

## 一株瘤胃源乳酸利用菌的分离鉴定及其体外代谢特性

龙黎明, 毛胜勇\*, 苏勇, 朱伟云

(南京农业大学动物科技学院消化道微生物实验室, 南京 210095)

**摘要:**【目的】从饲喂高精料的本地山羊瘤胃内分离到一株利用乳酸并能产生大量丙酸的菌株 L9, 并进一步研究了该菌在调控瘤胃微生物发酵中的作用。【方法】采用厌氧培养技术, 结合形态、生理生化特性和 16S rRNA 基因序列分析结果。【结果】该菌株被鉴定为反刍兽新月形单胞菌(*Selenomonas ruminantium*)。该菌株体外代谢特性研究表明, L9 可利用乳酸作为唯一碳源, 该菌在 24 h 内可对 90 mmol/L 的乳酸完全降解。体外模拟瘤胃急性酸中毒的发酵试验结果表明, 以淀粉为底物时, 与对照组相比, 添加菌株 L9 可显著降低瘤胃微生物体外培养体系中乳酸浓度, 提高 pH 值, 提高总挥发性脂肪酸和丙酸浓度, 并显著降低乙酸与丙酸的浓度比 ( $P < 0.05$ )。【结论】结果显示, 菌株 L9 是一株可代谢乳酸, 促进丙酸生成, 提高总挥发性脂肪酸浓度的有益瘤胃细菌。

**关键词:** 反刍兽新月形单胞菌; 乳酸利用菌; 瘤胃

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 12-1571-07

反刍动物瘤胃内栖息着大量的乳酸产生菌如牛链球菌、乳酸杆菌、多酸光岗菌等, 这些细菌可发酵碳水化合物和未被瘤胃壁吸收的糖产生大量的乳酸<sup>[1,2]</sup>; 同时瘤胃中还存在着大量的乳酸利用菌, 主要包括埃氏巨型球菌、反刍兽新月形单胞菌和韦荣氏球菌, 这些乳酸利用菌可发酵乳酸生成乙酸、丙酸和丁酸等<sup>[3-5]</sup>。正常情况下, 乳酸产生菌和乳酸利用菌之间处于相对平衡, 使瘤胃内乳酸浓度维持在相对较低的水平; 但是, 对于如高产奶牛、迅速育肥期肉牛等在饲喂大量精料后, 乳酸产生菌可以快速发酵碳水化合物并产生大量的乳酸, 当这一速度远超乳酸利用菌利用乳酸能力时, 乳酸会大量累积, 进而导致瘤胃酸中毒的发生<sup>[6-9]</sup>。

瘤胃酸中毒是当前影响世界奶牛养殖效益的一类主要营养代谢病。近年来一些学者认为, 通过调控瘤胃微生物之间的代谢平衡, 可有效降低瘤胃酸中毒的发生。其中, 乳酸利用菌是一类维持瘤胃乳酸相对

稳定的关键微生物, 其尤为人们关注。一些报道表明, 体外接种乳酸利用菌可预防乳酸的累积和 pH 值的快速下降, 此外, 一些报道还表明, 乳酸利用菌还能减少硝酸盐和亚硝酸盐的累积和甲烷的产生<sup>[10-14]</sup>, 而这些特性对维护动物健康和减少温室气体排放都具有积极意义。为深入了解我国本土山羊瘤胃内乳酸利用情况, 本试验采用常规微生物技术, 并结合系统学分析技术, 分离鉴定了一株具有较强乳酸利用能力的细菌, 在此基础上, 进一步探讨了该菌在瘤胃发酵中的潜在调控效果, 拟为深入探讨其在反刍动物瘤胃微生态中的作用奠定基础。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物:** 受试动物为 3 头装有永久性瘤胃瘘管的体况良好的南京本地雄性山羊。预饲两周: 第一周将山羊的日粮精料添加量从 200 g/d 逐渐增加到 600 g/d,

基金项目: 国家自然科学基金(30530560)

通讯作者: Tel: +86-25-84395523; E-mail: 1050410504@163.com

作者简介: 龙黎明(1984-), 男, 广西河池人, 硕士研究生, 主要从事动物营养和消化道微生物研究。

E-mail: longlimingyouxiang@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-05-02; 修回日期: 2008-08-18

日粮精料由 70%玉米和 30%豆粕组成,自由采食羊草;第二周精料添加量保持为 600 g/d,自由采食羊草。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** *Taq* 酶;序列测序、引物合成 (Invitrogen); Qiaquick PCR 产物纯化试剂盒 (申能博彩); PCR 仪 (Biometra, 德国); 生理生化特性微量发酵管 (杭州天和); 厌氧工作站 (Bug-Box) (Ruskin, 英国); GC-14B 型气相色谱仪 (日本岛津公司); S-3000N 可变电压扫描电子显微镜 (日本 HITACH 公司)。

