

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(8):1001-1007; 4 August 2010
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

骆驼瘤胃耐受/降解去氢骆驼蓬碱细菌的筛选

安登第, 朱艳蕾, 唐静, 叶永霞, 曾献春

(新疆师范大学生命科学学院, 乌鲁木齐 830054)

摘要:【目的】中药骆驼蓬含多种生物碱,对动物有毒性。生活于荒漠半荒漠的骆驼可采食部分有毒植物而不中毒。为了解骆驼瘤胃微生物对骆驼蓬植物毒素的耐受与降解能力进行本研究。【方法】以含 100 mg/L 纯品去氢骆驼蓬碱的 M98-5 培养基接种骆驼瘤胃内容物,经五代胁迫培养后分离可耐受/降解去氢骆驼蓬碱的细菌,以薄层析法检验其降解活力,以 16S rRNA 序列分析其进化地位。【结果】29 个分离株中 15 株具有降解去氢骆驼蓬碱活性;16S rRNA 序列分析显示,属于乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 16 株,占 55%;志贺氏菌属 (*Shigella*) 7 株,占 24%;芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 4 株,占 13.8%;肠球菌属 (*Enterococcus*) 和巨型肠球菌属 (*Megasphaera*) 各 1 株。【结论】可耐受/降解去氢骆驼蓬碱的骆驼瘤胃细菌仅限于少数几类,且检测到的具有降解活力的只有乳杆菌类。

关键词: 瘤胃微生物; 植物毒素; 耐受/降解; 骆驼

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 08-07-1001

骆驼是新疆的特色养殖家畜,数量占全国的 40%。虽是人工饲养,但仍处于半野生状态,喜食其他畜种不能利用的带有强烈异味、含盐量高的野生植物,如怪柳 (*Tamarix chinensis*)、骆驼刺 (*Alhagi sparsifolia*)、苦艾 (*Wormwood*)、羽毛草 (*Myriophyllum aquaticum*)、甘草 (*Glycyrrhiza uralensis*)、麻黄 (*Ephedra sinica*)、金合欢 (*Acacia farnesiana*)、沙蒿 (*Artemisia desertorum*) 等,特别是可采食骆驼蓬 (*Peganum harmala*)、假木贼 (*Anabasis tatarica*)、狼毒 (*Stellera chamaejasme*) 等有毒植物但却不会影响其正常生理机能或中毒。

骆驼蓬为蒺藜科 (*Zygophyllaceae*) 骆驼蓬属 (*Peganum*) 多年生草本植物,全株有毒,开花期地上部分含生物碱达 5.77%^[1]。骆驼蓬种子可做致幻剂,动物食后可抑制中枢神经系统、抑制呼吸及心脏,使血压下降而死亡^[2];骆驼蓬全草粗提物可杀灭小麦蚜虫^[3];骆驼蓬总碱及生物碱单体对大鼠和

小鼠均具有毒杀作用^[4],人口服 4 mg/kg 去氢骆驼蓬碱或骆驼蓬碱可引起幻觉,大剂量服用可引起全身战栗与阵发性惊厥^[1]。因此也被用来作为生物农药^[5-6]。

人们很早就发现反刍动物具有耐受或降解植物毒素的能力^[7-8],如含羞草素 (Mimosine)^[9]、双稠吡咯啉生物碱 (Pyrrolizidine Alkaloid)^[8,10]、单宁 (Tannin)^[11]、3-硝基丙酸 (3-Nitropropionic acid) 和硝基苯丙烷酸 (Nitropropanol)^[12] 及乳浆大戟 (*Euphorbia esula*) 毒素^[13] 等。而对骆驼瘤胃微生物耐受或降解植物毒素,及荒漠有毒植物骆驼蓬对骆驼的作用尚未有报道。

本研究以纯品去氢骆驼蓬碱为材料,以骆驼瘤胃内容物为接种源,经五代胁迫培养后分离具有耐受/降解这一植物毒素的细菌,以薄层析法检测其降解活力,以 16S rRNA 序列分析法研究其微生物组成。研究结果对了解骆驼的环境适应性和微生物与

