

树鼩粪便细菌分离培养与鉴定

刘丽君^{1,2}, 余柄廷³, 胡凝珠², 孙晓梅², 王 玮², 孙 静², 胡云章², 李建芳²

(1. 昆明医科大学, 昆明 650500; 2. 中国医学科学院北京协和医学院医学生物学研究所, 昆明 650118;
3. 河北大学生命学院, 河北 保定 071000)

【摘要】 目的 了解人工饲养树鼩粪便菌群多样性, 为树鼩的正常饲养繁殖和微生物质量控制标准化提供依据。**方法** 随机采集 10 份树鼩粪便样品, 利用有氧及厌氧培养基进行细菌分离培养, 提取细菌基因组 DNA 后 PCR 扩增 16S rRNA 基因并测序鉴定。**结果** 本实验从树鼩粪便样品中, 经有氧培养分离鉴定出 25 株、12 种细菌, 经厌氧培养分离鉴定出 25 株、10 种细菌, 包括变形杆菌属、肠球菌属、埃希菌属、志贺菌属、葡萄球菌属、气单胞菌属、拉恩氏菌属、拉乌尔菌属、微小杆菌属、链球菌属、明串珠菌属。**结论** 树鼩肠道好氧菌及厌氧菌具有丰富的种属多样性, 普通变形杆菌群、费格森埃希菌群和屎肠球菌群可能是树鼩肠道的主要寄生菌群。

【关键词】 树鼩; 粪便细菌; 有氧培养; 厌氧培养; 分离鉴定

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 10-0064-05

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2015. 010. 015

Isolation, culture and identification of bacterial strains from tree shrews feces

LIU Li-jun, YU Bing-ting, HU Ning-zhu, SUN Xiao-mei, WANG Wei, SUN Jing, HU Yun-zhang, LI Jian-fang

(1. Kunming Medical University, Kunming 650500, China; 2. Institute of Medical Biology, Chinese

Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Kunming 650118, China;

3. Hebei University, Hebei Baoding 071000, China)

【Abstract】 Objective Study the fecal flora diversity of the tree shrew, to provide a basis data of fecal bacteria of feeding the tree shrew. **Methods** Ten tree shrews were used in this study. The stools of the animals were respectively cultured with oxygen and without oxygen to isolate the bacterial. Then the PCR-amplified 16S rRNA of the bacterial was sequenced and analyzed. **Results** 25 bacterial strains belonging to ten bacterial species were isolated by anaerobic incubation, and 25 bacterial strains belonging to twelve bacterial species were isolated by aerobic incubation. *Proteus vulgaris*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia fergusonii*, *Enterococcus faecium*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas salmonicida* subsp. *masoucida*, *Rahnella aquatilis*, *Exiguobacterium aquaticum*, *Raoultella terrigena*, and *Escherichia coli* were identified in this study. **Conclusions** There is a fecal flora diversity of the tree shrew, and the *Proteus vulgaris*, *Escherichia fergusonii* and *Enterococcus faecium* may be the major parasitic flora.

【Key words】 Tree shrew; Faecal bacteria; Aerobic culture; Anaerobic culture; Isolation identification

树鼩 (*Tupaia belangeri*, tree shrew) 形态酷似松鼠, 是种生活在热带和亚热带地区的哺乳纲攀鼯类

的小型动物, 具有体型小, 繁殖能力强, 易驯养, 经济易得等优点。研究表明树鼩的许多分子和细胞

[基金项目] 国家科技支撑计划项目 (2014BAI01B01); 云南省社会发展新药专项 (2013BC011)。

[作者简介] 刘丽君 (1990 -), 女, 硕士生, 专业: 生物化学与分子生物学。

[通讯作者] 李建芳 (1982 -), 女, 助理研究员, E-mail: jianfangli@126.com。

结构近似于人类,新陈代谢与解剖结构比啮齿类更接近于非人灵长类动物,常用于替代或减少一些非人灵长类动物的使用。树鼩在肿瘤学、内分泌学、神经生物学、生殖生物学、免疫学等方面已有广泛和深入的研究,并对多种人类重要病毒易感,可作为重要人类病毒的动物模型^[1]。

但由于以往研究所用的树鼩多为野外捕获的动物,还没有实现树鼩标准化,使得有些结果判定出现困难,如在动物感染率、感染维持时间、感染指标检测等方面的稳定性和重复性存在不足,致使一些学者提出质疑,很大程度上影响了研究的进展^[2]。

