

不同纤维素培养基及温度对体外培养瘤胃细菌多样性的影响

曾燕¹ 孙朋¹ 倪学勤^{1,2*} 杨杰¹ 曾东^{1,2} 张洪瑜^{1,2}

(1. 四川农业大学 动物医学院,四川 雅安 625014;

2. 动物疫病与人类健康四川省重点实验室,四川 雅安 625014)

摘要 为探讨瘤胃细菌多样性,采用聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(Polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis,PCR-DGGE)技术结合共性及特异性条带的克隆测序和聚类分析及主成分分析,对牛体外厌氧条件下瘤胃细菌在 CMC、PCS、J、K 培养基及 37 和 50 °C 培养温度下的多样性进行研究。结果表明:1)37 °C 条件下不同培养基的 DGGE 图谱差异较大,虽然具有较高的平均条带数,CMC 和 K 培养基样品分别为 20 和 27 条,但各样品间的相似性系数较低,J 和 CMC 培养基间的相似性系数为 0.84,J 和 PCS 培养基间的相似性系数仅为 0.75。2)50 °C 条件下不同培养基的 DGGE 图谱差异较小,平均条带数较低,CMC 和 K 培养基样品均为 15 条,但各样品间的相似性较高,CMC 和 PCS 培养基间的相似性系数为 0.89;而 J 和 PCS 培养基间的相似性系数高达 0.97。3)DGGE 图谱中共性条带序列表明瘤胃优势细菌主要是 *Streptococcus macedonicus*,而特异性条带主要是 *Escherichia coli*、*Firmicutes* 以及 *Brevundimonas*。体外厌氧条件下不同纤维素培养基和温度在一定程度上影响瘤胃细菌的多样性。

关键词 PCR-DGGE; 瘤胃细菌; 纤维素; 聚类分析; 主成分分析 (PCA)

中图分类号 S 182

文章编号 1007-4333(2013)06-0148-05

文献标志码 A

Evaluate the diversity of rumen bacteria on anaerobic culture with different cellulose enrichment medium and temperature *in vitro*

ZENG Yan¹, SUN Peng¹, NI Xue-qin^{1,2*}, YANG Jie¹, ZENG Dong^{1,2}, ZHANG Hong-yu^{1,2}

(1. College of Veterinary, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China;

2. Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Ya'an 625014, China)

Abstract The study is to explore the diversity of rumen bacteria of anaerobic culture *in vitro*. The research methods included polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE), cluster analysis and PCA. CMC, PCS, J and K mediums were used in this trial and three rumen content samples were incubated at 37 and 50 °C respectively. Some common and special bands were identified at the same time. The results showed that the DGGE profiles of different mediums were significantly to each other at 37 °C, although it had the higher number of bands which the average bands of CMC and k mediums were 20 and 27. The similarity coefficient between J and CMC medium was 0.84, and it reduced to 0.75 between J and PCS medium. The DGGE profiles of different mediums were similar to each other at 50 °C, it had the lower number of bands, and the average samples of CMC and k mediums were only with 15 bands. However, the coefficient between CMC and PCS medium was 0.89, while the similarity coefficient between J and PCS medium could get 0.97. *Streptococcus macedonicus* was predominant in the upper G1 tract. The special bands in rumen content were *Escherichia coli*, *Firmicutes* and *Brevundimonas*. Furthermore, the diversity of rumen bacterial of anaerobic culture to some extent was affected by cellulose enrichment conditions *in vitro*.