基金项目: 国家自然科学基金 (30860007); 新疆师范大学博士后启动基金 (SDBS200802)

作者简介: 安登第 (1961-), 男, 籍贯甘肃省镇原县, 副教授, 博士, 主要从事共生与环境微生物研究。Fax: +86-991-4332417; E-mail: anddg@yeah.net

收稿日期: 2009-12-27; **修回日期:** 2010-06-02

植物毒素的相互关系有重要价值。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器和试剂:氯仿、甲醇均为分析纯;薄层层析硅胶:GF254(青岛海洋化工有限公司),化学纯;ZF-2 三用紫外仪(上海市安亭电子仪器厂);PCR 仪(ABI 2720);去氢骆驼蓬碱(harmine):Aldrich,纯度 98%。骆驼瘤胃液:采自乌鲁木齐市天鹰屠宰场,8000 r/min 离心 10 min,分装,-20℃保存。

1.1.2 培养基:厌氧瘤胃液培养基 M98-5^[14]成分为:骆驼瘤胃液 40%,葡萄糖 0.03%,纤维二糖 0.03%,淀粉 0.05%和矿物盐溶液 7.5%,去氢骆驼蓬碱终浓度 100 mg/L。固体培养基另加琼脂粉 1.5%。矿物盐溶液(培养基中终浓度): KH_2PO_4 3 mmol, NaCl 15.5 mmol, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.37 mmol, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2 mmol, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.1 mmol, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1×10^{-3} mmol, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.08×10^{-3} mmol。

1.2 骆驼瘤胃内容物采取

在刚宰杀取出内脏的骆驼瘤胃背部切开一长约 8 cm 的口,手戴一次性无菌手套,持经灭菌的厌氧管深入瘤胃内容物中部,混匀内容物,打开厌氧管盖,随机取瘤胃内容物混合物,厌氧管充满盖严管盖后取出。

1.3 厌氧培养基制备

配制好的培养基分装厌氧管每管 5 mL(固体管 8 mL),加塞后抽真空,充入氮气(纯度 99.99%),重复 5 次。113℃灭菌 30 min。

1.4 接种

将采取的 3 头骆驼瘤胃内容物在厌氧箱内混合,用移液器取 0.5 mL 接种到含有 5 mL 液体培养基的厌氧管中,设 3 个重复。39℃培养 5 d。

1.5 传代培养与菌株分离

取培养 5 d 的第一代培养物各 1 mL,充分混合后取 0.5 mL 接种第二代。同样方法传代培养 5 代。以第 5 代培养物为接种源,采用 Hungat 滚管技术分离纯化可耐受/降解去氢骆驼蓬碱的细菌菌株。

1.6 分离株的去氢骆驼蓬碱降解活力检测

分离纯化的菌株接种含去氢骆驼蓬碱液体培养基,39℃培养 5 d 后取 1 mL 12000 r/min 离心 5 min,取上清 10 μL 点硅胶板,干燥后以氯仿:甲醇(体积比 5:1)^[15] 为展开剂进行薄层析(thinlayer

chromatography, TLC),自然干燥或风干后在 265 nm 紫外灯下观察。

1.7 菌株培养与 DNA 提取、PCR 扩增、序列测定与进化分析

分离株在 PYRG(PYG 加 20% 瘤胃液)^[16] 培养基中培养以获得足够菌体,依照文献[17]方法提取菌株总 DNA,以 16S 通用引物 27F 和 1492R 进行 PCR 扩增,PCR 产物经柱回收纯化连接到 T 载体(Toyoba, Osaka, Japan),转化大肠杆菌 DH5 α ,挑选阳性克隆进行序列测定(北京鼎国生物技术公司)。序列测定结果经 BLASTn 与基因库进行比对,并选取相关序列构建进化树。

