

降解有毒的含羞草素和二羟基吡啶 化合物的瘤胃细菌

谭蓓英 王旭明*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

汪 傲

(中国农业科学院畜牧研究所 北京 100094)

摘 要 从采食银合欢不引起中毒症状的我国广西北海市涠洲岛的黄牛瘤胃中,分离出 4 株厌氧细菌。经高效液相色谱分析证实,菌株 BR-1, BR-2, BR-5 和 BR-7 能降解有毒的含羞草素(mimosine)、3-羟基-4(1 氢)吡啶酮(3,4 DHP)和 2,3-二羟基吡啶(2,3DHP)。在宿主体外进行纯菌和混菌液体培养,3 天分别降解含羞草素 44-59%, 3,4DHP 30-47% 和 2,3DHP 58-60%。经分类鉴定,确定为三个种:BR-1 和 BR-2 很相似,为乳杆菌属(*Lactobacillus*),可能是一个新种。BR-5 为牛链球菌(*Streptococcus bovis*)和 BR-7 为生孢梭菌(*Clostridium sporogenes*)。上述这些兼性和严格厌氧的革兰氏阳性细菌对含羞草素和二羟基吡啶类毒素具有降解活性,这是以前没有报道过的。由于这些脱毒细菌栖居于瘤胃的微生态系统中,从而保护宿主动物免受银合欢的毒害。

关键词 瘤胃细菌,脱毒,银合欢,含羞草素,二羟基吡啶

含羞草素是一种氨基酸类毒素 [β -(3-hydroxy-4-oxopyridyl) α -amino-propionic acid]。它存在于一种在热带、亚热带地区生长的豆科灌木植物银合欢 (*Leucaena leucocephala*) 中。当反刍动物采食银合欢以后,在其瘤胃中产生另外两种有毒的中间代谢产物 3,4DHP 和它的异构体 2,3DHP。这些毒素物质会致使动物出现甲状腺肿大,脱毛,体衰和生育力减退等中毒症状。在世界上有些地区中毒情况是严重的,从而限制了富含蛋白质达 25% 的银合欢作为饲料的开发利用^[1]。然而,在夏威夷、印度尼西亚,委内瑞拉以及我国广西涠洲岛等地区的反刍动物采食银合欢以后,并不出现中毒症状^[2-6]。经研究发现,在其瘤胃中生存着降解这些毒素的瘤胃细菌,通过从不中毒向中毒的反刍动物转灌瘤胃液后能克服银合欢的毒性这一试验得到了证实^[6-9]。Allison 首先从瘤胃中分离出具有这种脱毒能力的细菌^[10]。Dominguez-Bello 研究了银合欢对瘤胃微生态的影响并分离出形态不同的毒素降解菌^[11]。然而,对脱毒细菌的种类报道的不多,仅有一个新属新种和一株梭菌^[12,13]。

银合欢在我国南方有广泛的种植,当地的草食动物对其有不同程度的中毒反应。经寻找发现涠洲岛的黄牛是不会因银合欢中毒的^[6]。本文报道了从具有脱毒能力的涠洲岛的

* 现在地址:中国人民解放军农牧大学,长春 130062。

本文于 1993 年 10 月 12 日收到。

黄牛瘤胃中,分离脱毒菌株和进行分离株的鉴定。这对脱毒的瘤胃微生物的研究,银合欢的开发利用以及吡啶类化合物的厌氧降解的研究具有一定的价值。

1 材料和方法

1.1 厌氧方法

瘤胃细菌一般是厌氧的。对严格厌氧菌的培养用亨格特(Hungate)厌氧技术,具体内容请参看作者以前的工作^[14-16]。试验中的气相是无氧的CO₂。

1.2 培养基

1.2.1 Fe-2Y培养基:见Fe-2培养基^[17]。补加酵母粉(Oxoid)0.05%,113℃30分钟灭菌。

1.2.2 CPY基础培养基:近似酪胨培养基^[11]。每100ml加酪胨(Difco)1g,蛋白胨(大豆)1g,酵母粉(Oxoid)0.25g,盐溶液I、II(见Fe-2培养基)各7ml,瘤胃液15ml,(琼脂1.4g),半胱氨酸盐酸盐0.05g,Na₂CO₃0.4g,刃天青溶液(0.1%)0.1ml,mCPY,2CPY和3CPY培养基分别为在CPY中加mimosine(Sigma Chemical Co. USA)40mg/100ml,2,3DHP(Aldrich chemical Co. Inc. Milwaukee, Wis USA)50mg/100ml和3,4DHP(用mimosine水解制备)^[18]50mg/100ml。113℃30分钟灭菌。(瘤胃液:做培养基用,采自北京农业大学带胃插管的实验牛,平时喂干草和粮食。)

