培养基上, 厌氧培养后计数菌落并挑选单菌落进行鉴定。同时提取样品中细菌宏基因组 DNA, 应用变性梯度凝胶电泳技术 (Denaturing Gel Gradient Electrophoresis, DGGE) 和荧光定量 PCR 技术 (Quantitative Polymerase Chain Reaction, q-PCR) 揭示样品中双歧杆菌种类和数量, 并以此为依据, 客观评价上述 5 种选择性培养基的分离效果。【结果】BSM 培养基和 BLM 培养基上双歧杆菌的计数结果与 q-PCR 的定量结果最为接近, 并显著高于其它 3 种培养基。BLM 培养基上分离到双歧杆菌的种类与 DGGE 图谱多样性分析的结果最为接近。【结论】BLM 培养基是一种适用于人肠道中双歧杆菌分离培养的选择性培养基。

关键词: 双歧杆菌, 变性梯度凝胶电泳技术, 荧光定量 PCR 技术, 选择性培养

中图分类号: Q938.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2014)04-0433-09

健康人肠道内栖居着数以千计种类的微生物, 其中 99% 的微生物仅由 30 - 40 种细菌构成, 主要为拟杆菌、双歧杆菌、梭状芽胞菌、肠球菌、真杆菌、梭形杆菌、消化链球菌、乳杆菌及埃希氏杆菌属等^[1-2]。研究表明, 肠道菌群能够影响宿主的营养物质利用、能量平衡、免疫功能、胃肠道发育以及其它多种重要的生理活动^[3-4]。在这些种类繁多数目庞大的肠道菌群中, 双歧杆菌 (*Bifidobacterium*) 是人和动物肠道内最重要的革兰氏阳性无芽孢杆菌, 其在长期进化过程中与宿主形成了和谐互惠的依存关系。

1899 年, 法国巴斯德研究所的 Tissier 研究员首次从母乳喂养婴儿粪便中分离出双歧杆菌。一个

世纪以来, 研究人员从分类进化以及功能代谢的角度对该菌属进行了极其广泛的研究。报道称, 双歧杆菌的主要生理功能包括: 增强免疫功能^[5], 调整肠道菌群^[6-7], 防止便秘, 降低结肠癌的发病率^[8], 提高蛋白质和维生素的代谢, 缓解乳糖不耐症, 治疗肝损伤, 抗肿瘤, 降低胆固醇等^[9-10]。尽管双歧杆菌的益生机制还不是完全清楚, 但是近年来, 双歧杆菌类益生菌产品得到了消费者极大程度的追捧。由于只有健康人源的双歧杆菌才有可能作为潜在的益生菌添加到食品中, 因此目前市面上销售益生菌产品中的双歧杆菌如乳双歧杆菌 (*Bifidobacterium lactis*) BB12, V9 等均分离自人体肠道。由此可以看出, 健康人源双歧杆菌的获得是益

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30660135)

* 通信作者。Tel: +86-471-4319940; Fax: +86-471-4300122; E-mail: hepingdd@vip.sina.com

作者简介: 霍冬雪 (1987 -), 女, 内蒙古鄂尔多斯人, 硕士研究生, 研究方向为乳品生物技术。E-mail: 18647138363@126.com

收稿日期: 2013-08-09; **修回日期:** 2013-12-08

生菌产品开发应用的基础,而筛选出一种适用于人肠道中双歧杆菌计数和分离培养的选择性培养基就显得格外重要。

自 1993 年 Muzyer 首次将变性梯度凝胶电泳技术 (Denaturing Gel Gradient Electrophoresis, DGGE) 应用于微生物研究以来,近 20 年来该技术得到迅猛发展,并被广泛应用于肠道微生物多样性分析^[11]。DGGE 技术灵敏度高,甚至可以区分一个碱基的差异,所以当变性梯度选择合适的时候,在 DGGE 凝胶图谱中可以呈现样品中所有物种的信息。1996 年,荧光定量 PCR (Quantitative Polymerase Chain Reaction, q-PCR) 技术由美国 Applied Biosystems 公司率先推出。该技术是在完全封闭的 PCR 检测仪上进行扩增和分析,并且具有准确性好、灵敏度高、特异性强的优势,因此该技术已被广泛应用于肠道内目的微生物群落的定量研究。综上可知,DGGE 技术和 q-PCR 技术的联合使用可以全面精准快速的评估环境样品中微生物的种类及其数量。因此,将这两种技术联合使用,作为对人肠道中双歧杆菌选择性培养基培养效果的评估是最全面客观的。

