

文章编号 :1009-038X(2002)06-0597-05

# 丁酸菌的分离、鉴定及筛选

赵建新, 张灏, 田丰伟

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

**摘要:**从 32 位健康人的粪便中分离到 4 株丁酸梭状芽孢杆菌, 其中丁酸梭状芽孢杆菌 Z-10 产酸和细胞生长速度最快. 对其安全性评价为基本无毒, 并进行了鉴定.

**关键词:**丁酸梭状芽孢杆菌; 分离; 鉴定; 筛选

中图分类号: Q 93-331

文献标识码: A

## Isolation, Identification and Selection of *Clostridium butyricum*

ZHAO Jian-xin, ZHANG Hao, TIAN Feng-wei

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

**Abstract:** Four strains of *Clostridium butyricum* were isolated from feces of 32 normal individuals, among which strain Z-10 showed the highest speed of acid-producing and cell growth. The toxicological analysis showed *Clostridium butyricum* Z-10 was basically nonpoisonous.

**Key words:** *C. butyricum*; Isolation; Identification; Selection

丁酸梭状芽孢杆菌(*Clostridium butyricum*)又名酪酸菌, 主要存在于奶酪、天然酸奶、人与动物粪便、某些树叶、土壤等自然环境中, 一般在 10%~20% 健康人群中能分离得到<sup>[1]</sup>. 丁酸梭状芽孢杆菌作为微生态制剂来研究, 是 1933 年由日本千叶医科大学宫入近治首先发现并报告, 因此又名宫入菌<sup>[2]</sup>. 其作为微生态制剂的药理机制至今还没有得到清楚的解释<sup>[3]</sup>. 丁酸梭状芽孢杆菌活菌制剂经日本学者的大量研究证明, 主要在大肠和盲肠周边增殖, 目前广泛应用于消化、小儿、外科、肿瘤、妇产科等种种原因引起的肠道菌群失调, 急慢性腹泻, 肠易激综合症, 抗生素相关性肠炎, 便秘或腹泻便秘交替症等疾病的治疗<sup>[4,5,6]</sup>. 作为微生态制剂有如下特点 (1) 促进肠道内有益菌群的增殖和发育, 抑制肠道内有害菌和腐败菌的生长繁殖, 减少胺类、吲

哚类物质的产生<sup>[7]</sup> (2) 在肠道内产生维生素 B 族、维生素 K、淀粉酶, 有良好的保健作用 (3) 代谢物丁酸是肠上皮组织细胞再生和修复的主要营养物质 (4) 对多种抗生素有较强的耐受性, 与抗生素并用时不会影响其生物作用, 并能大幅度降低伪膜性肠炎的发病率<sup>[8]</sup> (5) 在人体内不受胃酸、消化酶、胆汁酸等影响. 作者从健康人群粪便中分离筛选出生长性状较优良的丁酸梭状芽孢杆菌, 并进行了菌种鉴定. 为丁酸梭状芽孢杆菌的进一步应用提供了理论依据.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 样品采集 选择不同健康人群的粪便作为样品来源.

收稿日期 2002-05-20; 修订日期 2002-09-07.

作者简介: 赵建新(1971-)男, 河南三门峡人, 工学硕士, 工程师.

万方数据

### 1.1.2 培养基

梭菌增殖培养基(均为质量浓度 g/dL):胰蛋白胨 2,牛肉浸膏 1,酵母膏 0.6,葡萄糖 0.4,牛胆酸盐 0.5,复合盐 1份( $K_2HPO_4$  0.2、 $KH_2PO_4$  0.1、 $MgSO_4$  0.04、 $CaCl_2$  0.02、 $FeSO_4$  0.01、盐酸半胱氨酸 0.05,以下同),pH 7.2,121 °C,15 min 杀菌。

梭菌计数培养基(均为质量浓度 g/dL):胰蛋白胨 1,牛肉浸膏 0.5,酵母膏 0.3,葡萄糖 0.4,琼脂 1.6,复合盐 1份,pH 7.2,15 min 杀菌。

