

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2016.09.002

荣昌猪肠道乳酸菌筛选及鉴定^①

张友华¹, 胡怀容¹, 鲜欣言¹,
唐萍¹, 蒲博¹, 李明元^{1,2}

1. 西华大学 生物工程学院/四川省食品生物技术重点实验室, 成都 610039;
2. 西华大学 古法发酵(酿造)生物技术研究, 成都 610039

摘要: 通过稀释涂布法, 在含有碳酸钙的 MRS 平板上选取有明显透明圈、革兰氏染色为阳性、接触酶实验为阴性的菌株, 反复划线纯化培养并保存, 然后经 16S rRNA 序列同源性分析鉴定菌株。结果从猪大肠中分离出 5 株乳酸菌, 经鉴定 D8 为干酪乳杆菌、D12 为鸟肠球菌同属菌株、D14 为约翰逊氏乳杆菌、D15 为唾液乳杆菌、D21 为植物乳杆菌; 从小肠中分离出 4 株乳酸菌, 经鉴定 XF 为嗜酸乳酸菌、XH 为乳酸乳球菌、XI 为约翰逊氏乳杆菌、XQ 为能动乳杆菌。表明荣昌猪肠道内含有丰富的乳酸菌群, 乳杆菌是荣昌猪肠道内乳酸菌中的优势菌。

关键词: 荣昌猪; 肠道; 筛选; 乳酸菌; 16S rRNA

中图分类号: S828

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2016)09-0006-06

荣昌猪主要产于重庆荣昌和四川隆昌两县, 现已成为我国养猪业推广面积最大、最具有影响力的地方猪种之一, 被誉为世界八大优良种猪之一。荣昌猪肉质鲜美、抗逆性和繁殖性能强, 在 1987 年被农业部列为国家一级保护品种资源, 同时在 2000 年被列入《国家级畜禽保护名录》^[1-2]。

在猪肠道内这个相对稳定的微环境生存着大量的微生物群系, 类型不同, 数量不一, 共同维持肠道内微生态平衡。仔猪出生后, 肠道内 48 h 开始出现乳杆菌, 72 h 拟杆菌和专性厌氧菌开始定植, 通常认为肠道微生物菌群直到育肥期才趋于平衡^[3]。乳酸菌是猪肠道的优势菌群^[4], 在肠道生态系统中发挥着重要的作用。乳酸菌是一种有益微生物, 通过与病原菌竞争黏附位点和营养, 对有害菌产生竞争性抑制作用; 通过产生细菌素、过氧化氢和酸性物质等代谢产物抑制病原菌的增殖; 还具有增强动物营养代谢, 提高自身免疫力, 改善肉质等生理功效。乳酸菌可用于研制防治仔猪腹泻的乳酸菌制剂及新型抗氧化剂。在国内外, 猪源乳酸菌的研究已受到广泛关注, 其益生菌的分离筛选是重要的基础研究工作。目前, 对荣昌猪遗传、饲养和肉质相关的研究报道较多, 还未见对其肠道乳酸菌的研究报道。本研究对世界名猪——荣昌猪的肠道乳酸菌进行分离筛选并进行 16S rRNA 鉴定, 为进一步研究荣昌猪同源性乳酸菌制剂奠定基础; 并通过对同源性乳酸菌制剂的研究, 为在荣昌猪饲养过程中预防病害、减少用药, 保证生猪健康和猪肉安全提供参考借鉴。

① 收稿日期: 2015-07-02

基金项目: 教育部春晖计划(Z2011093)。

作者简介: 张友华(1989-), 男, 四川达州人, 硕士, 主要从事食品卫生与安全研究。

通信作者: 李明元, 教授。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 实验样品

样品取自荣昌县昌元街道生猪定点屠宰场,随机选择 3 头已出栏即将屠宰的成年猪,无菌分离刚屠宰后猪的大、小肠内容物,冰盒包装后运回实验室.3 头生猪为吴家镇洪城生猪养殖场同栏同批次的出栏猪,预混合饲料,无乳酸菌制剂添加喂养.

