

# 瘤胃细菌的分离培养研究进展

严慧 胡文悦 宋晓晴 纪守坤 刘萱 黄卓涵 刘月琴 张英杰

(河北农业大学动物科技学院, 保定 071000)

**摘要:** 瘤胃微生物的发酵使反刍动物能够有效利用粗纤维等营养物质, 瘤胃作为自然界的天然饲料发酵罐, 是微生物剂开发的重要来源, 包括纤维素、木聚糖、脂肪、毒素降解菌、非蛋白氮利用菌、甲烷氧化菌等。然而, 瘤胃中大部分的微生物仍不可被培养, 人工培养方法和流程的参差不齐限制了瘤胃菌种资源的开发利用。因此, 本文基于国内外已有的瘤胃细菌分离研究进展, 从分离标准步骤、现有研究现状和改进意见三方面做了综述, 旨在为瘤胃功能细菌的分离提供更为全面的技术参考和现状概述。

**关键词:** 瘤胃细菌; 分离培养; 技术方法

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2020-1314

## Research Advances in Isolation and Cultivation of Rumen Bacteria

YAN Hui HU Wen-yue SONG Xiao-qing JI Shou-kun LIU Xuan HUANG Zhuo-han LIU Yue-qin  
ZHANG Ying-jie

(College of Animal Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000)

**Abstract:** The fermentation of rumen microorganisms enables ruminants to effectively utilize nutrients such as crude fibers. As a natural fermentation tank of feedstuffs, the rumen supplies important resources for the development of microecological agents, including cellulose, xylan, fat and toxin-degrading bacteria, non-protein nitrogen utilization bacteria and methanotrophic bacteria, etc. However, most of the microorganism in the rumen cannot be cultured, and non-standard artificial culture methods and processes further restrict the development and utilization of rumen bacterial resources. Therefore, based on the existing research progress in the isolation of rumen bacteria at home and abroad, this article summarizes the separation standard steps, the current research status and improvement opinions. It aims to provide a more comprehensive technical reference and an overview of the current situation for the separation of rumen functional bacteria.

**Key words:** rumen bacteria; isolation and cultivation; techniques

反刍动物的瘤胃被认为是纤维素物质降解效率最高的天然场所之一, 瘤胃微生物资源的开发已受到国内外研究者半个多世纪的关注<sup>[1]</sup>。随着二代高通量测序技术的应用, 越来越多未培养微生物被揭开面纱, 瘤胃微生物群落型态与动物的健康<sup>[2]</sup>和生产性能<sup>[3]</sup>息息相关。随着微生物组学的发展, 越来越多的“不可培养微生物”被揭开面纱, 但“不可培养”也成为其应用的阻碍。因此, 对提高饲料消化效率、降低腹泻、降解毒素等菌种资源的开发利用,

再度成为近些年的研究热点。自瘤胃厌氧培养技术发展以来, 国内外用于瘤胃细菌培养的方法多种多样, 因此, 本文将针对国内外自瘤胃菌群厌氧培养技术发展以来的相关报道, 围绕瘤胃细菌的分离培养步骤及特定功能菌的分离培养方法做一综述。

### 1 瘤胃细菌分离的基本流程

#### 1.1 瘤胃液采集

动物屠宰后, 将瘤胃剖开采集瘤胃液; 对于安

收稿日期: 2020-10-25

基金项目: 河北省教育厅青年基金项目(QN2019134), 河北省省属高等学校基本科研项目(KY202016), 国家重点研发计划项目(2018YFD0502100), 河北农业大学引进人才专项(YJ201846)

作者简介: 严慧, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 瘤胃菌种分离和微生态制剂开发; E-mail: yanhuihui@126.com

通讯作者: 张英杰, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 羊的营养和饲料调控; E-mail: zhangyingjie66@126.com

装有瘤胃瘘管的动物，可从瘘管口处采集瘤胃内容物<sup>[4]</sup>。另外，瘤胃液也可以采用从口腔<sup>[5]</sup>插入瘤胃管的方式采集，采样管的插入深度影响所采集瘤胃液的微生物发酵能力，对于奶牛来说，插入 200 cm 能够采集到瘤胃中央的样品，最具代表性，pH、VFA、氨态氮、离子浓度与通过瘤胃瘘管采集的样品无显著差异，180 cm 插入深度采集的样品 VFA、钙、磷、钾浓度显著偏低<sup>[6]</sup>。成年牛羊分别有不同尺寸的不锈钢瘤胃管，犊牛可使用成年羊的不锈钢瘤胃管，另外也可使用不同尺寸的硬质 PVC 管（Polyvinylchlorid，主要成分为聚氯乙烯）采集瘤胃液<sup>[7]</sup>，PVC 管法同样适用于新生羔羊。操作时，应注意避免插入气管中。

### 1.2 瘤胃液运输

为保持瘤胃液的厌氧环境，采集后通常立即注入提前充满 CO<sub>2</sub> 的密封灭菌容器中<sup>[8-9]</sup>。为保持与瘤胃内部相似的条件，部分研究者采用 37-39℃ 恒温运输<sup>[10-12]</sup>，有研究者为保持菌株的活力，采用 4℃<sup>[13]</sup>或冰浴<sup>[14]</sup>低温运输。有研究者添加保护剂（甘油：厌氧稀释液 = 7 : 3）于瘤胃液中<sup>[15]</sup>，可在运输途中维持厌氧环境。

### 1.3 瘤胃液匀浆（可选）

为使得饲料表面附着的微生物脱离，可在过滤前采用匀浆 10 s 的处理<sup>[16]</sup>，饲料颗粒附着菌的脱离有助于研究者分离到更丰富的微生物菌群。

### 1.4 瘤胃液过滤

运回实验室后，立即过滤饲料残渣，可采用 2 层<sup>[17]</sup>、4 层<sup>[18-20]</sup>、6 层无菌纱布<sup>[21]</sup>，4 层纱布的处理方法最为常见。需要注意的是，为分离严格厌氧的微生物，应迅速往滤液中通入 CO<sub>2</sub> 直至饱和<sup>[18]</sup>，所得滤液用于微生物分离培养。

### 1.5 瘤胃液离心（可选）

为去除饲料残渣和纤毛虫，可将瘤胃液 500-600 r/min 低速离心 10 min<sup>[22-25]</sup>。但是，由于饲料颗粒表面附着的细菌占比较高，瘤胃液不过滤和离心处理，可以分离出更为丰富的细菌群落<sup>[24]</sup>。

### 1.6 瘤胃液保存

若运回实验室后不能立即进行分离，可将瘤胃液添加保护剂后冻存在 -20℃<sup>[9]</sup>，后续再进行菌株

分离。

### 1.7 菌株富集

为增加目标菌群的丰度，部分研究者在稀释涂布之前先进行菌群的富集培养<sup>[26]</sup>，即增菌培养。由于不同微生物对营养物质的需求有偏好性，使用特定底物对某类微生物进行前期富集，或者添加某种抑制其他细菌生长的物质，可以大幅提高目标微生物比例，降低其它微生物类群比例。例如，为分离纤维素酶分解菌，首先进行纤维素降解菌的富集，不同研究者使用的富集培养基各异，有以葡萄糖<sup>[7]</sup>、纤维二糖<sup>[27]</sup>、羧甲基纤维素钠<sup>[16]</sup>、滤纸<sup>[28]</sup>、微晶纤维素<sup>[19]</sup>作为主要碳源进行菌群富集<sup>[29]</sup>的研究，可富集一次，也可进行二次富集。另外，可通过添加醋酸钠抑制其他菌的生长而对乳酸菌无害<sup>[30]</sup>，从而实现乳酸菌的富集。总之，经过富集培养，可以大幅提升目标菌株的相对比例，提高分离效率。

### 1.8 稀释涂布

富集之后通过稀释涂布分离菌株，一般选用 10<sup>-4</sup>-10<sup>-6</sup> 稀释梯度进行涂布<sup>[31]</sup>。也可不经过富集步骤，直接使用无菌生理盐水对滤液进行稀释后涂布<sup>[32-33]</sup>。另外，涂布之前也可向瘤胃液中加入无菌生理盐水和无菌玻璃珠，打散样品后再进行稀释涂布<sup>[34]</sup>，起到与第 3 步 10 s 匀浆类似的洗脱部分饲料附着微生物的效果。