普通级树鼩在人工繁育过程中,曾有病原微生物所致树鼩爆发腹泻少数致死的情况,因此对排便正常的树鼩,粪便中好氧及厌氧细菌的分离鉴定及分析,可为树鼩的正常饲养繁殖和微生物质量控制标准化提供依据,对树鼩的饲养繁殖和科学管理具有重要的现实意义^[3]。

1 材料和方法

1.1 动物

10 只健康来源于中国医学科学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心人工繁育普通级种群,生产许可证号【SCXK(滇)2013-0001】,使用许可证【SYXK(滇)2013-0001】。动物饲养温度 22℃~25℃,湿度 40%~60%,每日明暗交替照明 12 h 每天分别给予自制蒸料和商品化膨化犬料各一次,饮用城市供应的自来水。

1.2 设备与材料

Forma 恒温培养箱; BIO-RAD 梯度 PCR 仪; 苏州净化设备有限公司 HT6029 型超净工作台; 其林贝尔仪器制造有限公司 QL-901 型漩涡混合器; 恒温摇床; 三菱密闭式厌氧培养盒; 三菱厌氧产气袋; 三菱厌氧指示剂; OXOID LB 和脑心浸出液培养基; Promega-Wizard 基因组 DNA 纯化试剂盒。

1.3 方法

1.3.1 树鼩粪便的收集: 抓取并保定树鼩, 多数树鼩在抓取过程中因紧张而主动排出粪便, 对无粪便者通过轻轻按摩其腹部使其排便, 每只树鼩采集豌豆粒大小新鲜粪便标本。

1.3.2 粪便样品的混悬稀释

将粪便样品混悬到无菌生理盐水中后以 10 倍递增梯度稀释。

1.3.3 细菌分离培养

选取适合的稀释样品涂布 LB 琼脂平板和脑心浸出液琼脂平板, 分别做有氧和厌氧培养分离单菌落。

1.3.4 扩增 16SrDNA 片段

将分离到的单菌落接种到相应的液体培养基培养扩增, 用试剂盒抽提基因组 DNA, 用细菌 16SrRNA 的通用引物 27F 5'-AGAGTTTGATCATG GCTCAG-3' 和 1492R 5'-TACGTTACCTTGTTA CGACTT-3', PCR 扩增细菌 16SrDNA 片段。

1.3.5 载体构建

将纯化的 16SrDNA 片段构建到 pGEM-T 载体上, 转化细菌后筛选阳性克隆。

1.3.6 测序鉴定

将阳性克隆送到英潍捷基(上海)贸易有限公司做 DNA 测序。将得到的碱基序列输入 NCBI GenBank 做 blast 序列比对分析确定分离得到细菌的种属。

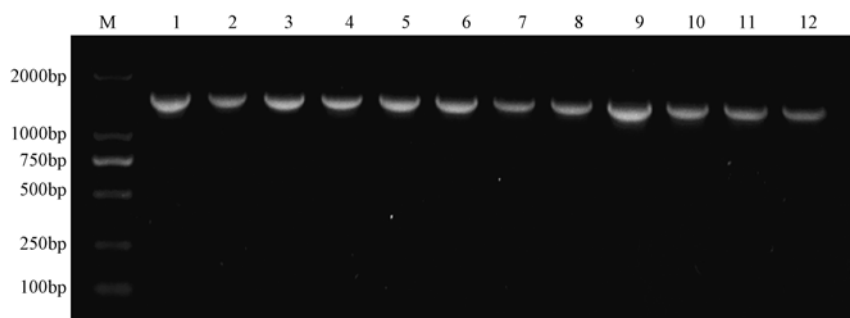
2 结果

2.1 细菌 16SrRNA 基因 PCR 扩增结果

本试验从 10 只无腹泻等症状的正常树鼩的粪便中, 有氧和厌氧培养分别分离鉴定出 25 株、12 种和 25 株、10 种细菌, 对分离菌株进行 16SrRNA 基因 PCR 扩增, 扩增产物进行 10g/L 琼脂糖凝胶电泳观察, 在 1500 bp 处均出现一条明亮的目的条带, 如图 1、图 2。将 PCR 产物送测序, 将测序结果与 NCBI GenBank 中参考菌株 16SrRNA, 基因核苷酸序列进行同源性分析比较, 根据不同属细菌 16SrRNA 基因同源性为 70%~90%, 而同一种内不同株间基因同源性大于 99% 的判定标准。有氧及厌氧培养分离到普通变形杆菌、粪肠球菌、费格森埃希菌、屎肠球菌、弗氏志贺菌、大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、杀鲑气单胞菌、水生拉恩氏菌、索氏志贺氏菌、土生拉乌尔菌、巴黎链球菌、肠系膜明串珠菌、水生微小杆菌等与 NCBI GenBank 中相关参考菌株 16SrRNA 基因的核苷酸序列同源性均在 99%~100% 之间, 从而确定分离到的纯培养菌株的种属。

