

Shuang Qi Gan Jun

主 编 康 白

双歧杆菌



连海事大学出版社

双歧杆菌

主编 康白

大连海事大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

双歧杆菌/康白主编. — 大连:大连海事大学出版社,
1998.4
ISBN 7-5632-1200-0

I. 双… II. 康… III. 肠道杆菌, 双歧杆菌-研究
IV. Q939.11

中国版本图书馆 CIP 数据核字(98)第 11159 号

大连海事大学出版社出版

(大连市凌水桥 邮政编码 116026 电话 4684394)

大连海事大学印刷厂印刷 大连海事大学出版社发行

1998 年 5 月第 1 版 1998 年 5 月第 1 次印刷

开本:850×1168 1/32 印张:6.375

字数:160 千 印数:1-5000

责任编辑:赵兴贤 封面设计:王 艳

责任校对:科 达 版式设计:王瑞国

定价:18.00 元

前 言

双歧杆菌是个出了名的细菌,不仅专业人员知道,一般老百姓也知道。这主要是新闻媒体的作用。即所谓“新闻细菌”。就如“新闻人物”一样。不管是褒,还是贬。总之,这个术语已经普及了。究其原因,就是因为其对人类有用处,并且具有商业价值。本书的目的就是要说明这个菌到底有什么作用,并且怎样发挥作用。

双歧杆菌的数量很大,每克肠内容物有几千亿个(10^{11}),但并不是最多的,还有很多其他正常菌群,其数量也很多。总体说,人体正常菌群有几百万亿个(10^{14}),总重量有1公斤多,其体积相当一个人的肝脏大小。双歧杆菌就是这些众多的细菌(几百种)中的一员。

为了研究这些包括双歧杆菌在内正常菌群(或微生物群),近年来诞生了一门新的生命科学分支“微生态学”。微生态学是研究正常菌群与其宿主的相互关系的学科,并且是开发和利用这些正常菌群新资源的新学科。双歧杆菌或者还有乳酸杆菌,是当代国内外利用最广泛的细菌。因此,得到人们普遍重视。

现在看来,把双歧杆菌看作是微生态学研究的核心或重心,是应当得到公允的。双歧杆菌的数量、种类、生理作用、生态效应及其他方面,都不是孤立的,而是与其他相关细菌保持着动态平衡或动态失调共同构成生命现象的整体性和群体性。因此,从双歧杆菌入手,研究微生态学的原理和实践,从现象看本质,将是一条捷径。

双歧杆菌的产品,在国际上已广泛涌现出来,近年来我国已出现了许多双歧杆菌产品,有药品(如回春生、丽珠肠乐及培菲康等)、口服液和双歧杆菌豆奶等。新的双歧杆菌产品已在不断出现。和双歧杆菌相联合的产品或类似产品也不断问世。生产的发展,必将要求或带动基础理论研究的发展。可以预见双歧杆菌的研究,必然会出现新的高潮。

中华预防医学会微生物学会对双歧杆菌的研究起到了极为重要的促进作用。微生物学会会员遍及全国,其中包括一批正在国外学习的留学生。近几年国内各省市已相继成立了分会,更加壮大了这支队伍。微生物学会会员,并团结一大批有识之士,促进和加强了以双歧杆菌为核心的微生物学研究,作出了卓越的贡献。

中国微生物学杂志已创刊十周年,大量刊载了双歧杆菌方面的论文,根据初步统计,现已发表 219 篇论文(从第一卷至第九卷)。双歧杆菌研究的进展,《中国微生物学杂志》的作用是很大的,也是关键性的。