### 1.9 菌株初筛

经过富集培养后，使用选择性底物<sup>[7, 27]</sup>制备的选择培养基进行分离初筛，培养温度常选用 37℃<sup>[18, 35]</sup>、38℃<sup>[11]</sup>、39℃<sup>[17]</sup>或 40℃<sup>[36]</sup>，接近瘤胃的真实温度。

### 1.10 菌株纯化

在生长出菌落后，挑出单菌落，使用初筛培养基进行划线纯化，反复进行几次，直至获得纯培养。

### 1.11 菌株复筛

获得菌株纯培养后，可使用发酵培养基对功能菌株进行复筛，例如通过 DNS 比色法测定纤维素酶活<sup>[29]</sup>进一步筛选纤维素高效降解菌株。另外，在瘤胃液梯度稀释后，也可选择营养丰富的非选择性培养基进行无差别分离，“地毯式”分离出能够培养出的所有菌株，保存后再进行特定功能菌株的筛选

鉴定。

### 1.12 菌株保藏

目标菌株经过纯化和筛选之后,需要保藏菌种,一方面是保藏菌种资源,另一方面保藏原种防止其在不断传代过程中发生退化。菌种长期保藏的方法有 $-80^{\circ}\text{C}$ 保藏和冷冻真空保藏, $-80^{\circ}\text{C}$ 保藏需要添加保护剂,包括甘油、吐温-80、DMSO等,刘玉承<sup>[27]</sup>研究发现甘油的保藏效果最好,其中以10%的甘油保存效果最佳,也有使用15%<sup>[37]</sup>、20%<sup>[38]</sup>或40%<sup>[39]</sup>浓度的甘油进行菌株保藏。不同菌种对超低温冷冻保藏保护剂的偏好不同,保藏效果不仅与保护剂种类及浓度有关,也与菌种类别有关<sup>[40]</sup>,笔者建议参考最相近菌种的保藏方法。除了冷冻低温保存,也可采用真空保存,将菌种加入牛奶等保护剂,经过冷冻真空干燥制成菌粉,保存在真空安培管中,放置在 $4^{\circ}\text{C}$ 下长期保存<sup>[41-42]</sup>,相对超低温保存来说更便于携带和邮寄。另外,菌种的短期保藏可选用试管斜面,菌体长成后,将斜面菌种置于 $4^{\circ}\text{C}$ 保存,方便菌种的随时取用、活化和实验,此方法可保存1-3个月,时间过久易发生菌种退化或死亡,需要进行定期活化<sup>[39]</sup>。

## 2 特定功能细菌的分离筛选方法

有目的地分离目标菌株可用于特定功能工业菌株的高效筛选,选择性培养基分离法是目前分离瘤胃细菌的常用方法。

### 2.1 培养基的基本成分组成

培养基的配方多种多样,同一种培养基也可进行组分改良<sup>[43]</sup>,但是总体来说,瘤胃细菌分离培养基成分可以总结为几大要素:缓冲液系统、碳源、氮源、无机盐和矿物质、厌氧指示剂、固化剂。其中无机盐和矿物质可以使用不同的无机化合物配比,也可以在无机化合物配比的基础上,添加一定含量的无菌瘤胃液,增加微生物原生环境中的微量元素和生长因子。使用不同培养基分离出的细菌种类见表1。碳源和氮源的改变可以制备功能不同的选择性培养基,例如,不添加氮源的培养基可用来分离固氮细菌<sup>[44]</sup>:纤维素作为唯一碳源可用来分离纤维素降解菌<sup>[19]</sup>;淀粉作为唯一碳源,用来分离淀粉降解菌<sup>[72-73]</sup>;尿素作为唯一氮源,用来分离尿素分解

菌<sup>[59]</sup>。虽然如此,使用选择培养基分离出的细菌不一定都属于目标菌株,Hobson等<sup>[74]</sup>发现甘油唯一碳源培养基分离出的细菌有些并不能利用甘油,仅仅能够利用酵母膏和瘤胃液生长,因此,分离出的菌株均需进一步复筛,验证其生长性能和功能。

### 2.2 纤维素降解菌的分离

纤维素降解菌培养基的底物主要分为不可溶性和可溶性纤维素。羧甲基纤维素钠(CMC)被广泛用作分离纤维素降解菌的碳源<sup>[33, 45, 75]</sup>,其溶于水,能够均匀分布在培养基中,还可以配合刚果红染色,根据透明圈的直径大小初步筛选纤维素降解菌<sup>[19]</sup>。另外,纤维二糖作为纤维素的基本结构单元,可被 $\beta$ -葡萄糖苷酶水解为2分子D-(+)-葡萄糖,溶于水,也常被用于纤维素降解菌富集、分离、纯化培养基的制备以及作为检测 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性的底物。此外,也可使用不可溶纤维素制备分离培养基,Hungate采取酸处理加球磨震荡的方法处理滤纸和脱脂棉<sup>[76]</sup>,使其均匀分布在培养基中。稻秸<sup>[18]</sup>、玉米秸秆<sup>[18]</sup>、木屑<sup>[18]</sup>、微晶纤维素<sup>[13, 77-78]</sup>等经处理后也都可被用作纤维素降解菌培养基的底物,Jung等<sup>[79]</sup>发现使用滤纸作为底物,相比较处理过的牧草来说,能够分离到更多的纤维素降解菌,可能由于滤纸中的纤维素相对牧草更容易被降解。但是,自然界中的纤维素往往伴随有半纤维素和木质素等同时存在,使用CMC等作为底物筛选出的菌有些并不能降解自然界中真正的不可溶纤维素,不可溶纤维素筛选出的菌往往具有更健全的降解自然界纤维素的能力<sup>[80]</sup>,仅仅使用单一纤维素进行纤维素降解菌的分离具有一定局限性。

### 2.3 木聚糖降解菌的分离

Butterworth等<sup>[81]</sup>使用小麦戊聚糖为碳源从瘤胃中分离到一株木聚糖降解菌,属于丁酸弧菌属(*Butyrivibrio*)。Sewell等<sup>[56]</sup>以燕麦木聚糖为唯一碳源从厌氧发酵罐中分离到6株木聚糖降解菌,属于溶纤维丁酸弧菌(*Butyrivibrio fibrisolvens*)。张贝贝<sup>[57]</sup>使用以木聚糖为唯一碳源的初筛固体培养基从奶牛瘤胃中分离到4株木聚糖降解菌,其中酶活最高的一株属于类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)。Nyonyo等<sup>[82]</sup>以CMC为碳源,共分离到129株



表 1 培养基类型及分离细菌

| 培养基类型                   | 分离菌株                                                                                                                                                                                                         | 参考文献                           |
|-------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| Types of culture medium | Isolated strains                                                                                                                                                                                             | References                     |
| CMC-Na 分离培养基            | 芽孢杆菌属、蜡样芽孢杆菌、木聚糖降解球形芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、短杆菌、假单胞菌属、铜绿假单胞菌、香茅醇假单胞菌、寡养单胞菌属、纤维单胞菌属、肠杆菌属、棒状杆菌属、微杆菌属、苍白杆菌属、大肠杆菌、鞘氨醇杆菌属、肠球菌属、粪肠球菌、副球菌属、黄色瘤胃球菌、白色瘤胃球菌、链球菌、菠萝泛菌、肺炎克雷伯菌、产酸克雷伯氏菌、溶纤维丁酸弧菌、拜氏梭菌、丁酸梭菌 | [ 7-8, 25, 29, 44, 45, 46-55 ] |
| 木聚糖唯一碳源培养基              | 溶纤维丁酸弧菌、类芽孢杆菌属                                                                                                                                                                                               | [ 56-57 ]                      |
| 酪蛋白主要氮源培养基              | 嗜淀粉拟杆菌、丁酸弧菌属、新月形单胞菌属、毛螺旋菌属、未知种                                                                                                                                                                               | [ 58 ]                         |
| 双缩脲、尿素唯一氮源培养基           | 葡萄球菌属、干酪乳杆菌、产气克雷伯氏菌、粪链球菌                                                                                                                                                                                     | [ 59-60 ]                      |
| 无氮培养基                   | 克雷伯氏菌属、弗兰克氏菌属、芽孢杆菌属                                                                                                                                                                                          | [ 44 ]                         |
| LSB 培养基                 | 痤疮丙酸杆菌、蜡样芽孢杆菌、草乳杆菌、弯曲乳杆菌、吉氏库特菌、粪肠球菌、解淀粉芽孢杆菌、牛链球菌、志贺氏菌、氧化木糖无色杆菌、夏威夷肠球菌、产粘棒状杆菌                                                                                                                                 | [ 24, 61 ]                     |
| CDC 厌氧血琼脂               | 反刍月形单胞菌、粪肠球菌                                                                                                                                                                                                 | [ 62-63 ]                      |
| MRS 培养基                 | 巴黎链球菌、肠膜明串珠菌、戊糖片球菌、弯曲乳杆菌、耐久肠球菌、海氏肠球菌、鸢鸡肠球菌、尿肠球菌、粪肠球菌                                                                                                                                                         | [ 64-65 ]                      |
| SL 培养基                  | 干酪乳杆菌，黏膜乳杆菌                                                                                                                                                                                                  | [ 66 ]                         |
| 厌氧杆菌培养基                 | 产琥珀酸放线杆菌                                                                                                                                                                                                     | [ 67-68 ]                      |
| 牛肉膏蛋白胨溴甲酚绿培养基           | 放线杆菌属、肠膜明串珠菌                                                                                                                                                                                                 | [ 69-70 ]                      |
| 单宁浓度耐受培养基               | 产碱普罗维登斯菌、克斯特菌、普罗威登斯菌和铜绿假单胞菌                                                                                                                                                                                  | [ 71 ]                         |