2.2 细菌总检出数及检出率

树鼩粪便经有氧和厌氧分离鉴定, 检出变形杆菌属、肠球菌属、埃希菌属、志贺菌属、葡萄球菌属、气单胞菌属、拉恩氏菌属、拉乌尔菌属、微小杆菌属、链球菌属、明串珠菌属, 包括普通变形杆菌、屎

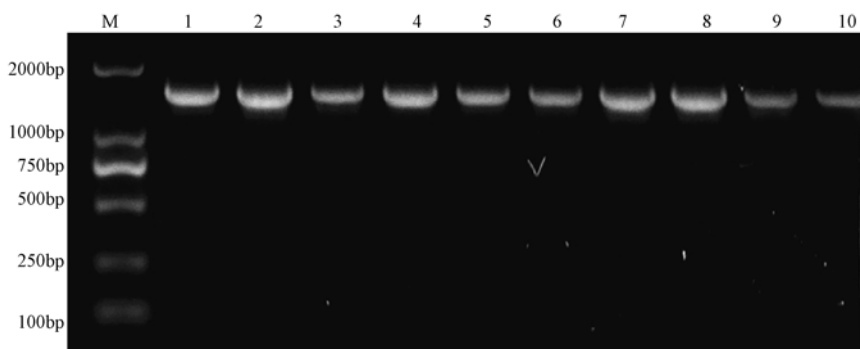


注: M. DNA 标准 DL2000; 1 - 12. 16SrRNA PCR 产物。

图 1 有氧培养分离细菌 16SrRNA PCR 扩增结果

Note: M. DNA Marker DL2000; 1 - 12. PCR products of 16SrRNA.

Fig. 1 PCR amplification of 16SrRNA which isolated bacterial strains by aerobic culture



注: M. DNA 标准 DL2000; 1 - 10. 16SrRNA PCR 产物。

图 2 厌氧培养分离细菌 16SrRNA PCR 扩增结果

Note: M. DNA Marker DL2000; 1 - 10. PCR products of 16SrRNA.

Fig. 2 PCR amplification of 16SrRNA which isolated bacterial strains by anaerobic culture

肠球菌、费格森埃希菌、弗氏志贺菌、粪肠球菌、索氏志贺氏菌、土生拉乌尔菌、巴黎链球菌、水生拉恩氏菌、水生微小杆菌、肠系膜明串珠菌、大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、杀鲑气单胞菌共 14 种细菌, 总检出数及检出率见表 1。其中普通变形杆菌、屎肠球菌、费格森埃希菌、弗氏志贺菌检出率达到 50%。

2. 2. 1 有氧培养分离鉴定结果

树鼩粪便经有氧培养分离鉴定得到的细菌主要有变形杆菌属、肠球菌属、埃希菌属、志贺菌属、葡萄球菌属、气单胞菌属、拉恩氏菌属、拉乌尔菌属、微小杆菌属, 其中普通变形杆菌 5 株、粪肠球菌 4 株、费格森埃希菌 3 株、屎肠球菌 3 株、弗氏志贺菌 2 株、索氏志贺氏菌 2 株、大肠埃希菌 1 株、金黄色葡萄球菌 1 株、杀鲑气单胞菌 1 株、水生拉恩氏菌 1 株、土生拉乌尔菌 1 株、水生微小杆菌 1 株。

2. 2. 2 厌氧培养分离鉴定结果

树鼩粪便经厌氧分离鉴定得到的细菌主要有埃希菌属、志贺菌属、链球菌属、肠球菌属、变形杆菌属、气单胞菌属、明串珠菌属、拉乌尔菌属, 其中费格森埃希菌 5 株、屎肠球菌 4 株、弗氏志贺菌 3 株、索氏志贺氏菌 3 株、巴黎链球菌 2 株、粪肠球菌 2 株、普通变形杆菌 2 株、土生拉乌尔菌 2 株、肠系膜明串珠菌 1 株、杀鲑气单胞菌 1 株。

3 讨论

肠道正常菌群是经过长期历史进化在宿主内形成的定植微生物群落, 他们对宿主是有益的和必需的, 在正常状态下是无害的。种类不同的肠道菌群按一定的比例组合, 各菌间互相拮抗互相协同, 在质和量上形成一种动态生物平衡。实验结果显示正常树鼩粪便菌群的多样性, 间接说明树鼩常态肠道寄生菌群的多样性。

表 1 培养细菌鉴定结果及检出数与检出率

Tab. 1 Identification results and detection number and detection rate of isolated bacterial strains.

