

热应激奶牛瘤胃液中嗜淀粉杆菌的含量

王建平¹ 王加启^{2*} 卜登攀²

(1. 河南科技大学 动物科技学院, 河南 洛阳 471003;

2. 中国农科院 北京畜牧兽医研究所, 北京 100094)

摘要 为探讨不同生理状态热应激奶牛嗜淀粉瘤胃杆菌(*Ruminobacter amylophilus*)的含量差异,选择48头产奶母牛,按照因子试验设计分为泌乳中期和后期牛、高产和中产牛、初产和经产牛。奶牛经历1周热应激后,采集瘤胃液,利用RT-PCR定量分析方法,测定瘤胃液中嗜淀粉杆菌的含量。结果显示,微生物的数量经lg转化后,泌乳中期奶牛嗜淀粉瘤胃杆菌为7.70,泌乳后期为7.95,差异不显著($P>0.05$);高产牛嗜淀粉瘤胃杆菌为7.46,中产牛为8.20,差异不显著($P>0.05$);初产牛嗜淀粉瘤胃杆菌为7.97,经产牛为7.68,差异不显著($P>0.05$)。综上所述,在奶牛遭受热应激时,嗜淀粉瘤胃杆菌含量与奶牛的耐受热应激能力无明显关系。

关键词 奶牛; 瘤胃; 热应激; 嗜淀粉杆菌; 实时定量PCR

中图分类号 S 823.9.1

文章编号 1007-4333(2011)04-0102-05

文献标志码 A

Quantities of ruminal cellulolytic bacteria in heat stress dairy cattle

WANG Jian-ping¹, WANG Jia-qi^{2*}, BU Deng-pan²

(1. School of Livestock Science & Technology, Henan University of Science & Technology, Luoyang 471003, China;

2. Institute of Animal Science Chinese Academy Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract The objective of this study was to investigate the quantities of *Ruminobacter amylophilus* in lactating dairy cows under heat stress. Forty eight cows were assigned to mid-stage or late-stage, high producing or medium producing, primiparous or multiparous groups with a factorial design. Rumen fluid was sampled 5 h in the morning post-feeding via oral cavity with stomach-tube when the animals had suffered heat stress for one week. The real-time PCR was employed with the specific primers targeting 16s rDNA genes to test the abundance of *Ruminobacter amylophilus*. The quantities expressed as a log-transformed of *Ruminobacter amylophilus* was 7.70 and 7.95 in mid-stage and late-stage dairy cows ($P>0.05$), 7.46 and 8.20 in high and medium producing cows ($P>0.05$), 7.97 and 7.68 in primiparous and multiparous, respectively. In summary, the quantities of *Ruminobacter amylophilus* has no relationship with heat resistance of cow.

Key words dairy cows; heat stress; cellulolytic bacteria; RT-PCR

反刍动物消化道中栖息着大量的细菌、真菌、古菌和原虫等微生物,这些微生物帮助宿主利用植物类物质获得能量^[1-2]。嗜淀粉瘤胃杆菌(*Ruminobacter amylophilus*)是主要的淀粉分解菌之一,对反刍动物饲料的消化起着极为重要的作用,Takebrandt和Hippe利用16S rRNA技术,发现了该菌并命名为嗜淀粉瘤胃杆菌^[3]。

嗜淀粉瘤胃杆菌是在犊牛断奶后随着采食植物性含淀粉日粮成分增加,逐渐增殖成为优势菌群,并

形成稳定菌群^[4]。嗜淀粉瘤胃杆菌在瘤胃细菌中的比例是一个相对稳定,但又处于持续变化中的群落,其组成和分布受日粮组成、季节变化、宿主健康状况和环境温湿度等多种因素影响^[5]。目前有关应激和日粮对瘤胃嗜淀粉杆菌影响的报道较少,Tajima等报道不同环境温度对热应激青年牛瘤胃中嗜淀粉杆菌的比例无显著影响,但受相对湿度和牛体重的影响较大^[6]。Benchaar等报道日粮中添加脂肪酸后,饲喂苜蓿青贮日粮的瘤胃总细菌数增加,饲喂玉米