本研究以采集自内蒙古呼和浩特市 6 份健康人粪便样品 (3 份婴儿,3 份成人) 为研究对象,选用 5 种双歧杆菌选择性培养基 (MTPY, BSM, BS, BLM, BBL) 在严格厌氧条件下分离计数以上 6 份粪便样品中的双歧杆菌。同时应用 DGGE 和 q-PCR 技术对 6 份粪便样品中双歧杆菌的种类和数量进行监测。最后,将培养基计数结果和分离株鉴定结果与 DGGE 多样性研究结果和 q-PCR 菌种定量结果

进行对比,全面客观的评估这 5 种培养基对于人源双歧杆菌的分离培养效果。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 培养基: (1) MTPY 培养基:在 TPY 培养基的基础上每升添加 1 mL 吐温 80, 1 mL 冰醋酸, 0.05% 的 L-半胱氨酸盐酸盐和 50 mg 莫匹罗星; (2) BSM 培养基:在 MRS 培养基的基础上每升添加 0.05% 的 L-半胱氨酸盐酸盐和 50 mg 莫匹罗星; (3) BS 培养基:在 MRS 培养基的基础上每升添加 20 mg 硫酸新霉素和 30 mg 硫酸巴龙霉素; (4) BLM 培养基,在 MRS 培养基的基础上每升添加 50 mL 的滤菌马血清和 50 mg 莫匹罗星; (5) BBL 培养基 (也称 BFM 培养基), 配制依照参考文献 [16]。

1.1.2 主要试剂和仪器:伯乐公司变性梯度凝胶电泳仪 (Dcode system), AB 公司荧光定量 PCR 仪 (Step-One plus), TGL-16B 型台式高速离心机, ND-1000 型微量紫外分光光度计, ML-30L 型全自动高压蒸汽灭菌器, HHSI-NI 恒温水浴槽, CDS8000 型 UPV 凝胶成像分析系统, DHP-9272 型电热恒温培养箱, HZS-H 水浴振荡器, PL303/01 电子天平, TGL-16G-A 型高速冷冻离心机, DG82 型干燥箱, PTC-200 型梯度基因扩增仪, 电泳仪, 本试验所用引物均由上海桑尼生物科技有限公司合成, 具体引物序列见表 1。

表 1. 试验所用引物

Table 1. Primers used in this study

method	primer	sequence (5'→3')	reference
16S rRNA gene analysis	A27F	CTACGGCTACCTTGTACGA	this work
	A1495R	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	
DGGE for <i>Bifidobacterium</i>	DBIF	CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGG CACGGGGGGGTGTTCTTCCCGATATCTACA	[12]
	DBIR	CTCCTGGAAACGGGTGG	
Q-PCR for <i>Bifidobacterium</i>	QBIF	GGTGTCTTCCCGATATCTACA	[13]
	QBIR	CTCCTGGAAACGGGTGG	

1.2 粪便样品的采集

使用无酶无菌粪便样品收集管采集内蒙古呼和浩特市 6 名健康人粪便样品 (3 名婴儿, 3 名成人), 并保证 20 min 内将样品运送转移至实验室用于后续菌种分离及 DNA 提取研究。

1.3 双歧杆菌的分离计数

将粪便样品用漩涡振荡器混匀, 用浓度为 0.85% 的无菌生理盐水以十倍稀释法对样品进行梯度稀释, 分别选取稀释度为 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 的稀释液 100 μ L 涂布于上述 5 种培养基中, 置于厌氧罐中

添加厌氧产气袋, 37℃ 恒温厌氧培养 48 h。而后观察并记录菌落形态, 计数菌落个数, 用无菌的接种针或接种环挑取单个特征菌落于以上 5 种液体培养基中, 37℃ 培养 48 h, 进行革兰氏染色, 镜检, 确定为革兰氏阳性纯培养物后继续活化保存纯分离株。

1.4 双歧杆菌分离株的鉴定

提取分离得到的双歧杆菌基因组 DNA, 采用改良的 CTAB-冻融方法提取菌株基因组 DNA^[14], 即用液氮反复冻融后进行提取。将 DNA 原液稀释到 100 ng/μL, 使用实验室自主设计的引物 A27F 和 A1495R 对参考菌株的 16S rRNA 片段进行扩增, 菌体扩增条件如下: 94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 58℃ 1 min, 72℃ 2 min, 30 个循环; 72℃ 10 min。然后将扩增成功的产物寄往上海美吉生物医药有限公司测序, 将测序结果上传到 NCBI 使用 BLAST 完成比对鉴定。