Key words PCR-DGGE; rumen bacterial; cellulose; cluster analysis; PCA

收稿日期: 2013-05-02

基金项目: 教育部留学回国人员科研启动基金资助(200835-1); 四川省学术带头人培养基金资助

第一作者: 曾燕, 硕士研究生, E-mail: zengyanA@foxmail.com

通讯作者: 倪学勤, 教授, 博士生导师, 主要从事动物微生态研究, E-mail: xueqinni@foxmail.com

将富含纤维素的秸秆开发为饲料将具有巨大的经济价值,添加微生物复合酶制剂可使秸秆饲料的利用率大幅度的提高^[1]。纤维素是地球上含量丰富的碳水化合物,而位于植物细胞壁纤维素之间起抗压作用的木质素却难以被微生物和酶降解^[2]。反刍动物瘤胃微生物能有效地将纤维素消化并作为自身重要的能量来源。成年牛瘤胃中栖息着数量庞大的微生物,包括细菌、真菌、原虫和古菌,而细菌在分解纤维素的过程中发挥着重要作用^[3]。因此,研究瘤胃纤维素分解细菌对提高反刍动物生产性能及开发秸秆饲料具有重要意义。

人们长期以来主要采用分离和培养的方法对瘤胃微生物菌群结构进行研究^[4-5],不但费时费力且重复性差。目前仅有11%左右的微生物种类通过纯培养技术被分离^[6]。近年来,国内外学者对瘤胃微生物进行了研究,对其多样性和功能有了一定的认识^[7-9],但对其中影响宿主代谢和生产性能的关键功能菌的分离、鉴定、作用模式及其利用的研究仍处于初步阶段,许多占优势的细菌至今还未在实验室里被分离出来。聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)技术被广泛用于鉴定微生物种群及进行复杂微生物群落结构演替规律、微生物种群动态、基因定位和表达调控的评价分析^[10],能更加全面准确地反映复杂肠道微生物菌群多样性。本研究通过将瘤胃样品进行富集培养后采用PCR-DGGE技术并应用聚类分析和主成分分析(PCA),同时结合共性条带和特异性条带的克隆和测序,旨在为评估反刍动物瘤胃细菌在不同培养条件下的多样性及了解瘤胃细菌种类提供依据,更可为后续分离纤维素降解细菌时富集培养条件的选择提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 样品的采集

瘤胃内容物采自四川省雅安市飞机坝屠宰场。无菌采集3头牛瘤胃内容物各约20~30 g(标记为A、B、C),置-80℃冰箱保存备用。

1.1.2 培养基

CMC培养基^[11-12]、纤维素富集培养基(J)^[13]、蛋白胨纤维素培养基(PCS)^[14]、K培养基(与CMC培养基进行对照,无CMC-Na、微晶纤维素和纤维素粉),121℃灭菌15 min。

1.2 瘤胃样品的富集培养

取瘤胃样品A、B、C各1 g至装有30 mL培养基的三角瓶中,分别在37和50℃厌氧培养48 h后摇匀分装于1.5 mL EP管中,置-20℃保存。

1.3 细菌总DNA的提取

参照文献^[15]提取细菌总DNA。用核酸浓度测定仪测定总DNA浓度后置-20℃保存备用。

1.4 基因组总DNA 16S rDNA V₃区扩增

参照文献^[16]根据大肠杆菌16S rRNA基因V₃片段(339~539)设计合成引物:上游引物为带GC发夹的5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG T-3',下游引物为5'-GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA C-3'。PCR反应体系包括1.0 μL上游引物、1.0 μL下游引物、12 μL的2×Taq MasterMix、1.0 μL DNA和10 μL ddH₂O,同时设置阴性对照管。PCR扩增条件为94℃预变性4 min;94℃变性30 s,58℃退火30 s,72℃延伸2 min,30个循环;72℃延伸10 min。用1.0%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物片段大小和浓度。

1.5 PCR-DGGE分析

参照文献^[17]使用Bio-Rad Dcode进行PCR-DGGE凝胶电泳,电泳梯度为35%~65%(7 mol/L尿素和40%甲酰胺),变性方向与电泳方向一致。采用1×TAE作电泳缓冲液,100 V,60℃,16 h,经硝酸银染色后用Bio-Rad GS800 Calibrated Densitometer扫描成像。