菌，其中 105 株菌具有木聚糖酶活性。Palakawong 等<sup>[26]</sup>使用直链淀粉作为唯一碳源，分别从牛和羊瘤胃中鉴定到两个新种：产琥珀酸放线杆菌未定种（*Actinomyces succiniciruminis* sp. nov.）和甘油放线菌未定种（*Actinomyces glycerinitorans* sp. nov.），均具有木聚糖降解活性。Simunek 等<sup>[83]</sup>使用 CMC 为碳源的培养基从赤鹿瘤胃中分离到一株严格厌氧的木聚糖降解菌，同时具有纤维素降解活性。能够降解纤维素的菌株大部分也能够分泌木聚糖酶，以丁酸弧菌属（*Butyrivibrio*）和类芽孢杆菌属（*Paenibacillus*）的菌株为代表。

2.4 乳酸菌的分离

乳酸菌常被用作益生菌的开发来源，具有重要的经济价值。MRS 是分离乳酸菌的常用培养基，制备 MRS 固体培养基时添加 CaCO<sub>3</sub>，可通过溶钙圈的形成初步筛选乳酸菌<sup>[64]</sup>。Ghali 等<sup>[84]</sup>使用 MRS 培养基从骆驼和鹿的瘤胃液中分离到 8 株牛链球菌（*Streptococcus bovis*），牛链球菌被认为是产生乳酸的关键菌株之一。徐凤等<sup>[65]</sup>使用 MRS 培养基从山羊

胃肠道中分离到 5 个属 9 个种的乳酸菌类群。王德光<sup>[64]</sup>从山羊瘤胃液、皱胃液等 18 种不同来源中共分离到 75 株乳酸菌，分属于 11 个种。分离乳酸菌也可使用 SL 培养基，杨龙龙<sup>[30]</sup>使用 SL 固体培养基分离、MRS 培养基纯化共获得 60 株乳酸菌：包括嗜酸乳杆菌、发酵乳杆菌和乳明串珠菌。Jensen 等<sup>[85]</sup>使用 SL、Brihhs 和强化脱脂牛奶 3 种培养基从瘤胃中共分离到 168 株乳酸菌：包括嗜酸乳杆菌（*Lactobacillus acidophilus*）、短乳杆菌（*L. brevis*）、布氏乳杆菌（*L. buchneri*）、干酪乳杆菌（*L. casei*）、发酵乳杆菌（*L. fermenti*）、植物乳杆菌（*L. plantarum*）。

2.5 蛋白质降解菌的分离

蛋白降解菌通常以蛋白质作为主要氮源进行菌株分离。Mcsweeney 等<sup>[86]</sup>使用 BHI（脑心浸液琼脂培养基）配合单宁分离菌株，使用 RHS 培养基配合 HCL 冲洗，筛选出数株蛋白降解菌，其中一株蛋白降解效率最高的菌株属于肉毒梭状芽孢杆菌（*Clostridium botulinum*）。Blackburn 等<sup>[58]</sup>以酪蛋白为主要氮源并添加多种碳源从羊瘤胃中分离蛋白降

解菌,包括嗜淀粉拟杆菌(*Bacteroides amylophilus*)、丁酸弧菌属(*Butyrivibrio*)、新月形单胞菌属(*Selenomonas*)、毛螺旋菌属(*Lachnospira*)和一些未知种,蛋白降解的功能不局限于某一类菌,瘤胃中很多菌都能够不同程度的降解蛋白。卢玉飞<sup>[15]</sup>以酪蛋白为主要氮源的培养基对蛋白降解菌进行富集,通过组学技术探究了奶牛瘤胃蛋白降解菌的主要细菌群落结构。

## 2.6 非蛋白氮降解菌的分离

非蛋白氮几乎不能被猪、禽等非反刍动物利用,但能够被反刍动物很好的利用,瘤胃微生物能够将非蛋白氮降解为氨,再利用氨合成真蛋白,是降低反刍动物饲料成本的重要途径之一。Bellingham等<sup>[60]</sup>使用双缩脲作为非蛋白氮来源,从瘤胃中分离到一株能够在瘤胃中降解双缩脲的菌株。John等<sup>[87]</sup>从饲喂了尿素的奶牛瘤胃中分离到一株尿素降解菌,属于反刍月形单胞菌(*Selenomonas ruminantium*)。Cook<sup>[59]</sup>以尿素作为培养基氮源,从绵羊瘤胃中分离尿素降解菌,但分离的1200株细菌中只有6株具有尿素降解活性,包括葡萄球菌属(*Staphylococcus*),干酪乳杆菌(*L. casei*)和产气克雷伯氏菌(*Kleisiella aerogenes*),其它菌株属于依靠培养基中其它成分生长的菌株;另外,通过富集培养,还分离到一株尿素降解活性最高且在瘤胃中丰度较高的粪链球菌(*Streptococcus faecium*)。非蛋白氮降解菌的分离筛选和应用有助于提高反刍动物对非蛋白的利用效率,降低饲料成本。

## 2.7 甲烷氧化菌的分离

甲烷氧化菌能够利用甲烷,降低甲烷排放,通常使用甲醇或甲烷作为唯一碳源进行分离。刘欢<sup>[88]</sup>使用以甲醇为唯一碳源的NMS液体培养基进行甲烷氧化菌的富集,若富集成功培养液呈现粉色,再使用NMS固体平板配合甲烷通入进行分离,纯化后得到一株甲基杆菌属(*Methylobacterium*)的甲烷氧化菌。高效率的甲烷氧化菌的生产应用有助于降低反刍动物甲烷排放,减少温室气体排放量,保护环境。

## 2.8 毒害物质降解菌的分离

有些粗饲料本身含有活性毒性成分,如氟乙酸钠、单宁、棉酚等,饲料由于储存不当也容易发生

霉变,产生霉菌毒素,对动物机体健康及生产性能造成影响。Intanoo等<sup>[10]</sup>从牛瘤胃中分离得到降解黄曲霉毒素B1的菌株,包括3株酵母菌和3株细菌,细菌属于屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)、荧光棒杆菌(*Corynebacterium phoceense*)和瘤胃棒杆菌(*C. vitaeruminis*)。另外,分离培养基中添加200 ng/mL的毒素,发酵后使用ELISA方法可检测剩余毒素含量,毒素降解菌的开发利用可用于降低饲料中的毒素污染。Zhang等<sup>[17]</sup>使用棉酚唯一碳源培养基从牛瘤胃液中分离到一株降解棉酚的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),对棉籽粕的发酵具有应用潜力。李兴芳等<sup>[71]</sup>从山羊瘤胃中分离单宁降解菌,首先使用牛肉膏蛋白胨培养基过夜富集,再使用不同浓度单宁的固体平板进行分离纯化,使用没食子酸丙酯作为底物测定单宁酶的活力,复筛得到4株降解单宁的菌株,分别属于产碱普罗威登斯菌(*Providencia alcalifaciens*)、克氏菌属(*Kerstesia*)、普罗威登菌属(*Providencia* sp.)和绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)。Sharma等<sup>[89]</sup>使用单宁培养基从山羊瘤胃中分离到3株单宁降解菌,属于变栖克雷伯氏菌(*Klebsiella variicola*)(2株)和肺炎克雷伯菌(*K. pneumoniae*),且能降解9-羰基-10,11-去氢泽兰酮,一种植物毒素。氟乙酸钠是植物中的一种活性毒性成分,Camboim等<sup>[90]</sup>和Pimentel等<sup>[36]</sup>分别使用添加有氟乙酸钠的培养基,从瘤胃中各分离到2株降解氟乙酸钠的菌株,分别属于*Pigmentiphaga kullae*、*Ancylobacter dichloromethanicus*和粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、芽孢杆菌属未知种(*Bacillus* sp.)。