1.5 粪便样品宏基因组 DNA 的提取

使用 QIAGEN 粪便中细菌基因组提取试剂盒 (QIAGEN, 51804) 按照说明书提取 6 份粪便样品中细菌宏基因组 DNA。

1.6 变性梯度凝胶电泳检测粪便样品中双歧杆菌属种类

选用双歧杆菌特异性引物 DBIF 和 DBIR^[12-13], 对粪便中双歧杆菌宏基因组 DNA 进行扩增, 并将 300 ng 扩增产物于 8% 的聚丙烯酰胺胶上进行分离, 变性剂梯度范围为 40% - 60% (100% 的变性剂包含 7 mol/L 尿素和 40% 去离子甲酰胺)。电泳在恒温 60℃ 下 1 × TAE 缓冲液中进行, 电压 120 V, 时间 7 h。电泳结束后进行银染并对电泳图谱进行分析。将图谱中每个单一条带回收后作为模板, 使用不带 GC 夹子的上述引物扩增并进行产物纯化。通过 A/T 克隆技术将扩增的 16S rDNA 目的片段与 pMD19-T 载体连接, 转化 *E. coil* JM109 感受态细胞, 经蓝白斑筛选挑取阳性克隆接入 5 mL 的 LB 液体培养基中, 在 37℃ 220 r/min 过夜培养, 将菌液送上海美吉生物医药有限公司测序, 将测序结果上传到 NCBI 使用 BLAST 完成比对鉴定。

1.7 荧光定量 PCR 检测粪便样品中双歧杆菌属数量

用双歧杆菌属特异性引物 QBIF 和 QBIR 扩增双歧杆菌参考菌株动物双歧杆菌 (*Bifidobacterium animalis*) ATCC 25527 (该菌株购自

美国模式培养物集存库), 将扩增产物与 pMD19-T 载体连接, 转化到 JM109 感受态细胞中, 筛选阳性克隆子, 试剂盒提取阳性克隆质粒。测定质粒浓度并计算拷贝数, 以 10 倍梯度稀释后的质粒为模板, 构建标准曲线。而后将构建的标品梯度稀释后与 6 份粪便样品宏基因组 DNA 一起在荧光定量 PCR 仪中运行计算样品中双歧杆菌属的数量。实时定量 PCR 反应体系: SYBR Green 2 × Buffer 10 μL, 引物 0.4 μL (10 μmol/L), 总 DNA 模板 2 μL, ddH₂O 补足至 20 μL, 设置 3 个重复。反应条件: 94℃ 30s; 94℃ 5s, 60℃ 40s, 72℃ 50s, 40 个循环; 融解温度 65℃ - 95℃。

1.8 试验数据统计分析

应用 BioNumerics 6.6 软件标准化 DGGE 凝胶电泳图并进行聚类分析, 应用 GraphPad Prism 6 分析双歧杆菌培养基计数结果和荧光定量结果并做箱型图和雷达图, 应用 Cluster 3.0 和 Java Treeview 构建基于 DGGE 比对结果和选择性培养基分离结果的树状图。

2 结果

2.1 分离于 5 种选择性培养基上的双歧杆菌鉴定结果

应用 16S rRNA 基因序列分析技术, 我们将 5 种选择性培养基上挑取的双歧杆菌分离株进行了鉴定, 鉴定结果如表 2 所示。使用 MTYP 和 BBL 培养基, 我们从 6 份样品中仅分离到假小链菌双歧杆菌 (*Bifidobacterium pseudocatenulatum*) 和短双歧杆菌 (*Bifidobacterium breve*) 两种双歧杆菌, 而在样品 2 和样品 5 中, 未能分离到双歧杆菌。使用 BSM 培养基, 分离到青春双歧杆菌 (*Bifidobacterium adolescentis*), *B. breve*, *B. animalis* 和 *B. pseudocatenulatum* 4 种双歧杆菌; 使用 BS 培养基, 分离到 *B. adolescentis*, *B. breve* 和 *B. animalis* 和 *B. pseudocatenulatum* 4 种双歧杆菌; 而使用 BLM 培养基, 我们共从 6 份样品中分离到 *B. adolescentis*, *B. breve* 和 *B. bifidum*, 长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum*) 和 *B. pseudocatenulatum* 5 种双歧杆菌。