双歧杆菌的研究,目前在国内外都是“热点”之一。国际上日新月异,进展飞速。我们有责任,把这一课题做一总结,供同行讨论、批评和指正。

中国微生物学学会,拥有一大批仁人志士,不为名,不为利,一心想把这一新学科建立起来。为了这一伟大事业,他们呕心沥血,奋斗终身。《易经》上说:“形而上之为道,形而下之为器,化而裁之谓之变,推而行之谓之通,举而措之天下之民,谓之事业”。意思说,要有观点(道),要有行动(器),要根据实际情况(变),要推广(通),要为天下人民着想,这才能叫作事业。因此我认为中国的微生物学会会员绝大部分都是为了事业。学会已开过 6 次全国年会,学组会及各省分会已开 20 余次学术会。他们的行动充分体现了这一点。

我虽年事已高,在我的同事和学生督促下,才决定组织国内外

目 录

前言

第一章 绪论	1
第一节 概述	1
第二节 历史	3
第三节 双歧杆菌研究的重要性	10
第四节 双歧杆菌研究的展望	18
第二章 双歧杆菌的分类学	20
第一节 双歧杆菌属的概念	20
第二节 双歧杆菌属分类依据	21
第三章 双歧杆菌的分离与鉴定	36
第一节 双歧杆菌的分离	36
第二节 双歧杆菌的鉴定	37
第四章 双歧杆菌的生物学	42
第一节 形态学	42
第二节 生理学	48
第三节 代谢	50
第四节 营养要求	59
第五节 抗生素耐药性	62
第五章 双歧杆菌的分子生物学	65
第一节 一般情况	65
第二节 分子生物学技术方法	69
第三节 耐性因子	71

第四节	表面分子结构	73
第五节	双歧杆菌的生物酶、合成物和分泌物	73
第六章	双歧杆菌的微生物生态学	76
第一节	双歧杆菌在肠道中的微生物生态学分类位置	76
第二节	双歧杆菌的空间分布	78
第三节	双歧杆菌的时间分布	78
第四节	双歧杆菌的宿主分布	81
第五节	定植与粘附	85
第六节	免疫	90
第七节	营养	93
第七章	双歧杆菌的病理生理学	99
第一节	因果关系	99
第二节	尿素代谢	102
第三节	胆固醇代谢	104
第四节	白血病与大肠腺癌	106
第五节	复发性溃疡性口腔炎	106
第八章	双歧杆菌与免疫	109
第一节	双歧杆菌的免疫赋活作用的类型	110
第二节	双歧杆菌免疫赋活作用的机理	112
第三节	双歧杆菌免疫赋活作用的依赖性	114
第四节	双歧杆菌免疫赋活作用的意义	115
第九章	动物的双歧杆菌	121
第一节	啮齿类动物	121
第二节	家畜	124
第三节	家禽	125
第四节	宠物	127
第十章	双歧杆菌的临床应用	130
第一节	概念	130

第二节	双歧杆菌的临床应用	131
第十一章	微生态调节剂	140
第一节	概述	141
第二节	益生菌	141
第三节	益生菌制品所采用的菌种	144
第四节	益生菌的选种	145
第五节	益生菌在疾病防治上的应用	149
第六节	目前国内益生菌制品的种类	153
第七节	益生菌的代谢产物	154
第八节	益生元	155
第九节	益生元与益生菌的联合作用	159
第十节	其它生长促进剂	159
第十二章	双歧杆菌酸奶	161
第一节	“双歧杆菌发酵酸奶及饮料”	
对人体的作用和意义		161
第二节	双歧杆菌的分离与生产驯化	162
第三节	双歧杆菌发酵酸奶及饮料的市场前景	164
第四节	双歧杆菌发酵酸奶及饮料生产技术特点	165
第五节	双歧杆菌发酵酸奶及饮料的工艺流程概略	166
第六节	双歧杆菌发酵酸奶及饮料生产的质量控制	166
第十三章	双歧杆菌制剂的生产工艺方法	169
第一节	双歧杆菌菌种的筛选	170
第二节	双歧杆菌制剂的生产工艺方法	171
第三节	双歧杆菌活菌制剂制造及检定试行规程	175
第十四章	益生菌的质量控制	179
第一节	益生菌的质量	179
第二节	益生菌的标准化	179
第三节	益生菌的菌种标准	180