收稿日期: 2011-01-10

基金项目: “十一五”国家奶业科技支撑计划(2006BAD04A14); 河南科技大学博士基金资助

第一作者: 王建平,副教授,博士,主要从事反刍动物营养研究, E-mail: wjp8800@163.com

通讯作者: 王加启,研究员,博士生导师,主要从事反刍动物营养和牛奶质量改良研究, E-mail: wang-jia-qi@263.net

青贮日粮的瘤胃总细菌数减少^[7]。

研究瘤胃微生物是研究反刍动物肠道微生态的基础,瘤胃微生态系统非常复杂,其中栖息着复杂、多样、非致病的各种微生物,包括瘤胃细菌、原虫、真菌和噬菌体等几大类^[2],其中瘤胃中细菌的数量最大,瘤胃内容物中细菌达 $10^{10} \sim 10^{11} \text{ mL}^{-1}$,已发现200多种,但由于大多数瘤胃细菌无法体外培养,对传统方法提出很大挑战,目前对瘤胃微生物的认识仍很有限^[8]。近年来,以细菌核糖体DNA序列(16S rDNA)分析为基础的微生物分子生态学的发展突破了微生物纯化培养的限制,成为研究瘤胃微生物生态的有效方法^[9]。本试验采用 real time-PCR 分析技术对热应激奶牛瘤胃液中嗜淀粉瘤胃杆菌(*Ruminobacter amylophilus*)进行定量,旨在为探讨奶牛热应激的瘤胃发酵机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验设计

选择48头中国荷斯坦奶牛,根据产乳量、分娩时间和胎次进行配对试验设计。分为高产牛(40.4 ± 4.7 kg/d)和中产生(30.5 ± 1.7 kg/d),中期牛(泌乳时间 136 ± 17 d)和后期牛(泌乳时间 205 ± 3.4 d),初产生(头胎)和经产生(2胎及以上)。

1.2 瘤胃液的采集

在试验牛舍内牛群的中间和两端,与牛体等高(距地面约1.5 m)挂温湿度表,每天记录07:00、14:00和22:00温度及相对湿度。根据Drackley等的方法计算环境湿热指数。当连续1周早中晚湿热指数(THI)均 >72 时进行瘤胃液的采集。采样在早晨饲喂后5 h进行,利用专用口腔采样器放入瘤胃底部采集瘤胃液,弃掉初采集含有较多粘液的部分,样品分装于10 mL离心管,液氮(-196 °C)中保存。

1.3 瘤胃微生物总DNA的提取与纯化

将样品无菌条件溶于磷酸缓冲液(Phosphate buffer solution, PBS; 137 mmol NaCl, 2.7 mmol KCl, 10 mmol Na_2HPO_4 , 2 mmol KH_2PO_4 , pH 7.4)制成0.15 g/mL混合液。于3 000g离心5 min,弃沉淀;10 000g离心5 min,弃上清;用PBS重悬0.25 g沉淀,在细胞破碎仪(200 W,超声10 s,间隔3 s,循环10次)上破碎,3 000g离心5 min,弃沉淀;10 000g离心5 min,弃上清,沉淀中加入1 mL溶胞缓冲液(500 mmol NaCl, 50 mmol Tris-HCl, pH 8.0, 50 mmol 乙二胺四乙酸(EDTA), 0.4 g/mL 十二烷基硫酸钠(SDS)及0.4 g 氧化锆玻璃珠