表 2. 5 种双歧杆菌选择性培养基上双歧杆菌分离情况

Table 2. The *Bifidobacterium* isolates on five selective mediums

medium	sample 1	sample2	sample3	sample4	sample5	sample6
MTPY	<i>B. pseudocatenulatum</i>	–	<i>B. pseudocatenulatum</i>	<i>B. pseudocatenulatum</i>	–	<i>B. pseudocatenulatum</i>
BSM	<i>B. adolescentis</i>	<i>B. breve</i>	<i>B. animalis</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>B. animalis</i>	<i>B. adolescentis</i>
	<i>B. breve</i>	<i>B. pseudocatenulatum</i>	<i>B. pseudocatenulatum</i>	<i>B. breve</i>	<i>B. breve</i>	<i>B. pseudocatenulatum</i>
	<i>B. pseudocatenulatum</i>			<i>B. pseudocatenulatum</i>		
BS	<i>B. adolescentis</i>	<i>B. breve</i>	<i>B. animalis</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>B. breve</i>	<i>B. adolescentis</i>
	<i>B. pseudocatenulatum</i>	<i>B. pseudocatenulatum</i>	<i>B. pseudocatenulatum</i>	<i>B. pseudocatenulatum</i>		<i>B. pseudocatenulatum</i>
BLM	<i>B. adolescentis</i>	<i>B. animalis</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>B. animalis</i>	<i>B. animalis</i>	<i>B. bifidum</i>
	<i>B. longum</i>	<i>B. breve</i>	<i>B. longum</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>B. breve</i>	<i>B. adolescentis</i>
	<i>B. breve</i>	<i>B. pseudocatenulatum</i>	<i>B. animalis</i>	<i>B. breve</i>	<i>B. pseudocatenulatum</i>	<i>B. pseudocatenulatum</i>
	<i>B. pseudocatenulatum</i>		<i>B. pseudocatenulatum</i>	<i>B. pseudocatenulatum</i>		
BBL	<i>B. pseudocatenulatum</i>	<i>B. breve</i>	<i>B. pseudocatenulatum</i>	<i>B. pseudocatenulatum</i>	–	<i>B. pseudocatenulatum</i>
		<i>B. pseudocatenulatum</i>				

“–” means no *Bifidobacterium* was isolated.

2.2 5 种选择性培养基和 q-PCR 定量样品中双歧杆菌数量

结合上文双歧杆菌鉴定结果,我们对涂布有粪便样品的 5 种双歧杆菌选择性培养基上生长的双歧杆菌菌落进行了计数。同时,选取双歧杆菌属特异性引物,应用 q-PCR 技术对 6 份粪便样品中的双歧杆菌进行定量。计数和定量结果如图 1 所示。由图 1 我们可知,双歧杆菌菌落在 5 种选择性培养基上的生长数量分别为: MTPY, $(4.29 \pm 1.34) \lg_{10} \text{ CFU/g}$; BSM, $(8.43 \pm 0.23) \lg_{10} \text{ CFU/g}$; BS, $(6.96 \pm 0.19) \lg_{10} \text{ CFU/g}$; BLM, $(8.08 \pm 0.22) \lg_{10} \text{ CFU/g}$; BBL, $(5.34 \pm 1.08) \lg_{10} \text{ CFU/g}$ 。而应用 q-PCR 技术的定量结果为: $(9.93 \pm 0.19) \lg_{10} \text{ CFU/g}$ 。经过显著性分析可知,应用 q-PCR 定量双歧杆菌结果显著高于选择性培养基上双歧杆菌的计数结果 ($p < 0.001$),而双歧杆菌疑似菌落在 BSM 和 BLM 培养基上的生长数量又显著高于其它 3 种培养基 ($p < 0.001$)。

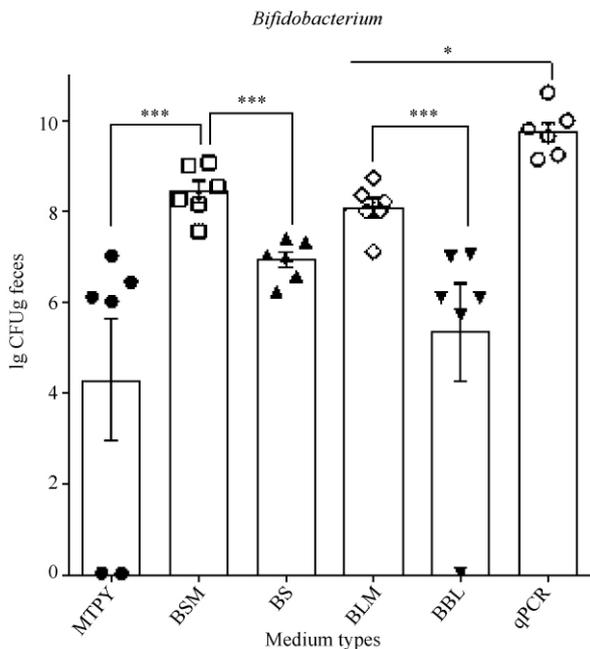


图 1. 双歧杆菌计数结果

Figure 1. The amount of *Bifidobacterium*.