1.1.2 试剂及仪器

pGM-T 连接试剂盒(北京天根生化科技有限公司);质粒提取试剂盒(美科美(北京)生物医学科技中心);Gel DNA Extract Kit(50)(购于美科美(北京)生物医学科技中心);恒温培养箱(SGSP-02,黄石);高速低温离心机(TGL-16G,上海);水平电泳仪(DYY-8C,北京);PCR 扩增仪(Biometra-T1, Germany).

1.1.3 培养基

MRS 合成培养基(奥博星生物技术公司,北京);MRS 固体培养基(含 CaCO_3);LB 液体培养基(参照《分子克隆实验指南》^[5]配制);SOC 培养基;含 Amp,X-gal 和 IPTG 的 LB 培养基.

1.2 实验方法

1.2.1 猪肠道乳酸菌初步分离及纯化

内容物样品 10 g 加 90 mL 无菌生理盐水摇匀后制成母液,用无菌生理盐水 10 倍梯度稀释.取 0.1 mL 合适稀释梯度菌液涂布于 MRS 平板上,37 °C 下培养 48 h,挑选出长势良好的单菌落并编号.将挑选出的菌株转接到含 CaCO_3 (百分比为 1%)的 MRS 培养基上,37 °C 下培养 48 h,挑选出健壮、具有明显溶钙圈的菌落^[6],再经革兰氏染色和接触酶实验,选取其中革兰氏染色呈阳性,接触酶实验呈阴性的菌株^[7],反复平板划线纯化后保存.

1.2.2 细菌 DNA 提取

采用酚/氯仿抽提法^[8],并用 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测提取效果.

1.2.3 16S rRNA 基因 PCR 扩增

模板为所提样品 DNA,采用扩增通用引物 Eu27F 和 1490R,反应体系为 50 μL 进行 PCR 扩增,PCR 反应程序参照 WANG Sheng-ping^[9]等的设定.

1.2.4 16S rRNA 基因系统发育分析

PCR 产物经电泳跑胶后,按操作说明用 Gel DNA Extract Kit 进行凝胶回收,将回收产物连接至 pGEM-T 载体,连接后转化至 *Escherichia coli* DH5 α 中,在 LB 培养基(40 μL :40 μL :30 μL 的 20 mg/mL X-gal,25 mg/mL Amp,20 mg/mL IPTG)平板上培养,挑选阳性菌落,按 Mini Plasmid Extract Kit 操作说明提取重组子质粒并外送测序.用 Blast 对比分析测序结果,再通过 Clustal X 进行完全比对后^[10],利用 MEGA4.0 软件构建系统发育树,构建方法采用 NeighBor-Joining 法^[11].

2 结果与分析

2.1 乳酸菌筛选结果

分离长势良好,具有明显溶钙圈的乳酸菌疑似菌株,大肠中 22 株,小肠中 18 株;进一步筛选出革兰氏染色呈阳性且 H_2O_2 酶反应呈阴性的菌株,大肠中 5 株,小肠中 4 株.各菌株菌落和细胞形态如表 1.

2.2 DNA 提取和 16S rRNA 基因 PCR 结果

琼脂糖电泳检测各菌株 DNA 和 16S rRNA 的 PCR 扩增产物,凝胶成像分析系统照相观察,结果见图 1、

图 2 和图 3. 由图 1、图 2 可知, 各菌株基因组 DNA 提取效果非常好, 泳道中的条带非常清晰明亮, 达到了对菌株基因组 DNA 的提取要求, 可进入下一步实验. 由图 3 可知, 泳道中的条带清晰明亮且集中, PCR 扩增片段大小约为 1.5 kb, 扩增效果理想.