细菌编号 Number	细菌名称 Names of bacteria	检出率/% Detection rate
1	普通变形杆菌 <i>Proteus vulgaris</i>	6/10(60.00)
2	尿肠球菌 <i>Enterococcus faecium</i>	6/10(60.00)
3	费格森埃希菌 <i>Escherichia fergusonii</i>	6/10(60.00)
4	弗氏志贺菌 <i>Shigella flexneri</i>	5/10(50.00)
5	粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i>	4/10(40.00)
6	索氏志贺氏菌 <i>Shigella sonnei</i>	4/10(40.00)
7	土生拉乌尔菌 <i>Raoultella terrigena</i>	2/10(20.00)
8	巴黎链球菌 <i>Streptococcus lutetiensis</i>	2/10(20.00)
9	水生拉恩氏菌 <i>Rahnella aquatilis</i>	1/10(10.00)
10	水生微小杆菌 <i>Exiguobacterium aquaticum</i>	1/10(10.00)
11	肠系膜明串珠菌 <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1/10(10.00)
12	大肠埃希菌 <i>Escherichia coli</i>	1/10(10.00)
13	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	1/10(10.00)
14	杀鲑气单胞菌 <i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i>	1/10(10.00)

在 10 只正常排便树鼩的粪便样品中,我们通过有氧培养和厌氧培养分离到 50 株细菌,经过 16SrRNA 的序列比对分析鉴定分离到细菌包含了变形杆菌属、肠球菌属、埃希菌属、志贺菌属、葡萄球菌属、气单胞菌属、拉恩氏菌属、拉乌尔菌属、微小杆菌属、链球菌属、明串珠菌属共 11 个属,14 种细菌。其中分离到的费格森埃希菌、弗氏志贺菌、粪肠球菌、普通变形杆菌、尿肠球菌、索氏志贺氏菌、土生拉乌尔菌、杀鲑气单胞菌等为兼性厌氧菌,在有氧和厌氧培养过程中均能分离得到。

根据分离培养结果,普通变形杆菌群、费格森埃希菌群和尿肠球菌群的检出比例均达到 60%,表明普通变形杆菌群、费格森埃希菌群和尿肠球菌群为树鼩优势菌群,且可能是树鼩肠道的主要寄生菌群。这些优势菌群与树鼩的饮食习惯、生活习性和生理代谢等密切相关。

肠球菌属的尿肠球菌和粪肠球菌是人和动物肠道内主要正常菌群。粪肠球菌其能产生天然抗生素,有利于机体健康同时还能产生细菌素等抑菌物质,对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌等致病菌具有良好的抑制作用,改善肠道微环境^[4-5]。且有报道普通变形杆菌、费格森埃希菌等属于条件致病菌,可存在于健康动物体内,当机体免疫力降低时,极易引起疾病的发生^[6-8]。

本实验对粪便样品进行完全厌氧培养,另外得到肠系膜明串珠菌和巴黎链球菌,已广泛应用于风味剂、血浆代用品的肠系膜明串珠菌,证实其能产生大量有机酸、醇类及各种氨基酸等代谢物,能拮抗致病菌,促进肠道益生菌的生长^[9]。巴黎链球菌

又称婴儿链球菌结肠亚种,是牛链球菌的一种。牛链球菌与结肠疾病有关^[10]。到目前为止国内外报道的文献中,对于巴黎链球菌的研究非常稀少,而这种菌株只从少数的临床血、尿样品以及非临床的粪便样品中分离到,因此该菌株的生物学特性尚不清楚,有待开展进一步的研究^[11-12]。

所有树鼩在采样时虽然粪便色泽有所差异,但数周来均无拉稀腹泻症状,大便正常,而且外观健康,精神活动状况良好,没有治疗用药情况。因此,所检出的普通变形杆菌、费格森埃希菌、志贺氏菌、杀鲑气单胞菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌等条件致病菌种^[5-8,13],可以初步判断应为常态寄生菌种,这些条件致病菌的检测监控对于实验树鼩的健康管理、质量控制、日常饲养管理、疾病预防工作和将来生物净化树鼩种群的建立和生产提供指导具有一定的意义。