2.3 基于 DGGE 技术的样品中双歧杆菌多样性分析

使用带有 GC 夹子的双歧杆菌属特异性引物直接扩增 6 份粪便样品中细菌的宏基因组 DNA,将扩增产物进行 DGGE 电泳。电泳图谱经过 BioNumerics 6.6 软件的标准化的后如图 2-A 所示,在

图中我们可以清晰的看到基于样品条带多样性的聚类分析将样品 1-3 (3 份婴儿粪便样品聚在了一起),而样品 4-6 (3 份成人粪便样品)则聚在图谱下方。将电泳图谱中的特异性条带(条带 A-J)回收后鉴定,鉴定结果如图 2-B 所示。由条带(A-J)鉴定结果判别,所有 6 份样品中均含有 *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. breve* 和 *B. pseudocatenulatum* 以上 4 种双歧杆菌,而在样品 1, 3, 4, 5 中还富含 *B. angulatum* 和 *B. longum*。此外,我们发现在婴儿粪便样品中含有 *B. infantis* 和 *B. dentium*,而在成人样品中含有 *B. bifidum*。

3 讨论

本研究比较评价了 5 种双歧杆菌选择性培养基用于人肠道中双歧杆菌分离的效果,并应用 DGGE 和 q-PCR 的分子生物学手段进行了验证。

在本研究中,我们选用的 5 种选择性培养基 (MTPY, BSM, BS, BLM 和 BBL) 是在广泛查阅文献的基础上挑选出来的。在现有的文献报道中, BSM, MTPY 和 BBL (也有人称为 BFM) 使用的比较广泛,而 BSM 培养基被认为效果最好^[15-18]。BSM 培养基是在 MRS 培养基的基础上添加了抗生素莫匹罗星和 L-半胱氨酸盐酸盐配制而成。MRS 培养基被认为是最佳的乳酸菌分离培养基,而双歧杆菌又具有莫匹罗星的抗性,此外,双歧杆菌严格厌氧, L-半胱氨酸盐酸盐具有还原性可以降低氧化还原电势,因此 BSM 培养基在选择性分离双歧杆菌的效果上自然非凡。而 BLM 培养基和 BS 培养基则是本实验室自己配置,它们的配制是受到了 Simpson 关于双歧杆菌研究的启发^[19]。该研究发现,马血清的加入可以显著促进双歧杆菌的生长,而且双歧杆菌还兼有硫酸新霉素和硫酸巴龙霉素的抗性。因此 BLM 培养基的配制是在 BSM 培养基的基础上添加了马血清,而 BS 培养基的配制是将 BSM 培养基中的莫匹罗星换成了硫酸新霉素和硫酸巴龙霉素。

2010 年,南非学者 Akihito Endo 应用纯培养和分子生物学的技术研究了南非西开普草原上 16 种动物肠道内乳杆菌和双歧杆菌的多样性^[15]。这 16 种动物既包括食草类的小袋鼠和跳羚羊也包括食肉