第四节	益生菌的菌种管理	180
第五节	益生菌的质量检定	183
主要参考文献		185

第一章 绪 论

双歧杆菌是发现最早的生理性细菌之一。双歧杆菌研究的发展,与微生物生态学的发展是相一致的。可以说,双歧杆菌的研究,带动并促进了微生物生态学的崛起。把双歧杆菌作为核心来研究人体正常微生物群的特征和基本规律,特别是研究其他生理性细菌,和其与这些正常微生物的相互关系,是这一新兴学科发展的客观需要。

为了阐明微生物生态学的过去、现在和未来,本书将从双歧杆菌的发现、分类、基础研究和应用研究入手,来探索正常微生物群与人类生理、病理、疾病与保健的关系。总结过去,展望未来。推动微生物生态学的发展。

第一节 概 述

1. 双歧杆菌的生物学特性

双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)是人类和动物(包括昆虫)正常肠内微生物群的主要成员之一。双歧杆菌属是一组包括迄今已发现的 28 个种的革兰氏阳性、多形态、专性厌氧、主要寄居在人类、动物及蜜蜂肠道内的生理性细菌。该菌无芽胞、荚膜及鞭毛,无运动性,触酶、硝酸盐还原、淀粉产生、明胶液化及精氨酸水解均阴性。葡萄糖经果糖—6—磷途径发酵生成 1.5:1.0 mole(醋酸:乳酸)的有机酸比例,不生成 CO_2 、丁酸及丙酸。最适生长温度 36—38℃。G+C% 为 57—68%。

2. 双歧杆菌的微生物学定义

迄今为止,可以认为,双歧杆菌是最主要的人和动物肠道内的

生理性细菌之一。双歧杆菌虽然数量大,每克肠内容物含活菌数超过 10^9 个,但无毒、无害,而且具有许多生态效应或生理意义。双歧杆菌参与了宿主的消化、营养、代谢、吸收、免疫及抗感染过程。人类从出生到死亡,一直伴随着双歧杆菌的存在,只是在患病、衰老或其他不利条件下才减少、甚至消失。

宿主对双歧杆菌生物学特性也有相应的影响,宿主的年龄、生理现象、营养、健康状态、患病状态都会对双歧杆菌的定性、定量和定位产生作用。

双歧杆菌与其在长期历史进化过程中已经形成一个和谐的微生态系(Microecosystem)。保持这个微生态系的发育与发展,对人类健康与长寿,对动物的品质和产量均具有极为重要的意义。

3. 微生态调节剂

由于双歧杆菌的生物学特性和微生态学意义研究不断进展,现在国内、国际均将其产品应用于人类或动物疾病的治疗和预防、保健和延年益寿,已经出现的产品有饮料、沃格特(酸奶)、药品和食品或饲料添加剂。所有这些称为微生态调节剂(Microecological modulator)。

国际上,现在应用的微生态调节剂包括益生菌(Probiotics)、益生元(Prebiotics)及合生素(Synbiotics)3种类型。双歧杆菌作为一种益生菌,单独或与其他益生菌(如乳杆菌、粪链球菌、酵母菌或芽胞菌)制成复合益生菌制品,已经广泛应用。为了增进益生菌的作用,又采用其生长促进物质,如双歧因子(Bifidofactor)或各种寡糖类(Oligosaccharide)物质即所谓益生元,以辅助其效应。如果将益生菌与益生元合起来,制成微生态调节剂,这就是合生素。目前这3种类型的产品并驾齐驱地迅速发展起来了,为人类健康和发展,正在或将要作出重大奉献。