1.8 进化树构建

测定序列及由 GenBank 获得的参考序列共同用 CLUSTAL_X 进行相似性分析,并用 MEGA2 软件的相邻法构建进化树。

2 结果

2.1 耐受/降解去氢骆驼蓬碱骆驼瘤胃分离株基本特性

由胁迫培养的第五代培养物,用 Hungate 滚管技术分离纯化出 29 株菌,经革兰氏染色显微镜观察,16 株为革兰氏阳性杆菌,占 55%,大多数为直杆,少数稍有弯曲;4 株为革兰氏阳性芽孢杆菌,占 14%;7 株为革兰氏阴性杆菌,占 24%;革兰氏阳性和革兰氏阴性球菌各 1 株(表 1)。

2.2 分离株对去氢骆驼蓬碱的降解活力检测

29 株分离菌中经薄层析检测,有 15 株表现出降解去氢骆驼蓬碱活性,且均为与德氏乳杆菌(*L. delbrueckii*)相似性较高的菌株,其余 14 株未表现降解能力(表 1,图 1)。

2.3 耐受/降解去氢骆驼蓬碱的可培养骆驼瘤胃细菌种类

经 16S rRNA 序列分析(表 1)(序列登录号:GU366011- GU366039),分离纯化的 29 株菌株中 16 株属乳杆菌属(*Lactobacillus*),占 55%,其中与德氏乳杆菌保加利亚亚种(*L. delbrueckii* subsp. *Bulgarius*) ATCC BAA-365 相近的 12 株,相似性 94% - 99%;2 株与黏膜乳杆菌(*L. mucosae*) LAB87 菌株相近,相似性 98% 和 99%;2 株与乳杆菌 RA2120 菌株接近,相似性 97% 和 99%。4 株属芽孢杆菌属(*Bacillus*),与凝结芽孢杆菌(*B. coagulans*) 菌株 NRIC 1526 相关,相似性 96% - 99%;7 株属于志贺氏菌属(*Shigella*),分别与鲍氏

表1 耐受/降解去氢骆驼蓬碱骆驼瘤胃微生物的基本特性与降解活力

Table 1 Characteristics and degrading activity of harmine tolerance/degradation bacteria isolated from camel rumen

Number	Strains	Gram staining	Phynotype *	Degrading activity on Harmine **	Closest type strains		
					Strains in GenBank database (Accession No.)	Length of fragment for alignment analysis/bp	Similarity /%
1	AB012-1	—	R	—	<i>Shigella sonnei</i> strain AU65 (EF032687)	893/894	99
2	AB0122	+	B	+	<i>Bacillus coagulans</i> strain; NRIC 1526 (AB362706)	465/482	96
3	AB014	+	B	—	<i>Bacillus coagulans</i> strain; NRIC 1526 (AB362706)	995/1024	97
4	AB015	+	R	+	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. bulgaricus ATCC 11842 (CR954253)	818/823	99
5	AB024	—	R	—	<i>Shigella dysenteriae</i> strain LS92 (FJ937911)	969/981	98
6	AB032	—	C	—	<i>Megasphaera elsdenii</i> strain YJ-4 (AY038996)	1460/1543	94
7	AB05	+	R	+	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. bulgaricus ATCC BAA-365 (CP000412)	1517/1528	99
8	AB05-1	+	R	+	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. bulgaricus ATCC BAA-365 (CP000412)	1512/1531	98
9	AB06	+	R	+	<i>Lactobacillus</i> sp. RA2120 (AY445128)	1512/1527	99
10	AB511	+	R	+	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. bulgaricus ATCC BAA-365 (CP000412)	1514/1529	99
11	AB511-2	+	R	—	<i>Lactobacillus mucosae</i> strain LAB87 (EF120376)	583/590	98
12	AB51122	+	R	+	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. bulgaricus ATCC BAA-365 (CP000412)	289/291	98
13	AB5112-8	+	C	—	<i>Enterococcus cecorum</i> strain ATCC 43198 (NR_024905)	1159/1189	97
14	AB5115-9	+	R	+	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. bulgaricus ATCC BAA-365 (CP000412)	1195/1265	94
15	AB5121	—	R	—	<i>Shigella boydii</i> strain 3557-77 (AY696660)	1012/1031	98
16	AB5216-1	+	B	—	<i>Bacillus coagulans</i> strain; NRIC 1526 (AB362706)	1513/1519	99
17	AB5216-2	+	R	+	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. bulgaricus ATCC BAA-365 (CP000412)	997/1025	97
18	AB5221	—	R	—	<i>Shigella sonnei</i> strain AU65 (EF032687)	1152/1190	96
19	AB5223	—	R	—	<i>Shigella sonnei</i> strain HDDMG06 (EU723822)	932/942	98
20	AB523-1	+	R	+	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. bulgaricus ATCC BAA-365 (CP000412)	954/962	99
21	AB5242	—	R	—	<i>Shigella boydii</i> strain 3557-77 (AY696660)	1037/1054	98
22	AB524-2	—	R	—	<i>Shigella sonnei</i> strain HDDMG06 (EU723822)	821/825	99
23	AB5252	+	R	—	<i>Lactobacillus mucosae</i> strain LAB87 (EF120376)	901/906	99
24	AB5261-2	+	R	+	<i>Lactobacillus</i> sp. RA2120 (AY445128)	964/984	97
25	AB5262	+	R	+	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. bulgaricus ATCC BAA-365 (CP000412)	1034/1049	98
26	AB526-2	+	R	+	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. bulgaricus ATCC BAA-365 (CP000412)	1167/1206	96
27	AB5281	+	R	+	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. bulgaricus ATCC BAA-365 (CP000412)	1015/1055	96
28	AB5282	+	R	+	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. bulgaricus ATCC BAA-365 (CP000412)	1026/1051	97
29	AB5283	+	B	—	<i>Bacillus coagulans</i> strain; NRIC 1526 (AB362706)	1174/1220	96