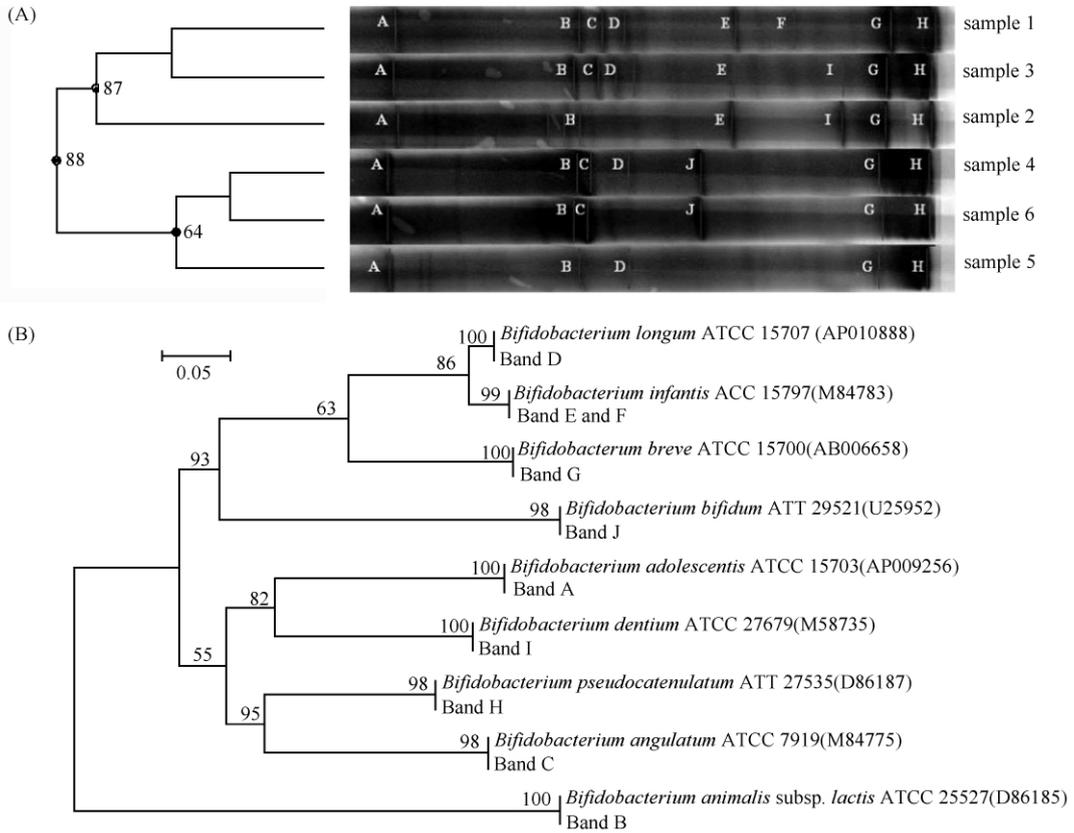


图 2. 基于 DGGE 样品中双歧杆菌多样性分析和系统发育树

Figure 2. Phylogenetic tree of the diversity of *Bifidobacterium* revealed by DGGE profile. Band A-J represented the bands extracted from the DGGE profile. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 0.5% sequence divergence.

类的狮子和豺狼还包括一些杂食类的浣熊和鸵鸟。在此研究中,BSM 培养基被选取为双歧杆菌选择性分离培养基。应用该培养基,研究人员共从以上 16 种动物中分离得到 4 种 15 株双歧杆菌,分别为:*B. scardovii*, *B. breve* 和 *B. longum* 和 *B. pseudocatenulatum*,而且这些双歧杆菌全部是从食草和杂食动物肠道中分离出。而基于 DGGE 技术的双歧杆菌多样性分析结果则鉴定出更多种类的双歧杆菌。尽管如此,作者还是给予 BSM 培养基在分离双歧杆菌效果上的充分肯定。同年,法国学者 Laurent Ferraris 比较了双歧杆菌在 BSM, MTPY 和 BFM3 种选择性培养基上的生长情况^[16]。在本研究中,实验人员首先选取了双歧杆菌属下 9 种 15 株参考菌株,涂布培养于以上 3 种培养基上。而后采集 15 份健康法国志愿者的粪便样品,经过稀释涂布严格厌氧培养后,对 3 种培养基上生长的菌落进行了计数和鉴定。研究结果表明,不论是针对单一菌株

的培养,还是针对人粪便样品中双歧杆菌的选择性分离培养,BSM 培养基上菌落生长情况都是最好的,平均可以达到 $(8.15 \pm 0.17) \lg_{10} \text{CFU/g}$,而 MTPY 和 BFM 培养效果次之,仅能够达到 $(7.28 \pm 0.31) \lg_{10} \text{CFU/g}$ 和 $(7.14 \pm 0.21) \lg_{10} \text{CFU/g}$ 。

为了更加客观的评估上述 5 种选择性培养基在人源双歧杆菌分离中的效果,本文选用了 DGGE 和 q-PCR 相结合的分子生物学手段对 6 份粪便样品中双歧杆菌的多样性进行了研究。DGGE 技术灵敏度高,可以尽可能多的揭示样品中物种的多样性,而 q-PCR 技术具有准确性好特异性强的优势,因此近些年这两种技术常常被联合使用,用于评估样品中特定菌属的多样性和数量^[20-23]。芬兰学者 SATOKARI 应用 PCR-DGGE 技术研究了 6 名芬兰成年志愿者粪便中双歧杆菌的多样性^[20]。通过双歧杆菌属特异性引物,研究人员获得一段 520 bp 大小的双歧杆菌特异性片段,将该片段进行 DGGE 凝胶

