

痤疮丙酸杆菌的分离鉴定及其对瘤胃微生物发酵的影响

吴凌, 赵明娟, 夏成, 倪宏波, 张洪友

(黑龙江八一农垦大学动物科技学院, 大庆 163319)

摘要 【目的】奶牛围产期能量代谢的特点是能量负平衡, 瘤胃发酵产生的丙酸是奶牛糖异生供能的主要底物, 对预防奶牛能量负平衡具有重要的意义。本研究旨在从健康奶牛瘤胃液中分离、筛选出以产丙酸为主的痤疮丙酸杆菌, 研究其瘤胃发酵特性。【方法】无菌采取装有瘤胃瘘奶牛的瘤胃液, 按照厌氧菌分离步骤, 通过丙酸生成菌株的特异性培养基 SLB 进行筛选, 提取分离菌的基因组 DNA, 克隆其 16S rRNA 基因, 进行序列测定, 分离出一株痤疮丙酸杆菌。通过体内外发酵试验研究痤疮丙酸杆菌对瘤胃液 pH、挥发性脂肪酸和乳酸的影响。【结果】通过形态学观察、生化反应和序列分析证实所分离的一株产丙酸的杆菌为痤疮丙酸杆菌。该菌株在体外发酵过程中, 瘤胃液 pH 先下降, 在 12 h 时降至最低, 随后上升; 乙酸、丙酸、丁酸等挥发性脂肪酸先升高, 于 12h 时升至最高, 随后又降低; 乳酸浓度和乙酸/丙酸总体上一直下降; 在体内发酵过程中, pH 总体上下降; 乙酸、丙酸、丁酸等挥发性脂肪酸总体上升。【结论】在国内首次从健康牛瘤胃液中成功分离出一株痤疮丙酸杆菌, 为今后研发预防奶牛能量负平衡的微生态制剂奠定基础。

关键词: 痤疮丙酸杆菌; 分离鉴定; 瘤胃微生物发酵

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2009)02-0168-06

奶牛围产期能量代谢的特点是能量负平衡, 是造成奶牛产后易发酮病和脂肪肝的重要病理学基础。奶牛能量代谢不同于其他动物, 主要靠瘤胃微生物发酵产生的乙酸、丙酸、丁酸等挥发性脂肪酸供能。体内 90% 葡萄糖是由糖异生供给的, 其中由生糖先质丙酸经肝脏糖异生生成的葡萄糖约占 50% ~ 60%^[1-3], 因此瘤胃内充足的丙酸对预防奶牛围产期能量负平衡极为重要。瘤胃中丙酸生成菌主要包括: 反刍兽月形单胞菌、埃氏巨型球菌、痤疮丙酸杆菌、栖瘤胃拟杆菌、小韦荣球菌和发酵氨基酸球菌^[4-7]。早期的研究表明, 瘤胃丙酸主要是由两个特殊的途径生成的。一是利用琥珀酸脱羧生成丙酸, 二是经丙烯酰辅酶 A 生成丙酸。痤疮丙酸杆菌作为瘤胃内的优势菌之一^[8-9], 可利用奶牛主要日粮成分精料产生的乳酸作为碳源, 通过糖酵解

(EMP) 和己糖单磷酸(HMP)两种途径生成丙酸^[10]。这对反刍动物的能量提供具有十分重要的作用。因此, 本试验采用 SLB 培养基利用厌氧法从健康奶牛瘤胃液中成功分离出一株痤疮丙酸杆菌, 并通过体内外发酵试验揭示了该菌株可以利用乳酸产生大量丙酸, 同时改变瘤胃发酵类型, 促进乙酸、丁酸等挥发性脂肪酸的生成。为构建基因工程菌, 调控瘤胃微生物发酵, 增加丙酸的比例, 防治围产期奶牛能量负平衡开辟新的途径。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器: 琼脂粉、乳酸钠、吐温-80、Tris 饱和酚、氯仿、异戊醇、无水乙醇均为国产分析纯。胰蛋白胨、酵母提取物购自 Oxoid 公司,