1.2.3 PYG培养基:细菌鉴定用,按照Holdeman等人编著的一书^[19]。

1.3 菌株的分离

分离用的瘤胃液样品来自涠洲岛的黄牛,用胃管采样,装满厌氧管,带到实验室。用Fe-2Y和mCPY固体培养基做滚管分离单菌落和进行纯化。Fe-2Y培养基在初筛时有用,因为具有降解含羞草素能力的细菌有可能在这个培养基中长出黑色菌落^[17]。真正的筛选用比色法和高效液相色谱法^[20,21]。培养温度38℃。

1.4 菌株的鉴定

请参看作者以前的工作^[14-16]。乳酸旋光性的测定用Skerman的方法^[22],用L(+)-和DL-乳酸试剂(Fluka)作标样,所用仪器为岛津-D型旋光仪。抗生素敏感性试验参照戴自英编著一书的方法^[23]。

1.5 测定毒素的降解

将各毒素配成0.4%水溶液,用0.22μm孔径的滤膜过滤灭菌,接种前加至CPY培养基中,测定培养一段时间的毒素降解率。毒素的常规测定用比色法^[20]。决定性测定用高效液相色谱法^[21]。两种方法都要先离心培养液,取其上清液进行分析。高效液相色谱仪为Waters 244型,柱子Novapak C18(0.4×15cm),流动相0.1%正磷酸水溶液,流速0.7ml/min,柱温为室温,紫外检测器波长254nm。

2 结果

瘤胃细菌的种群之间关系密切,在分离纯化过程中比需氧菌困难得多,必须经过多次纯化才能得到纯培养物,而且要善于识别具有多形态的纯培养物。

2.1 分离菌株对毒素的降解

高效液相色谱的分析结果表明, 菌株 BR-1、BR-2、BR-5 和 BR-7 能降解含羞草素, 3, 4DHP 和 2, 3DHP。

将这4株菌分别进行纯菌培养, 3天降解含羞草素44—59%, 3, 4DHP 30—47% 和 2, 3DHP 58—60%。其中 BR-5 降解活性较高。将这4株菌进行混菌培养, 混菌并没有高于单菌的降解率 (表1)。

表1 分离菌株对不同毒素的降解率

Table 1 Degradation rates of isolates against different toxins

分离菌株 Isolates	毒素降解率 (%) [*] Degradation rates of toxins		
	含羞草素 Mimosine	3, 4 DHP	2, 3 DHP
BR-1	48.9	30.0	59.5
BR-2	46.0	35.7	59.3
BR-5	58.8	46.9	59.3
BR-7	44.2	32.5	57.7
BR-1, 2, 5, 7混合 Mixed	54.0	34.5	ND

* 培养3天的降解率。在 CPY 培养基中加含羞草素, 3, 4DHP 和 2, 3DHP 的终浓度分别为40、50、50 (mg/100ml)。“ND”未测。

Degradation rates show in 3 days. Final concentrations of mimosine, 3, 4 DHP and 2, 3 DHP in CPY medium were 40, 50, 50 (mg/100ml) respectively. “ND” not detected.

2.2 菌株的鉴定

2.2.1 BR-1和 BR-2菌株: 来自初筛的黑色菌落。在含毒素的培养基中细胞呈多形态, 球或球杆状, 偶见棒骨状和退化的分支。在 PYG 培养基中细胞杆状, 长短可变 (图1-1, 2a, 2b), 在严格厌氧条件下常呈短杆或球杆状, $0.7-0.9 \times 1.2-2.2 \mu\text{m}$, 在有氧情况下, 一些细胞可伸长至 $9-50 \mu\text{m}$ 。革兰氏阳性, 不运动, 不形成芽孢, 15°C 和 45°C 能生长, 异型乳酸发酵产 D (-)-乳酸、乙酸、 CO_2 和 NH_3 。发酵终 pH 4.8—5.0。DNA 的 G+C 含量分别为 51.5 和 51.7 mol% (Tm)。除了能还原硝酸盐是乳杆菌属的少见特征以外, 它们具备这个属的其它典型特性。BR-1 和 BR-2 菌株特性几乎相同 (尽管对含羞草素的降解能力曾有不同), 认为它们是同一个种, 并鉴定为乳杆菌属 (*Lactobacillus*)^[24]。这个种与 *L. fermentum*, *L. brevis* 和 *L. delbrückii* 三个种接近, 但又不同, 可能是一个新种。