## 2.9 产脂肪酶菌株的分离

Hobson等<sup>[74]</sup>使用亚麻籽油作为培养基碳源,添加绵羊腮腺唾液作为亚麻籽油的乳化剂,使得脂肪在培养基中均匀分布。Faruque等<sup>[91]</sup>使用三丁酸甘油酯和三油酸甘油酯作为培养基中的能量来源,从牛瘤胃中分离到3株脂肪酶降解菌。Henderson<sup>[92]</sup>以三月桂酸甘油酯作为碳源,进行脂肪降解菌的分离,具有脂肪酶活性的细菌会在培养基上形成明显的透明圈。韩生义等<sup>[93]</sup>以橄榄油为唯一碳源,以中性红为指示剂,从牦牛瘤胃中筛选到6株产脂肪酶高活力的菌株,包括液化沙雷氏菌和真菌。Priji

等<sup>[94]</sup>使用花生油作为能源物质,使用超声法使得花生油在培养基中形成悬浊液,分离到一株脂肪酶产生菌,且后续验证该菌株还能够产生鼠李糖酯类生物表面活性剂<sup>[95]</sup>,有较高的生产应用潜力。

### 2.10 产琥珀酸及蛋氨酸菌株的分离

产琥珀酸和产蛋氨酸的菌株,可用于琥珀酸或蛋氨酸的生产发酵。李兴江等<sup>[69]</sup>使用添加地克球利的琥珀酸钠富集培养基进行富集培养,结合溴甲酚绿中性平板分离获得300株产酸菌,再通过薄层色谱法点样筛选到31株产琥珀酸能力的菌株,能力最强的菌株来自于肠膜明串珠菌。陈晓晖<sup>[70]</sup>使用以葡萄糖和玉米浆为主要碳源的富集培养基进行菌群富集,在富集培养基中添加莫能菌素和富马酸钠,以促进琥珀酸产生菌的生长,减少复筛压力,后使用添加了溴甲酚绿的牛肉膏蛋白胨培养基进行菌株分离,产酸菌的菌落周围可变为黄色,结合薄层色谱最终从牛瘤胃中筛选获得28株产琥珀酸菌。另外,王铁良等<sup>[96]</sup>使用营养琼脂培养基分离到18株菌,通过后续的发酵实验测定蛋氨酸产量,复筛到3株能够产蛋氨酸的菌株,产量最高者属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)。

### 3 已分离到的瘤胃菌株现状

从瘤胃中鉴定出的菌株数量众多,包括许多新种,从瘤胃中鉴定出的新种有产琥珀酸放线杆菌(*Actinomyces succiniciruminis* sp. nov.)<sup>[26]</sup>、甘油放线菌(*Actinomyces glycerinitolerans* sp. nov.)<sup>[26]</sup>、反刍小单胞菌(*Micromonospora ruminantium* sp. nov.)<sup>[97]</sup>、反刍库特氏菌(*Kurthia ruminicola* sp. nov.)<sup>[32]</sup>、反刍白杆菌(*Leucobacter ruminantium* sp. nov.)<sup>[98]</sup>、六角巨球菌(*Megasphaera hexanoica* sp. nov.)<sup>[99]</sup>、*Oscillibacter ruminantium* sp. nov.<sup>[35]</sup>。近些年,高通量和菌株分离均表明,瘤胃中仍存在众多未定种等待被分离、鉴定和功能挖掘。瘤胃作为纤维素发酵的重要场所,纤维素降解菌的分离是重中之重,也是目前瘤胃细菌分离工作的研究重心。目前已从瘤胃中分离到多种纤维素降解菌,包括反刍小单胞菌(*Micromonospora ruminantium* sp. nov.)<sup>[97]</sup>、大肠杆菌(*Escherichia coli*)<sup>[19]</sup>、溶纤维拟杆菌(*Cillobacterium cellulosolvens*)<sup>[100]</sup>、溶

纤维丁酸弧菌(*Butyrivibrio fibrisolvens*)<sup>[101]</sup>、白色瘤胃球菌(*Ruminococcus albus*)<sup>[101-102]</sup>、黄色瘤胃球菌(*R. flavefaciens*)<sup>[11, 101-102]</sup>、产琥珀酸丝状杆菌(*Fibrobacter succinogenes*)<sup>[76]</sup>、地衣芽胞杆菌(*Bacillus licheniformis*)<sup>[75]</sup>、肠杆菌属(*Enterobacter*)<sup>[45]</sup>、志贺氏菌属(*Shigella*)<sup>[103]</sup>等。目前认为瘤胃中最重要的3种纤维素降解菌是产琥珀酸丝状杆菌(*Fibrobacter succinogenes*)、白色瘤胃球菌(*Ruminococcus albus*)和黄色瘤胃球菌(*Ruminococcus flavefaciens*)<sup>[82]</sup>。总体来说,从瘤胃中分离出的纤维素降解好氧菌主要属于放线菌门(*Actinobacteria*),厌氧菌主要属于厚壁菌门(*Firmicutes*)<sup>[104]</sup>,具有纤维素降解能力的菌株分布广泛,但是纤维素降解能力极强的菌株筛选工作仍需要不断探索。

### 4 目前分离方法的改进与建议

瘤胃的自然环境中具有特定的营养、温度、湿度、气体条件,在实验室人工模拟的条件下,很难完全重现瘤胃内的微生态环境。因此,配制的人工培养基可能适合其中某几类菌的生长,却由于营养或气体条件等的限制,导致大量的瘤胃微生物仍然无法被培养出来,或者培养出来后极易死亡。因此,目前用于瘤胃细菌分离的培养方法仍有可改进的进步空间。

#### 4.1 严格厌氧环境的控制

大部分的瘤胃细菌包括肠道细菌都属于严格厌氧菌,严格厌氧的操作环境是保障能够分离到瘤胃关键菌株的重要条件之一。由于严格厌氧环境的控制较难,严格厌氧菌即使分离出来,在保藏和传代的过程中由于条件控制不当也极易死亡。传统的Hungate滚管法具有较好的控制严格厌氧的效果,但是挑取单菌落的纯化过程仍然不易操作<sup>[27]</sup>,限制了此方法的应用。近些年厌氧工作站的发展同时兼顾到了厌氧条件的控制和纯化过程的便捷,目前也有更多的实验室有条件通过厌氧工作站开展培养工作,为瘤胃中大量严格厌氧菌种资源的获取创造了技术条件。

#### 4.2 营养组分的限制

培养基的组分不能完全模拟瘤胃自然发酵状态



下的营养成分状态,也是限制瘤胃菌种资源开发的重要因素之一。更接近瘤胃液营养条件的培养基配比往往能够分离出多样性更丰富的菌群,但由于大多数培养基成分需具有可溶性或均一性的限制,很多饲料并不能被直接制备成培养基,因此,无菌瘤胃液的添加至关重要<sup>[74]</sup>。无菌瘤胃液可以在实验室条件为菌株生长提供必要的微量元素和生长因子,研究发现培养基中添加无菌瘤胃液能够显著加快菌株生长速度,同时也能够支持更多样的菌株生长<sup>[18, 105]</sup>。瘤胃液可以从屠宰场大量获得,经过离心灭菌后,冻存备用。除了无菌瘤胃液的添加,另有研究表明培养基中的琼脂可能会对部分微生物的生长产生抑制,使用结兰胶为固化剂的培养基所分离到的菌群相比较琼脂拥有更高的 Chao1 指数,能够支持更多样的菌株生长<sup>[82]</sup>,结兰胶对琼脂的一定程度的替代仍需进一步研究。