(0.3 g, 0.1 mm 和 0.1 g, 0.5 mm);在珠磨仪上匀质化3 min;70 °C保温15 min;4 °C, 15 000g离心5 min,将上清液转移至另一离心管;加入300 μL 溶胞缓冲液,重复珠磨步骤,移取上清;在上清中加入260 μL 10 mol 乙酸铵,混匀,置冰上5 min;4 °C, 15 000g离心10 min,取上清。加入与上述上清液等体积的酚:氯仿:异戊醇(体积比为25:24:1)混合液,抽提2次,再加入1倍体积的异丙醇,置冰上沉淀30 min;4 °C, 15 000g离心5 min,弃去上清,以70%乙醇洗涤核酸,干燥。用100 μL TE溶解核酸。加2 μL 不含DNase的RNase(10 mg/mL),37 °C保温15 min, -20 °C保存。DNA浓度由Beckman DU7500分光光度计在260 nm下测定。 $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ 比值大于1.8的样品用于试验。

1.4 RT-PCR 反应

参照GenBank中已发表的嗜淀粉瘤胃杆菌的16S rDNA序列,利用DNA SIS v2.5软件进行多序列同源性比较,从中找出其特异序列,利用Primer Premier 5.0软件自行设计及筛选引物,嗜淀粉瘤胃杆菌(*Ruminobacter amylophilus*)上游引物为CAACCAGTCGCATTCAGA,下游引物为CACTACTCATGGCAACAT。采用PE 7500型荧光定量PCR仪(SYBR Green I 荧光染料)进行定量扩增。根据随机挑选模板的浓度梯度确定检测效率。PCR反应体系为25 μL :模板(质量浓度调整在30~70 ng/mL之间),12.5 μL 的10 \times Mastermix(包括FastStart Taq酶、reaction DNA、dNTP、 MgCl_2 和SYBR Green I染料),上、下游引物0.8~1.0 μL 。反应条件:95 °C 3 min 变性;95 °C, 30 s;退火30 s,退火温度为57 °C,产物长度为642 bp;72 °C延伸1 min,共33个循环。荧光检测设在每个循环的最后一步。熔解曲线从65~95 °C,每秒增加0.1 °C,收集荧光信号。

1.5 统计分析

瘤胃微生物PCR拷贝数(拷贝/ μL)经lg转化后,采用SAS 9.0版本(SAS Inst., Inc., Cary, NC) MIXED程序进行分析,个体牛为随机效应,产奶量、胎次和泌乳阶段为固定效应,用Tukey法进行多重比较,显著水平为0.05。分析所用模型为:

$$y_{ijkl} = \mu + y_i + p_j + s_k + e_{ijkl}$$

式中: y_{ijkl} 为试验期间第*i*个产乳量水平第*j*个胎次和第*k*个泌乳阶段牛的观测值; μ 为总体平均数; y_i 为第*i*(高产、中产)个产乳量水平效应; p_j 为第*j*(初产、经产)胎次效应; s_k 为第*k*(中期、后期)个泌乳阶

段的效应; e_{ijkl} 为随机误差。

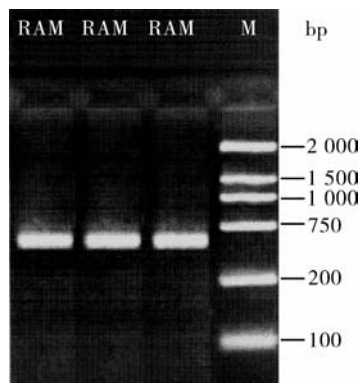
2 结果与分析

2.1 目标片段的扩增

用设计的引物进行 PCR 检测, 扩增出的目的片段, 结果见图 1。产物长度与设计的目标片段一致, PCR 产物(图 1) 条带清晰、产物唯一, 特异性好, PCR 产物的亮度表明产物浓度较高。

2.2 Real Time PCR 熔解曲线

目标基因的 RT-PCR 扩增图和熔解曲线见图 2, 图 3。在 RT-PCR 扩增体系中, 细菌在相同模板浓度情况下, 均检测到了荧光信号, 熔解曲线 T_m 值唯一。表明 PCR 产物是单一的、特异的。标准曲线的决定系数均在 0.95 以上可用于定量分析。



RAM 为嗜淀粉瘤胃杆菌的平行样; M 为标准样品。

图 1 嗜淀粉瘤胃杆菌 16S rRNA 片段扩增电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of target 16S rRNA fragment of *Ruminobacter amylophilus*