* Phynotype, C, cocci; R, rod; B, bacillus; ** Degrading activity on Harmine: “+” positive, “—” negative.

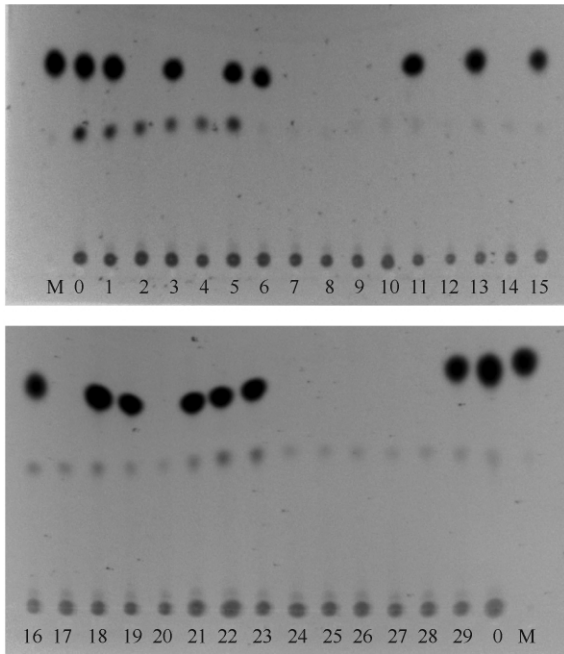


图 1 分离株降解去氢骆驼蓬碱薄层析分析

Fig. 1 Harmine degrading activity of the isolates identified by TLC. Number 1-29 is the cultures of the isolated strains depicted in table 1, M is the harmine marker, and 0 is the M98-5 medium.

志贺氏菌(*S. boydii*)菌株 3557-77(2 株)、索氏志贺氏菌(*S. sonnei*)菌株 AU65(4 株)和痢疾志贺氏菌(*S. dysenteriae*)菌株 LS92(1 株)接近,相似性在 96% -99% 之间;1 株与巨型球菌属(*Megasphaera*)的埃氏巨球形菌(*M. elsdenii*)菌株 YJ-4 最为接近,但相似性仅为 94%;1 株与肠球菌属(*Enterococcus*)的盲肠肠球菌(*E. cecorum*)菌株 ATCC 43198 相近,相似性为 97%。