表 1 菌落及细胞形态

项目	D8	D12	D14	D15	D21	XF	XH	XI	XQ
细胞形态	短杆	椭球形	杆状	短杆	短杆	短杆	卵圆形	杆状	杆状
菌苔形状	扩展的	扩展的	扩展的	扩展的	扩展的	扩展的	扩展的	扩展的	扩展的
菌落形状	圆形	圆形	圆形	圆形	圆形	圆形	圆形	圆形	圆形
菌落颜色	灰白色	灰白色	灰白色	乳白色	灰白色	灰白色	乳白色	灰白色	灰白色
隆起度	稍隆起	隆起	隆起	隆起	隆起	微隆起	隆起	隆起	隆起
边缘	整齐	粗糙	整齐	整齐	整齐	粗糙	整齐	整齐	整齐
表面状态	光滑	光滑	光滑	光滑	光滑	光滑	光滑	光滑	光滑
光泽	有光泽	有光泽	有光泽	有光泽	有光泽	有光泽	有光泽	有光泽	有光泽
质地	湿润	湿润	湿润	湿润	粘稠	粘稠	湿润	湿润	粘稠
透明度	不透明	不透明	不透明	不透明	半透明	不透明	半透明	不透明	不透明

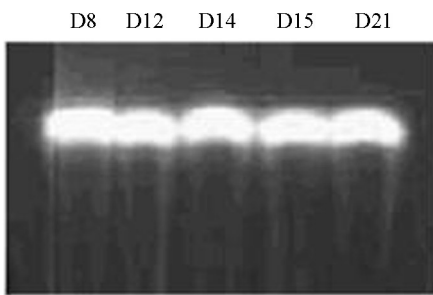


图 1 大肠中菌株的基因组 DNA

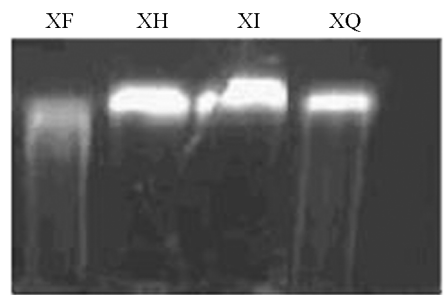


图 2 小肠中菌株的基因组 DNA

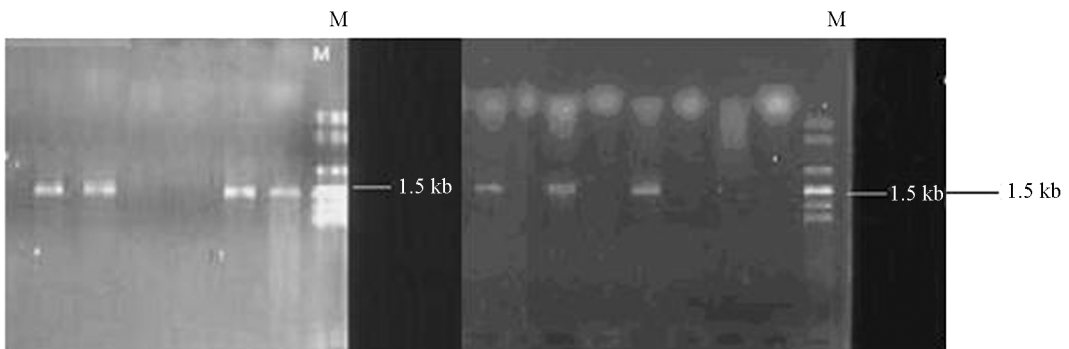


图 3 部分样品的 16S rRNA 片段扩增结果

2.3 系统发育树分析

大肠内容物分离筛选出 5 株菌, 小肠内容物分离筛选出 4 株菌, 其完整 16S rRNA 基因经外送测序后的序列通过 Blast 比对分析和 Clustal X 完全比对后, 用 MEGA4.0 构建系统发育树, 结果如图 4、图 5 所示.

由图 4 可知, 菌株 D8 与 *Lactobacillus casei* (干酪乳酸杆菌) 的同源性为 99%; 菌株 D12 与 *Enterococcus avium* (鸟肠球菌) 的同源性为 98%; 菌株 D14 与 *Lactobacillus johnsonii* (约翰逊氏乳酸杆菌) 的同源性为 99%; 菌株 D15 与 *Lactobacillus salivarius* (唾液乳酸杆菌) 的同源性为 99%; 菌株 D21 与 *Lactobacillus*