#### 4.3 菌株生长速度限制

生长速度快的菌株首先形成菌落,被优先分离出来,而生长慢的菌株被生长速度快的菌株覆盖,生长不起来。Jones 等<sup>[87]</sup>在 37℃ 厌氧条件下培养尿素分解菌大都需要 1-2 周的时间形成菌落, Van<sup>[106]</sup>提出使用选择性培养基需要在 39℃ 培养 4 周,使用非选择性培养基需要培养 1 周。Battumur 等<sup>[107]</sup>从瘤胃中分离菌株需要在 38℃ 培养 2 周。因此,在进行瘤胃菌株分离培养时,适当延长菌株分离的培养时间,可以兼顾到一些生长速度较慢的菌株。

### 5 展望

国内外对于瘤胃菌种资源的开发已开展了半个世纪之久,但已经被开发利用的菌种资源非常有限,瘤胃中仍有广袤的资源等待被挖掘。国际和国内瘤胃菌种资源库的建立和共享,是未来瘤胃菌种资源开发的必然趋势。除了传统培养技术,以原位培养、共培养、高通量微滴培养等为代表的最新技术也逐渐兴起,原位培养通过模拟目标微生物的自然生活环境来培养微生物,解除了人工培养基营养成分的限制,滤膜允许小分子物质通过的同时可阻挡微生物,从而实现在复杂的原生环境下获得纯培养。共培养技术利用辅助微生物提供必要的营养代谢产物,实现“未培养微生物”的培养。高通量微滴培养利

用微滴技术可从一个环境样本中实现 10 000 多个菌株的培养。但最新的培养技术仍在探索和完善中,传统培养方法仍是目前绝大部分实验室使用的主流技术,且不可被替代。本综述针对瘤胃细菌的分离培养流程及功能菌的分离方法进行了总结归纳,分离流程的总结梳理对于瘤胃菌种资源开发利用和资源库的扩建具有重要的应用价值和借鉴意义。

#### 参考文献

- [1] Hungate RE. Studies on cellulose fermentation; III. The culture and isolation for cellulose-decomposing bacteria from the rumen of cattle [J]. *Journal of Bacteriology*, 1947, 53 (5): 631-645.
- [2] Zeineldin M, Barakat R, Elolimy AA, et al. Synergetic action between the rumen microbiota and bovine health [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2018, 124: 106-115.
- [3] Scharen M, Frahm J, Kersten S, et al. Interrelations between the rumen microbiota and production, behavioral, rumen-fermentation, metabolic, and immunological attributes of dairy cows [J]. *Journal of Dairy Science*, 2018, 101 (5): 4615-4637.
- [4] DePeters EJ, George LW. Rumen transfaunation [J]. *Immunology Letters*, 2014, 162 (2): 69-76.
- [5] 王继文, 王立志, 闫天海, 等. 山羊瘤胃与粪便微生物多样性 [J]. *动物营养学报*, 2015, 27 (8): 2559-2571.  
Wang JW, Wang LZ, Yan TH, et al. Rumen and fecal microbial diversity of goat [J]. *Journal of Animal Nutrition*, 2015, 27 (8): 2559-2571.
- [6] Shen JS, Chai Z, Song LJ, et al. Insertion depth of oral stomach tubes may affect the fermentation parameters of ruminal fluid collected in dairy cows [J]. *Journal of Dairy Science*, 2012, 95 (10): 5978-5984.
- [7] 李润沄. 牦牛瘤胃产纤维素酶兼性厌氧细菌的筛选、鉴定及发酵研究 [D]. 兰州: 兰州交通大学, 2015.  
Li RX. Screening, identification and fermentation of cellulase-producing facultative anaerobic bacteria in Rumen of yak [D]. Lanzhou: Lanzhou Jiaotong University, 2015.
- [8] 李阳阳. 瘤胃源降解纤维素细菌的分离鉴定及产酶条件优化 [D]. 大连: 大连工业大学, 2017.  
Li YY. Isolation and identification of rumen cellulose-degrading bacteria and optimization of enzyme production conditions [D]. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2017.

- [ 9 ] Kim ET, Min K, Kim CH, et al. The effect of plant extracts on *in-vitro* ruminal fermentation, methanogenesis and methane-related microbes in the rumen [ J ] . Asian-australasian Journal of Animal Sciences, 2013, 26 ( 4 ) : 517-522.
- [ 10 ] Intanoo M, Kongkeitkajorn MB, Pattarajinda V, et al. Isolation and screening of aflatoxin-detoxifying yeast and bacteria from ruminal fluids to reduce aflatoxin B1 contamination in dairy cattle feed [ J ] . Journal of Applied Microbiology, 2018, 125 ( 6 ) : 1603-1613.
- [ 11 ] Boonsaen P, Poonko S, Kanjanapruetipong J, et al. Isolation and partial characterization of *Ruminococcus flavefaciens* from the rumen of swamp buffalo [ J ] . Buffalo Bulletin, 2019, 38 ( 2 ) : 311-325.
- [ 12 ] Joshi A, Lanjekar VB, Dhakephalkar PK, et al. *Liebetanzomyces polymorphus* gen. et sp. nov. , a new anaerobic fungus ( Neocallimastigomycota ) isolated from the rumen of a goat [ J ] . MycoKeys, 2018 ( 40 ) : 89.
- [ 13 ] Abrao FO, Duarte ER, Pessoa MS, et al. Notable fibrolytic enzyme production by *Aspergillus* spp. isolates from the gastrointestinal tract of beef cattle fed in lignified pastures [ J ] . PLoS One, 2017, 12 ( 8 ) : e0183628.
- [ 14 ] Hanafy RA, Elshahed MS, Youssef NH. *Feromyces austinii*, gen. nov. , sp. nov. , an anaerobic gut fungus from rumen and fecal samples of wild Barbary sheep and fallow deer [ J ] . Mycologia, 2018, 110 ( 3 ) : 513-525.
- [ 15 ] 卢玉飞. 瘤胃蛋白质降解相关细菌群落结构的解析[ D ]. 扬州: 扬州大学, 2013.
- Lu YF. Analysis of protein-degrading bacterial community structure in rumen [ D ] . Yangzhou : Yangzhou University, 2013.
- [ 16 ] 李君凤, 原现军, 董志浩, 等. 西藏地区牦牛瘤胃中兼性厌氧纤维素降解菌的分离鉴定 [ J ] . 草业学报, 2017, 26 ( 6 ) : 176-184.
- Li JY, Yuan XJ, Dong ZH. Isolation and identification of facultative anaerobic cellulose-degrading bacteria from rumen of yak in Tibet [ J ] . Acta Prataculturae Sinica, 2017, 26 ( 6 ) : 176-184.
- [ 17 ] Zhang YH, Zhang ZY, Dai L, et al. Isolation and characterization of a novel gossypol-degrading bacteria *Bacillus subtilis* strain RBS [ J ] . Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2018, 31 ( 1 ) : 63.
- [ 18 ] Habu JB, Ndams IS, Wuyep PA, et al. Isolation and biochemical characterization of anaerobic bacteria strains from discarded ruminal contents of Nigerian breed cattle and preliminary evaluation of its suitability for animal feedstuff [ J ] . Biotechnology Journal International, 2017 : 1-13.
- [ 19 ] Pang J, Liu ZY, Hao M, et al. An isolated cellulolytic *Escherichia coli* from bovine rumen produces ethanol and hydrogen from corn straw [ J ] . Biotechnology for Biofuels, 2017, 10 ( 1 ) : 165.
- [ 20 ] Miguel MA, Lee SS, Mamuad LL, et al. Enhancing butyrate production, ruminal fermentation and microbial population through supplementation with *Clostridium saccharobutylicum* [ J ] . Journal of Microbiology Biotechnology, 2019, 29 ( 7 ) : 1083-1095.
- [ 21 ] Yang Y, Zhou MX, Hardwidge PR, et al. Isolation and characterization of N-acyl homoserine lactone-producing bacteria from cattle rumen and swine intestines [ J ] . Frontiers in Cellular Infection Microbiology, 2018, 8 : 155.
- [ 22 ] 胡盼, 夏成, 吴凌, 等. 一株瘤胃厌氧菌 *Actinomyces ruminicola* 的分离鉴定 [ J ] . 中国微生态学杂志, 2009, 21 ( 9 ) : 809-811.
- Hu P, Xia C, Wu L, et al. Isolation and characterization of one strain of rumen anaerobic bacteria *Actinomyces ruminicola* [ J ] . Chinese Journal of Microbiology, 2009, 21 ( 9 ) : 809-811.
- [ 23 ] 武心镇, 高玉霞, 欧海龙, 等. 奶牛瘤胃中反刍兽月形单胞菌的分离鉴定 [ J ] . 动物医学进展, 2008 ( 10 ) : 25-28.
- Wu XZ, Gao YX, Ou HL, et al. Isolation and characterization of *Selenomonas ruminantium* from the rumen of Dairy Cows [ J ] . Progress in Veterinary Medicine, 2008 ( 10 ) : 25-28.
- [ 24 ] 赵明娟. 12 株瘤胃细菌的分离及痤疮丙酸杆菌对瘤胃微生物发酵的影响 [ D ] . 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2008.
- Zhao MJ. Isolation of 12 strains of rumen bacteria and effects of *Propionibacterium acnes* on rumen microbial fermentation [ D ] . Daqing : Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2008.
- [ 25 ] 林聪宏. 贵州黑山羊瘤胃溶纤维丁酸弧菌分离鉴定 [ D ] . 贵阳: 贵州大学, 2016.
- Lin CH. Isolation and identification of rumen *Butyrivibrio fibrisolvens* from Guizhou Black Goat [ D ] . Guiyang : Guizhou University, 2016.
- [ 26 ] Palakawong NAS, Pristas P, Hrehova L, et al. *Actinomyces succinicuriminis* sp. nov. and *Actinomyces glycerinitolerans* sp. nov., two novel organic acid-producing bacteria isolated from rumen [ J ] . Systematic Applied Microbiology, 2016, 39 ( 7 ) :