2.4 耐受/降解去氢骆驼蓬碱骆驼瘤胃细菌进化分析

29 株分离株序列测定结果经与 GenBank 比对,选取相似性最高的菌株序列,共同用 CLUSTAL_X^[18]进行相似性分析,并用 MEGA 2 软件进行最大相邻法^[19]构建进化树(图 2)。由于有 12 株与德氏乳杆菌最为接近且相互间相似性高,故在进化树构建中选取分离株 AB05 为代表,进化树中分离株 AB05 (Isolate Strain AB05)后以括号显示所代表的菌株数与总菌株数的比例(余同)。

由图 2 可见,29 个分离株可分为三大类群。第一类群包括了乳杆菌属、芽孢杆菌属和肠球菌属,共 21 个分离株,占总数的 72.4%。这一类群中又分为 4 个次级类群,包括乳杆菌属 2 个,芽孢杆菌属和肠

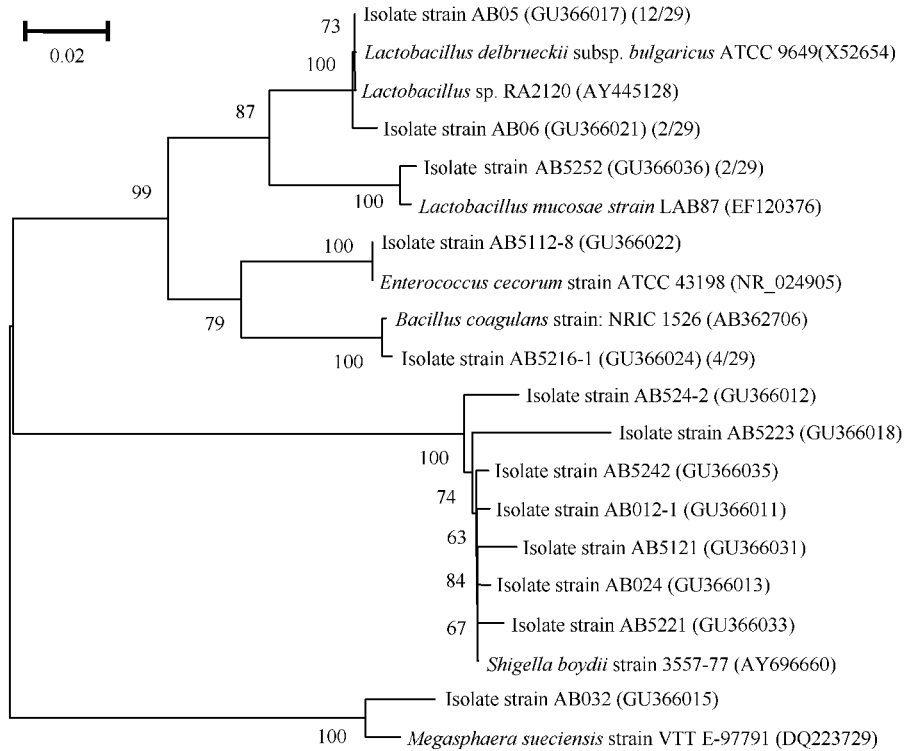


图 2 耐受/降解去氢骆驼蓬碱骆驼瘤胃细菌的进化分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of the isolates from the harmine enrichment of the camel rumen. The phylogenetic tree was constructed based on 16S rDNA gene fragments. Reference strains used in the phylogenetic tree can be retrieved by the database accession number in parentheses. The numbers at the branch nodes are bootstrap values based on 1000 re-samplings for maximum likelihood. Scale bar equals approximately 2% nucleotide.

球菌属各1个,它们之间的进化距离比较一致。另外两个类群分别是志贺氏菌属和巨型球菌属,其中志贺氏菌属有7个分离株,占总数的24%,而巨型球菌属只有1个分离株,且进化距离较大,明显属于不同的进化分支。由此结果可见,可耐受或降解去氢骆驼蓬碱的骆驼瘤胃微生物种类并不是特别多,说明具有耐受/降解骆驼蓬碱功能的骆驼瘤胃微生物只局限于部分微生物种类。

3 讨论

瘤胃是一个极其复杂而高效的生物反应器,其中包含着200多种微生物,包括细菌、真菌、放线菌和原生动物等^[20-21]。反刍动物除依赖瘤胃微生物消化饲料外,还对其适应环境有重要价值。

