

圈养猕猴胃肠道细菌的分离与初步鉴定

蒲忠慧, 王雄清*, 陈希文, 游章强, 党明术, 马 纓 (绵阳师范学院生命科学与技术学院, 四川绵阳 621000)

摘要 [目的] 通过圈养猕猴胃肠道细菌的分离鉴定, 对分离的细菌进行形态学分析。[方法] 选择不同培养基对绵阳富乐山圈养病猴胃肠道细菌进行分离、纯化和培养, 初步得到 10 株分离菌, 通过细菌培养特性、革兰氏染色镜检和生化鉴定。[结果] 10 株分离菌分别属于明串珠菌属 (*Leuconostoc*)、拟杆菌属 (*Bacteroides*)、双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*)、梭杆菌属 (*Fusobacteria*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*)。[结论] 为开发功能微生物、丰富菌质资源以及研制生态制剂提供理论基础。

关键词 猕猴; 胃肠道; 微生物菌群

中图分类号 S865.3⁺1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2013)34-13248-02

Isolation and Preliminary Identification of Gastrointestinal Bacteria in the Rhesus Macaque

PU Zhong-hui et al (College of Life Science and Technology of Mianyang Normal University, Mianyang, Sichuan 621000)

Abstract [Objective] To conduct morphology analysis on isolated bacteria from gastrointestinal bacteria in the rhesus macaque. [Method] The intestinal bacteria isolated from Rhesus Macaque were identified by bacterial cultivation, microscopy, biochemical test. [Result] The results showed that these bacteria mainly belonged to *Leuconostoc*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Fusobacteria* and *Lactobacillus*. [Conclusion] The study can provide theoretical basis for development of microbial abundant bacteria resource and ecological agent.

Key words Macaque; Gastrointestinal tract; Microflora

动物胃肠道中栖息着大量微生物, 微生物与宿主的各项生理活动密不可分, 形成了动态平衡的微生态区系, 对维持动物机体的生理功能、免疫功能等起着重要作用, 并且影响动物体的生长、发育等生命活动。猕猴 (*Macaca mulatta*) 属国家二级重点保护动物, 在《中国濒危动物红皮书兽类》中被列为易危种^[1]。目前国内外对猕猴胃肠道正常菌群的研究报道很少, 陈希文等^[2]从具有明显痢疾症状的猕猴粪便样品中分离出志贺氏菌, 蒋观成等^[3]研究表明志贺氏菌是猕猴肠道中主要致病菌之一。该研究主要针对绵阳富乐山病猴胃肠道细菌进行分离与鉴定, 揭示猕猴胃肠道正常菌群的种类、来源和分布规律, 探讨其结构, 可为开发功能微生物、丰富菌质资源以及研制微生态制剂提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物。该试验猕猴来自于绵阳富乐山病猴。

1.1.2 主要仪器。全自动高压灭菌锅 (SANYO), 电子天平 (JT12001), 无菌操作台 (SP-DJ), 恒温培养摇床 (HZ-9311K), 恒温培养箱 (PYX-DHS. 400-BS-II), 光学显微镜 (SA3000), 微量移液器 (100 ~ 1 000 ul)。

1.1.3 培养基及试剂。根据胃肠道正常菌群的特点, 选用血清普通琼脂培养基、MRS 琼脂培养基、BL 琼脂培养基、厌氧琼脂培养基、Baird-Parker 琼脂培养基 (购自成都奥博星生物试剂有限公司), 制备方法参照常规方法^[4-5]和市售培养基使用说明, 灭菌后分别放入 37 °C 恒温培养箱和厌氧培养箱内作无菌检验 24 ~ 48 h 后, 置 4 °C 冰箱保存备用。所用试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 猕猴胃肠道细菌的分离纯化。通过剖腹产手术^[1]取