电泳。电泳后在凝胶图谱中挑选清晰单一条带回收扩增测序比对, 得出鉴定结果。研究结果表明, 在芬兰志愿者肠道内共分布有 *B. adolescentis*, *B. Breve*, *B. longum*, *B. angulatum*, *B. bifidum* 和 *B. pseudocatenulatum*, 其中 *B. Pseudocatenulatum* 和 *B. Bifidum* 是优势菌群。应用 q-PCR 技术, 日本养乐多集团研究人员 Matsuki 定量研究了 6 名日本志愿者肠道内优势菌群的数量^[21]。通过设计种属特异性引物, 该研究准确评估了 *Clostridium coccoides* group, *Clostridium leptum* subgroup, *Bacteroides fragilis* group, *Bifidobacterium*, *Atopobium* 和 *Prevotella* 等 6 类肠道内常见菌群的数量。其中双歧杆菌属在 6 名志愿者体内的数量平均为 $(9.78 \pm 0.17) \lg_{10}$ CFU/g。应用 PCR-DGGE 和 q-PCR 相结合的技术, 西班牙学者 Martín 准确分析了 23 名母乳喂养的婴儿粪便中双歧杆菌的种类及其数量^[22]。他发现在婴儿降生初期, *Bifidobacterium breve*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. bifidum*, 和 *B. dentium* 均可以在婴儿粪便中检测到, 而 q-PCR 的结果显示 *Bifidobacterium breve* 和 *B. adolescentis* 的含量显著高于其它菌种。

评价一种选择性培养基的优劣, 首先要看其是否能尽可能多的分离到目标菌种, 而且要兼顾目标菌种在该培养基上的生长情况。在本研究中, 从计数结果来看, BSM 培养基和 BLM 培养基的计数结果

显著高于其它 3 种培养基, 且与 q-PCR 的定量结果最为接近。因此以上两种培养基适合于双歧杆菌的生长。再从分离到双歧杆菌的种类来评价 (如图 3 所示), 与 DGGE 的鉴定结果比较, BLM 培养基最为接近, 能够尽可能多的分离到样品中的不同种类的双歧杆菌。因此, 综合比较后我们认为, 不论从菌落生长的数量, 还是从菌种分离的种类, BLM 培养基都是一种适用于人肠道中双歧杆菌分离培养的选择性培养基。

参考文献

- [1] Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 1995, 125 (6): 1401-1412.
- [2] Delcenserie V, Martel D, Lamoureux M, Amiot J, Boutin Y, Roy D. Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. *Current Issues in Molecular Biology*, 2008, 10 (1/2): 37-54.
- [3] Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI. Molecular Analysis of Commensal Host-Microbial Relationships in the Intestine. *Science*, 2001, 291 (5505): 881-884.
- [4] Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, Bewtra M, Knights D, Walters WA, Knight R, Sinha R, Gilroy E, Gupta K, Baldassano R, Nessel L, Li H, Bushman FD, Lewis JD. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*, 2011, 334 (6052): 105-108.
- [5] Tojo M, Oikawa T, Morikawa Y, Yamashita N, Iwata S, Satoh Y, Hanada J, Tanaka R. The effects of *Bifidobacterium breve* administration on campylobacter enteritis. *Acta Paediatr*, 1987, 29 (1): 160-167.
- [6] Rial DR. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *The Journal of Nutrition*, 2000, 130 (2): 396-402.
- [7] Gibson GR, Willems A, Reading S, Collins MD. Fermentation of non-digestible oligosaccharides by human colonic bacteria. *Proceeding of the Nutrition Society*, 1996, 55 (3): 899-912.
- [8] Linda JB, Daniel DG, Frank FB. The role of probiotic cultures in prevention of colon cancer. *The Journal of Nutrition*, 2000, 130 (2): 410-414.

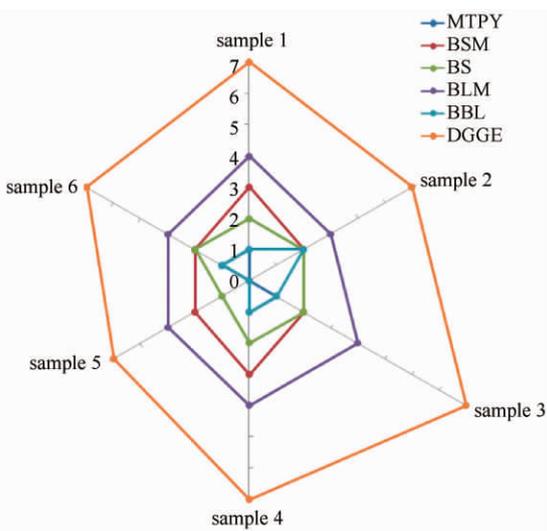


图 3. 5 种选择性培养基分离双歧杆菌效果图

Figure 3. The effects of five selective mediums for *Bifidobacterium* isolation.