**1.1.3 培养基:** 基础培养基 LH 配方参照文献<sup>[15]</sup> (100 mL)。培养基通 CO<sub>2</sub> 至厌氧后, 调节 pH 值到 6.8, 厌氧分装培养基, 115 °C 灭菌 20 min。

## 1.2 乳酸利用菌的富集与分离纯化

在预饲 2 周后, 采集 3 头山羊的混合瘤胃液样品, 并保存于装有温水的保温瓶内。富集与分离纯化的方法参照文献<sup>[16]</sup>。瘤胃液经过 4 层纱布过滤去除固相, 取 1 mL 瘤胃液接种到 10 mL LH 培养基内, 39 °C 富集培养。间隔 24 h 以 1% (V/V) 的接种量传代一次, 连续传代 5 次。将第五代培养物梯度稀释, 取 0.1 mL 各梯度稀释液接种到 5 mL 含有 2% 琼脂的基础培养基的亨氏滚管中, 于冰面上进行滚管, 39 °C 培养 48 h。在厌氧工作站中将单一菌落转移至液体培养基中, 培养 24 h 后检测发酵液中乳酸含量, 将具有乳酸利用能力的菌株再次进行滚管。重复以上步骤直至得到形态一致的单菌落。

## 1.3 菌株的鉴定

**1.3.1 菌落及菌体形态特征观察:** 菌体经稀释后涂布于平板上, 置于厌氧工作站中 39 °C 培养。48 h 后观察菌落形态; 对 18 h 培养物进行革兰氏染色和拍摄电镜扫描照片, 观察革兰氏染色结果和菌株菌体形态。

**1.3.2 菌株的生理生化特性鉴定:** 鉴定方法参照参考文献<sup>[17-18]</sup>的方法进行。

**1.3.3 16S rRNA 基因序列系统发育分析:** DNA 的提取参照文献<sup>[19]</sup>, 采用引物 8 f 和 1510 r 扩增 L9 的 16S rRNA 基因<sup>[20]</sup>。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 片段长度正确的 PCR 产物送至上海英骏生物技术有限公司测序。序列同源性与 GenBank 数据库进行比较。本实验所测菌株 L9 16S rRNA 基因序列在 GenBank 的登录号 EU327401。从 GenBank 数据库中获得与之有较高同源性的模式菌株的 16S rRNA 基因序列。采用 Clustalx1.81 和 MEGA 3.1 软件进行系统进化

分析, 利用 Neighbor-joining 方法建立系统进化树。

## 1.4 不同碳源的代谢特性

分别添加纤维二糖 20 mmol/L、麦芽糖 20 mmol/L、乳糖 20 mmol/L、葡萄糖 20 mmol/L、乳酸 90 mmol/L 和组合添加乳酸钠 40 mmol/L 和葡萄糖 20 mmol/L 到基础培养基, 接种 1% (V/V) 已活化的 L9 菌株发酵液, 39 °C 下进行批次培养, 接种后 0、2、5、8、12、18、24 h 取发酵液 3 份, 一份用于 OD<sub>650</sub> 值测定, 一份 -20 °C 保存, 用比色法测定乳酸浓度和葡萄糖浓度, 一份用于挥发性脂肪酸 (VFA) 浓度测定。

## 1.5 体外模拟急性酸中毒条件下添加 L9 菌株对瘤胃微生物体外发酵的影响

**1.5.1 培养基的制备:** 瘤胃细菌培养采用文献<sup>[21]</sup>中的培养基。发酵底物为 0.8 g 淀粉。培养基定量 (48 mL/瓶) 分装至含上述底物的发酵瓶中, 用橡皮塞和铝盖密封后, 115 °C 灭菌 20 min。

**1.5.2 试验设计:** 试验采用体外批次培养, 每个发酵瓶接种 12 mL 经过四层纱布过滤的新鲜瘤胃液, 根据菌株 L9 接种量 (0、4 和 8 mL) 分为 3 组, 即 T<sub>0</sub>、T<sub>4</sub> 和 T<sub>8</sub> 组, 各组均设 4 个重复。菌株 L9 接种量不足 8 mL 的发酵瓶, 用菌株 L9 的无细胞发酵液 (5000 r/min 离心 5 min) 补足 8 mL, 以保证每个发酵瓶内培养液体积一致。39 °C 条件下培养 18 h, 每间隔 3 h 测定 pH 值, 同时收集样品以备测定各时间点的乳酸浓度和 VFA 浓度。