梭菌分离培养基:在增殖培养基中加入:牛胆酸盐 0.5 g/dL,琼脂 1.6 g/dL,调 pH 到 7.2,15 min 杀菌。

梭菌培养基:在梭菌增殖培养基中减掉牛胆酸盐,其它成分不变,pH 依试验需要用 NaOH 调节,15 min 杀菌。

产酸指示培养基:在梭菌培养基中加入 3 mL 质量浓度为 0.4 g/dL 的溴甲酚紫。

明胶液化培养基:在梭菌培养基中加入 1.2 g/dL 的明胶即可。

无碳基础培养基(均为质量浓度 g/dL):酵母膏 0.1( $NH_4$   $SO_4$  0.2,碳源另加 0.5;复合盐 1份)。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 分离方法

1)取粪便样品 10 g 加到 90 mL 稀释液中,放入 80 °C 水浴 10 min,杀死非芽孢菌,然后放入增殖培养基,于 31 °C 培养 36 h。

2)将样品分别稀释到  $10^{-3}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-7}$ ,涂布于梭菌分离培养基,放入厌氧罐中,置换 3 次气体(体积分数分别为 10% 的  $H_2$ 、10%  $CO_2$  和 80%  $N_2$ ),并用铂粒作为催化剂,在 0.01 MPa 的气体压力下 37 °C 厌氧培养<sup>[9]</sup> 36~48 h。

3)采用影印平板法分离菌株<sup>[10]</sup>,分别进行好氧和厌氧培养,选取厌氧生长良好的菌株,镜检。

1.2.2 属及群的初步鉴定:按《伯杰氏细菌鉴定手册》<sup>[3]</sup>和《细菌属的鉴定指导》<sup>[11]</sup>对分离到的纯菌株进行属的相关试验,以及群、种的相关生理生化实验,分别包括:明胶液化试验,蜜二糖、松三糖、淀粉水解试验。

1.2.3 菌种的产酸及最大活菌量试验 按体积分数为 2% 的菌种到产酸指示培养基,37 °C 条件下,厌氧培养不同时间,培养时记录指示剂变色时间,培养变色后,用计数培养基进行菌落计数(cfu)。

### 1.2.4 安全性评价方法

给药途径 霍恩氏法——经口(灌胃);

急性毒理试验法——GB15193—94<sup>[12]</sup>。

将菌株经液体培养,4 000 r/min 离心,生理盐水洗 3 次,对离心得到的湿菌体称重,按国标规定方法进行灌胃。

1.2.5 生理生化试验及糖类发酵试验 参见参考文献 [11]。

## 2 结果与讨论

丁酸梭状芽孢杆菌广泛存在于自然界中,作为整肠剂使用,必须具有以下特点(1)必须来源于人体,只有这样才能最大限度在人的肠道中定植(2)菌株对人体的消化道环境有明显的适应性,即能在高酸度的胃液环境和高胆汁的小肠中存活。因此选择健康人群的粪便作为该菌的来源,采用选择性培养基从中分离,对分离得到的菌株进行筛选和安全性评价,得到活力较高且安全并具有生产前景的菌株,进而研究其形态特征、生长特性。

### 2.1 菌种分离的理论依据

丁酸梭状芽孢杆菌为典型的严格厌氧菌,直或微弯的杆菌,产芽孢,孢子卵圆,偏心到次端生,无孢子外壁和附属丝( $0.6\sim 1.2$ )  $\mu m \times (3.0\sim 7.0)$   $\mu m$ (宽 $\times$ 长),端圆,单个或成对,短链,偶见长丝状菌体,以周生鞭毛运动,革兰氏阳性菌,在培养后期能变为阴性菌。依据这些特点,设计这样的筛选分离方法(1)对样品进行热处理,基本杀死非芽孢菌(2)涂布平板,初步得到纯菌株(3)影印好氧与厌氧培养,除去好氧和兼性厌氧菌,得到严格厌氧菌(4)镜检得到典型的 *Clostridium* 属。依据《伯杰氏细菌手册》,从菌落形态及个体形态以及严格厌氧型能鉴定到属。对所得到的菌株进行明胶液化试验及芽孢位置染色试验,可以鉴定到群。在群内只要进行蜜二糖、松三糖、淀粉利用试验,即可鉴定到种。