- 445-452.
- [27] 刘玉承. 32 株瘤胃纤维降解细菌的分离鉴定与保藏研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2007.
- Liu YC. Isolation, identification and preservation of 32 fiber-degrading strains in rumen [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agriculture University, 2007.
- [28] Zhang L, Chung J, Jiang QQ, et al. Characteristics of rumen microorganisms involved in anaerobic degradation of cellulose at various pH values [J]. RSC Advances, 2017, 7 ( 64 ): 40303-40310.
- [29] 韦海婷. 梅花鹿瘤胃纤维素降解菌的分离鉴定及降解特性研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2018.
- Wei HT. Isolation, identification and degradation characteristics of rumen cellulose-degrading bacteria from sika deer [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2018.
- [30] 杨龙龙. 饲用乳酸菌的分离筛选及其活菌制剂在围产期奶牛和新生犊牛保健中的初步应用 [D]. 石河子: 石河子大学, 2014.
- Yang LL. Isolation and screening of feed lactic acid bacteria and preliminary application of live bacterial preparations in perinatal dairy cows and newborn calves [D]. Shihezi: Shihezi University, 2014.
- [31] Latham EA, Pinchak WE, Trachsel J, et al. Isolation, characterization and strain selection of a *Paenibacillus* species for use as a probiotic to aid in ruminal methane mitigation, nitrate/nitrite detoxification and food safety [J]. Bioresource Technology, 2018, 263: 358-364.
- [32] Kim MK, Kim ET, Kim SB, et al. *Kurthia ruminicola* sp. nov., isolated from the rumen contents of a Holstein cow [J]. Journal of Microbiology, 2018, 56 ( 1 ): 36-41.
- [33] Rawway M, Ali SG, Badawy AS. Isolation and identification of cellulose degrading bacteria from different sources at Assiut Governorate ( Upper Egypt ) [J]. Journal of Ecology of Health & Environment, 2018, 6: 15.
- [34] 苏少锋, 呼和, 王超, 等. 瘤胃枯草芽孢杆菌的分离鉴定及其木聚糖酶基因的克隆和在乳酸球菌中表达的研究 [J]. 畜牧与饲料科学, 2013, 34 ( 9 ): 5-9, 13.
- Su SF, Hu H, Wang C. Isolation and identification of *Bacillus subtilis* and cloning of xylanase gene and its expression in *Lactococcus* [J]. Animal Husbandry and Feed Science, 2013, 34 ( 9 ): 5-9, 13.
- [35] Lee GH, Rhee MS, Chang DH, et al. *Oscillibacter ruminantium* sp. nov., isolated from the rumen of Korean native cattle [J]. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology, 2013, 63 ( 6 ): 1942-1946.
- [36] Pimentel MFA, Paula DAJD, Rietcorrea F, et al. Detection and characterization of bovine rumen microorganisms resistant to sodium fluoroacetate [J]. Acta Scientiae Veterinariae, 2019, 47: 1627.
- [37] Sousa A, Ramiro RS, Barroso-Batista J, et al. Recurrent reverse evolution maintains polymorphism after strong bottlenecks in commensal gut bacteria [J]. Molecular Biology and Evolution, 2017, 34 ( 11 ): 2879-2892.
- [38] Oskoue DD, Bekmen N, Ellidokuz H, et al. Evaluation of different cryoprotective agents in maintenance of viability of *Helicobacter pylori* in stock culture media [J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2010, 41 ( 4 ): 1038-1046.
- [39] 郭玲玲. 微生物菌种保藏方法及关键技术 [J]. 微生物学杂志, 2019, 39 ( 3 ): 105-108.
- Guo LL. Preservation methods and preservation key technology of microbial strain seed [J]. Journal of Microbiology, 2019, 39 ( 3 ): 105-108.
- [40] Rojas-Tapias D, Ortiz-Vera M, Rivera D, et al. Evaluation of three methods for preservation of *Azotobacter chroococcum* and *Azotobacter vinelandii* [J]. Universitas Scientiarum, 2013, 18 ( 2 ): 129-139.
- [41] Morgan CA, Herman N, White PA, et al. Preservation of microorganisms by drying; a review [J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 66 ( 2 ): 183-93.
- [42] Miyamoto-Shinohara Y, Imaizumi T, Sukenobe J, et al. Survival rate of microbes after freeze-drying and long-term storage [J]. Cryobiology, 2000, 41 ( 3 ): 251-255.
- [43] Caldwell DR, Bryant MP. Medium without rumen fluid for nonselective enumeration and isolation of rumen bacteria [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1966, 14 ( 5 ): 794-801.
- [44] 李昊. 固氮菌和纤维素分解菌的分离及混合添加对瘤胃发酵的影响 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2013.
- Li H. Isolation of nitrogen-fixing bacteria and cellulolytic bacteria and the effect of its mixed addition on rumen fermentation [D].