## 1.6 测定指标及方法

乳酸浓度采用比色法测定<sup>[22]</sup>; 葡萄糖浓度用葡萄糖试剂盒测定; VFA 浓度采用毛细管气相色谱 (GC) 测定<sup>[23]</sup>, 取 1 mL 的发酵液到离心管中, 加入 0.2 mL 的 25% (W/V) 偏磷酸巴豆酸混合溶液, 巴豆酸作为内标, 10000 r/min 离心 5 min, 用 1 μm 进样器取上清 0.5 μm 直接进样。色谱条件: 色谱柱采用毛细管柱, 柱温 140 °C, 汽化温度 180 °C, 采用氢离子火焰检测器, 检测温度 180 °C, 载气为氮气, 压力为 0.05 MPa, 氢气压力为 0.05 MPa, 氧气压力 0.05 MPa, 灵敏度 (档) 为 10<sup>1</sup>, 衰减 3.0。由于瘤胃微生物发酵产生的 VFA 主要由乙酸、丙酸和丁酸组成, 其它酸所占比例之和低于 1%, 因此, 本实验主要测定了乙酸、丙酸及丁酸浓度, 并以三者之和作为总挥发性脂肪酸 (TVFA) 浓度。

## 1.7 统计方法

所有试验数据经 Excel 初步处理, 数据分析采用

SPSS13.0 软件，对数据进行单因素方差分析。

## 2 结果和分析

### 2.1 乳酸利用菌的富集与分离纯化

通过富集和分离纯化得到了 5 株具有利用乳酸能力的菌株，分别命名为 L1、L2、L8、L9、Y6，发酵液总乳酸含量测定结果显示(图 1)，发酵 18 h 后，除菌株 L8 外，其它菌株都具备很强的乳酸利用能力，其中菌株 L9 的利用能力最强，乳酸消失率为 99.98%。鉴于 L9 具有良好的乳酸利用能力，对其进行了进一步的鉴定。

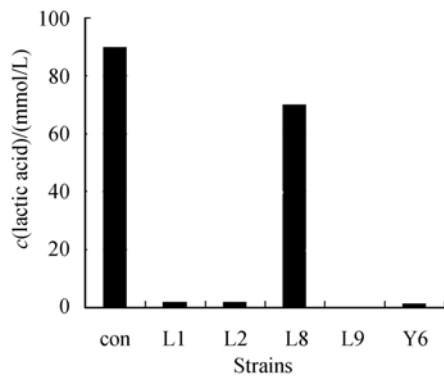


图 1 菌株 L1、L2、L8、L9 和 Y6 发酵 24 h 发酵液中乳酸浓度

Fig.1 Lactic acid concentration in strains L1、L2、L8、L9 and Y6 culture supernatant after 24 h incubation. Con means “without inoculation”.

### 2.2 菌株的鉴定

2.2.1 菌落及菌体形态特征观察：L9 在琼脂平板上培养 48 h 后，菌落全缘，稍凸起，颜色为淡黄褐色，表面光滑，直径达 0.8 mm；深层菌落薄并呈凸镜状。细胞革兰氏染色阴性，电镜显示该菌菌体为新月状或弯的螺旋状的杆菌，末端为圆或钝的渐尖的形状。细胞多为单个或成对出现，偶有短链排列，大小 (2.3~3.1)  $\mu\text{m} \times$  (0.6~0.8)  $\mu\text{m}$  (图 2)。

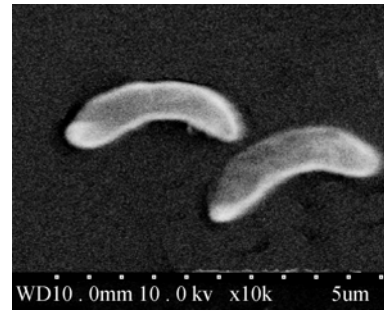


图 2 菌株 L9 形态 (10000 $\times$ )

Fig. 2 Electron micrograph of strain L9 (10000  $\times$ ).

2.2.2 菌株的生理生化特性：菌株的生理生化特性鉴定结果显示(表 1)，与伯杰氏手册(第 9 版)对照，菌株 L9 与反刍兽新月形单胞菌(*Selenomonas ruminantium*)特征最相近。

表 1 菌株 L9 的生理生化特性鉴定结果

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of strain L9 and *Selenomonas ruminantium*

Identification	L9	<i>Selenomonas ruminantium</i>	Identification	L9	<i>Selenomonas ruminantium</i>	Identification	L9	<i>Selenomonas ruminantium</i>
Cellobiose	+	+	Lactose	+	+	Sulfur hydride	-	+/-
Raffinose	+	+	Aesculin	+	+	Dextrin	-	+/-
Salicin	+	+	Arabinose	+	+	Gelatin	-	-
Sucrose	-	-	Galactose	-	+	Nitrate Disoxidation	-	+/-
Mannitol	+	+	Fructose	-	+	Dulcite	-	+
Inulin	-	+/-	Fucose	-	+/-			

“+” means positive; “-” means negative.