### 2.2 菌种分离结果

采样来源见表 1。对 32 个样品处理培养后,共得到菌株 930 个,以影印平板进行厌氧和好氧培养,得到严格厌氧菌 262 个。镜检得到典型的 *Clostridium* 属 21 个菌株。对这 21 株进一步纯化后进行个体形态、菌落特征观察,结果见表 2 和表 3。

按《伯杰氏细菌手册》,对这 21 株菌种进行属到群的鉴定,对于符合群特征的菌株进行群内的初步生理生化实验,对结果不符合要求的不再进行下一步实验,对于可能存在不确定结果的继续进行下一步实验,对得到的 10 株菌种进一步进行糖醇类发酵实验,得到 4 株丁酸梭状芽孢杆菌。结果见

表4.

## 2.3 菌种产酸及最大活菌量实验

以菌株最大的产酸能力及最多的活菌量作为目标,可采用 pH 指示剂的变色和活菌计数来简化筛选. 试验结果见表5. 可以看出 Z-10 株有较好的产酸能力和最多的活菌数. 因此选择 Z-10 株作为优选菌株.

表1 采样来源表

Tab.1 Origin of sampling

人群年龄	样品数(份)	
	男	女
30~50 d	4	4
20~25 岁	5	5
40~45 岁	4	3
65 岁以上	3	4
合计	16	16

表2 分离菌种的个体形态

Tab.2 Cell morphology conformation of isolated strains

菌株编号	形态	大小 ( $\mu\text{m}$ )	初期革兰氏 染色结果	后期革兰氏 染色结果	芽孢的 形状、位置
Z-5	直的杆菌、单个、较大	0.9~6.8	+	+	卵圆、次端生
Z-7	直的杆菌、单个、成对	0.6~2.0	+	+	卵圆、次端生
Z-10	单个、成对、单端膨大梭状	0.4~6.0	+	-	卵圆、次端生
Z-15	直、微弯杆菌	1.6~7.0	+	-	卵圆、次端生
Z-19	杆状、单个	1.3~5.2	+	-	卵圆、次端生
Z-21	直到微弯的杆菌	0.7~5.5	+	-	卵圆、端生
Z-22	直、微弯杆菌	1.6~7.5	+	-	卵圆、次端生
Z-24	直、微弯杆菌	0.6~5.0	+	+	球形、端生
Z-26	直、微弯杆菌	1.0~9.5	+	+	卵圆、端生
Z-28	单个、成对、单端膨大梭状	0.4~6.0	+	-	卵圆、次端生
Z-30	直、微弯杆菌	0.4~6.0	+	+	卵圆、端生
Z-32	杆状、单个	1.3~5.2	+	-	卵圆、次端生
Z-42	单个、成对、单端膨大梭状	0.4~5.8	+	-	卵圆、次端生
Z-43	直、微弯杆菌	1.0~9.5	+	+	卵圆、端生
Z-50	直的杆菌、单个、较大	1.0~7.8	+	+	卵圆、次端生
Z-52	直、微弯杆菌	0.4~6.0	+	+	卵圆、端生
Z-60	端圆的直杆菌	1.1~3.5	+	+	卵圆、次端生
Z-63	直、微弯杆菌	1.6~7.5	+	-	卵圆、次端生
Z-64	直到微弯的杆菌	0.7~6.0	+	-	卵圆、端生
Z-65	单个、成对、梭状	0.4~5.8	+	-	卵圆、次端生
Z-70	端圆的直杆菌	1.1~3.5	+	+	卵圆、次端生

表3 分离菌种的菌落形态

Tab.3 Colony conformation of isolated strains

菌株编号	大小(mm)	形态		边缘	表面状态	颜色	透明度
		正面观	侧面观				
Z-5	2.5~5	圆形	突起	微扩张	有光泽	淡灰黄	半透明
Z-7	1~2	圆形	凸起	整齐	光滑	微黄	半透明
Z-10	1.2~3	圆形	低凸面	整齐	湿润光滑	乳黄色	不透明
Z-15	1.0~2	圆形	凸起	整齐	有光泽	灰色	半透明
Z-19	3~5	圆形	低突起	整齐	无光泽	灰白	半透明