2.2.2 BR-5菌株: 细胞球形, 直径 $0.6-0.9 \mu\text{m}$, 成对, 成链或成堆 (图1-3), 革兰氏阳性, 不运动, 不形成芽孢, 兼性和严格厌氧, DNA 的 G+C 含量为 36.2 mol% (Tm), 鉴定为牛链球菌 (*Streptococcus bovis*), 各项特性与标准菌株的描述相同^[24]。在该种的可变特性中, BR-5 的特性是发酵阿拉伯糖、菊糖、蜜二糖、棉子糖, 不发酵甘露醇、山梨醇、海藻糖和木糖。该菌株耐热, 经 80°C 10 分钟处理后仍能生长。对青霉素 G 敏感 (最低抑制浓度 $\text{MIC} < 0.4 \text{ u/ml}$), 对 α -氨基苄青霉素具有抗性 ($\text{MIC} > 400 \text{ u/ml}$)。

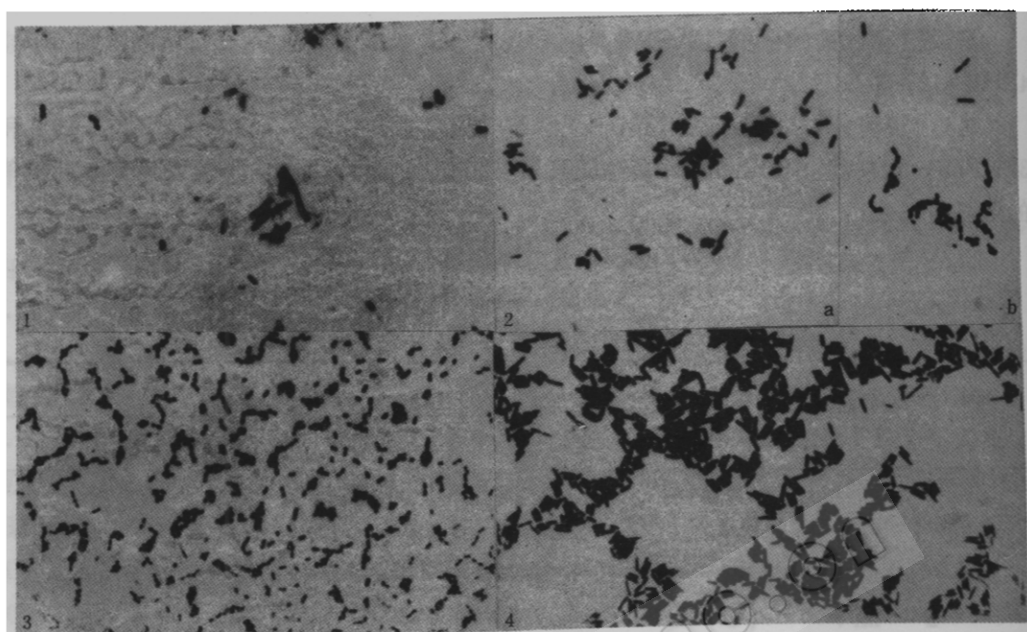


图1 分离菌株的显微照片 (在 PYG 培养基中, 革兰氏染色1320×)

Fig. 1 Photomicrographs of isolates in PYG medium by Gram stain

1. BR-1 菌株; 2 (a, b). BR-2菌株; 3. BR-5菌株; 4. BR-7菌株。

1. Strain BR-1; 2 (a. b.). Strain BR-2; 3. Strain BR-5; 4. Strain BR-7.

2.2.3 BR-7菌株: 细胞杆状, 单生, $0.5-0.7 \times 1.5-3.4 \mu\text{m}$, 个别伸长可达 $9.5 \mu\text{m}$ (图1-4), 革兰氏阳性, 能运动, 严格厌氧, 形成芽孢, 芽孢卵形, 次端生和端生, 游离芽孢椭圆形。产生 NH_3 和 H_2S , 有恶臭味, 刚分离出来时尤为明显。DNA 的 G+C 含量为 25.1mol% (Tm)。这株菌定名为生孢梭菌 (*Clostridium sporogenes*), 除了不产生丁酸, 不消化碎肉和能水解淀粉以外, 其它特性与其标准菌株的描述相同^[24]。该菌株对青霉素G、氯霉素、四环素、红霉素和万古霉素敏感, (MIC 依次为1.6、6.3、0.2、0.4和1.6u/ml), 对新霉素、卡那霉素和链霉素具有抗性 (MIC 依次为25、25和400u/ml)。

3 讨论

从没有特殊的银合欢中毒症状到银合欢脱毒菌株的分离, 表明涠洲岛的黄牛与夏威夷的山羊和委内瑞拉的山羊一样, 在瘤胃微生态环境中存在脱毒细菌从而保护宿主动物免受银合欢的毒害^[2,10,11]。

分离的牛链球菌、生孢梭菌已知种和乳杆菌新种能降解含羞草素、3, 4DHP 和2, 3DHP 这是以前没有报道过的^[12,13]。每个菌株都能降解含羞草素和 DHP, 其降解活性比报道的菌株高^[13]。这些特点对脱毒是很有利的。