出病猴的大肠、小肠、十二指肠和胃粘膜上提取的内容物后置于无菌器皿中。通过无菌生理盐水冲洗后用 75% 酒精浸泡约 5 min, 再用无菌生理盐水反复冲洗。电子天平称重后放于无菌组织研磨器中进行研磨, 其间加入约 3 ml 无菌生理盐水, 形成均匀的混合液体; 将研磨液均匀涂布于各种琼脂培养基平板上, 每种培养基设 3 个平行样, 每板均匀涂布 200 μl 研磨液, 同时每种培养基设 1 个空白对照, 每板均匀涂布 200 μl 无菌生理盐水; 封口膜封板后将 BP 平板和普通琼脂平板放于 37 °C 恒温培养箱内培养 2 ~ 3 d, 将 BL 平板、MRS 平板和厌氧菌琼脂平板放于厌氧培养箱内培养 2 ~ 3 d, 之后观察菌落形态并对可见菌落进行染色镜检, 选取具有代表性的菌株进行显微数码照相, 将分离到的细菌进行纯培养 4 °C 冰箱保存备用。

1.2.2 猴胃肠道细菌的生化试验鉴定。选取具有代表性的 10 株分离菌的纯培养物进行糖发酵试验、V-P 试验、吲哚试验、甲基红试验、硝酸盐还原试验、接触酶试验、淀粉液化试验、枸橼酸盐试验、精氨酸双水解试验、硫化氢还原试验等各项生化试验^[6-8], 在规定时间内观察结果。

2 结果与分析

2.1 猕猴胃肠道细菌分离菌菌落的培养特性 圈养猕猴胃肠道中的分离细菌在不同种培养基中的生长表现各异, 结果见表 1。在血清普通琼脂平板和 MRS 琼脂平板上均形成表面湿润光滑、透明有光泽、边缘整齐, 小而突起乳白色圆形菌落; BL 琼脂平板上形成表面光滑、边缘整齐, 中间隆起浅黄色圆形菌落; Baird-Parker 琼脂平板上形成表面光滑、边缘整齐, 中间隆起的黑色圆形菌落; 厌氧琼脂平板上形成表面光滑、边缘整齐, 中间隆起乳白色圆形菌落。各种培养基对照组上涂布无菌生理盐水后也未见菌落生长, 从而可以排除试验操作和培养过程中被污染的可能性。

从以上不同的选择性培养基上挑取各种典型生长的菌落, 在相应的选择性培养基上反复进行平板划线分离, 直到

作者简介 蒲忠慧 (1982 -), 女, 四川万源人, 讲师, 研究方向: 天然药物及活性研究。* 通讯作者, 从事动物疾病防治、环境毒理学研究。

收稿日期 2013-11-04

得到纯菌株,共 10 株,编号分别是 MH1 ~ MH10。

表 1 不同培养基所分离各菌株的菌落特征

培养基	含水状态	外观形态	菌落透明度	菌落边缘	菌落颜色
血清普通培养基	湿润、光滑	小而突起	透明有光泽	整齐	乳白色
MRS 培养基	湿润、光滑	小而突起	透明有光泽	整齐	乳白色
BL 培养基	湿润、光滑	中间隆起	透明有光泽	整齐	浅黄色
Baird-Parker 培养基	湿润、光滑	中间隆起	透明有光泽	整齐	黑色
厌氧培养基	湿润、光滑	大而突起	透明有光泽	整齐	乳白色

2.2 猕猴胃肠道分离菌的显微鉴定 通过对具有代表性的分离细菌的纯培养物进行革兰氏染色镜检,发现圈养猕猴胃肠道分离菌中只有 2 株 (MH8、MH9) 为革兰氏阴性菌,呈红色,其他分离菌都是革兰氏阳性菌,兼性厌氧或严格厌氧,其菌体形态各异,多数为单个、成对或链状排列的小杆菌,成对、四联或短链排列的球菌,还有单个、成对或成堆排列的球菌,分离菌 MH4、MH8、MH9 的显微图见图 1 ~ 图 3。