2.2.3 L9 的系统发育学分析：将菌株 L9 的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 中进行同源性比较，结果表明：在与 L9 同源性超过 97% 的 33 条序列中，有 27 条属于反刍兽新月形单胞菌(*S. ruminantium*)。16S rRNA 基因系统进化分析表明(图 3)，菌株 L9 与反刍兽新月形单胞菌的同源性最高，大于 99%，故将菌株 L9 归类为反刍兽新月形单胞菌，命名为 *S. ruminantium* L9。

### 2.3 菌株的代谢特性

2.3.1 在不同碳源中的生长特性：图 4 显示，菌株

L9 在含纤维二糖、麦芽糖、乳糖、葡萄糖和乳酸的培养基中都能迅速地生长，说明这些碳源皆能被菌株 L9 利用。在以乳酸为碳源的培养基中 L9 生长迅速，接种后 4 h 进入对数生长期，12 h 后进入稳定期，随后 OD 值逐渐降低。而在含纤维二糖、麦芽糖、乳糖和葡萄糖的培养基中菌株 L9 生长速度更快，在接种后 2 h 进入对数生长期，6~8 h 后即进入稳定期。以上结果说明，菌株 L9 除了能利用乳酸外，也可以利用葡萄糖、纤维二糖、麦芽糖和乳糖生长。

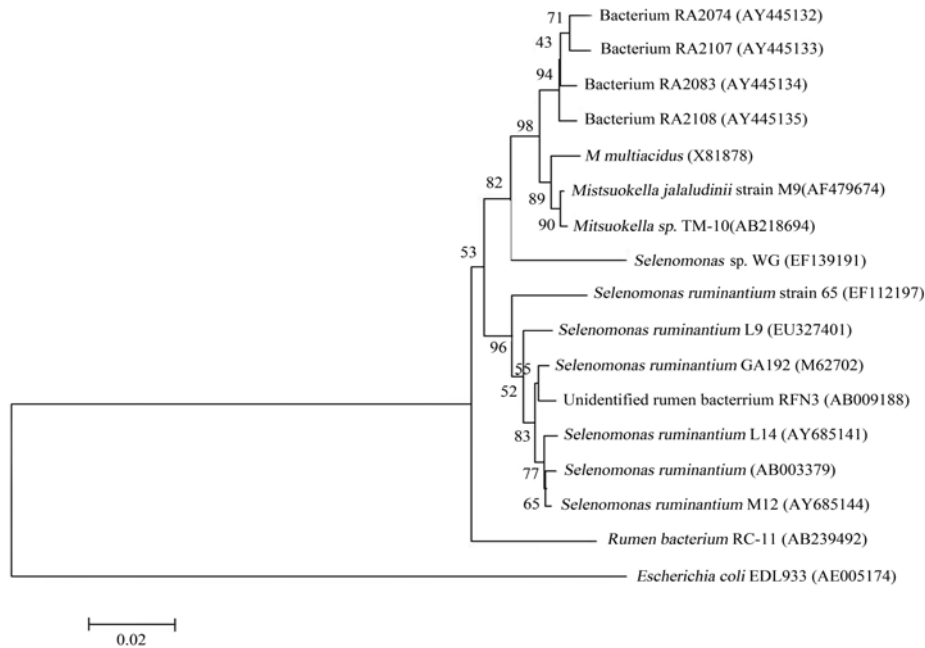


图3 L9的16S rRNA基因序列系统进化分析

Fig.3 Phylogenetic tree of strain L9 based on 16S rRNA gene sequence. The numbers at the nodes indicate the levels of bootstrap support (%) based on 1000 resample data sets. The scale bar corresponds to 0.02 substitutions per nucleotide position.

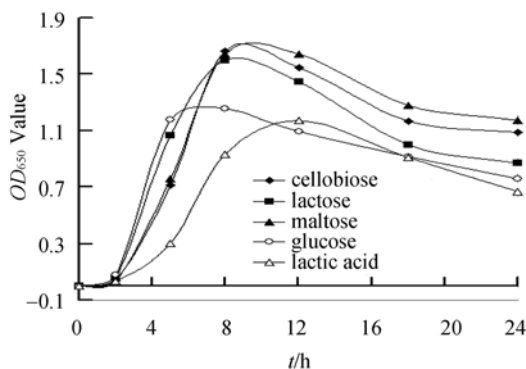


图4 菌株L9在不同碳源中的生长曲线

Fig. 4 The growth curve of strain L9 growing on different carbon source.