plantarum (植物乳酸杆菌) 的同源性为 99%。由图 5 可知, 菌株 XF 与 *Lactobacillus acidophilus* (嗜酸乳酸菌) 的同源性为 99%; 菌株 XH 与 *Lactococcus lactis* (乳酸乳球菌) 的同源性为 99%; 菌株 XI 与 *Lactobacillus johnsonii* (约翰逊氏乳酸杆菌) 的同源性为 99%; 菌株 XQ 与 *Lactobacillus agilis* (能动乳杆菌) 的同源性为 99%。根据 Bosshard 等^[12] 的报道, 相似度大于 99% 的细菌判定为同种细菌, 介于 95%~99% 之间则判定为同属, 故鉴定结果如表 2。

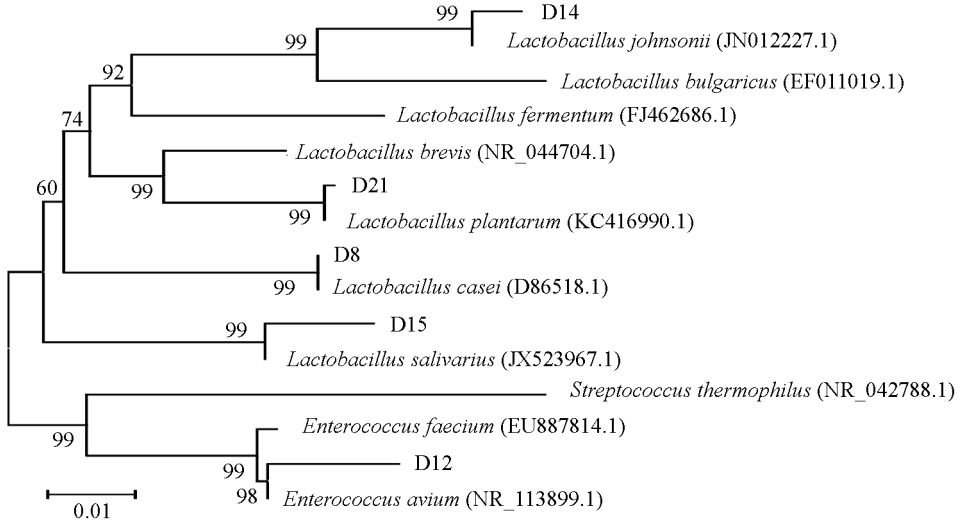


图 4 大肠中菌株 16S rRNA 基因序列的系统发育树

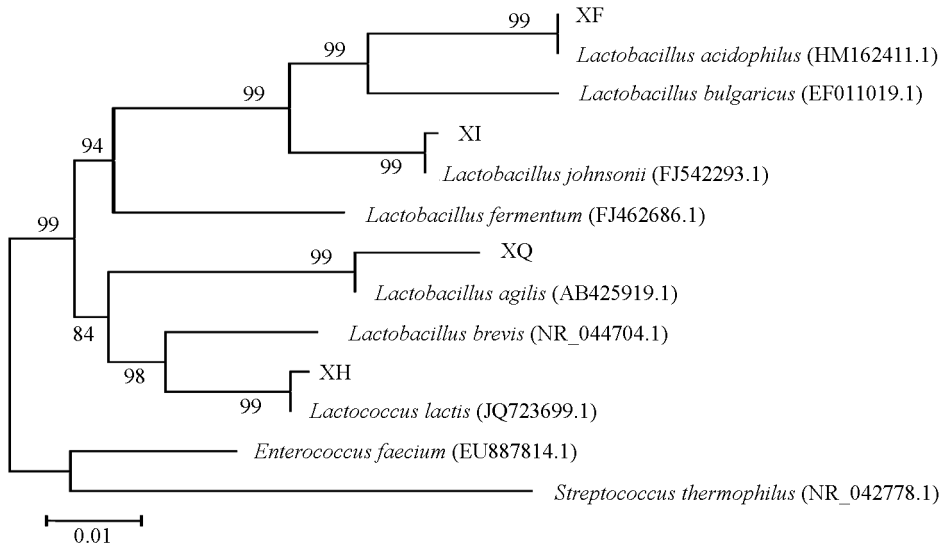


图 5 小肠中菌株 16S rRNA 基因序列的系统发育树

表 2 菌株鉴定结果

大肠中菌株	同源性/%	鉴定结果	小肠中菌株	同源性/%	鉴定结果
D8	99	<i>Lactobacillus casei</i>	XF	99	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
D12	98	<i>Enterococcus avium</i> sp	XH	99	<i>Lactococcus lactis</i>
D14	99	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	XI	99	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
D15	99	<i>Lactobacillus salivarius</i>	XQ	99	<i>Lactobacillus agilis</i>
D21	99	<i>Lactobacillus plantarum</i>			

3 结论与讨论