2.3 猕猴胃肠道分离菌的生化鉴定 选取具有代表性的 10 株分离菌的纯培养物的各项生化试验,鉴定结果见表 2。由表 2 可知,分离菌 MH1 和 MH2、MH3 和 MH4 利用糖的特性

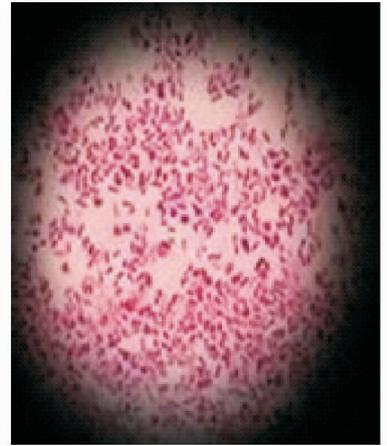
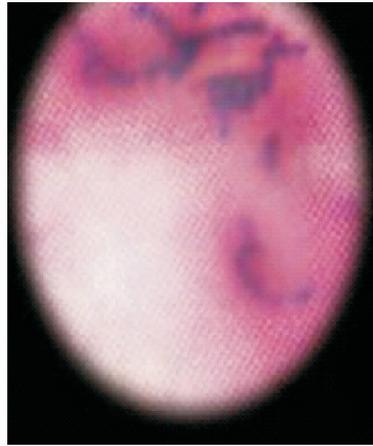
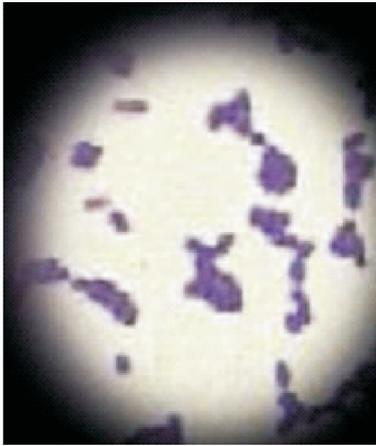


图 1 分离菌 MH4 显微照相图(10 × 100)

图 2 分离菌 MH8 显微照相图(10 × 100)

图 3 分离菌 MH9 显微照相图(10 × 100)

和各種生化特征相似,可初步确认为同一菌属。其他 6 株分离菌在利用糖上存在大体相似,但其他生化特征存在差异,可能分属于不同的菌种。结合猕猴胃肠道分离菌的生长表现(大小、形状、颜色、边缘状况、表面隆起度、透明度等)和革兰氏染色特性及菌体形态进行综合分析,比对《伯杰氏细菌

鉴定手册》^[9] 和《常见细菌系统鉴定手册》^[10],对所培养的菌株进行鉴定得出最终分类结果如下:

MH1、MH2 为棒杆菌属, MH3、MH4 为梭杆菌属, MH5 为乳杆菌属, MH6 为明串球菌属, MH7 为乳球菌属, MH8 为双歧杆菌属, MH9 为拟杆菌属, MH10 为韦荣氏球菌属。

表 2 所得各纯菌株的生化鉴定结果

菌株号	蔗糖发酵	葡萄糖发酵	脲酶试验	甲基红试验	V - P 试验	吡啶试验	接触酶试验	明胶液化试验	淀粉液化试验	运动性试验	产气试验	硫化氢试验	精氨酸双水解试验	硝酸盐还原试验	枸橼酸盐利用试验
MH1	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-
MH2	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-
MH3	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
MH4	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-
MH5	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-
MH6	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+
MH7	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-
MH8	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-
MH9	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	±	+	+	+
MH10	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-

注:“+”表示反应为阳性;“-”表示反应为阴性;“±”表示反应为弱阳性。

3 讨论

对圈养猕猴胃肠道中的分离细菌进行分离鉴定,通过对分离细菌进行菌体形态学观察,革兰氏染色和生化试验,与《伯杰氏系统细菌学手册》和《常见细菌系统鉴定手册》比对,初步判定分离菌的特点,圈养猕猴胃肠道分离菌中革兰氏阳性菌占有绝对优势,只有 2 株菌 (MH8、MH9) 为革兰氏阴性菌。