乳酸菌已被公认是具有保健作用的微生物,其作用机理被认为是可产生抑制致病菌的物质、抑制致病菌在消化道的附着和抑制微生物毒性物质的活性等,对植物毒素的降解作用只有谭蓓英等^[22]报道的乳酸杆菌(*Lactota cillus*)体外培养3d可降解44%–59%的含羞草素,其它尚未见可降解植物毒素的报道。本实验结果显示16株与乳酸菌相关的分离株中有15株表现了降解去氢骆驼蓬碱的活性,这一结果与谭蓓英等^[17]报道的一致。

凝结芽孢杆菌也是一类被用作益生菌的微生物,对多种致病菌有抑制作用^[23],已被用作益生菌添加到食品中^[24],部分菌株已获得专利保护^[25]。埃氏巨球形菌是共生于各类动物消化道的一种常见微生物^[26],也被用于动物保健^[27],具有降解乙酸盐^[28]、利用乳酸盐^[29]等功能。肠球菌属(*Enterococcus*)是人和动物肠道正常菌群之一^[30],原认为对宿主无害,但近年已证实具有致病力^[31]。志贺氏菌是一类致病菌^[32]。但这几种微生物均没有关于可降解植物毒素的报道,本实验中也未发现其降解去氢骆驼蓬碱活性,所以尚无法确定其保健功能与毒素降解有关联。

骆驼作为可在荒漠环境生存的动物种类,除具备一般反刍动物的强大消化功能外,对有毒植物的适应是其环境适应性的显著特点。本项研究结果显示,可耐受/降解去氢骆驼蓬碱的微生物种类主要是乳酸菌属、志贺氏菌属和凝结芽孢杆菌属三类,显著区别于由绵羊分离的可降解双稠吡咯啉生物碱的是球杆菌属(*Coccobacillus*)^[33],分离自山羊的6株能够耐受/降解单宁的菌株有4株属链球菌属(*Streptococcus*),另外2株分别是低G+C的革兰氏

阳性菌和肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)的革兰氏阴性杆菌^[34],经DGGE分析绵羊瘤胃可降解双稠吡咯啉生物碱的微生物类群主要是厌氧弧菌属(*Anaerovibrio*)、脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)、巨球形菌属(*Megasphaera*)、普雷沃氏菌属(*Prevotella*)和*Synergistes*菌属^[10],及谭蓓英等^[22]从广西涠洲岛黄牛瘤胃中分离出的可在体外降解含羞草素的种类为乳杆菌(*Lactota cillus*)、牛链球菌(*Streptococcus bovis*)和生孢梭菌(*Lostridium sporogerues*),说明骆驼瘤胃可耐受/降解去氢骆驼蓬碱的细菌类群有显著特点。

由于缺乏有关骆驼瘤胃微生物的背景资料,也无骆驼蓬植物毒素降解微生物的报道,本研究结果中能够耐受/降解去氢骆驼蓬碱的四类主要骆驼瘤胃微生物中,除志贺氏菌属为致病菌外,其余3种均为益生菌。在已有的报道中,除凝结芽孢杆菌对多种致病菌有抑制作用并可提高小鼠免疫功能,和谭蓓英等所分离的黄牛瘤胃乳杆菌可降解含羞草素、巨型肠球菌属可降解乳酸盐及三硝基甲苯外,尚没有关于它们具有降解植物毒素而增强保健功能的报道。能够耐受/降解去氢骆驼蓬碱的主要微生物类群显著区别于可降解其它植物毒素的种类,具体是因为动物种类的区别,或者是因为只针对于去氢骆驼蓬碱一种植物毒素,亦或二者兼而有之,尚需要进一步研究。