续表 3

菌株编号	大小(mm)	形态		边缘	表面状态	颜色	透明度
		正面观	侧面观				
Z-21	5~7	不规则、圆形	扁平	扩展	有光泽	灰白	半透明
Z-22	1.0~1.7	圆形	突起	整齐	光滑	灰色	半透明
Z-24	1~2	圆形	稍突	裂叶状	光滑	灰色	半透明
Z-26	1~2.5	不规则圆形	低突起	裂叶状	光滑	灰色	不透明
Z-28	1.2~3	圆形	低凸面	整齐	湿润光滑	乳黄色	不透明
Z-30	1~2	圆形	不规则	凸起	光滑	白色	半透明
Z-32	2.5~5	圆形	低凸面	整齐	无光泽	灰白	半透明
Z-42	1.0~2.8	圆形	低凸面	整齐	湿润光滑	奶油色	不透明
Z-43	1~2.5	不规则、圆形	低突起	裂片状	光滑	灰色	半透明
Z-50	2.5~5	圆形	突起	裂叶状	有光泽	淡黄	半透明
Z-52	1~2.5	圆形	不规则	突起	光滑	白色	半透明
Z-60	0.5~1	圆形	稍突	整齐	光滑	灰暗	半透明
Z-63	1.0~1.8	圆形	突起	整齐	光滑	灰色	半透明
Z-64	4.5~6	不规则、圆形	扁平	扩展	有光泽	灰白	半透明
Z-65	1.0~2.9	圆形	低凸面	整齐	湿润光滑	奶油色	不透明
Z-70	0.5~1.2	圆形	稍突	整齐	光滑	暗淡	半透明

表 4 群内及种的鉴别实验结果

Tab. 4 Identifying experiment of species and group

菌株编号	孢子位置	水解明胶	蜜二糖	松三糖	淀粉	菌株编号	孢子位置	水解明胶	蜜二糖	松三糖	淀粉
Z-5	次端生	+	*			Z-32	次端生	+	*		
Z-7	次端生	-	-	-	-	Z-42	次端生	-	+	-	+
Z-10	次端生	-	+	-	+	Z-43	端生	-			
Z-15	次端生	-	+	+	-	Z-50	次端生	+	*		
Z-19	次端生	+	*			Z-52	端生	+	*		
Z-21	端生	-	*			Z-60	次端生	-	-	-	+
Z-22	次端生	-	+	+	-	Z-63	次端生	-	+	+	-
Z-24	端生	-	*			Z-64	端生	-	*		
Z-26	端生	-	*			Z-65	次端生	-	+	-	+
Z-28	次端生	-	+	-	+	Z-70	次端生	-	-	-	+
Z-30	端生	+	*								

注：“+”实验结果阳性；“-”实验结果阴性；“\*”表示前一试验结果与要求特性不符，不再继续进行下一步实验。

表 5 产酸及最大活菌量实验结果

Tab. 5 Experimental result of producing acid and maximum active strain

菌株编号	变色时间(h)	菌体(个/mL)
Z-10	11	$1.2 \times 10^8$
Z-28	15	$0.3 \times 10^8$
Z-42	15	$0.1 \times 10^8$
Z-65	21	$0.3 \times 10^8$

## 2.4 安全性评价

按我国卫生部 1985 年颁发的《食品安全性毒理学评价程序(试行)》的规定,丁酸梭状芽孢杆菌作为一种保健食品必须进行安全性毒理学评价试验.第一步是急性毒性试验,半致死量  $LD_{50}$  是在一定条件下衡量物质毒性大小的基本数据<sup>[13]</sup>.用湿菌体进行灌胃后,小鼠一直活泼,无异常及死亡现象,说明 Z-10 株的经口  $LD_{50} > 10$  g/kg.由中药类急性

毒性试验分级标准可以认定属基本无毒<sup>[14]</sup>.