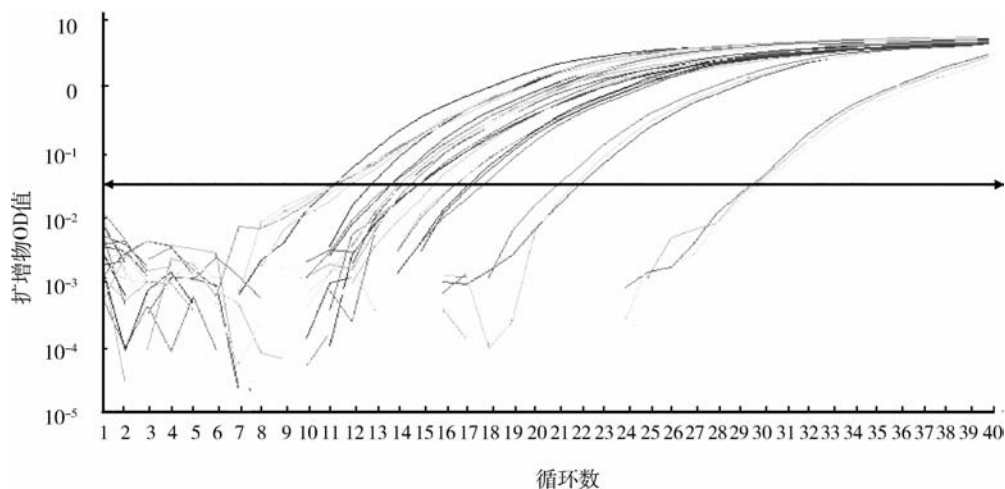


图 2 RT-PCR 扩增图

Fig. 2 Amplification plot of amplified products by real time PCR

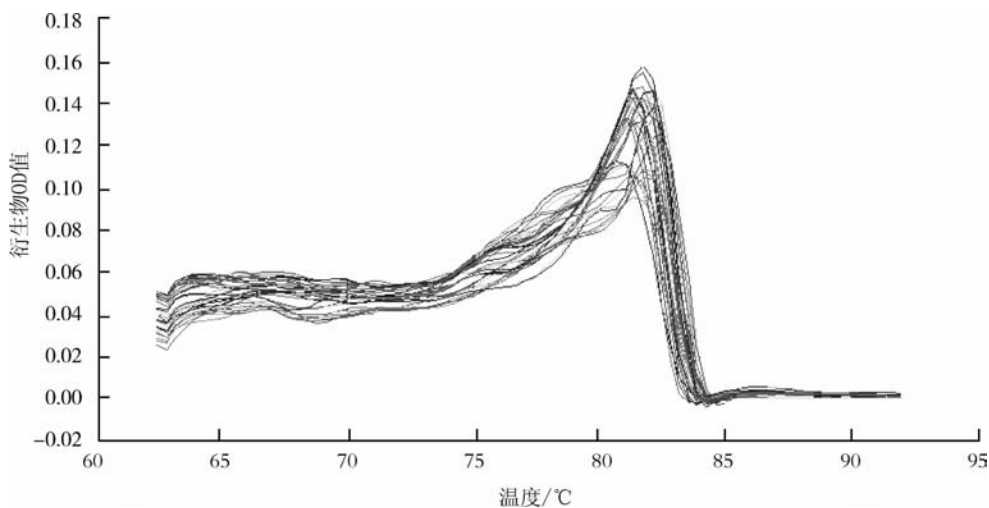


图 3 RT-PCR 熔解曲线

Fig. 3 Dissociation curves of amplified products by real time PCR

2.3 对嗜淀粉瘤胃杆菌含量的影响

各生理状态奶牛瘤胃液中嗜淀粉瘤胃杆菌的含量见表1。利用 RT-PCR 对瘤胃液中 DNA 的定量结果经 lg 转化后,泌乳中期奶牛嗜淀粉瘤胃杆菌为 7.70,后期奶牛瘤胃液中嗜淀粉瘤胃杆菌为 7.95,后期牛高 3.1%,二者差异不显著;高产牛为 7.46,中产牛为 8.20,中产牛高于高产牛 9.9%,二者差异不显著;初产牛为 7.97,经产牛为 7.68,初产牛高于高产牛 3.8%,二者差异亦不显著。