基金项目: 黑龙江省科技厅攻关项目(GC05B504)

作者简介: 吴凌(1966-), 女, 教授, 硕士, 研究方向为兽医微生物学及免疫学。Tel: +86-459-6819666; E-mail: wuling8@163.com

收稿日期: 2008-07-01; 修回日期: 2008-10-28

K_2HPO_4 、Proteinase K、RNaseA 购自美国 Fermentas (MBI) 公司; *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、DNA Marker DL2000 均购自 TaKaRa 公司; CTAB 购自美国 Sigma 公司; 琼脂糖购自美国 OXOID 公司。圆底立式培养袋(日本三菱瓦斯化学株式会社)、厌氧产气袋(日本三菱瓦斯化学株式会社)、DK-S12 型可调式恒温水浴箱(上海森信实验仪器有限公司)、DRP-9272 型电热恒温培养箱(上海森信实验仪器有限公司)、pHS-3C 精密 pH 计(上海雷磁仪器厂)等。

1.1.2 培养基 (1) SLB 液体培养基: 每升含 15 g 乳酸钠, 7 mL 吐温-80, 10 g 胰蛋白胨, 10 g 酵母粉, 0.25 g K_2HPO_4 。(2) SLB 固体培养基: 每升液体培养基中加入 15 g 琼脂粉, 0.30 g 甲硝唑。调 pH 为 7.0, 高压灭菌(100 kPa, 20 min), 冷却至 60°C 时加入甲硝唑, 充分混匀后铺平板。4°C 保存。(甲硝唑的灭菌方法: 将称量好的甲硝唑粉末在紫外灯下照射 20 min 可达到较好的灭菌效果)。

1.2 痤疮丙酸杆菌的分离方法

无菌采取健康奶牛瘤胃液, 于 37°C 迅速送回实验室, 置 10 mL 离心管中, 72 × g 离心 10 min 去掉饲料颗粒及纤毛虫。取上清用生理盐水倍比稀释至 10^{-7} , 各取 40 μ L 不同稀释度的稀释液用 L 棒均匀涂布于 SLB 琼脂板上, 放在厌氧袋中于 37°C 的温箱内厌氧环境培养 48 h。取单个疑似菌落继续在 SLB 琼脂板上纯化培养, 对纯培养菌落进行革兰氏染色, 光学显微镜观察。

1.3 生化试验^[11]

按照常规细菌接种法进行生化试验, 将分离菌株接种于阿拉伯糖、木糖、葡萄糖、甘露糖、果糖、半乳糖、蔗糖、麦芽糖、淀粉、纤维二糖、甘露醇生化反应管中, 37°C 厌氧培养 48 h 观察结果。

1.4 16S rRNA 基因序列鉴定

1.4.1 引物设计及基因组的提取: 按照参考文献 [12] 设计细菌 16S rRNA 基因片段 PCR 扩增通用引物, 上游引物序列为: 5'-AGAGTTTGATC(A/C)TGG-3', 下游引物序列为: 5'-GGACTAC(A/T/C)AGGGTATCTAAT-3'。扩增目的片段大小约 780 bp。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。提取分离菌株的基因组 DNA, 扩增其 16S rRNA 基因片段, 与 GenBank 中发表的痤疮丙酸杆菌 (*Propionibacterium acnes*) 16S rRNA 基因进行基因序列同源性分析。

1.4.2 16S rRNA 基因片段扩增 按参考文献 [13] 提取纯培养细菌的基因组, 以纯培养细菌染色体 DNA

为模板, 扩增其 16S rRNA 基因片段。PCR 反应采用 25 μ L, 反应条件: 94°C 3 min, 94°C 1 min, 33°C 1 min, 72°C 1 min, 30 个循环, 72°C 10 min。

PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。将上述扩增的目的片段用 DNA 片段回收纯化试剂盒回收(按试剂盒说明操作), 将纯化后的目的片段送至上海生工生物工程技术有限公司测序。测序结果用 BLAST 进行比对分析。