该研究结果表明,圈养猕猴胃肠道内微生物包括 5 个已

知菌属,分别为明串珠菌属 (*Leuconostoc*)、拟杆菌属 (*Bacteroides*)、双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*)、梭杆菌属 (*Fusobacteria*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*)。常维山等^[11]对兔肠道正常菌群分离鉴定结果表明,厌氧菌中以消化球菌、双歧杆菌、乳杆菌等占绝对优势,需氧菌中主要为酵母菌和肠杆菌,但不含有肠球菌,这些正常菌群的确定为预防和治疗肠道疾病提供了理论依据。该研究结果与上述文献报道相似。另外,在该

(下转第 13252 页)

营养补充阶段,这会导致小鼠吃过量的食物。但是由于小鼠的消化道功能被破坏,吃的食物不能被消化而停留在体内,造成小鼠体重虚高的现象。到第8天,小鼠的消化功能开始慢慢恢复,体内的食物被消化吸收,就造成了小鼠体重突然下降的现象。回归分析结果显示,直线回归系数均在0.85以上,说明回归方程与试验数据符合良好。空白对照组斜率最大,说明其随着时间的延长,体重增加最快,体质恢复最好。自然恢复组斜率最小,说明其体质恢复最慢。而添加蛋清多肽可不同程度促进小鼠体质恢复。

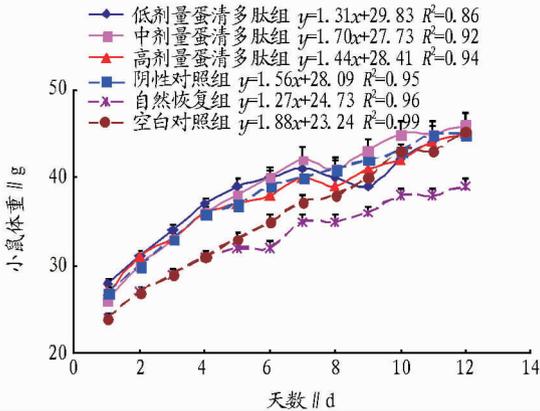


图3 蛋清多肽对小鼠体重的影响

2.3 蛋清多肽对消化不良小鼠体质恢复中血脂的影响 对消化不良小鼠血清中的胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白、高密度脂蛋白进行检测,结果见图4。由图4可知,随着小鼠体重的增加小鼠血脂的含量也相应增加,但是小鼠血脂达到一定值后就不再具有显著变化,而且小鼠血脂的成分并未因为蛋清多肽而发生显著变化。