邢进、高家红等^[14-15]关于树鼩肠道细菌的研究显示,大肠杆菌菌群、葡萄球菌菌群及链球菌菌群的检出率较高,与本实验结果有较大差异。分析可能原因为本实验检测样品为树鼩的粪便,与活体树鼩的肛门内取样或剖杀树鼩采集回盲部内容物的采样不同,且本实验增加严格厌氧培养,因而可分离获得一些不常检出的厌氧菌。

本实验以温和方式采集树鼩粪便样品,可减少树鼩的惊吓及避免不必要的损伤。由于 16SrRNA 序列的保守性和存在的普遍性,以及核酸序列本身的稳定性、序列分析的重现性极高,应用 16SrRNA 作为分子指标,分类鉴定细菌具有快速、微量、准确、简便的特点。但本实验采用的分离培养方式是

传统的细菌鉴定方法,然而在人类微生物群系研究中发现,根据部位的不同,在人体中约有 20% ~ 60% 的细菌不能培养^[16]。且有些细菌在粪便中可能丰度较低,或培养时间较长易遗漏,不易通过传统方法分离,提示我们可利用 454 焦磷酸测序技术等对这些微生物进行高通量测序鉴定^[17],以便更加全面的检测树鼩粪便的微生物群系,为树鼩的正常饲养繁殖和微生物质量控制标准化提供依据。

参考文献:

- [1] 沈培清,郑红,刘汝文,等. 中国树鼩实验动物物化研究进展和展望[J]. 动物学研究,2011,01:109-114.
- [2] 黄晓燕,徐娟,孙晓梅,等. 树鼩在人类疾病动物模型中应用研究进展[J]. 实验动物科学,2013,02:59-64.
- [3] 全品芬,年朝琴,彭超,等. 致树鼩腹泻的奇异变形杆菌分离鉴定及药敏试验[J]. 实验动物科学,2014,01:41-44.
- [4] Malik R K, Montecalvo M A, Reale M R, et al. Epidemiology and control of vancomycin-resistant enterococci in a regional neonatal intensive care unit. [J]. Pediatric Infectious Disease Journal, 1999, 18(4):352-356.
- [5] Hugas M, Garriga M, Aymerich M T. Functionality of enterococci in meat products[J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 88(2-3):223-233.
- [6] 陶元勇,孙铭艳,李建花,等. 弗格森埃希菌的生物学特征研究与 16SrRNA 检测[J]. 中国病原生物学杂志,2013,(3):229-232.
- [7] Sullivan A, T02rblom H, Lindberg G, et al. The micro-flora of the small bowel in health and disease[J]. Anaerobe, 2003, 9(1):11-14.
- [8] Norin E. How normal is a "normal" flora in animal or man [J]? Anaerobe, 2011, 17(6):431-432.
- [9] 李文斌,宋敏丽,高荣琨. 肠膜明串珠菌的研究和应用进展[J]. 食品工程,2006,(4):3-4.
- [10] 李仲兴. 牛链球菌群感染的研究进展[J]. 临床荟萃,2006,21(24):1802-1804.
- [11] Vanhoutte T, Huys G, Brandt E, et al. Molecular monitoring and characterization of the faecal microbiota of healthy dogs during fructan supplementation. [J]. Fems Microbiology Letters, 2005, 249(1):65-71.
- [12] 董银苹,崔生辉,李凤琴,等. 乳酸杆菌及嗜热链球菌的种水平鉴定——16SrRNA 基因 PCR 扩增及序列分析[J]. 卫生研究,2010,39(4):454-458.
- [13] 林如涛,周作勇,王小林,等. 羊源杀鲑气单胞菌 16SrRNA 基因的克隆测序及分析[J]. 西南大学学报:自然科学版,2011,33(8):46-51.
- [14] 邢进,冯育芳,付瑞,等. 野生树鼩可培养细菌和真菌携带情况的调查[J]. 实验动物科学,2012,03:34-38.
- [15] 高家红,江勤芳,罗志武,等. 树鼩正常肠道细菌的培养分离鉴定及其药敏试验研究[J]. 中国比较医学杂志,2009,12:24-26+34.
- [16] Peterson J, Garges S, Giovanni M, et al. The NIH Human Microbiome Project [J]. Genome Res. 2009, 19(12):2317-2323.
- [17] 陈秀,张晓君,李沁元,等. 454 焦磷酸测序分析几种哺乳动物粪便细菌多样性[J]. 微生物学报,2015,06:683-690.

[修回日期]2015-08-31