1.5 痤疮丙酸杆菌的培养

将鉴定后的痤疮丙酸杆菌接种于 SLB 特异性培养基中, 于 37°C 恒温厌氧环境下培养 48 h, 大量增菌。

1.6 菌液 OD 值的测定及细菌计数

用紫外分光光度计测定菌液 OD_{600} 的值。将菌液用培养液倍比稀释为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} , 用微量移液器分别吸取每个稀释度的菌液 50 μ L 均匀涂于 SLB 板上, 37°C 厌氧培养 48 h。选取平板上菌落数适中的稀释度进行计数。

细菌浓度(个/L) = 菌落数 / $50 \times 10^6 \times$ 稀释倍数

1.7 痤疮丙酸杆菌的耐酸性试验

将鉴定后的痤疮丙酸杆菌接种于 SLB 特异性培养基中, 于 37°C 恒温厌氧环境下培养 48 h, 大量增菌。以 pH 0.5 为间隔配制 pH 4.0 ~ 7.0 系列的 SLB 琼脂平板。将菌液用培养液倍比稀释为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} , 用微量移液器吸取原菌液及各稀释度的菌液 50 μ L 均匀涂于 SLB 板上, 每个稀释度、梯度一式三份, 37°C 厌氧培养 48 h 观察。

1.8 痤疮丙酸杆菌体外发酵试验

绵羊晨饲后 2 h 由 3 只绵羊瘤胃内上下左右不同位点采集足量瘤胃液, 放入预热达 39°C 的保温瓶中, 迅速送至实验室, 经 4 层纱布过滤后持续充入 CO_2 气体 5 min, 然后迅速分装至已预热并通有 CO_2 的 250 mL 葡萄糖瓶内(每个葡萄糖瓶加 100 mL 瘤胃液), 加入痤疮丙酸杆菌菌液 50 mL, 再加入作用底物乳酸 465 μ L。37°C 恒温厌氧培养。于处理前及处理后 2、4、6、8、10、12、24、36、48 h, 取培养液检测 pH、乙酸、丙酸、丁酸、乳酸含量。

1.9 痤疮丙酸杆菌体内发酵试验

取造瘘羊 6 只, 分为实验组和对照组, 每组 3 只。试验组羊经瘤胃瘘管注入痤疮丙酸杆菌培养液 100 mL, 对照组注入等量生理盐水, 于处理前及处理后 2、4、6、8、10、12、24 h, 采集瘤胃液检测 pH、乙酸、丙酸、丁酸、乳酸含量。

1.10 样品 pH、VFAs 及乳酸含量的测定

样品 pH 用精密 pH 计测定, VFAs 及乳酸含量使用 Waters-Baseline 810 液相色谱仪进行测定, 波长 214 nm, C18 柱温维持在 30°C, 流动相 0.02 mol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$, pH 2.37, 流速 1 mL/min。

分析步骤: 取培养液或用 8 层纱布过滤后的瘤胃液 5 mL 置于 10 mL 离心管中, 加入 1 mL 25% 的偏磷酸, 混匀, 静置 10 min, 再加入 250 μL 甲酸, 混匀 450 \times g, 离心 10 min。取上清置于新的离心管中, 置于 -20°C 保存, 直到测定。每批样品检测前, 首先检测标准液。标准液由 600 mmol/L 乙酸、200 mmol/L 丙酸、200 mmol/L 丁酸、200 mmol/L 乳酸各 1 mL 混合而成。进样前标准液、样品均需先通过 0.45 μm 的 Muiipore 过滤膜, 进样量为 10 μL 。

1.11 数据处理

试验数据用 $\bar{X} \pm \text{SD}$ 表示, 用 SPSS 10.0 软件进行数据分析, 组间差异显著性用 ANOVA (方差分析) 进行分析。