参考文献

- [1] 江苏省医学院编. 中药大辞典(*Dictionary of Chinese Crude Drugs*). 第一版. 上海: 上海人民出版社, 1977: 1751-1758.
- [2] 陈冀胜. 中国有毒植物. 北京: 科学出版社: 1987, 216-233
- [3] 姚伟琴, 王俊儒, 张普照, 彭菊艳, 张义英. 骆驼蓬醇提取物杀虫活性初步研究. 西北植物学报(*Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*), 2004, 24(6): 1096-1099.
- [4] 杨小平, 潘启超, 潘伟光, 梁永钜, 李奕荪, 李春杰. 骆驼蓬总碱的毒性. 中山医科大学学报(*Academic Journal of Sun Yat-Sen University of Medical Sciences*), 1998, 19(3): 170-171, 178.
- [5] 赵国林, 姜双林, 薛林贵, 刘斌. 骆驼蓬粗提物对植食性螨类的药效试验初报. 西北农业大学学报(*Acta University Agriculture. Boreali-occidentalis*), 1997, 25(4): 111-114.
- [6] 马安勤, 钟国华, 胡关英, 王强, 王文祥, 孙之潭. 骆驼蓬植物提取物杀虫活性的研究. 华南农业大学学报(*Journal of South China Agricultural University*), 2003, 24(1): 38-41.

- [7] Carlson JR, Breeze RG. Ruminal metabolism of plant toxins with emphasis on indolic compounds. *Journal of animal science*, 1984, 58(4):1040-1049.
- [8] Cheeke PR. Toxicity and metabolism of pyrrolizidine alkaloids. *Journal of animal science*, 1988, 66:2343-2350.
- [9] Kumar S. Degradation of mimosine by rumen fluid and its fraction from buffalo. *The Indian journal of animal sciences*, 1987, 57(10):1128-1131.
- [10] Rattray RM, Craig AM. Molecular Characterization of Sheep Ruminal Enrichments that Detoxify Pyrrolizidine Alkaloids by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Cloning. *Microbial Ecology*, 2007, 54: 264-275.
- [11] Goel G, Puniya AK, Aguilar CN, Singh K. Interaction of gut microflora with tannins in feeds. *Naturwissenschaften*, 2005, 92:497-503.
- [12] Anderson RC, Rasmussen MA, Allison NJ. Metabolism of the plant toxins nitropropionic acid and nitropropanol by ruminal microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(9):3056-61.
- [13] Kronberg SL, Halaweish FT, Hubert MB, Weimer PJ. Interactions between *Euphorbia esula* toxins and bovine ruminal microbes. *Journal of chemical ecology*, 2006, 32(1):15-28.
- [14] Salanitro JP, Fairchild IG, Zgornicki YD. Isolation, Culture Characteristics, and Identification of Anaerobic Bacteria from the Chicken Cecum. *Applied Microbiology*, 1974, 27(4):678-687.
- [15] 姚伟琴. 骆驼蓬植物化学及生物活性研究, 西北农林科技大学硕士学位论文, 2004.
- [16] An D, Cai S, Dong X. *Actinomyces ruminicola* sp. nov. isolated from cattle rumen. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2006, 56: 2043-2048.
- [17] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Laboratory Press; 1989.
- [18] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F *et al.*. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25:4876 - 4882.
- [19] Kumar S. Degradation of mimosine by rumen fluid and its fraction from buffalo. *The Indian journal of animal sciences*, 1987, 57(10):1128-1131.
- [20] Williams AG, Coleman GS. in *The Rumen Microbial Ecosystem*, PN Hobson, CS Stewart, Eds. (Blackie, London,), 1997. chap. 3.
- [21] Tajima K, Aminov RI, Nagamine T, Ogata K, Nakamura M, Matsui H, Benno Y. Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, 29:159-169.
- [22] 谭蓓英,王旭明,汪傲. 降解有毒的含羞草素和二羟基吡啶化合物的瘤胃细菌. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 1994, 34(5):379-384.
- [23] 崔云龙,闫述翠,万阜昌. 凝结芽胞杆菌 TBC 169 株对肠道致病菌的抑菌作用. *中国微生态学杂志 (Chinese Journal of Microecology)*, 2005, 17(5): 333-338.
- [24] Endresa JR, Clewella A, Jadea KA, Farber T, Hauswirth J, Schauss AG. Safety assessment of a proprietary preparation of a novel Probiotic, *Bacillus coagulans*, as a food ingredient. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 2009, 47(6):1231 - 1238.
- [25] Baron M. A patented strain of *Bacillus coagulans* increased immune response to viral challenge. *Postgraduate Medicine*, 2009, 121(2):114-118.
- [26] Sugihara PT, Sutter VL, Attebery HR, Bricknell KS, Finegold SM. Isolation of *Acidaminococcus fermentans* and *Megasphaera elsdenii* from normal human feces. *Applied Microbiology*, 1974, 27:274 - 275.
- [27] Klieve AV, Hennessy D, Ouwerkerk D, Forster RJ, Mackie RI, Attwood GT. Establishing populations of *Megasphaera elsdenii* YE 34 and *Butyrivibrio fibrisolvens* YE 44 in the rumen of cattle fed high grain diets. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, 95:621 - 630.
- [28] Blanch M, Calsamiglia S, DiLorenzo N, DiCostanzo A, Muetzel S, Wallace RJ. Physiological changes in rumen fermentation during acidosis induction and its control using a multivalent polyclonal antibody preparation in heifers. *Journal of animal science*, 2009, 87(5):1722-1730.
- [29] Brossard L, Martin C, Chaucheyras-Durand F, Michalet-Doreau B. Protozoa involved in butyric rather than lactic fermentative pattern during latent acidosis in sheep. *Reproduction Nutrition Development*, 2004, 44(3):195-206.
- [30] Devriese LA, Dutta GN, Farrow JAE, Van De Kerckhove A, Phillips BA. *Streptococcus cecorum*, a new species isolated from chickens. *International journal of systematic bacteriology*, 1983, 73:421-425.
- [31] De Baere T, Claeys G, Verschraegen G, Devriese LA, Baele M, Van Vlem B, Vanholder R, Dequidt C, Vaneechoutte M. Continuous ambulatory peritoneal dialysis peritonitis due to *Enterococcus cecorum*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38:3511-3512.