- Harbin : Northeast Agriculture Univesity, 2013.
- [45] Sari WN, Safika, Darmawi, et al. Isolation and identification of a cellulolytic *Enterobacter* from rumen of Aceh cattle [J]. Veterinary World, 2017, 10 ( 12 ) : 1515-1520.
- [46] 朱继红, 孙满吉, 张永根. 瘤胃纤维降解菌株的筛选 [J]. 饲料博览, 2012 ( 1 ) : 5-8.
- Zhu JH, Sun MJ, Zhang YG. Screening of the ruminal rice straw cellulolytic bacteria [J]. Feed Review, 2012 ( 1 ) : 5-8.
- [47] 朱继红. 瘤胃兼性厌氧 CDB 的分离鉴定及其对奶牛生产性能的研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2012.
- Zhu JH. Study on isolation, characterization and production performance of ruminal facultatively anaerobic cellulose-decomposing bacteria in Holstein Cows [D]. Harbin : Northeast Agricultural University, 2012.
- [48] 买尔哈巴·艾合买提. 瘤胃中纤维素分解菌的分离、鉴定及其在青贮饲料中的应用研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆大学, 2013.
- Maierhaba A. Isolation and identification of cellulose decomposing bacteria in rumen and its application in silage [D]. Urumqi : Xinjiang University, 2013.
- [49] 蒋培培, 刘福音, 邹智坤, 等. 牦牛瘤胃中产纤维素酶芽孢杆菌的分离鉴定 [J]. 中国畜牧兽医, 2016, 43 ( 2 ) : 527-534.
- Jiang PP, Liu JC, Zou ZK, et al. Isolation and identification of Cellulase Producing Bacillus from rumen of yak [J]. Chinese Animal Husbandry and Veterinary, 2016, 43 ( 2 ) : 527-534.
- [50] 侯进慧, 刘彤, 李同祥. 产纤维素酶菌株 *Pantoea ananatis* P5 的筛选鉴定和活性研究 [J]. 徐州工程学院学报: 自然科学版, 2013, 28 ( 4 ) : 80-84.
- Hou JH, Liu T, Li TX. Screening, identification and activity of Cellulase Producing Strain *Pantoea ananatis* P5 [J]. Journal of Xuzhou Institute of Technology : Natural Science Edition, 2013, 28 ( 4 ) : 80-84.
- [51] 王炳晓. 奶牛瘤胃兼性厌氧纤维素分解细菌的分离鉴定及其产酶研究 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2008.
- Wang BX. Isolation, identification and enzyme production of facultative anaerobic cellulolytic bacteria from rumen of dairy cows [D]. Tai'an : Shandong Agricultural University, 2008.
- [52] 王炳晓, 柴同杰, 苏鹏程, 等. 奶牛瘤胃兼性厌氧纤维素分解菌的分离鉴定 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2009, 37 ( 3 ) : 35-42.
- Wang BX, Chai TJ, Su PC, et al. Isolation and identification of facultative anaerobic cellulolytic bacteria in rumen of dairy cows [J]. Journal of Northwest A & F University : Natural Science Edition, 2009, 37 ( 3 ) : 35-42.
- [53] 彭忠利, 邹智坤, 曾泽, 等. 藏绵羊瘤胃中产纤维素酶芽孢杆菌的分离鉴定 [J]. 动物医学进展, 2016, 37 ( 4 ) : 70-73.
- Peng ZL, Zou ZK, Zeng Z, et al. Isolation and identification of Cellulase Producing Bacillus from rumen of Tibetan sheep [J]. Progress in Animal Medicine, 2016, 37 ( 4 ) : 70-73.
- [54] 崔小蕾. 功能性微生物的筛选 [D]. 大连: 大连工业大学, 2017.
- Cui XL. Screening of functional microorganisms [D]. Dalian : Dalian University of Technology, 2017.
- [55] 周非帆. 瘤胃纤维降解细菌的分离鉴定及纤维降解特性研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2014.
- Zhou FF. Isolation and identification of rumen fiber degrading bacteria and study on fiber degradation characteristics [D]. Hohhot : Inner Mongolia Agricultural University, 2014.
- [56] Sewell GW, Aldrich HC, Williams D, et al. Isolation and characterization of xylan-degrading strains of *butyrivibrio fibrisolvens* from a napier grass-fed anaerobic digester [J]. Applied Environmental Microbiology, 1988, 54 ( 5 ) : 1085-1090.
- [57] 张贝贝. 牛瘤胃细菌产木聚糖酶菌株的筛选及其酶学性质的研究 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2013.
- Zhang BB. Screening of xylanase-producing strain from bovine rumen and its enzymatic properties [D]. Zhengzhou : Henan Agricultural University, 2013.
- [58] Blackburn TH, Hobson PN. Further studies on the isolation of proteolytic bacteria from the sheep rumen [J]. Microbiology, 1962, 29 ( 1 ) : 69-81.
- [59] Cook AR. Urease activity in the rumen of sheep and the isolation of ureolytic bacteria [J]. Microbiology, 1976, 92 ( 1 ) : 32-48.
- [60] Bellingham F, Bernstein M. The isolation of a biuret degrading bacterium from the rumen of a sheep [J]. Journal of Applied Microbiology, 1973, 36 ( 1 ) : 183-186.
- [61] 吴凌, 赵明娟, 夏成, 等. 痤疮丙酸杆菌的分离鉴定及其对瘤胃微生物发酵的影响 [J]. 微生物学报, 2009, 49 ( 2 ) : 168-173.
- Wu L, Zhao MJ, Xia C, et al. Isolation and identification of *Propionibacterium acnes* and its effect on rumen microbial

- fermentation [J]. *Acta microbiologica Sinica*, 2009, 49 (2): 168-173.
- [62] 赵明娟, 吴凌, 夏成, 等. 奶牛瘤胃中粪肠球菌的分离鉴定[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2008 (9): 65-66.
- Zhao MJ, Wu L, Xia C, et al. Isolation and identification of *Enterococcus faecalis* from rumen of dairy cows [J]. *Heilongjiang Animal Husbandry and Veterinary*, 2008 (9): 65-66.
- [63] 于鸿玲. 反刍月形单胞菌及其转座工程菌对羊瘤胃发酵的影响[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2006.
- Yu HL. Effects of lunamonas ruminant and its transposable engineering bacteria on rumen fermentation of sheep [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2006.
- [64] 王德光. 饲用菌种(株)的分离鉴定及复合菌剂降解玉米皮一统糠粗纤维的效果研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.
- Wang DG. Isolation and identification of feeding species (strains) and effect of compound bacteria on degradation of Corn Meal-rice bran [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2017.
- [65] 徐凤, 张焕容, 张兴民, 等. 不同年龄山羊胃肠道乳酸菌的分离鉴定[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2017 (5): 108-110.
- Xu F, Zhang HR, Zhang XM. Isolation and identification of lactic acid bacteria from gastrointestinal tract of goats of different ages [J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2017 (5): 108-110.
- [66] 龙森, 逢晓阳, 朱连勤, 等. 牛瘤胃耐酸乳酸杆菌的分离与鉴定[J]. *中国兽医学报*, 2009, 29 (3): 288-291.
- Long M, Fu XY, Zhu LQ, et al. Isolation and identification of acid fast *Lactobacillus* from rumen of cattle [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2009, 29 (3): 288-291.
- [67] 欧海龙. 产琥珀酸放线杆菌的分离鉴定及发酵特性[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2009.
- Ou HL. Isolation, identification and fermentation characteristics of *Actinobacillus succinogenes* [D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2009.
- [68] 吴凌, 欧海龙, 夏成, 等. 产琥珀酸放线杆菌的分离鉴定及其对瘤胃微生物发酵的影响[J]. *中国微生态学杂志*, 2009, 21 (8): 737-740, 742.
- Wu L, Ou HL, Xia C, et al. Isolation and identification of *Actinobacillus succinogenes* and its effect on rumen microbial fermentation [J]. *Chinese Journal of Microbiology*, 2009, 21 (8): 737-740, 742.
- [69] 李兴江, 潘丽军, 姜绍通, 等. 牛瘤胃中琥珀酸产生菌的分离鉴定研究[J]. *合肥工业大学学报: 自然科学版*, 2007, 30 (10): 1327-1330.
- Li XJ, Pan LJ, Jiang ST. Isolation and identification of succinic acid producing bacteria from rumen of bovine [J]. *Journal of Hefei University of Technology: Natural Science*, 2007, 30 (10): 1327-1330.
- [70] 陈晓晖. 琥珀酸产生菌的分离鉴定、诱变选育及发酵条件优化[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2007.
- Chen XH. Isolation, identification, mutation breeding and optimal fermentation conditions of succinic acid producing bacteria [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2007.
- [71] 李兴芳, 徐雯, 张胜男, 等. 山羊瘤胃中单宁降解菌的分离、筛选和鉴定[J]. *动物营养学报*, 2015, 27 (6): 1921-1927.
- Li XF, Xu W, Zhang SN. Isolation, screening and identification of tannin degrading bacteria in rumen of goats [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2015, 27 (6): 1921-1927.
- [72] Macpherson MJ. Isolation and identification of amylolytic Streptococci from the rumen of the sheep [J]. *Journal of Pathology Bacteriology*, 1953, 66: 95-102.
- [73] Jung D, Seo D, Kim G, et al. The effect of resistant starch (RS) on the bovine rumen microflora and isolation of RS-degrading bacteria [J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2018, 102 (11): 4927-4936.
- [74] Hobson PN, Mann SOJ. The isolation of glycerol-fermenting and lipolytic bacteria from the rumen of the sheep [J]. *Microbiology*, 1961, 25 (2): 227-240.
- [75] Sanusi OA. Identification and enzyme production of a cellulolytic *Bacillus*-strain isolated from moose (*Alces alces*) rumen [D]. Elverlum: Hedmark University College, 2013.
- [76] Hungate RE. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria [J]. *Bacteriol Rev*, 1950, 14 (1): 1-49.
- [77] Kolinko S, Wu YW, Tachea F, et al. A bacterial pioneer produces cellulase complexes that persist through community succession [J]. *Nature Microbiology*, 2018, 3 (1): 99-107.
- [78] Reichardt W. Impact of the Antarctic benthic fauna on the enrichment of biopolymer degrading psychrophilic bacteria [J]. *Microbial Ecology*, 1988, 15 (3): 311-321.
- [79] Jung HG, Varel VH. Influence of forage type on ruminal bacterial