第二节 历 史

1. 双歧杆菌的发现

1.1 双歧杆菌发现的历史背景

双歧杆菌是 1899 年在法国巴黎巴斯德研究院由蒂赛(Tisser H. 1899)发现的。这一发现,并非偶然。一是客观存在,二是时代背景。当时正是十九世纪末二十年代初。这是一个各种细菌大发现时代。这里有 3 个伟人的功绩是不可忽视的。首先是巴斯德(Pasteur L. 1822~1895)。巴斯德是化学家,他从发酵角度,认为肠内菌是有益的,并且由于他对法国柞蚕业和造酒业在细菌学的研究方面作出了重大贡献,挽救了法国当时赖以生存的重要工业,因而推动了细菌学的发展。其次是德国的科赫(Koch R. 1843—1910),他发明了固体培养基,因而相继发现了炭疽杆菌、结核杆菌和霍乱弧菌,掀起了当时科学界追逐病原菌的高潮。再次就是俄国的细菌学家梅奇尼科夫(Michnioff, 1845—1916)。当时他在巴斯德研究院作研究工作,并兼任巴斯德研究院的副院长。在假期他与他的学生曾在长寿之国保加利亚考察。他发现那里的游牧民族都喝当地居民叫作沃格特(Yughort)的酸奶,并分离出一种乳杆菌,他将其命名为保加利亚乳杆菌(*L. bulgaricus*)。梅奇尼科夫认为,大肠内的大肠杆菌是有害的,如果饮用沃格特,可抑制大肠杆菌,从而延年益寿,他本人自从发现沃格特以后,一直坚持饮用这种饮料。

上述 3 位是当时的科学界名流,对人类肠道内微生物意义提出对立的两种观点:一派认为是有害的,应该予排除;另一派认为是有益的,如果没有肠内菌,势必无法生存。前者是梅奇尼科夫的观点,后者是巴斯德的观点。其实这两派都对,只是因为看问题的侧面不同。概括地说,在正常情况下,肠内微生物与其宿主保持平

衡就是有益的,如果发生了失调就是有害的。

德国的科赫不仅在发现致病菌方面起了先锋作用,而且在研究手段方面,特别是固体培养方法,也给双歧杆菌的发现提供了物质基础。在上述时代背景下,双歧杆菌的发现就有了思想基础与物质基础。

蒂赛是在 1899 年 12 月 2 日在巴黎生物学会学术会议上发表他的论文。题目是“肠内菌群—乳幼儿的正常与病态”,副标题是“乳幼儿肠内菌群的研究—正常与疾病”。蒂赛发现,天然营养儿和人工营养儿的大便内有一种革兰氏阳性的多形态的杆菌,而且天然营养儿较人工营养儿更多,甚至是纯种状态。但是,不论那种营养方式的婴幼儿在患腹泻时,这种杆菌就会减少或消失。这一发现在 1900 年又被奥地利医生莫罗(Moro E, 1900)复试成功,并且发现婴幼儿离乳后这种杆菌随即减少,并接近于成人状态。

1.2 双歧杆菌的发现顺序

双歧杆菌的发现,除了受巴斯德、科赫、和梅奇尼科夫 3 位科学巨匠的影响外,还受时代的历史现实的影响。在欧洲,当时以德、法为核心掀起了猎逐各种疾病病原体的热潮。当时发现新的细菌层出不穷,几乎每天都有发现新的细菌的消息。不仅在欧洲广泛传播着,而且通过电波传到北美洲及世界各先进国家。刚刚明治维新的日本,也派了大批留学生到欧洲来研究细菌。蒂赛就在这种浪潮中发现了双歧杆菌。

蒂赛(Tisser H. 1899)1890 年在巴黎波斯克特(Boucicaut)儿童医院 Grauche 教授指导下读研究生,他的题目是“对婴幼儿消化不良病因的研究”。经过十年艰苦的努力,在他的两位朋友 Zuber 与 Veillon 帮助下,终于在 1899 年,在天然营养儿正常大便内发现了双歧杆菌。从此开辟了近百年来双歧杆菌研究的新篇章,同时也揭开了研究生理性细菌的新纪元。细菌的发现顺序如表 1—1 所示。