1.6 共性及特异性条带的克隆测序

割胶回收DGGE图谱上的共性和特异性条带浸泡于缓冲液,按1.4方法做PCR扩增,产物做DGGE电泳确认回收片段的正确性,重复该过程3次。使用不带GC发夹的引物对回收纯化的DNA进行PCR扩增。采用pMD[®] 19-T Vector试剂盒对目标模板PCR产物进行连接后转入大肠杆菌DH5α感受态细胞中,涂布含氨苄青霉素的营养琼脂平板,每个条带选取3个阳性克隆送上海英潍捷基贸易有限公司测序。应用Chromas 2软件对测定序列进行编辑,非嵌合体序列在GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)数据库中进行比对分析,寻找亲缘关系最近的细菌或克隆。

1.7 统计分析

用SAS 9.1软件和NTSYS 2.1软件对数据进

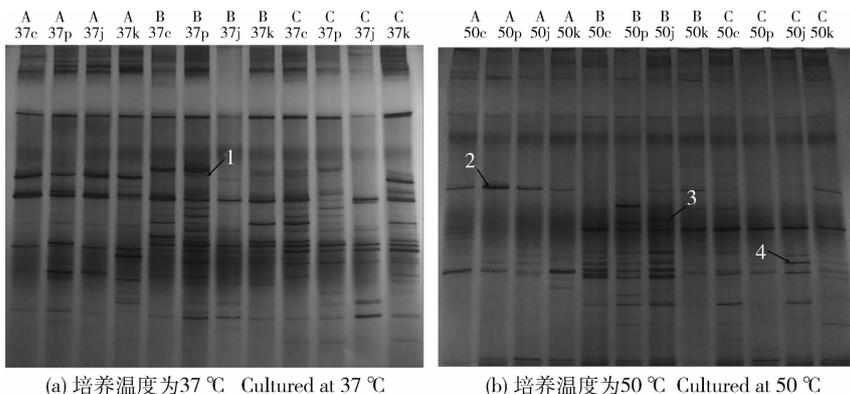
行聚类分析及主成分分析。

2 结果与分析

2.1 不同培养条件下瘤胃样品 16S rDNA V₃ 区的 DGGE 图谱分析

DGGE 图谱中强的电泳条带反应瘤胃样品中的优势菌群,条带数量和位置的复杂性代表细菌菌群的多样性。不同纤维素培养基和温度的样品均产生了丰富的电泳条带,但瘤胃细菌菌群结构和组成

存在较大差别:50 °C 样品与 37 °C 相比其物种丰富度较低,用 CMC 和 K 培养基培养的样品在 50 °C 条件下的平均条带数均仅为 15 条,而在 37 °C 条件下的平均条带数均分别为 20、27 条;同样用 PCS 培养基培养的样品在 50 °C 条件下的平均条带数仅为 12 条,而在 37 °C 条件下高达 27 条。50 °C 条件下各培养基的瘤胃样品平均条带数差异不大,而在 37 °C 条件下不仅具有较高的条带数,且各培养基的样品条带数差异较大,可能与培养温度有关(图 1)。



A、B、C 为瘤胃内容物样品;37 为 37 °C;50 为 50 °C;c 为 CMC 培养基;p 为 PCS 培养基;j 为 J 培养基;k 为 K 培养基。下图同。1、2、3 和 4 为条带 1、2、3、4。

A, B, C. Rumen content samples; 37. 37 °C; 50. 50 °C; c. CMC medium; p. PCS medium; j. J medium; k. K medium. The same as below. 1, 2, 3 and 4 band 1, 2, 3, 4.

图 1 不同条件富集培养后样品细菌 16S rDNA V₃ 区 PCR-DGGE 图谱

Fig. 1 PCR-DGGE profiles of 16S rDNA V₃ region of the samples under different cultures

2.2 PCR-DGGE 图谱的聚类分析

聚类分析结果(图 2)显示,不同纤维素培养基和培养温度影响样品细菌的多样性:在 37 °C 的样品中,J 和 CMC 培养基间的相似性系数为 0.84;J 和 PCS 培养基间的相似性系数仅为 0.75。在 50 °C 的样品中,CMC 和 PCS 培养基间的相似性系数为