2 结果

2.1 分离细菌的革兰氏染色结果

分离细菌为革兰氏阳性, 菌体呈短棒状, 两端钝圆或稍尖, 细胞单个、成对或短链, 呈“V”或“Y”字形出现, 或方形排列。

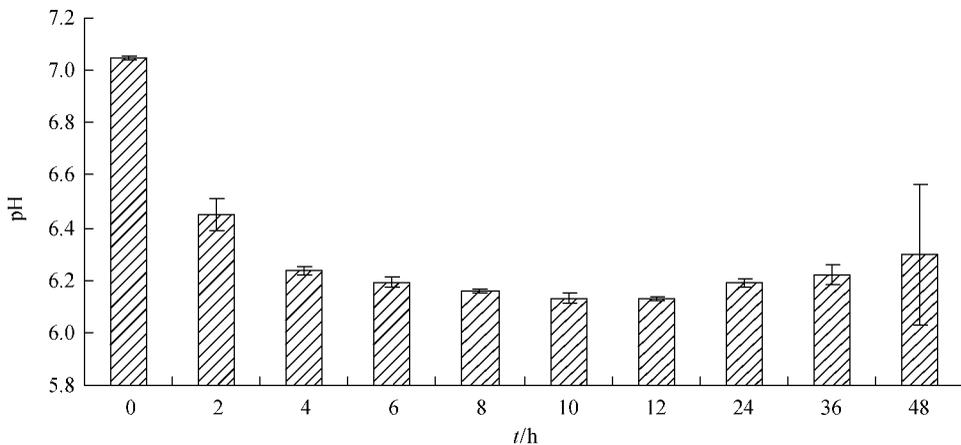


图 1 痤疮丙酸杆菌对体外培养液 pH 值的影响

Fig. 1 Effect of *Propionibacterium acnes* on pH in vitro.

2.6.2 体外培养液中 VFAs、乳酸浓度及乙酸/丙酸结果 取 0、2、4、6、8、10、12、24、36、48 h 的体外培养液检测 VFAs、乳酸浓度及乙酸/丙酸。结果显示(图 2) 随着培养时间的延长, 痤疮丙酸杆菌体外培养液的乙酸、丙酸、丁酸浓度均呈上升趋势, 且都在 12 h 达到最大值, 分别为 39.86、28.57 和 33.91; 随后有

2.2 分离细菌的生化反应鉴定结果

葡萄糖、甘露醇、果糖、半乳糖呈现阳性, 阿拉伯糖、木糖、蔗糖、麦芽糖、淀粉、纤维二糖、甘露醇呈阴性。

2.3 分离菌株的 16S rRNA PCR 基因序列测定及同源性比较结果

分离细菌的序列如下, 与 GenBank 中序列号为 emb1AM157438.11 *Propionibacterium acnes* (痤疮丙酸杆菌) 16S rRNA 基因同源性达到 99%。因此确定分离菌为痤疮丙酸杆菌。

2.4 痤疮丙酸杆菌培养液的 OD 值及菌体数

细菌培养液的 OD 值为 0.8, 菌体浓度为 2.7×10^8 个/mL。

2.5 痤疮丙酸杆菌的耐酸试验结果

原菌液及各稀释度菌液, pH 7.0、6.5、6.0、5.5、5.0 时, 细菌生长良好; pH 4.5 时, 生长受到一定的抑制, 菌落数减少; pH 4.0 时, 细菌的生长完全受到抑制, 平板表面无菌落生长。

2.6 体外培养液中环境参数的检测结果

2.6.1 体外培养液的 pH 检测结果 取 0、2、4、6、8、10、12、24、36、48 h 的痤疮丙酸杆菌体外培养液检测 pH。结果显示(图 1) 随着培养时间的延长, 培养液的 pH 逐渐降低, 12 h 降至最低点, 为 6.13, 以后逐渐回升。

所下降, 乳酸浓度则一直呈下降趋势; 乙酸/丙酸值不断下降, 且在 12 h 降至最低, 随后有所上升。说明痤疮丙酸杆菌可以促进乙酸、丙酸、丁酸等挥发性脂肪酸的生成, 并且以丙酸的增加量显著, 同时, 降低乳酸的生成量。