**2.3.2 乳酸的利用特性：**在含 90 mmol/L 乳酸的培养基中接种 L9 菌株后，乳酸浓度迅速下降，发酵 12 h 后，98.67%的乳酸能被 L9 菌株利用，发酵 24 h 后，在培养基中检测不到乳酸，说明乳酸已被全部利用（图 5-A）；如图 5-B 所示，在含 20 mmol/L 葡萄糖和 40 mmol/L 乳酸的培养基中，接种 L9 菌株 2 h 后，乳酸和葡萄糖浓度均有所降低，说明菌株 L9 可同时发酵乳酸和葡萄糖，但葡萄糖浓度降低幅度更大，说明菌株 L9 对葡萄糖的利用效率更高；发酵 5 h 后，大部分葡萄糖被利用掉，乳酸浓度达到最大值，说明菌株 L9 可发酵葡萄糖并产生乳酸；发酵 8 h 后，随葡萄糖的耗尽，乳酸浓度开始迅速下降；发酵 24 h 后，

发酵液中乳酸的终浓度为 0.48 mmol/L。以上试验结果一方面说明了菌株 L9 利用葡萄糖的效率要高于乳酸，另一方面说明了菌株 L9 自身存在一个初级和次级代谢的关系，可利用葡萄糖发酵产物乳酸进行二次发酵。

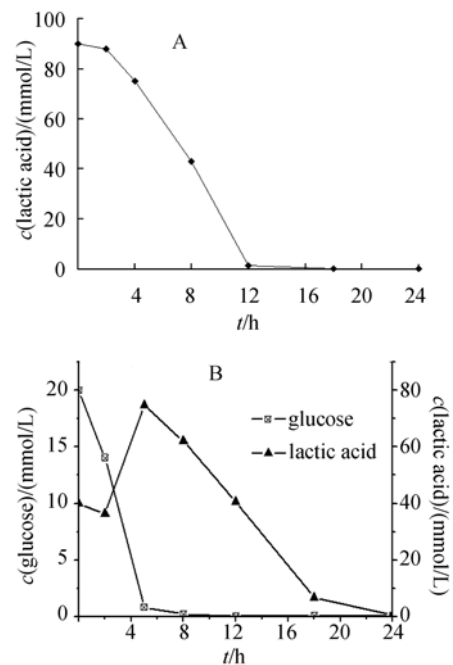


图5 乳酸浓度 (A) 以及乳酸和葡萄糖浓度 (B) 随发酵时间的变化曲线

Fig. 5 The curve of lactic acid concentration (A) and lactic acid and glucose concentration (B) after incubation.

**2.3.3 在不同碳源中的产乳酸特性：**图 6 显示，菌株 L9 发酵葡萄糖、纤维二糖、麦芽糖和乳糖可产生乳酸，并且以发酵葡萄糖产乳酸的效率最高，在 4~5 h 时乳酸浓度达到峰值 35.6 mmol/L，发酵纤维二糖、麦芽糖和乳糖产生乳酸的峰值出现在 9~10 h，峰值分别为 31.1 mmol/L，31.6 mmol/L 和 9.8 mmol/L。但随着发酵时间的延长，菌株 L9 发酵葡萄糖、纤维二糖、麦芽糖和乳糖所产生的乳酸可被再次利用，24 h 时发酵液中乳酸浓度分别降到 0.23 mmol/L，2.01 mmol/L，5.5 mmol/L 和 0.15 mmol/L (图 6)。上述结果显示，菌株 L9 具有产生乳酸和利用乳酸的双重作用，自身存在着一个初次级代谢的关系，菌株 L9 可以利用自身发酵多

糖所产生的乳酸进行二次发酵，并产生大量丙酸(表 2)。

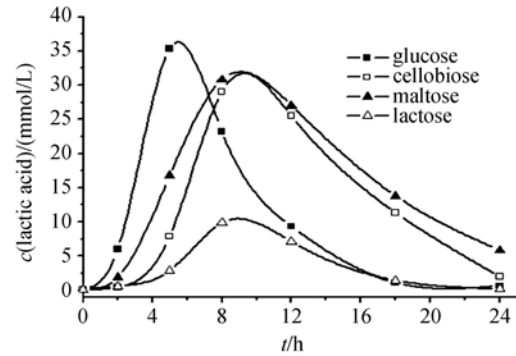


图 6 乳酸浓度随发酵时间的变化曲线

Fig.6 The curve of lactic acid concentration of strain L9 growing on different carbon source and fermentation time.

表 2 菌株 L9 在不同碳源培养基中的短链脂肪酸产量

Table 2 Effect of different carbon source on the acetate, propionate and butyrate production of strain L9

Sample	Cellobiose	Lactose	Maltose	Glucose	Lactic acid	Glucose+lactate
Acetate/(mmol/L)	26.26 ± 0.59	28.38 ± 0.35	20.60 ± 0.20	10.76 ± 0.49	33.28 ± 0.82	17.26 ± 0.91
Propionate/(mmol/L)	32.77 ± 0.61	46.51 ± 0.72	27.91 ± 0.03	24.83 ± 0.43	65.68 ± 1.53	37.41 ± 0.59
Butyrate/(mmol/L)	0.46 ± 0.06	0.48 ± 0.01	0.33 ± 0.03	-	0.18 ± 0.03	-

“-”means it was not detected.