- [32] Ryan KJ, Ray CG (editors) . Sherris Medical Microbiology. 4th ed. McGraw Hill. 2004.
- [33] Lodge-Ivey SL, Rappe MS, Johnston WH Bohlken RE, Craig AM. Molecular analysis of a consortium of ruminal microbes that detoxify pyrrolizidine alkaloids. *Canadian journal of microbiology*, 2005, 51:455 - 465.
- [34] Nelson K, Thonney M, Woolston T Zinder SH, Pell AN. Phenotypic and phylogenetic characterization of ruminal tannin-tolerant bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(1) :3824-3830.

Screening of harmine tolerance/degrading bacteria from camel rumen

Dengdi An^{*}, Yanlei Zhu, Jing Tang, Yongxia Ye, Xianchun Zeng

(College of Life Science, Xinjiang Normal University, Urumqi 830054, China)

Abstract: [**Objective**] *Peganum harmala*, a famous traditional Chinese drug, contains a variety of alkaloids and toxic for many animals. Camels mainly live in desert or semi-desert areas, with the robust gastro- intestine system in digesting various feed including toxic plants without disease symptoms. [**Methods**] Camel rumen content was used as the inoculant to inoculate medium M98-5 which contains $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ harmin and cultivated for 5 days. Upto 5 subculturings, strains that could degrading or tolerant harmine were isolated. Their conversion activity was determined by thin-layer chromatography. The taxonomic position of the strains were identified based on 16S rRNA sequences analysis. [**Results**] 15 out of the 29 isolates have harmine degrading activity. Most of the isolates are identified as the members of the Genera *Lactobacillus* (16 strains, 55%), *Shigella* (7 strains, 24%) and *Bacillus* (4 strains, 13.8%). Only one strain belong to genus *Enterococcus* and one belong to genus *Megasphaera*. [**Conclusion**] The results indicated that the harmine tolerance/degrading communities of camel rumen are limited and only *Lactobacillus* have harmine-degrading activity.

Keywords: rumen microbe; plant toxins; tolerance/degrading; camels

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30860007) and the Postdoctor Foundation of Xinjiang Normal University (SDBS200802)

^{*} Corresponding author. Fax: +86-991-4332417; E-mail: anddg@yeah.net

Received: 27 December 2009/Revised: 2 June 2010