表1 瘤胃液中嗜淀粉瘤胃杆菌的含量

Table 1 Quantities of ruminal cellulolytic bacteria in dairy cattles

试验设计		嗜淀粉瘤胃杆菌/lg
产奶量	高产	7.46±0.47
	中产	8.20±0.47
胎次	初产	7.97±0.42
	经产	7.68±0.51
泌乳阶段	中期	7.70±0.47
	后期	7.95±0.47

3 讨论

1)RT-PCR 是一种现代分子分析技术,能够较为准确的定量瘤胃微生物。Tajima 等^[10]首次利用 Real-time PCR 方法研究了日粮变化对 13 种瘤胃细菌数量的影响,并对不同日粮以及同一动物在日粮转换 3 和 28 d 的上述菌株的变化情况进行了详细阐述。此后,研究者们陆续把 RT-PCR 应用于其他瘤胃微生物的研究^[9]。Ouwkerk 等^[11]对牛瘤胃内接种的乳酸利用菌 *Mphaera elsdenii* Y4 的数量进行检测,在接种之前未发现该菌,接种 2 h 细菌数达到 313×10^6 和 311×10^6 mL⁻¹,50 h 后达 217×10^6 和 714×10^6 mL⁻¹。Klieve 等^[12]利用同样的方法研究了 *Megasphaera elsdenii* YE34 和 *Butyrivibrio fibrisolvens* YE44 在牛瘤胃中的建立情况,发现 *Streptococcus bovis* 细菌数一直保持恒定(10^7 mL⁻¹)的水平,*M. elsdenii* YE34 在饲喂干草日粮之前未检测到,但在接种后的动物中很快检测到细菌数为 10^6 mL⁻¹,并且在接种 4 d 后上升了 100 倍;*B. fibrisolvens* 在干草日粮中细菌数达

10^6 mL⁻¹,当转换为高精料日粮时迅速下降,并在转换日粮的第 8 天检测不到该菌。这些研究为 *M. elsdenii* 益生菌在瘤胃中的建立提供了一定依据。Sylvester 等^[13]则首次利用 RT-PCR 技术检测了牛在饲喂 2 种 NDF 的日粮时瘤胃液和十二指肠食糜纤毛虫的生物量,使原虫 N 能从微生物蛋白中独立出来。在这些研究中荧光定量 PCR 法被证明是一种较为有效的微生物定量方法。

2)嗜淀粉瘤胃杆菌是一类严格厌氧的革兰氏阴性菌,是目前已知的蛋白质降解活性最高的菌株之一,并且具有很强的淀粉酶活性,因而对蛋白质、淀粉等饲料的降解有重要作用^[14]。瘤胃环境对微生物的生长有明显影响。奶牛在热应激状态下,食欲降低,采食量减少,饮水量增大,瘤胃内容物流通速度加快,导致营养浓度降低;基础代谢增加,体热释放不畅,会导致体温增加;流涎增多,会导致瘤胃的 pH 降低。以前的研究表明高产奶牛比低产奶牛、初产奶牛比经产奶牛对热应激更加敏感^[15],但是目前关于热应激瘤胃环境的变化对对奶牛瘤胃微生物的影响报道较少。Tajima 等^[6]报道了热应激对后备牛瘤胃微生物的影响,第 1 个试验的结果为瘤胃微生物无明显变化,但第 2 和第 3 个试验结果瘤胃微生物组成有明显变化。在本研究中,奶牛经历热应激后,嗜淀粉瘤胃杆菌含量各类牛之间均未达到统计上的差异,一方面可能是由于本次试验牛所用的饲料和所处的环境是一样的,饲料和环境对瘤胃微生物的影响有重要作用,另一方面可能与牛个体之间差异较大有关,但在数值上可以看出中期牛低于后期牛,高产牛低于中产牛,经产牛低于初产牛,特别是高产牛低于中产牛近 10 倍。与前期的研究结果相联系,泌乳后期牛对热应激的耐受高于中期牛,中产牛高于高产牛,初产牛高于经产牛。是否可以据此推断,在热应激条件下,奶牛瘤胃发酵减弱,营养利用降低,与嗜淀粉瘤胃杆菌对蛋白和淀粉的分解作用有关,需要大量的试验研究进行证实。