2.5 丁酸梭状芽孢杆菌 Z-10 菌种的鉴定

2.5.1 细胞形态 将菌种接入液体培养基,于 37℃ 厌氧培养 12 h 取出,涂片、染色,进行显微摄影.菌株 Z-10 为梭状,芽孢卵圆 (0.6~1.1) μm × (4.0~7.0) μm,其形态见图 1.



1000x

图 1 丁酸梭状芽孢杆菌 Z-10 的菌体形态

Fig.1 Cell morphology of *Clostridium butyricum* Z-10

2.5.2 培养特征 将菌种接入液体培养基,于 37℃ 厌氧培养.培养初期试管上部轻微浑浊,符合严格厌氧菌的特征.培养初期产大量气,后期沉淀较多.在产气旺盛期,将密封培养的试管在酒精灯旁打开,有明显的“突”声,可能是生长产生的氢气所致.将菌种在平板划线,于 31℃ 厌氧培养 24 h,其菌落如图 2 所示.菌落大小约 1.2~3 mm,正面为圆形,边缘整齐,侧面低凸,表面湿润光滑,乳黄色,不透明,略有酸臭味.其形态如图 2 所示.



图 2 丁酸梭状芽孢杆菌 Z-10 的菌落形态

Fig.2 Colonial morphology of *Clostridium butyricum* Z-10

2.5.3 生理生化特征 采用《细菌属的鉴定指导》中介绍的方法,测定 Z-10 对各种碳源的利用情况以及进行其它生理生化试验,结果见表 6,表 7.根据试验结果,对照《伯杰氏细菌鉴定手册》和《细菌属的鉴定指导》检索,菌株 Z-10 初步鉴定结果为丁酸梭状芽孢杆菌.

表 6 菌株 Z-10 对碳源的同化

Tab.6 Assimilation of carbon compounds by *Clostridium butyricum* Z-10

碳源	结果	碳源	结果	碳源	结果
苦杏仁苷	w	菊糖	+	水杨苷	+
阿拉伯糖	w	乳糖	+	山梨醇	-
纤维二糖	+	麦芽糖	+	山梨糖	-
卫矛醇	-	甘露糖	+	淀粉	+
七叶苷	w	甘露醇	+	蔗糖	+
果糖	+	松三糖	-	海藻糖	+
半乳糖	+	密二糖	+	木糖	+
葡萄糖	+	棉子糖	+	核糖醇	-
甘油	+	鼠李糖	w	纤维素	-
糖原	+	核糖	+	赤藓糖醇	-
肌醇	w				

注: + 试验结果阳性; - 试验结果阴性; w 表示试验结果不明显.

表 7 菌株 Z-10 的其它生理试验结果

Tab.7 Other physiological characters of *Clostridium butyricum* Z-10

实验项目	结果	实验项目	结果
过氧化氢酶试验	-	水解明胶试验	-
硝酸盐还原试验	+	水解酪蛋白试验	-
吲哚试验	-	运动性试验	+
乙酰甲基甲醇试验	-		

注: + 试验结果阳性; - 试验结果阴性.

3 结 论

从健康人群的粪便分离到 930 株菌种,从 930 株中经影印平板严格厌氧实验筛选到 262 株,对 262 株镜检得到符合梭菌属的特征菌株 21 株,对 21 株进行个体形态和菌落形态观察及属内群、种的研究,得到符合梭菌属群(I)特征菌株 10 株,经部分生理生化实验得到 4 株丁酸梭状芽孢杆菌,进行发酵能力试验,选出产酸和菌体生长速度较快的 Z-10 株.对 Z-10 株进行安全性评价得出基本无毒.说明丁酸梭状芽孢杆菌 Z-10 株可以用于制造丁酸梭状芽孢杆菌微生态制剂.