致谢 Allison M. J. 博士惠赠手稿、论文和菌种, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] National Research Council. *Leucaena: Promising Forage and Tree Crop for the tropics*. 2nd ed. Washington D C : National Academy Press, 1984.
- [2] Jones R J. *Aust Vet J*, 1981, **57**: 55-56.
- [3] Jones R J, Megarrity R G. *Aust J Agric Res*, 1983, **34**: 781-790.
- [4] Tangendjaja B, Lowry J B, Will R B H. *Trop Anim Prod*, 1985, **10**: 39-43.
- [5] Kudo H, Cheng K J, Majak W *et al.* *Can J Anim Sci*, 1984, **64**: 937-942.
- [6] 汪 徽, 雷祖玉, 冯学勤, 等. 草业科学, 1992, **9** (1): 20-23.
- [7] Jones R J, Lowry J B. *Experientia*, 1984, **40**: 1435-1436.
- [8] Jones R J, Megarrity R G. *Aust Vet J*, 1986, **63**: 259-262.
- [9] Hammond A C, Allison M J, Williams M J *et al.* *Am J Vet Res*, 1989, **50**: 2176-2180.
- [10] Allison M J, Cook H M, Stahl D A. *Proc Int Symp Nutr Herb Univ Queensland Brisbane Australia*, 1987. 55-56.
- [11] Dominguez-Bello M G, Stewart C S. *FEMS Microbiol Ecol*, 1990, **73**: 283-290.
- [12] Allison M J, Mayberry W R, Mcsweeney C S *et al.* *System Appl Microbiol*, 1992, **15**: 522-529.
- [13] Dominguez-Bello M G, Stewart C S. *System Appl Microbiol*, 1991, **14**: 67-71.
- [14] 谭蓓英, 王大相. 微生物学报, 1987, **27** (3): 211-216.
- [15] 谭蓓英, 贺 青, 王大相. 微生物学报, 1991, **31** (6): 484-487.
- [16] 谭蓓英, 王大相. 微生物学报, 1992, **32** (3): 155-160.
- [17] Allison M J. *Leucaena Res Reports*, 1991, **12**: 105-108.
- [18] Hart N K, Hofmann A, Lamberton J A *et al.* *Heterocycles*, 1977, **7**: 265-272.
- [19] Holdeman L V, Cato E P, Moore W E. *Anaerobe Laboratory Manual*. 4th ed. Blacksburg: Anaerobe Laboratory, Virginia Polytechnic Institute and State University, 1977.
- [20] Allison M J, Hammond A C, Jones R J. *Appl Environ Microbiol*, 1990, **56** (3): 590-594.
- [21] Tangendjaja B, Wills R B H. *J Chromatogr*, 1980, **202**: 317-318.
- [22] Skerman V B D. *A Guide to the Identification of the Genera of Bacteria*. 2nd ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1967.
- [23] 戴自英编. 抗菌素临床应用手册. 北京: 人民卫生出版社, 1986, 6-8.
- [24] Sneath P H A, Mair N S, Sharpe M E *et al.* *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol 2*. Baltimore: Williams and Wilkins, 1985.

RUMEN BACTERIA DEGRADING TOXIC MIMOSINE AND DIHYDROXYPYRIDINE COMPOUNDS IN CHINA*

Tan Peiying Wang Xuming**

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 10080)

Wang Jing

(Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094)

Abstract Four anaerobic strains were isolated from the rumen of the cattle which no specific toxic symptoms were seen when *Leucaena* was fed in Weizhou island Beihai city, Guangxi Province, China. All of these strains (BR-1, BR-2, BR-5 and BR-7) possess degradative activities to toxic mimosine, 3-hydroxy-4 (1H) -pyridone (3, 4-DHP) and 2, 3-dihydroxypyridine (2, 3DHP) from *Leucaena*, that were confirmed by analysis of HPLC. Pure and mixed cultures of these four strains in vitro degraded 44—59% of mimosine, 30—47% of 3, 4 DHP, and 58—60% of 2, 3 DHP respectively in 3 days. Strains of Both BR-1 and BR-2 were almost identical and were characterized as *Lactobacillus*, may be a new species. Strains of BR-5 and BR-7 were characterized as *Streptococcus bovis* and *Clostridium sporogenes* respectively. It has not yet been reported that these Gram positive facultatively and obligately anaerobic bacteria were able to degrade mimosine, 3, 4 DHP and 2, 3 DHP. These detoxic bacteria were existing in the rumen microflora of cattle in Weizhou island, protecting therefore their hosts animal from *Leucaena* toxicity.

Key words Rumen bacteria, Detoxin, *Leucaena*, Mimosine, Dihydroxypyridine

* Acknowledgement: Here, We want to express our gratitude towards Ph. D. Milton J. Allison for his valuable help of manuscript, papers and culture.

** Present address: Agriculture and Husbandry University of CPLA, Changchun 130062.