4 结论

在奶牛遭受热应激时,泌乳后期牛与中期牛、中产牛与高产牛、经产牛与初产牛嗜淀粉瘤胃杆菌含量无明显差异。

参 考 文 献

- [1] Krause D O, Russell J B. How many ruminal bacteria are there? [J]. *Journal of Dairy Science*, 1996, 79(8):1467-1475
- [2] 高巍, 孟庆翔. 瘤胃细菌, 原虫和真菌降解植物细胞壁的相对贡献及其互作[J]. *中国农业大学学报*, 2003, 8(5):98-104
- [3] Stackebrandt E, Hippe H. Transfer of *Bacteroides amylophilus* to a new genus *Ruminobacter* gen. nov., nom. rev. as *Ruminobacter amylophilus* comb nov [J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 1986, 8(3):204-207
- [4] 于萍, 王加启, 卜登攀, 等. 日粮添加纳豆芽孢杆菌对断奶后犊牛胃肠道纤维分解菌的影响[J]. *中国农业大学学报*, 2009, 14(1):111-116
- [5] 刘开朗, 卜登攀, 王加启, 等. 六个不同品种牛的瘤胃微生物群落的比较分析[J]. *中国农业大学学报*, 2009, 14(1):13-18
- [6] Tajima K, Nonaka I, Higuchi K, et al. Influence of high temperature and humidity on rumen bacterial diversity in Holstein heifers[J]. *Anaerobe*, 2007, 13(2):57-64
- [7] Benchaar C, Petit H V, Berthiaume R, et al. Effects of essential oils on digestion, ruminal fermentation, rumen microbial populations, milk production, and milk composition in dairy cows fed alfalfa silage or corn silage [J]. *Journal of Dairy Science*, 2007, 90(2):886-897
- [8] Newbold C J, McIntosh F M, Williams P, et al. Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2004, 114(1/2/3/4):105-112
- [9] 赵玉华, 王加启. 利用实时定量 PCR 对瘤胃甲酸甲烷杆菌定量方法的建立与应用[J]. *中国农业科学*, 2006, 39(01):161-169
- [10] Tajima K, Aminov R I, Nagamine T, et al. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with Real-time PCR[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(6):2766-2774
- [11] Ouwerkerk D, Klieve A V, Forster R J. Enumeration of *Megasphaera elsdenii* in rumen contents by real-time Taqnuclase assay[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, 92:753-758
- [12] Klieve A V, Hennessy D, Ouwerkerk D, et al. Establishing populations of *Megasphaera elsdenii* YE 34 and *Butyrivibrio fibrisolvens* YE 44 in the rumen of cattle fed high grain diets fed high grain diets[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, 95:621-630
- [13] Sylvester J T, Karnati S K R, Yu Z, et al. Development of an assay to quantify rumen ciliate protozoal biomass in cows using real-time PCR[J]. *Journal of Nutrition*, 2004, 134(12):3378-3384
- [14] 王梦芝, 詹爱军, 高杨, 等. 利用实时定量 PCR 研究不同蛋白质饲料对嗜淀粉瘤胃杆菌生长参数的影响[J]. *动物营养学报*, 2010, 22(2):327-334
- [15] Kadzere C T, Murphy M R, Silanikove N, et al. Heat stress in lactating dairy cows: a review[J]. *Livestock Production Science* 2002, 77(1):59-91

(责任编辑: 苏燕)