本次实验在荣昌猪大肠内筛选出了 5 株乳酸菌, D8 为 *Lactobacillus casei* (干酪乳杆菌)、D12 为 *Enterococcus avium* (鸟肠球菌) 同属菌株、D14 为 *Lactobacillus johnsonii* (约翰逊氏乳杆菌)、D15 为 *Lactobacillus salivarius* (唾液乳杆菌)、D21 为 *Lactobacillus plantarum* (植物乳杆菌); 在荣昌猪的小肠内筛选出了 4 株乳酸菌, XF 为 *Lactobacillus acidophilus* (嗜酸乳杆菌)、XH 为 *Lactococcus lactis* (乳酸乳球菌)、XI 为 *Lactobacillus johnsonii* (约翰逊氏乳杆菌)、XQ 为 *Lactobacillus agilis* (能动乳杆菌)。

本次实验共筛选出 9 株乳酸菌, 8 株为不同种乳酸菌, 表明荣昌猪肠道含有丰富的乳酸菌群; 其中 7 株为乳杆菌, 1 株为鸟肠球菌同属菌株, 1 株为乳酸乳球菌, 表明乳杆菌是荣昌猪肠道内乳酸菌中的优势菌。

乳酸菌是可发酵碳水化合物产生大量乳酸的革兰氏阳性菌的通称, 绝大多数为厌氧或兼性厌氧菌, 其中乳酸杆菌属、双歧杆菌属、肠球菌属与猪体关系最密切^[12]。目前关于猪肠道乳酸菌的研究主要集中在菌种分离和筛选等方面^[13], 在乳酸菌的分类和鉴定研究中运用较多的方法是 16S rRNA 基因检测技术。倪敬轩等^[14]从健康仔猪粪便中筛选出了 2 株唾液乳杆菌, 郭志杰等^[15]在仔猪粪便中筛选出了嗜酸乳杆菌和肠球菌, 刘长建等^[16]从育肥猪肠道内容物筛选出了具有降胆固醇能力的鹌鸡肠球菌和植物乳杆菌。本次研究筛选出的乳酸菌与已经报道的猪肠道乳酸菌筛选结果一致, 但筛选出乳酸乳球菌还未见报道, 还有进一步研究的价值。本次实验通过传统平板划线法和生理生化实验加现代分子生物学鉴定方法, 保证了乳酸菌鉴定结果的准确性。从本次研究的实验过程和实验条件出发, 筛选出的乳酸菌均是兼性厌氧菌, 荣昌猪肠道严格厌氧性乳酸菌的筛选和鉴定工作还需更深入地研究, 为充分利用微生物资源、研制微生态制剂奠定基础。通过荣昌猪肠道乳酸菌的研究, 研制同源性乳酸菌制剂, 又回归到荣昌猪的饲养具有极大的现实意义。

参考文献:

- [1] 薛梅, 李大军, 黄微. 荣昌猪肉质风味性状浅析 [J]. 畜禽业, 2011(7): 36—37.
- [2] 唐跃富. 我国地方优良猪种—荣昌猪 [J]. 农家顾问, 2007(12): 40.
- [3] 张董燕, 季海峰, 王四新, 等. 猪肠道乳酸菌的微生物学研究进展 [J]. 饲料与畜牧, 1998, 10(2): 42—44.
- [4] BATEUP J, DOBBINSON S, MUNRO K, et al. Molecular Analysis of the Composition of *Lactobacillus* populations Inhabiting the Stomach and Caecum of Pigs [J]. Microb EcolHealth Dis, 1998(10): 95—102.
- [5] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2005.
- [6] 吴三林, 刘芳, 罗小琴, 等. 灌服雪莲果粉对小鼠肠道菌群的影响 [J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2012, 37(2): 42—45.
- [7] 胡杨, 项松涛, 杨宇清, 等. 泡菜中产细菌素的乳酸菌分离研究 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2012, 34(3): 144—148.
- [8] 金晶, 彭颖, 李晓波. 快速提取肠道微生物基因组 DNA 的方法 [J]. 现代生物医学进展, 2007, 01: 100—103.
- [9] WANG Sheng-ping, BO Mei-juan, Kong Xiang-feng, et al. 16S rRNA Gene Based Analysis of Ileal Bacterial Community and Phylogeny in Nursing and Weaned Piglets [J]. Animal Husbandry and Feed Science, 2009, 45(1): 12—17.
- [10] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIK F, et al. The Clustal X Windows Interface: Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools [J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(24): 4876—4882.
- [11] GALTIER N, GOUY M, GAUTIER C. SEAVIEW and PHYLO_WIN: Two Graphic Tools for Sequence Alignment and Molecular Phylogeny [J]. Bioinformatics, 1996, 12(6): 543—548.
- [12] BOSSHARD P P, ABELS S, ZBINDEN R, et al. Ribosomal DNA Sequencing for Identification of Aerobic Gram-Positive Rods in the Clinical Laboratory (an 18-Month Evaluation) [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(9): 4114—4140.

- [13] 马 坤, 王春风. 猪肠道内乳酸菌数量和分布规律 [C] // 第三届第八次全国学术研讨会暨动物微生态企业发展战略论坛论文集. 广州: 中国畜牧兽医学动物微生态学分会, 2006.
- [14] 倪敬轩, 杨 英. 猪源乳酸菌抑致病性大肠埃希菌研究 [J]. 动物医学进展, 2012, 33(2): 26-31.
- [15] 郭志杰, 李 杰, 李 鑫, 等. 猪源乳酸菌的分离、筛选、鉴定及产酸性能研究 [J]. 饲料工业, 2010, 31(20): 45-48.
- [16] 刘长建, 齐小辉, 刘 秋, 等. 猪源降胆固醇乳酸菌的分离鉴定 [J]. 食品与生物技术学报, 2012, 31(8): 826-830.

Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Intestinal Tract of Rongchang Pig

ZHANG You-hua¹, HU Huai-rong¹, XIAN Xin-yan¹,
TANG Ping¹, PU Bo¹, LI Ming-yuan^{1,2}

1. Provincial Key Laboratory of Food Biotechnology of Sichuan/College of Bioengineering,
Xihua University, Chengdu 610039, China;

2. Biotechnology Institute of Ancient Brewing, Xihua University, Chengdu 610039, China

Abstract: Using with the dilution separation methods, I chosen these strains which had clear transparent circles, Gram positive and negative in the catalase reaction on the MRS medium contained calcium carbonate. After iteratively purifying cultivation and keeping, I identified the bacterial strains through homologous analysis of 16S rRNA sequence. The consequences proved that the five strains of lactic acid bacteria which were isolated from large intestine had been identified that the D8 was *Lactobacillus casei*, the D12 was the same genus with *Enterococcus valium*, the D14 was *Lactobacillus johnsonii*, the D15 was *Lactobacillus salivarius* and the D21 was *Lactobacillus plantarum*. These four strains of lactic acid bacteria which were isolated from small intestine had been identified that the XF was *Lactobacillus acidophilus*, the XH was *Lactococcus lactis*, the XI was *Lactobacillus johnsonii* and the XQ was *Lactobacillus agilis*. The results showed that there were abundant *Lactobacillus* in intestine of Rongchang pig and the *Lactobacillus* was the dominant bacteria in intestinal lactic acid bacteria.

Key words: Rongchang pig; intestine; screen; *Lactobacillus*; 16S rRNA

责任编辑 夏 娟