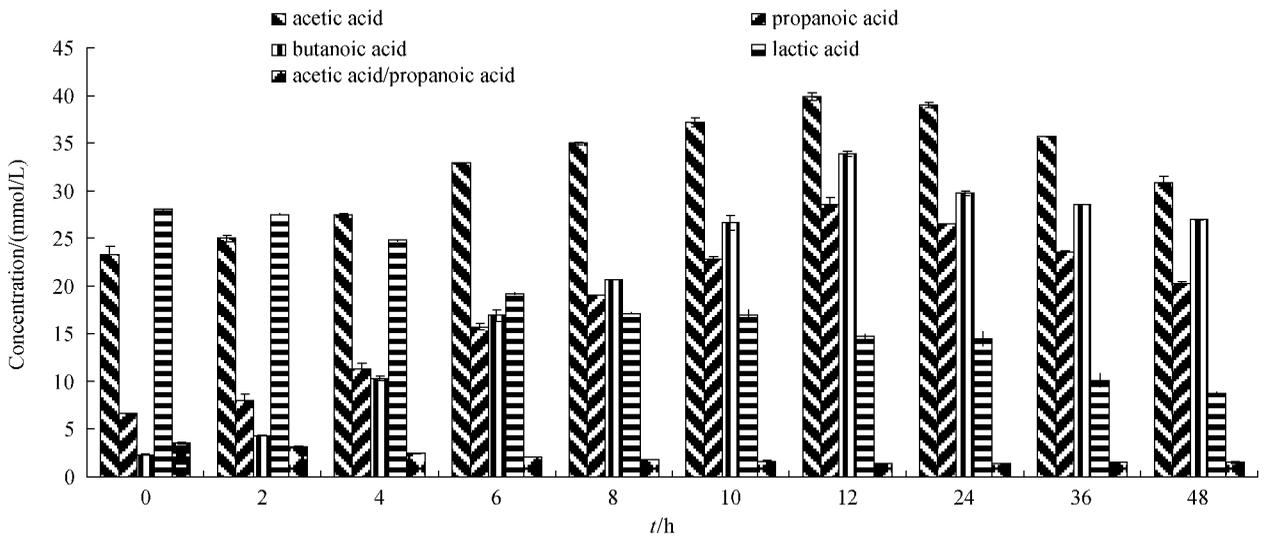


图 2 痤疮丙酸杆菌对培养液 VFAs、乳酸浓度及乙酸/丙酸的影响

Fig.2 Effect of *Propionibacterium acnes* on VFAs, lactic acid and the ratio of C₂/C₃ in Vitro.

2.7 体内瘤胃液环境参数检测结果

2.7.1 体内瘤胃液 pH 检测结果:取 0、2、4、6、8、10、12、24 h 的瘤胃液测 pH 结果显示(图 3),在 0~12 h 内,对照组和试验组的 pH 总体上呈下降趋势,12 h