#### 2.4 体外模拟急性酸中毒条件下添加菌株 L9 对瘤胃微生物体外发酵的影响

图 7-A 显示，对照组和处理组的乳酸浓度在接种后 0~6 h 期间急剧增加，对照组 T<sub>0</sub> 在 6 h 达峰值，处理组 T<sub>4</sub> 和 T<sub>8</sub> 分别在接种后 9 h 和 3 h 达峰值。接种菌株 L9 能减少乳酸的累积，在接种后 3 h 时处理组 T<sub>4</sub> 的乳酸浓度低于 T<sub>8</sub> 组 ( $P < 0.01$ )，但是在 6~18 h 内 T<sub>8</sub> 组显著低于 T<sub>4</sub> 组 ( $P < 0.01$ )。如图 7-B 所示，各组的 pH 值从 3 h 时开始急剧下降，在 6 h 时 T<sub>4</sub> 与对照组 T<sub>0</sub> 的 pH 值分别下降至 5.06 和 5.19，而 T<sub>8</sub> 组则降至 5.48，显著高于 T<sub>4</sub> 和 T<sub>0</sub> 组 ( $P < 0.01$ )。在 9~18 h 期间，各组 pH 值均下降到 5.0 以下，达到瘤胃急性酸中毒阈值，在 18 h 时，T<sub>8</sub> 组的 pH 值显著高于 T<sub>4</sub> 和 T<sub>0</sub> 组。

由表 3 可知，与对照组 T<sub>0</sub> 相比，接种后 18 h 时处理组 T<sub>4</sub> 和 T<sub>8</sub> 发酵液中 TVFA 浓度分别提高了 32.3% ( $P < 0.01$ ) 和 63.7% ( $P < 0.01$ )；乙酸比例分别降低了 11.0% ( $P < 0.01$ ) 和 17.1% ( $P < 0.01$ )；丙酸比例分别提高了 23.6% ( $P < 0.01$ ) 和 33.9% ( $P < 0.01$ )；乙酸与丙酸比分别下降了 0.45 ( $P < 0.01$ ) 和 0.62 ( $P < 0.01$ )。添加菌株 L9 对 TVFA 及其组成百分比的影响呈明显的剂量效应，T<sub>8</sub> 组的 TVFA 和丙酸比例显著高于 T<sub>4</sub> 组 ( $P < 0.01$ )，乙酸比例和乙丙比值显著低于 T<sub>4</sub> 组 ( $P < 0.01$ )。

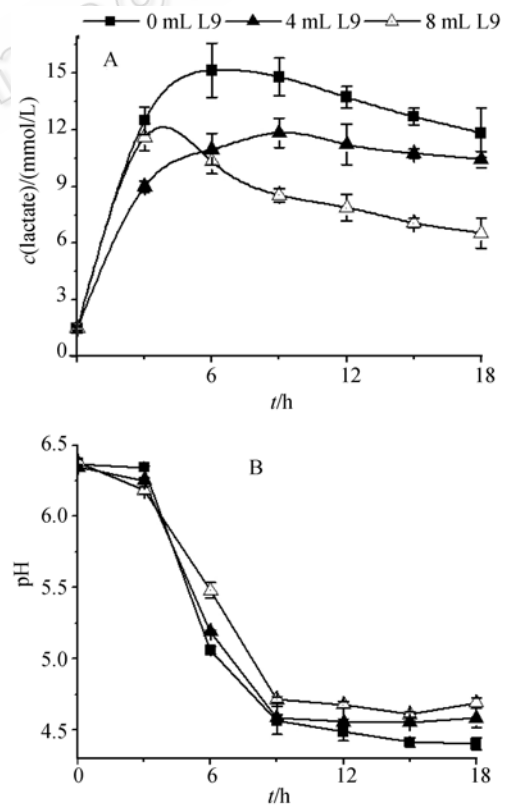


图 7 添加菌株 L9 培养物对发酵乳酸浓度(A)及 pH 值(B)的影响

Fig.7 Effect of strain L9 cultures addition on the lactate concentration (A) and pH value(B).

表3 添加 L9 对 TVFA 及其组成百分比的影响  
Table 3 Effect of strain L9 addition on the concentration of TVFA and its composition

Sample	TVFA/(mmol/L)	Acetate ratio/%	Propionate ratio/%	Acetate/Propionate
T <sub>0</sub> (0 mL L9)	58.47±3.92 <sup>c</sup>	56.96±0.86 <sup>a</sup>	36.16±0.71 <sup>c</sup>	1.58±0.05 <sup>a</sup>
T <sub>4</sub> (4 mL L9)	77.37±4.63 <sup>b</sup>	50.68±0.70 <sup>b</sup>	44.69±0.64 <sup>b</sup>	1.13±0.03 <sup>b</sup>
T <sub>8</sub> (8 mL L9)	95.73±2.79 <sup>a</sup>	47.21±1.29 <sup>c</sup>	48.43±1.23 <sup>a</sup>	0.96±0.05 <sup>c</sup>

Values in the column with different superscripts differ significantly ( $P < 0.05$ ).