0.89;而 J 和 PCS 培养基间的相似性系数高达 0.97。温度对样品细菌的培养有一定影响:37 °C 的样品聚为两大族,而全部 50 °C 的样品聚为一大族,PCS 和 J 培养基间的相似性系数在 37 °C 仅为 0.75,而在 50 °C 高达 0.97,可能与瘤胃细菌生存的环境温度有关。

2.3 PCR-DGGE 图谱条带的 PCA 分析

对 DGGE 图谱条带的 PCA 分析(图 3)同聚类分析的结果相一致。主成分因子 1(PC1)的贡献率为 24.40%,主成分因子 2(PC2)的贡献率为 14.16%;PC1 明显地将所有样品聚在图的右边,而 PC2 则明显的将所有样品分为两部分,50 °C 的样品主要分布在图的上部,37 °C 的样品主要分布在图的下部;在 50 °C 的样品中,PC2 将 CMC、PCS 和 J 培养的样品同 K 培养的样品区别开来;37 °C 的样品中,PC2 同样将 CMC、PCS 和 J 培养的样品同 K 培养的样品基本分开。可能与培养基中的纤维素富集

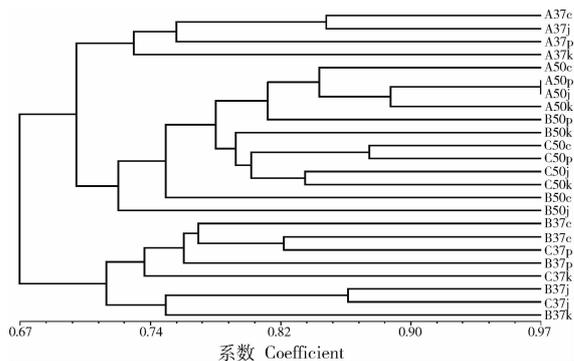


图 2 PCR-DGGE 图谱条带的聚类分析

Fig. 2 Cluster dendrogram of PCR-DGGE bands in gel

和营养物质有关。

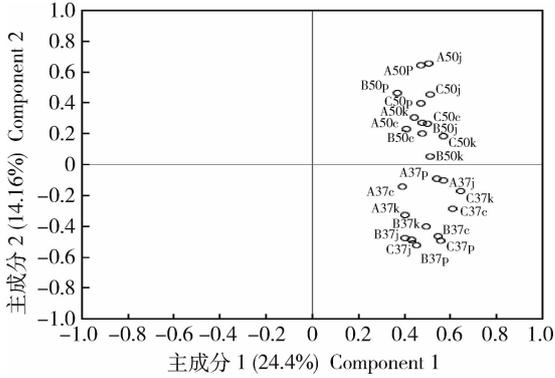


图 3 PCR-DGGE 图谱条带的 PCA 分析

Fig. 3 PCA analysis of PCR-DGGE profiles

2.4 不同培养条件下瘤胃共性和特异性条带的克隆测序结果分析

DGGE 图谱割胶回收的条带见图 1, 序列比对结果见表 1。不同纤维素富集培养后的瘤胃细菌菌群结构丰富, 含有大量链球菌 (*Streptococcus macedonicus*)。37 °C 培养条件下的 1 个特异性条带为大肠埃希菌 (*Escherichia coli*), 而 50 °C 培养条件下的 2 个特异性条带分别为未培养厚壁菌门 (*Firmicutes*) 和未培养短波单胞菌属 (*Brevundimonas*) 等。

在 4 个测序结果中, 与 GenBank 数据库中微生物的同源性绝大多数都到达了 100%, 仅条带 4 同数据库中与之同源性最高的未培养微生物的相似性

表 1 DGGE 共性条带和特异性条带的基因片段序列的对比结果

Table 1 Comparison of genomic sequences in common bands and special bands by sequencing and BLAST analysis

条带号	序列长度/bp	GenBank 数据库中最相近的菌种名称(登录号)	相似性/%	备注
Band name	Sequence size	Closest relatives found in the GenBank database(Access number)	Similarity	Note
条带 1	199	<i>Escherichia coli</i> strain ATCC 11303 clone ControlH02(JF508263.1)	100	
条带 2	224	<i>Streptococcus macedonicus</i> strain AB1(JX188068.1)	100	常见条带
条带 3	199	Uncultured <i>Firmicutes</i> bacterium clone CTF2-127(GU959241.1)	99	
条带 4	174	Uncultured <i>Brevundimonas sp.</i> clone GI2-SSB-cs-D01(FJ193663.1)	96	