后逐渐升高,对照组和试验组的 pH 都在 12 h 处降至最低,分别为 6.16 和 6.02。同一时间点的 pH 试验组低于对照组,并且差异显著。

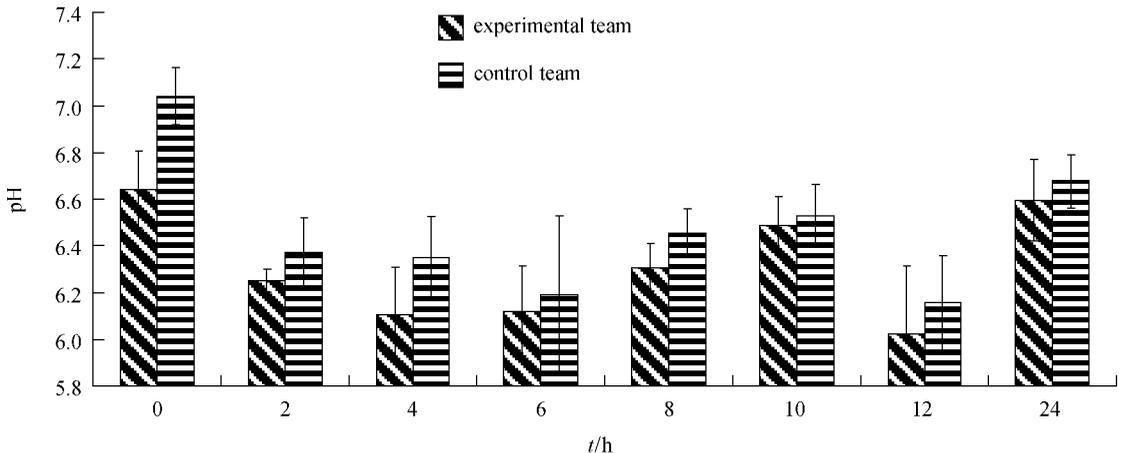


图 3 痤疮丙酸杆菌对瘤胃液 pH 值的影响

Fig.3 Effect of *Propionibacterium acnes* on pH in Rumen Fluid.

2.7.2 瘤胃液中 VFAs 浓度、乳酸浓度及乙酸/丙酸结果:取 0、2、4、6、8、10、12、24 h 的瘤胃液检测 VFAs、乳酸浓度及乙酸/丙酸。结果显示(图 4),由图 4 可知,在 0~24 h 内,对照组和试验组的乙酸、丙酸、丁酸浓度都呈上升趋势,在 12 h 处达到最高点,随后逐渐降低。并且同一时间点的乙酸、丙酸、丁酸浓度,试验组高于对照组,并且差异显著;对照组和试验组的乳酸浓度都呈下降趋势,试验组下降幅度大于对照组,并且差异显著;对照组和实验组的乙酸/丙酸值总体都呈下降趋势,试验组下降幅度大于对照组,并且差异显著。

3 讨论

丙酸对反刍动物的营养具有重要的意义,它是唯一能净生成葡萄糖的挥发性脂肪酸。因此,瘤胃内适宜的丙酸产量对糖代谢极为重要。痤疮丙酸杆菌为革兰氏阳性短棒状杆菌,在严格厌氧的环境中生长最快,CO₂ 可促进其生长,但也有一定程度的耐氧性。此菌可发酵葡萄糖、甘露糖、果糖及半乳糖。其在瘤胃发酵中的重要功能是将乳酸和葡萄糖作为碳源,通过糖酵解 (EMP) 和己糖单磷酸 (HMP) 两种途径生成丙酸,其中 EMP 是己糖分解的主要途径。