- [9] Yusof RM, Haque F, Ismail M, Hassan Z. Isolation of Bifidobacteria infants and its antagonistic activity against ET EC 0157 and Salmonella typhimurium S-285 in weaning foods. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 2000, 9(2): 130-135.
- [10] Arunachalam KD. Role of bifidobacteria in nutrition, medicine and technology. *Nutrition Research*, 1999, 19(10): 1559-1597.
- [11] Muyzer G, Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3): 695-700.
- [12] Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1998, 73(1): 127-141.
- [13] Satokari RM, Vaughan EE, Akkermans AD, Saarela M, de Vos WM. Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001, 67(2): 504-513.
- [14] Wu R, Zhang H, Menghe B. 16S rDNA sequence and cluster analysis of *L. casei*Zhang and ZL12-1 isolated from Koumsis. *China Dairy Industry*, 2005, 33(6): 4-9. (in Chinese)
乌日娜, 张和平, 孟和毕力格. 酸马奶中乳杆菌 *L. casei*Zhang, ZL12-1 的 16S rDNA 基因序列及聚类分析. *中国乳品工业*, 2005, 33(6): 4-9.
- [15] Endo A, Futagawa-Endo Y, Dicks LM. Diversity of Lactobacillus and Bifidobacterium in feces of herbivores, omnivores and carnivores. *Anaerobe*, 2010, 16(6): 590-596.
- [16] Laurent Ferraris, Julio Aires, Anne-Judith Waligora-Dupriet, Marie-José Butel. New selective medium for selection of bifidobacteria from human feces. *Anaerobe*, 2010, 2:1-3.
- [17] Thitaram SN, Siragusa GR, Hinton A. Bifidobacterium-selective isolation and enumeration from chicken caeca by a modified oligosaccharide antibioticselective agar medium. *Letters in Applied Microbiology*, 2005, 41(4): 355-360.
- [18] Bibiloni R, Zavaglia AG, De Antoni G. Enzyme-based most probable number for the enumeration of Bifidobacterium in dairy products. *Journal of Food Protection*, 2001, 64(12): 2001-2006.
- [19] Simpson PJ, Stanton C, Fitzgerald GF, Ross RP. Genomic diversity and relatedness of bifidobacteria isolated from a porcine cecum. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(8): 2571-2581.
- [20] Satokari RM, Vaughan EE, Akkermans AD, Saarela M, de Vos WM. Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(2): 504-513.
- [21] Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, Takada T, Tanaka R. Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(12): 7220-7228.
- [22] Martín R, Jiménez E, Heilig H, Fernández L, Marín ML, Zoetendal EG, Rodríguez JM. Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(4): 965-969.
- [23] Harmsen HJ, Raangs GC, He T, Degener JE, Welling GW. Extensive set of 16S rRNA-based probes for detection of bacteria in human feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(6): 2982-2990.

Selective medium to isolate human *Bifidobacterium*

Dongxue Huo, Jiachao Zhang, Na Bai, Weiqiang Huang, Heping Zhang*

Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Bioengineering, Education Ministry; Department of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Abstract: [Objective] To compare five selective media to isolate human *Bifidobacterium* [Methods] Feces from six healthy human volunteers were diluted and cultivated on five *Bifidobacterium* selective media. After anaerobic cultivation, bacterial colonies were counted, selected and identified. Meanwhile, bacterial genomic DNA was extracted from the feces samples, and the Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) and Quantitative Polymerase Chain Reaction (q-PCR) were applied to reveal the diversity of *Bifidobacterium*. [Results] The amount of *Bifidobacterium* grown on BSM and BLM media was similar to the result detected by q-PCR and was significantly higher than that on three other media. *Bifidobacterium* isolated from BLM medium was similar to the identified result of DGGE profile. [Conclusion] BLM medium is the best selective medium for *Bifidobacterium* isolation from human gastrointestinal tract.

Keywords: *Bifidobacterium*, denaturing gel gradient electrophoresis (DGGE), quantitative polymerase chain reaction (q-PCR), selective medium

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Foundation of China (30660135)

* Corresponding author. Tel: +86-471-4319940; Fax: +86-471-4300122; E-mail: hepingdd@vip.sina.com

Received: 9 August 2013/ Revised: 8 December 2013

《微生物学报》关于署名

经过本刊审查通过后即将发表的稿件,作者在修改时,如果对“作者或单位的署名”进行变更,与最初的投稿不同,本刊要求:作者必须再提供有关证明,否则不能生效!此项规定早已公布在本刊的网页上、并且在本刊的纸质出版物中也多次公布。请作者登陆本刊网页(<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>),在首页内、“常见问题”中有显示,点开左侧的“署名”,其中有详细的说明和办理方法。

- (1) 如变单位署名顺序,需要原研究内容所属单位(通常是第一署名单位)的证明信,证明内容:原署名顺序→现署名顺序→盖章。
- (2) 如变更作者署名顺序,需要通讯作者和第一作者同意的签字证明。证明内容:原作者姓名及顺序→修改之后的作者姓名及顺序。
- (3) 将此证明信返回编辑部(邮寄原件或扫描后 E-mail 发来),新的变更即可生效。