### 3 讨论

反刍兽新月形单胞菌是瘤胃内琥珀酸—丙酸生成过程中的重要细菌, 由于其能利用乳酸进行代谢, 因此对瘤胃功能的正常发挥具有重要意义<sup>[16]</sup>。反刍兽新月形单胞菌占瘤胃内可培养细菌的 22%~51%, 但其中具有乳酸降解能力的菌株所占比重不到 1%<sup>[13]</sup>。本研究从山羊瘤胃内分离到一株可高效发酵乳酸的乳酸利用菌, 通过 16S rRNA 基因序列的系统进化分析发现, L9 与反刍兽新月形单胞菌的同源性最高, 达到 97% 以上。结合形态特征和生理生化鉴定结果, L9 被初步鉴定为反刍兽新月形单胞菌。体外研究表明, 该菌在培养 12 h 内对 90 mmol/L 的乳酸利用率为 98.67%, 在 24 h 时可完全代谢乳酸, 结果说明该菌具有较强的发酵乳酸的能力。分析相关报道, 菌株 L9 的乳酸代谢能力要强于 Jeef 等<sup>[24]</sup>所分离到的反刍兽新月型单胞菌菌株。本研究结果同时表明, 该菌代谢乳酸的主要产物是丙酸, 由于丙酸是反刍动物的重要生糖物质, 因而该菌可能在促进瘤胃丙酸生成, 进而对维持动物生产性能方面有重要作用。

本研究表明, 菌株 L9 除可代谢乳酸产生丙酸外, 还能代谢多种糖, 并产生乳酸, 随后又利用乳酸产生大量丙酸, 该结果说明菌株 L9 自身也存在一个初级和次级代谢的关系, 这也进一步显示瘤胃微生物菌株代谢的复杂性。目前尚无有关反刍兽新月型单胞菌对急性酸中毒条件下瘤胃微生物发酵影响的研究。本研究以淀粉为底物, 体外模拟了瘤胃急性酸中毒条件下添加 L9 对发酵产物的影响。结果表明, 添加菌株 L9 可显著提高发酵体系中 pH 值和总挥发性脂肪酸浓度, 提高丙酸的百分比例, 降低乳酸浓度。该结果显示, L9 菌株有缓解瘤胃酸中毒的作用。

综上所述, L9 菌株是一株具有较强的发酵乳酸能力的反刍兽新月型单胞菌, 其可降低体外发酵系统中乳酸浓度, 提高丙酸比例和 TVFA 浓度, 改善瘤胃发酵类型, 因此, L9 具有用做新型反刍动物添加剂的潜力。目前, 有关如何促进其生长及加强其对乳酸

发酵能力的研究正在进行之中。

### 参 考 文 献

- [1] Russell J B, Rychlik J L. Factors that alter rumen microbial ecology. *Science*, 2001, 292: 1119–1122.
- [2] Huntington G B, Britton R A. Effect of dietary lactic acid on rumen lactate metabolism and blood acid-base status of lambs switched from low to high concentrate diets. *Journal of Animal Science*, 1979, 49(6): 1569–1576.
- [3] Iwamoto M, Asanuma N, Hino T. Ability of *Selenomonas ruminantium*, *Veillonella parvula*, and *Wolinella succinogenes* to reduce nitrate and nitrite with special reference to the suppression of ruminal methanogenesis. *Anaerobe*, 2002, 428: 209–215.
- [4] Counotte G H, Prins R A, Janssen R H, et al. Role of *Megasphaera elsdenii* in the fermentation of DL-[2-<sup>13</sup>C] lactate in the rumen of dairy cattle. *Applied and Environmental Microbiology*, 1981, 42: 649–655.
- [5] Hashizume KT, Takamitsu K, Yamada H, et al. *Megasphaera elsdenii* JCM1772T normalizes hyperlactate production in the large intestine of fructooligosaccharide-fed rats by stimulating butyrate production. *Journal of Nutrition*, 2003, 133 (10): 3187–3190.
- [6] Jouany J P. Optimizing rumen functions in the close-up transition period and early lactation to drive dry matter intake and energy balance in cows. *Animal Reproduction Science*, 2006, 96: 250–264.
- [7] Mackie R I, Gilchrist F M. Changes in lactate-producing and lactate-utilising bacteria in relation to pH in the rumen of sheep during stepwise adaptation to a high-concentrate diet. *Applied and Environmental Microbiology*, 1979, 38: 422–430.
- [8] Owens F N, Secrist D S, Hill W J, et al. Acidosis in cattle: a review. *Journal of Animal Science*, 1998, 76: 275–286.
- [9] Russell J B, Hino T. Regulation of lactate production in *Streptococcus bovis*: a spiralling effect that contributes to rumen acidosis. *Journal of Dairy Science*, 1985, 68: 1712–1721.
- [10] Limin K J, Hession A. Preventing *in vitro* lactate accumulation in ruminal fermentations by inoculation with *Megasphaera elsdenii*. *Journal of Animal Science*, 1995, 73(1): 250–256.
- [11] Wiryawan K G, Brooker J D. Probiotic control of lactate accumulation in acutely grain-fed sheep. *Australian Journal of Ag-*