为 96%, 说明试验中所得的序列与已鉴定的微生物有较高的亲缘性。

3 讨论

3.1 不同培养条件下瘤胃样品 DGGE 图谱分析

瘤胃内栖息着复杂、多样和数量巨大的微生物^[18]。DGGE 图谱(图 1)显示不同培养基和温度条件下, 瘤胃细菌物种相当丰富, 各条件下样品的平均条带数高达 20 条。CMC 和 PCS 培养基富含丰富的羧甲基纤维素钠盐、微晶纤维素和纤维素粉等成分, 为瘤胃纤维素降解菌提供了丰富的营养成分。戈婷婷等^[19]研究添加不同水平的甘露寡糖、果寡糖和大豆寡糖的日粮饲喂锦江黄牛后, 在不同程度上促进了瘤胃微生物的生长, 最大生长效率高达 59.50 g/kg。Li 等采用 PCR-DGGE 分析比较了牛瘤胃微生物, 发现瘤胃内容物中的微生物多样性指数明显高于瘤胃组织^[20]。本研究发现在不同纤维素培养基和温度下瘤胃样品 DGGE 图谱存在较大差异, 可能是因为纤维素富集和温度从不同程度影

响瘤胃细菌的多样性。

3.2 PCR-DGGE 图谱的聚类分析和 PCA 分析

37 °C 条件下用 CMC 和 PCS 培养基所富集培养的菌群结构较类似, 可能是 CMC 和 PCS 2 种培养基的营养成分基本类似, 为细菌的生长提供了较类似的营养物质; 而在 50 °C 富集培养条件下, 无论用 CMC 培养基, 还是 PCS 培养基所富集培养的菌群结构相似度非常高。因为瘤胃细菌菌群的生长环境温度为 39~41 °C, 对于大多数瘤胃细菌而言, 温度高于 50 °C 条件下即引起死亡^[21], 仅有少数耐高温的细菌能生存下来。所以 50 °C 条件下的瘤胃细菌相似性系数高, 各培养基的微生物多样性异小。因此, 对纤维素分解菌进行富集培养时, 可以从 CMC 和 PCS 2 种培养基中选取 1 种, 同时可选择适当的温度培养嗜热菌。

3.3 不同纤维素富集培养条件下共性条带和特异性条带分析

孔庆亮等^[22]应用 PCR-16S rDNA 鉴定和动态监测奶牛瘤胃液细菌种类, 鉴定出具有代表性的细

菌为牛链球菌、蜡样芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌和嗜热链球菌。同样,本研究在不同纤维素富集培养条件下鉴定出的瘤胃优势菌之一为链球菌。Mao等^[23]通过焦磷酸测序技术评估了奶牛粪样的微生物,发现厚壁菌门和拟杆菌为优势菌。本试验通过富含纤维素物质的J培养基培养后的特异性条带鉴定为未培养短波单胞菌和未培养的厚壁菌门菌。通过PCS培养基培养后的特异性条带鉴定为大肠杆菌,可能是因为PCS培养基中含有的蛋白胨为微生物的生长提供了充足的氮源及维生素等物质。目前随着分子生物学的发展,越来越多的瘤胃微生物信息被人们掌握,大量有价值的瘤胃微生物还有待探究。