- populations and subsequent *in vitro* fiber digestion [J]. Journal of Dairy Science, 1988, 71 (6): 1526-1535.
- [80] McDonald JE, Rooks DJ, McCarthy AJ, Methods for the isolation of cellulose-degrading microorganisms [J]. Methods in Enzymology, 2012, 510: 349-374.
- [81] Butterworth JP, Bell SE, Garvock MG. Isolation and properties of the xylan-fermenting bacterium 11 [J]. Biochemical Journal, 1960, 74 (1): 180-182.
- [82] Nyonyo T, Shinkai T, Mitsumori M. Improved culturability of cellulolytic rumen bacteria and phylogenetic diversity of culturable cellulolytic and xylanolytic bacteria newly isolated from the bovine rumen [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2014, 88 (3): 528-537.
- [83] Simunek J, Killer J, Sechovcova H, et al. Characterization of a xylanolytic bacterial strain C10 isolated from the rumen of a red deer (*Cervus elaphus*) closely related of the recently described species *Actinomyces succiniciruminis*, *A. glycerinitolerans*, and *A. ruminicola* [J]. Folia Microbiologica, 2018, 63 (3): 391-399.
- [84] Ghali MB, Scott PT, Jassim RAM. Characterization of *Streptococcus bovis* from the rumen of the dromedary camel and Rusa deer [J]. Letters in Applied Microbiology, 2004, 39 (4): 341-346.
- [85] Jensen RG, Smith KL, Edmondson JE, et al. The characteristics of some rumen *Lactobacilli* [J]. Journal of Bacteriology, 1956, 72 (2): 253-258.
- [86] Mcsweeney CS, Palmer B, Bunch RJ, et al. Isolation and characterization of proteolytic ruminal bacteria from sheep and goats fed the tannin-containing shrub legume *Calliandra calothyrsus* [J]. Applied Environmental Microbiology, 1999, 65 (7): 3075-3083.
- [87] John A, Isaacson HR, Bryant MP. Isolation and characteristics of a ureolytic strain of *Selenomonas ruminantium* [J]. Journal of Dairy Science, 1974, 57 (9): 1003-1014.
- [88] 刘欢. 甲烷氧化菌的分离与鉴定及其活菌制剂对奶牛瘤胃内甲烷排放量的影响 [D]. 长春: 吉林大学, 2016.
- Liu H. Isolation and identification of methanotrophic bacteria and effect of its active agents on methane emission of dairy cows [D]. Changchun: Jilin University, 2016.
- [89] Sharma D, Mal G, Kannan A, et al. Degradation of euptox A by tannase-producing rumen bacteria from migratory goats [J]. Journal of Applied Microbiology, 2017, 123 (5): 1194-1202.
- [90] Camboim EK, Almeida AP, Tadra-Sfeir MZ, et al. Isolation and identification of sodium fluoroacetate degrading bacteria from caprine rumen in Brazil [J]. The Scientific World Journal, 2012 (1): 178254.
- [91] Faruque AJMO, Jarvis BDW, Hawke JC. Studies on rumen metabolism. VIII. Characteristics of lipases in rumen contents and in rumen bacteria [J]. Journal of the Science of Food Agriculture, 1974, 25 (4): 439-449.
- [92] Henderson C. The isolation and characterization of strains of lipolytic bacteria from the ovine rumen [J]. Journal of Applied Microbiology, 1975, 39 (2): 101-109.
- [93] 韩生义, 刘晓丽, 张国权, 等. 牦牛瘤胃中产脂肪酶微生物的分离与鉴定 [J]. 微生物学通报, 2019, 46 (9): 2292-2301.
- Han SY, Liu XL, Zhang GQ, et al. Isolation and identification of lipase-producing bacteria from rumen of yak [J]. Microbiology China, 2019, 46 (9): 2292-2301.
- [94] Priji P, Unni KN, Sajith S, et al. Production, optimization, and partial purification of lipase from *Pseudomonas* sp. strain BUP6, a novel rumen bacterium characterized from Malabari goat [J]. Biotechnology Applied Biochemistry, 2015, 62 (1): 71-78.
- [95] Priji P, Sajith S, Unni KN, et al. *Pseudomonas* sp. BUP6, a novel isolate from Malabari goat produces an efficient rhamnolipid type biosurfactant [J]. Journal of Basic Microbiology, 2017, 57 (1): 21-33.
- [96] 王铁良, 于颖, 刘秀萍. 牛源性蛋氨酸生产菌的分离筛选及发酵条件优化 [J]. 畜牧与兽医, 2017, 49 (8): 57-61.
- Wang TL, Yu Y, Liu XP. Isolation, screening and optimal fermentation conditions of methionine producing bacteria from bovine [J]. Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2017, 49 (8): 57-61.
- [97] Maluszynska GM, Janotabassalik L. A cellulolytic rumen bacterium, *Micromonospora ruminantium* sp. nov [J]. Microbiology, 1974, 82 (1): 57-65.
- [98] Chun BH, Lee HJ, Jeong SE, et al. *Leucobacter ruminantium* sp. nov., isolated from the bovine rumen [J]. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology, 2017, 67 (8): 2634-2639.
- [99] Jeon BS, Kim S, Sang B. *Megasphaera hexanoica* sp. nov., a medium-chain carboxylic acid-producing bacterium isolated from a cow rumen [J]. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology, 2017, 67 (7): 2114-2120.

- [ 100 ] Gylswyk NOV, Hoffman JPL. Characteristics of cellulolytic cillobacteria from the rumens of sheep fed teff ( *Eragrostis tef* ) hay diets [ J ] . *Microbiology*, 1970, 60 ( 3 ) : 381-386.
- [ 101 ] Gylswyk NOV, Roche C. Characteristics of *Ruminococcus* and cellulolytic *Butyrivibrio* species from the rumens of sheep fed differently supplemented teff ( *Eragrostis tef* ) hay diets [ J ] . *Microbiology*, 1970, 64 ( 1 ) : 11-17.
- [ 102 ] Jarvis BDW, Annison EF. Isolation, classification and nutritional requirements of cellulolytic cocci in the sheep rumen [ J ] . *Microbiology*, 1967, 47 ( 2 ) : 295-307.
- [ 103 ] Luna L, Hernández D, Silva HV, et al. Isolation, biochemical characterization, and phylogeny of a cellulose-degrading ruminal bacterium [ J ] . *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 2019, 32 ( 2 ) : 117-125.
- [ 104 ] Kameshwar AKS, Qin WS. Isolation and screening of cellulose-degrading microorganisms from different ecological niches, In: *Methods in Molecular Biology* [ M ] . New York : Humana Press, 2018 : 47-56.
- [ 105 ] King KW, Smith PH. Comparisons of two media proposed for the isolation of bacteria from the rumen [ J ] . *Journal of Bacteriology*, 1955, 70 ( 6 ) : 726.
- [ 106 ] Gylswyk NOV. A comparison of two techniques for counting cellulolytic rumen bacteria [ J ] . *Microbiology*, 1970, 60 ( 2 ) : 191-197.
- [ 107 ] Battumur U, Lee M, Bae GS, et al. Isolation and characterization of a new *Methanoculleus bourgensis* strain KOR-2 from the rumen of Holstein steers [ J ] . *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2019, 32 ( 2 ) : 241.

( 责任编辑 张婷婷 )