- ricultural Research*, 1995, 46: 1555–1568.
- [12] Iwamoto M, Asanuma N, Hino T. Effect of pH and electron donors on nitrate and nitrite reduction in ruminal microbiota. *Journal of Animal Science*, 2001, 72, 117–125.
- [13] Yoshii T, Asanuma N, Hino T. Number of nitrate- and nitrite-reducing *Selenomonas ruminantium* in the rumen, and possible factors affecting its growth. *Journal of Animal Science*, 2003, 74: 483–491.
- [14] Asanuma N, Hino T. Prevention of rumen acidosis and suppression of ruminal methanogenesis by augmentation of lactate utilization. *Nihon Chikusan Gakkaiho*, 2004, 75: 543–550.
- [15] Mackie R I, Heath S. Enumeration and isolation of lactate-utilizing bacteria from the rumen of sheep. *Applied and Environmental Microbiology*, 1979, 38(3): 416–421.
- [16] Flint H J, Bisset J. Genetic diversity in *Selenomonas ruminantium* isolated from the rumen. *FEMS Microbiology Reviews*, 1990, 73: 351–360.
- [17] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 236–237.
- [18] Kreg N R. *Bergey's Manual of systematic Bacteriology* (Vol. 1). Baltimore: The Williams & Wilkins Co, 1984, pp587–590.
- [19] Duncan S H, Louis P, Flint H J. Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70 (10): 5810–5817.
- [20] Shannon C, Wear W. *A mathematical theory of communication*. Urbana: University of Illinois Press, 1963.
- [21] Martin S A, Streeter M N. Effect of malate on *in vitro* mixed ruminal microorganism fermentation. *Journal of Animal Science*, 1995, 73(7): 214–215.
- [22] 张龙翔, 张庭芳, 李玲媛. 生化试验方法和技术. 第二版. 北京: 高等教育出版社, 1997, pp422–428.
- [23] Zhu W Y, Theodorou M K, Longland A C, *et al.* Growth and survival of anaerobic fungi in batch and continuous-flow cultures. *Anaerobe*, 1996, 2(1): 29–37.
- [24] Jeff D, Evans S A, Martin S A. Factors affecting lactate and malate utilization by *Selenomonas ruminantium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(12): 4853–4858.

## Isolation and *in vitro* metabolic characterization of a lactate-utilizing bacterium from goat rumen

Liming Long, Shengyong Mao<sup>\*</sup>, Yong Su, Weiyun Zhu

(Laboratory of Gastrointestinal Microbiology, College of Animal science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** [Objective] A lactate-utilizing, propionate-producing bacterium, strain L9, was isolated from rumen of goat fed with high concentrate by utilizing modified Hungate technique and anaerobic culture technique. The effect of the strain L9 culture on the rumen fermentation was further studied. [Methods] According to the characteristics of morphology, physiology, biochemistry tests and sequence comparison of 16S rRNA gene, strain L9 was identified as *selenomonas ruminantium*. The influence of strain L9 culture on *in vitro* rumen fermentation was studied using mixed rumen micro-organisms of goats as inoculums. [Results] The results of the metabolism experiment showed that it was capable of using lactate as the sole carbon source, and 90mmol/L lactate in LH medium could be completely utilized after 24h incubation. As compared with the control, strain L9 culture addition significantly increased the total volatile fatty acids (TVFA), the percentage of propionate and pH value, while reduced the ratio of acetate to propionate and lactate production ( $P < 0.05$ ). [Conclusion] The results suggested that strain L9 can reduce lactic acid production and enhance the TVFA and propionate production in *in vitro* fermentation, and thus could be beneficial for the fermentation of rumen microorganisms.

**Keywords:** *Selenomonas ruminantium*; lactate-utilizing bacterium; rumen

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30530560)

<sup>\*</sup>Corresponding author. Tel: +86-25-84395523; E-mail: 1050410504@163.com

Received: 2 May 2008 / Revised: 18 August 2008