(下转第 612 页)

- [ 11 ] 刘忠洲. 微滤超滤过程中的膜污染与清洗 [ J ]. 水处理技术 ,1997, 23( 4 ):187.
- [ 12 ] 杨严俊. 免疫活性蛋白—鸡蛋免疫球蛋白和乳铁蛋白的研究与开发 [ D ]. 无锡 :无锡轻工大学 ,1997.
- [ 13 ] 赵玉萍, 张灏, 杨严俊. 溶菌酶测定方法的改进 [ J ]. 食品科技, 2002 ( 1 ):58 - 59.
- [ 14 ] 中山大学生物系生化微生物教研室. 生化技术导论 [ M ]. 北京 :人民教育出版社 ,1978.
- [ 15 ] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术 [ M ]. 北京 :科学出版社 ,1999.
- [ 16 ] 史景江, 马熙中. 色谱分析法 [ M ]. 重庆 :重庆大学出版社 ,1994.
- [ 17 ] 潘永康, 王喜忠. 现代干燥技术 [ M ]. 北京 :化学工业出版社 ,1998.
- [ 18 ] GHOSH R , CUI Z F. Purification of Lysozyme Using Ultrafiltration [ M ]. New York :John Wiley & Sons Inc ,2000.

(责任编辑 杨萌)

(上接第 601 页)

## 参考文献 :

- [ 1 ] BENNO Y , SAWA K , MITSUOKA T. The intestinal microflora of infants : composition of fecal flora in breast fed and bottle-fed infants [ J ]. **Microbiol Immunol** ,1984 ,28 :975 - 986.
- [ 2 ] FUJITA I , MAEDA A , TAKASHIK. Studies on the anti-diarrheal activity of *Clostridium butyricum* Miyairi II 588 [ J ]. **Jpn Pharmacol Ther** ,1986 ,14 :6073 - 6080.
- [ 3 ] SATO R , TANAKA M. Intestinal Distribution and Intraluminal Localization of Orally Administered *Clostridium butyricum* in Rats [ J ]. **Microbiology and immunology** ,1997 ,41( 9 ) :665 - 671.
- [ 4 ] FUJITA I , TAKASHI K. Studies on the anti-diarrheal activity of *Clostridium butyricum* Miyairi 588 [ J ]. **Jpn Pharmacol Ther** ,1986 ,14 :137 - 141.
- [ 5 ] KUROIWA T , KOBTI K , IWANGA M. Inhibition of enteropathogens by *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 [ J ]. **J Jpn A Inf d** ,1990 ,64 :257 - 263.
- [ 6 ] OKAMOTO T , SASKI M , ARAKI Y. Therapeutic efficiency of oral-administration of *Clostridium butyricum* [ J ]. **Digestion Absorp** ,1996 ,19 :65 - 68.
- [ 7 ] KUROIWA T , IWANAGA M , KOBARI K. Preventive effect of *Clostridium butyricum* M588 against the proliferation of *Clostridium difficile* during antimicrobial therapy [ J ]. **J Jpn A Inf D** ,1990 ,64 :1425 - 1432.
- [ 8 ] TAGUCHI N , ABE F , MIKAMI Y. Prevention of experimental antibiotic-associated diarrhea by *Clostridium butyricum* [ J ]. **Jpn J Bacterio** ,1988 ,43 :829 - 835.
- [ 9 ] 张灏. 两歧双歧杆菌在酸乳中的应用和探讨 [ D ]. 无锡 :无锡轻工业学院 ,1986.
- [ 10 ] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物实验手册 [ M ]. 北京 :中国轻工出版社 ,1994.
- [ 11 ] [澳] V. B. D. 斯克尔曼. 细菌属的鉴定指导 [ M ]. 蔡妙英译. 北京 :科学出版社 ,1978.
- [ 12 ] GB15193. 3—94. 食品安全性毒理学评价程序和方法 [ S ].
- [ 13 ] 《食品卫生学》编写组编. 食品卫生学 [ M ]. 北京 :中国轻工出版社 ,1991.
- [ 14 ] 李建华. 中药类急性毒性技术法与 LD50 值的分级 [ J ]. 中草药 ,1994 ,25( 7 ) :388 - 389.

(责任编辑 杨萌)