3 结论与讨论

试验结果表明,蛋清多肽能很好地调节消化不良小鼠肠道益生菌,从而有效改善消化不良小鼠的体质。在今后的研

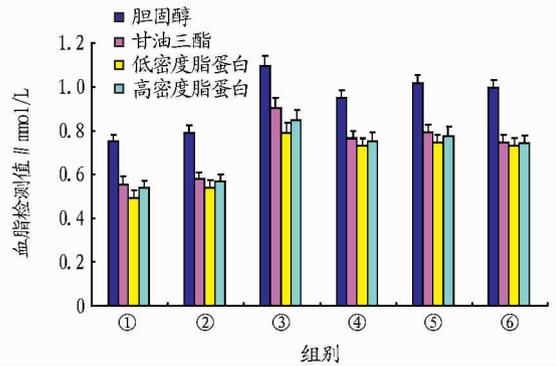


图4 蛋清多肽对消化不良小鼠血脂含量的影响

究中应扩大有关蛋清多肽作用、改善蛋清多肽性能方面的研究,使蛋清多肽能被广泛应用。同时也希望能改善蛋清多肽的制备工艺,使多肽的制备更简单,产率更高。

参考文献

- [1] BEDRANI L, HELLOIN E, GUYOT N, et al. Passive maternal exposure to environmental microbes selectively modulates the innate defences of chicken egg white by increasing some of its antibacterial activities[J]. BMC Microbiology, 2013, 13: 128.
- [2] EVENEPOEL P, CLAUS D, GEYPENS B, et al. Amount and fate of egg protein escaping assimilation in the small intestine of humans[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 1999, 277: 935-943.
- [3] MAJUMDER K, CHAKRABARTI S, DAVIDGE S T, et al. Structure and activity study of egg protein ovotransferrin derived peptides (IRW and IQW) on endothelial inflammatory response and oxidative stress[J]. J Agric Food Chem, 2013, 61: 2120-2129.
- [4] 邓朝晖, 许春娣, 陈舜年. 新生小鼠轮状病毒腹泻模型建立及病理学致病机制研究[J]. 临床儿科杂志, 2008, 26(10): 862-865.
- [5] CHERIAN T, WANG S, MANTEL C. Rotavirus vaccines in developing countries: The potential impact, implementation challenges, and remaining questions[J]. Vaccine, 2011, 30(S1): 3-6.
- [6] 姚英民, 欧巧群, 李宁. 小儿轮状病毒血症与临床发病特点关系初探[J]. 中华儿科杂志, 2005(11): 865-868.
- [7] 李颖畅, 孟宪军, 孙靖靖, 等. 蓝莓花色苷的降血脂和抗氧化作用[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(10): 40-48.

(上接第13249页)

试验中经分离鉴定得到的明串球菌属在其他动物胃肠道微生物的研究中是没有发现的,与文献^[12-13]报道的动物肠道菌群有差异,究其原因可能与获得肠道微生物所研究的材料有关。因此,该研究将进一步利用16S rDNA基因序列对相关分离菌进行分析鉴定,通过分子生物学技术有效地揭示猕猴胃肠道菌群多样性,以期来弥补传统分离鉴定方法的不足。

参考文献

- [1] 叶智彰, 彭燕章, 张耀平. 猕猴解剖[M]. 北京: 科学出版社, 1985: 210-213.
- [2] 陈希文, 王雄清, 郭晓萍, 等. 圈养猕猴志贺氏菌的分离鉴定及药敏分析[J]. 四川动物, 2013, 31(2): 202-207.
- [3] 蒋观成, 王德莲, 宋怀燕, 等. 猕猴肠道致病菌的检测[J]. 中国人兽共患病志, 1993, 9(4): 26-28.

- [4] 黄秀梨, 辛明秀. 微生物学实验指导[M]. 2版. 北京: 高等教育出版社, 2008: 7-9, 22-24.
- [5] 吴爱武. 临床微生物学与检验实验指导[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 17-28.
- [6] 郭海勇, 许磊, 吴静, 等. 小鼠胚胎胃肠道细菌的分离与初步鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30(8): 597-600.
- [7] 王付彬, 刘玉升. 小碎斑鱼鲢幼虫肠道细菌分离及鉴定研究[J]. 中国微生物学杂志, 2010, 22(5): 423-426.
- [8] 胡秀彩, 李会, 吕爱军. 鲤鱼肠道细菌的分离及其生理生化特性研究[J]. 中国农学通报, 2010, 26(14): 365-367.
- [9] R·E·希一坎南, N·E·吉布寺. 伯杰氏细菌鉴定手册[K]. 8版. 北京: 科学出版社, 1984.
- [10] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[K]. 北京: 科技出版社, 1999.
- [11] 常维山, 牛钟相, 朱瑞良, 等. 兔肠道正常微生物群的研究[J]. 中国微生物学杂志, 1996, 8(3): 14-16.
- [12] 能德鑫. 厌氧菌的分离和鉴定[M]. 南昌: 江西科学技术出版社, 1986: 1-7.
- [13] 贝澜. 肠道菌群和菌群失调[J]. 中华消化杂志, 1997, 17(6): 3-8.