表 1-1 细菌的发现顺序

年 代	菌 种 名 称	发 现 者
1883	霍乱弧菌	Koch
1884	白喉杆菌	Loeffler
	伤寒杆菌	Gaffky
	链球菌	Rosenbach
	葡萄球菌	Rosenbach
1885	淋病球菌	Neisser
	大肠杆菌	Eschenich
1886	肺炎双球菌	Frankel
1887	布氏杆菌	bruce
	脑膜炎双球菌	Weichselbaum
1889	破伤风杆菌	北里柴三郎
1891	放线菌	Wolff~Israel
1894	鼠疫杆菌	北里柴三郎, Yersin
1898	痢疾杆菌	志贺 洁
1899	双歧杆菌	Tissier

表 1-1 指出,在 1899 年以前,共发现的 15 个细菌,其中只有双歧杆菌 1 个是生理性细菌,其余 14 个都是病原菌。蒂赛的功绩就在于他开辟了病理细菌学(Pathological bacteriology)与生理细菌学(Physiological bacteriology)的两个命题。这与蒂塞发现双歧杆菌有关。

2. 双歧杆菌的生物学研究

自 1899 年蒂赛发现双歧杆菌以来,双歧杆菌的微生物学研究,已从初级阶段进入高级阶段,现在已进入现代化阶段。

2.1 双歧杆菌的形态学

双歧杆菌在蒂赛 1899 年刚发现时曾指出在刚从婴幼儿分离出来时是多形态的,呈 Y 形、V 形或其他形状排列。但在经过一阶人工培养阶段可为直杆状。这种表型变异是可逆的。在 80 年代初

期已经证明,通过配对的无菌小鼠可使已变成杆状的双歧杆菌恢复到分叉状(Haraguch Y 与 Chodo A,1981)。我们研制回春生的生产菌种青春型双歧杆菌(*B. adolescentis* DM8504)也从分叉状转化为杆状。经过配对无菌小鼠传代又恢复成分叉状(康白,熊德鑫等,1994)。双歧杆菌的形态学,经过长期地众多学者的观察已经证明是客观存在的一种生物学现象。

2.2 厌氧性

双歧杆菌的厌氧性(anaerobiosis)已作了详细的研究。在本世纪初就已发现该菌是专性厌氧菌。但由于厌氧技术的不成熟常常有许多菌株不能分离成功。在早期还认为这些在大便涂片能看到的革兰氏阳性杆菌大部分是死菌。但是到了50年代末期,德国柏林自由大学的 Haenel 教授把各种厌氧培养法联合使用,结果证明90%以上都是活菌。现在的厌氧方法已能成功地分离出双歧杆菌的多个种。双歧杆菌的厌氧法,在刚分离时厌氧性特别强,但有的菌株却经过传代后可变成微需氧。这种厌氧性也可通过动物传代恢复原来的专性厌氧状态。

2.3 双歧杆菌的生理学研究

近10年来人们就双歧杆菌的生理学作了大量研究。现在对双歧杆菌的代谢、营养要求、温度、pH、生化特性等方面有了现代化的研究。这些研究成果使得双歧杆菌的应用研究有了坚实的基础。

3. 双歧杆菌分类学的研究

由于双歧杆菌生物学特性的研究不断发展与进步,有关这方面的科学信息不断增加,双歧杆菌的分类也是经历过不完善到比较完善,不全面到逐渐全面的发展过程。双歧杆菌的分类可分为以下4个阶段:

3.1 混乱时期

在整个细菌分类尚不完善的情况下,1899年 Tisser 发现双歧杆菌的当时,就将该菌命名为普通分叉杆菌(*Bacillus bifidus com-*

munis)。在后来看来这个分类是不妥的,因为一则双歧杆菌无芽胞,二则不是需氧菌。对此 1919 年 Orla-Jensen 建议把 *Bacillus bifidus* 改为 *Bacterium bifidus*,并在 1924 年又提出改为双歧杆菌(*Bifidobacterium*),但未能被很多人接受。在杂志上仍有 *Bacillus bifidus*、*Bacteroids bifidus*(双歧类杆菌)、*Lactobacillus bifidus*(分叉乳杆菌)及 *Actinomycetes bifidus*(分叉放线菌)等的提法。甚至还有人(Pribram, 1929)提议建立一个新的菌属,叫做蒂赛分叉菌(*Tisser bifidus*)。

上述混乱状态使得双歧杆菌属曾经被列入乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)、放线菌属(*Actinomycetales*)、棒状杆菌属(*Corynebacterium*)及丙酸杆菌属(*Propionibacterium*)。

3.2 稳定时期

经过混乱时期,双歧杆菌的分类,已统一了认识,进入稳定时期。

双歧杆菌从 1899 年 Tisser 发现以来到 1974 年正式列为属的分类已经历了 75 年之久。1974 年正式确定的双歧杆菌菌属(Genus: *Bifidobacterium*),包括 21 个种(Species),载入国际细菌分类专书“伯杰氏鉴定细菌学”(Bergeys Manual of Determinative Bacteriology)第 8 版。1986 年载入第 9 版后又增加 3 个种,计 24 个种。到 90 年代初再增加 4 个种,共为 28 个。

1899~1974 双歧杆菌分类的编年史如表 1-2 所示。

3.3 现代时期

1971, Sacardovi 等根据糖发酵结果及 DNA 杂交试验,对双歧杆菌属内的种(species)和亚种(Subspecies)进行分类学研究。从此对从人、动物(猪、犬、牛、鸡、大鼠、小鼠、豚鼠)及蜜蜂分离的菌种进行了生物学、分子生物学及遗传学的分类研究,从而使双歧杆菌的分类学进入了现代化时期。

表 1-2 双歧杆菌分类编年史

分类名称	作者	年代
<i>Bacillus bifidus</i>	Tisser	1900
<i>Bacteroides bifidus</i>	Castellani and Chalmers	1919
<i>Lactobacillus bifidus</i>	Bergey's Manual eds. 1-4	1923-1924
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Holland	1924
<i>Bacterium bifidum</i>	Orla-Jensen	1927
<i>Tisseria bifida</i>	Lehmann and Neumann	1929
<i>Nocardia bifida</i>	Pribram	1931
<i>Actynomices bifidus</i>	Vuillemin	1934
<i>Actinobacterium bifidum</i>	Nannizzi	1937
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Puntoni	1938
var <i>bifidus</i>	Weiss and Rettger	1938
<i>Lactobacillus parabifidus</i>		1938
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Weiss and Rettger	1938
<i>Lactobacillus bifidus</i>	Prevot	1939-1957
<i>Cohnistreptothrix bifidus</i>	Bergey's Manual eds. 5-7	1944
<i>Corynebacterium bifidum</i>	Negrovi and Fischer	1949
<i>Lactobacillus bifidus</i>	Olsen	1950
<i>Lactobacillus bifidus</i>	Norris et al.	1953
Var <i>pennsylvanicus</i>		1957
Five groups of bifidus bacteria	Gyorgy	
Description of human species	Dehnert	1963
New animal species	Mitsuoka	1969
New animal species	Seardovi	1972
Creation of the genus <i>Bifidobacterium</i> constituted by 11 species	Holderman and Bergey's Manual	Moore 1974

4. 双歧杆菌的微生态效应研究

自发现双歧杆菌以来,因其具有一系列微生态效应而引起世人的注意。这些微生态效应研究包括以下几方面。

4.1 保健

Tisser(1899)与 Moro(1900)就是因为双歧杆菌在母乳喂养儿