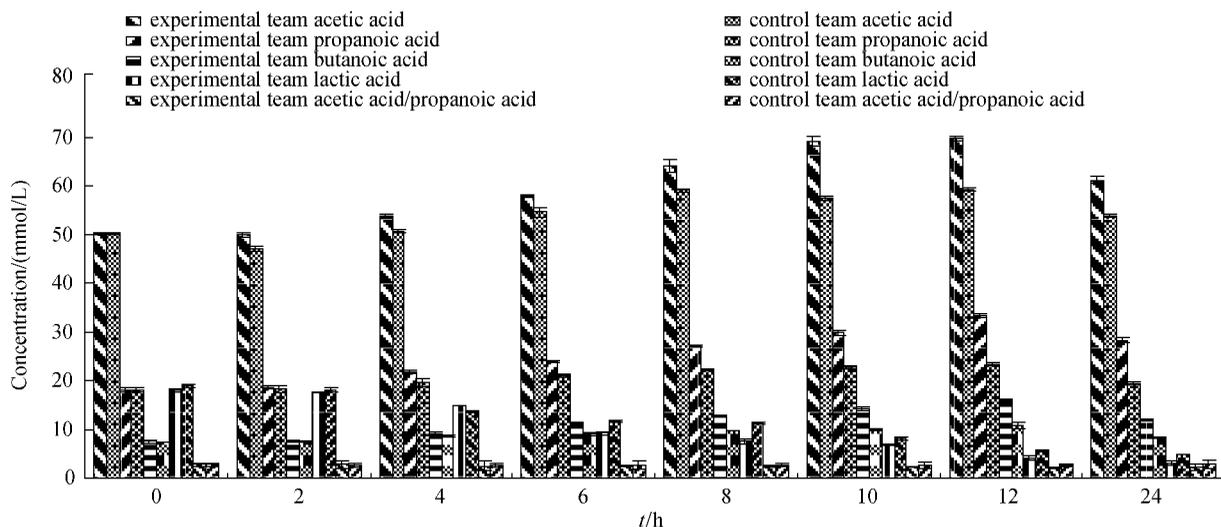


图4 痤疮丙酸杆菌对瘤胃液 VFAs、乳酸浓度及乙酸/丙酸的影响

Fig. 4 Effect of *Propionibacterium acnes* on VFAs, lactic acid and the ratio of C₂/C₃ in rumen fluid.

乳糖或其它糖类分解产生两个丙酮酸,一个氧化成乙酸和 CO₂,另一个通过转羧基酶循环还原为丙酸,其中转羧基酶参与的反应需要生物素作为辅助因子,因为它不需要 ATP 和二价金属离子而区别于其它生物素酶。草酰乙酸通过苹果酸和延胡索酸还原为琥珀酸,同时需要两个 NADH + H⁺。琥珀酸形成后,辅酶转移酶将辅酶从丙酰辅酶转移到琥珀酸生成丙酸和琥珀酰辅酶。最后,甲基丙二酰辅酶羧基转到丙酮酸生成草酰乙酸,完成这个循环途径。本研究采用 SLB 培养基通过厌氧培养技术成功的分离出一株细菌,通过对分离菌株的形态学、生化特性、16S rRNA 基因序列测序结果的分析,确定该分离菌株为痤疮丙酸杆菌,并对该菌进行了瘤胃液的体外发酵试验和体内发酵试验,试验结果表明,痤疮丙酸杆菌能降低瘤胃内乳酸的浓度,同时提高瘤胃内乙酸、丙酸、丁酸的浓度,C₂/C₃ 的比例减小,主要以生成丙酸为主。能够增加丙酸在总 VFA 中的比例,增加反刍动物的能量供给,缓解奶牛围产期能量的负平衡。本研究为该菌可以作为调控瘤胃微生物发酵生成丙酸的候选菌种奠定理论基础。

参考文献

[1] Enjalbert F, Nicot MC, Bayourthe C, et al. Ketone bodies in milk and blood of dairy cows: relationship between concentrations and utilization for detection of subclinical ketosis. *Journal of Dairy Science*, 2001, 84(3): 583 - 589.

[2] Hungate RE. *The Rumen and its Microbes*. New York: Academic Press, 1966.

[3] Floover WH, Stokes SR. Balancing carbohydrates and proteins for optimum rumen microbial yield. *Journal of Dairy Science*, 1991, 74(10): 3630 - 3644.

[4] Kung L, Hession AO. Preventing in vitro lactate accumulation in ruminal fermentations by inoculation with *Megasphaera elsdenii*. *Journal of Animal Science*, 1995, 73(1): 250 - 256.

[5] Yousten AA, Delwiche EA. Succinic acid degradation by *Veillonella alcalescens*. *Journal of Bacteriology*, 1964, 87(6): 1527 - 1528.

[6] Veysel A, Richard G. Effects of *Propionibacterium* strain P5 on in-vitro volatile fatty acids production and digestibility of fiber and starch. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 2001, 25: 635 - 642.

[7] Bryant MP. Normal flora-rumen bacteria. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1970, 11(23): 1440 - 1450.

[8] Elsdén, SR. Fermentation of carbohydrates in the rumen of sheep. *Journal of Experimental Biology*, 1945, 22: 51 - 61.

[9] Koniarova I. Biochemical and physiologic properties of strains of *Propionibacterium acnes* isolated from the rumen of calves and lambs. *Veterinarnej Mediciny (Praha)*, 1993, 38(1): 43 - 52.