4 结 论

同一温度条件下,CMC和PCS培养基的瘤胃样品细菌具有较高的物种丰富度。瘤胃细菌菌群在37℃条件下有较高的物种丰富度,而可用50℃条件下筛选培养瘤胃嗜热菌。

参 考 文 献

- [1] 刘瑞玲,苏希孟.复合酶制剂-秸秆分解剂的应用研究[J].畜牧兽医学杂志,2012,31(1):12-14
- [2] 赵天章,李慧英,闫素梅.反刍动物饲料纤维物质瘤胃降解规律研究进展[J].饲料工业,2010,31(7):28-31
- [3] 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
- [4] Van der wien P W J, Biesterveld S, Notermans S, et al. Role of volatile fatty acids in development of the caecal microflora in broiler chickens during growth[J]. Appl Environ Microbiol, 2000,66:2536-2540
- [5] 龙森,邢欣,逢晓阳.犊牛瘤胃内黏膜乳杆菌的分离鉴定及生物学特性研究[J].畜牧与兽医,2009,41(3):70-72
- [6] Edwards J E, Mcewan N R, Travis A J, et al. 16S rDNA library-based analysis of ruminal bacterial diversity [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2004,86(3):263-281
- [7] 王艳明,王俊红,王翀,等.不同饱和度脂肪添加抗氧化剂对瘤胃发酵、抗氧化状态和微生物区系的影响[J].中国畜牧兽医学报,2011,31(1):90-93
- [8] 冯薇,王加启,刘开朗,等.参与瘤胃内纤维素降解过程的主要微生物研究进展[J].中国畜牧兽医,2011,38(2):37-42
- [9] 卢玉飞,周凌云,赵圣国,等.近10年瘤胃微生物分离培养研究进展[J].中国微生态学杂志,2012,24(9):856-861
- [10] 艾丹,郭春华,尹永志,等.16S rRNA 指纹分析技术在瘤胃微生物研究中的应用[J].饲料研究,2011,(2):10-12
- [11] 郝月,杨翔华,张晶,等.秸秆纤维素分解菌的分离筛选[J].中国农学通报,2005,21(7):58-60
- [12] 祝令香,徐建,于巍,等.一株纤维素降解菌的鉴定[J].农业生物技术学报,2001,9(3):255-257
- [13] Nakajima-Kambe, Okada T, N Takeda M, et al. Screening of novel cellulose-degrading bacterium and its application to denitrification of groundwater [J]. J Biosci Bioeng, 2005, 99(4):429-433
- [14] 王伟东,崔宗均,杨洪岩,等.高效稳定纤维素分解菌复合系WSC-6的稳定性[J].中国环境科学,2005,25(5):567-571
- [15] Li M, Gong J, Cotrill M, et al. Evaluation of QIAamp[®] DNA Mini Stoll Kit for microbial ecological studies[J]. J Microbiol Meth, 2003,54:13-20
- [16] Walter J, Hertel C, Tannock G W, et al. Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis [J]. Appl Environ Microb, 2001,67:2578-2585
- [17] 倪学勤, Joshua Gong, Hai Yu, 等.采用PCR-DGGE技术分析蛋鸡肠道细菌种群结构及多样性[J].畜牧兽医学报,2008,39:955-961
- [18] 荆元强,宋恩亮,杨维仁,等.牛瘤胃微生物定量测定方法研究进展[J].动物医学进展,2011,32(7):93-96
- [19] 戈婷婷,瞿明仁,张晖,等.功能性寡糖对锦江黄牛瘤胃发酵及微生物生长效率的影响[J].动物营养学报,2012,24(3):557-562
- [20] Li M, Zhou M, Adamowicz E, et al. Characterization of bovine ruminal epithelial bacterial communities using 16S rDNA sequencing, PCR-DGGE, and qRT-PCR analysis [J]. Vet Microbiol, 2012,155(1):72-80
- [21] 张彩英,胡国良,曹华斌.反刍动物瘤胃内环境的特点及调控措施[J].中国畜牧兽医,2010,37(4):18-20
- [22] 孔庆亮,王振勇,柴同杰,等.奶牛瘤胃需氧及兼性厌氧菌的PCR-16S rDNA 鉴定及日粮的影响[J].畜牧兽医学报,2008,39(10):1367-1372
- [23] Mao S, Zhang R, Wang D, et al. The diversity of the fecal bacterial community and its relationship with the concentration of volatile fatty acids in the feces during subacute rumen acidosis in dairy cows[J]. Bmc Vet Res, 2012,8(1):237