[10] 常忠义. 谷氨酰胺转氨酶和丙酸杆菌代谢物对酸奶品质影响的研究. 华东师范大学博士后论文. 2004.

[11] 陆承平. 兽医微生物学. 第一版. 北京: 中国农业出版社, 1992.

[12] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(2): 697 - 703.

[13] Frederick M. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖, 王海林, 译. 第一版. 北京: 科学出版社, 1998.

Isolation , identification and rumen fermentation characteristics of *Propionibacterium acnes*

Ling Wu* , Mingjuan Zhao , Cheng Xia , Hongbo Ni , Hongyou Zhang

(College of Animal Science and Technology , Heilongjiang Aug.1st Land Reclamation University , Daqing 163319 , China)

Abstract [Objectives] Characteristic of energy metabolism in ruminant is a negative energy balance in perinatal period. Propionic acid from ruminal microbe fermentation is a vital glyconeogenesis substrate for preventing negative energy balance. We isolated and screened a *Propionibacterium acnes* strain from health cow rumen fluid , and studied its rumen fermentation characteristics. **[Methods]** A *Propionibacterium acnes* strain from rumen fluid of health cow with permanent rumen fistula under sterile condition was isolated by segregation procedure of anaerobic bacterium and Sodium Lactate Broth(SLB) , and identified by extraction of the genome DNA , cloning of the 16S rRNA gene , and sequencing. We studied the effect of the strain on pH , volatile fatty acid and lactic acid in rumen fluid in vitro and in vivo. **[Results]** A bacterium isolated from health cow rumen fluid was identified as *Propionibacterium acnes* by morphology , biochemical characteristics and sequence homology. In vitro , pH in rumen fluid decreased to the lowest after rumen fermentation of the strain for 12 h , then increased gradually. However , concentration of volatile fatty acid , such as acetic acid , propionic acid and butyric acid , increased to the highest after rumen fermentation of the strain for 12 h , then decreased gradually in vitro. The concentration of lactic acid and ratio of acetate to propionate decreased overall in vitro. In vivo , pH in rumen fluid decreased overall , concentration of the volatile fatty acid increased overall. **[Conclusions]** A strain of *Propionibacterium acnes* was isolated successfully from health cow rumen fluid. It is an important basis to develop microecological preparation for preventing cows ' negative energy balance in perinatal period in future.

Keywords : *Propionibacterium acnes* ; isolation and identification ; rumen microorganism Fermentation

(本文责编 :王晋芳)

Supported by the Heilongjiang province science and technology project(GC05B504)

* Corresponding author. Tel : + 86-459-6819666 ; E-mail : wuling8@163.com

Received : 1 July 2008/Revised : 28 October 2008

《微生物学报》对摘要的写作要求

1. 研究报告摘要 :基本要素包括研究目的、方法、结果和结论 ,并要求在文中给出“【目的】、【方法】、【结果】和【结论】”等字样。具体地讲就是研究工作的主要对象和范围 ,采用的手段和方法 ,得出的结果和重要的结论。在结果和讨论中应写明本文的创新之处。
2. 综述摘要 :包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望。
3. 英文摘要的撰写要点 :英文摘要的内容应与中文摘要一致 ,但比中文摘要更详尽。要求在文中给出[Objective] [Methods] [Results] [Conclusion]等 words。英文摘要完成后 ,务必请英文较好、且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。凡不符合要求的 ,即使学术上可以达到刊出的水平 ,本刊也将推迟发表。
 - (1)在英语摘要中 ,不要使用任何汉字字符 ,包括标点、括号、温度、希腊字母等。
 - (2)建议使用第一人称 ,以此可区分研究结果是引用文献的还是作者的。
 - (3)建议用主动语态 ,被动语态表达拖拉模糊尽量不用 ,这样可以免好多长句 ,以求简单清晰。
 - (4)摘要应当使用过去时态 ,语法正确 ,句子通顺。
 - (5)摘要中不用缩写语 ,除非是人人皆知的 ,如 :DNA ,ATP 等。
 - (6)句子的开头处最好不要使用数字。