

曹连宾,崔占鸿,孙红梅,等.全放牧牦牛与舍饲牦牛瘤胃细菌多样性比较[J].江苏农业科学,2016,44(3):242-248.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.03.068

全放牧牦牛与舍饲牦牛瘤胃细菌多样性比较

曹连宾,崔占鸿,孙红梅,郝力壮,刘书杰

(青海大学畜牧兽医科学院/青海省畜牧兽医科学院/青海省高原放牧家畜营养与生态国家重点实验室培育基地/
青海省高原放牧家畜动物营养与饲料科学重点实验室,青海西宁 810016)

摘要:以青海省黄南藏族自治州河南蒙古族自治县全放牧牦牛和青海省畜牧兽医科学院舍饲牦牛瘤胃内容物为样本,对牦牛瘤胃细菌多样性进行分析及比较。使用细菌通用引物进行瘤胃细菌 16S rRNA 基因序列的扩增,以 16S rRNA 序列分析技术分析瘤胃细菌多样性,并构建 16S rRNA 基因克隆文库。结果表明,放牧牦牛与舍饲牦牛瘤胃细菌都主要分为两大类:Firmicutes 类和 Bacteroidetes 类。放牧牦牛瘤胃 Firmicutes 类所占比例(79.52%)比舍饲牦牛瘤胃 Firmicutes 类所占比例(62.79%)要高,Bacteroidetes 类在瘤胃内所占比例放牧牦牛(19.27%)比舍饲牦牛(25.58%)要低。放牧牦牛与舍饲牦牛瘤胃内纤维降解菌的差别不大,都为瘤胃内优势菌群,但舍饲牦牛瘤胃内比放牧牦牛瘤胃内的蛋白降解菌和淀粉降解菌更丰富。

关键词:牦牛;放牧;舍饲;瘤胃细菌;16S rRNA 基因序列

中图分类号: S823.8⁺55 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)03-0242-07

青海作为中国牦牛第一大省,拥有丰富的牦牛资源,但放牧草场属于高寒草甸类型,牧草返青期时间短,枯黄期时间长,枯黄期牧草营养品质差难以消化利用,造成青海牦牛在冬季掉膘严重的现象,这些情况严重制约了青海牦牛业的发展。而牦牛舍饲情况下则能避免这一情况,但瘤胃细菌多样性受日粮结构影响显著。An 等(2005 年)曾报道全放牧牦牛其瘤胃细菌比之黄牛(补饲)的细菌丰富度要低^[1]。但是全放牧

牦牛与舍饲牦牛瘤胃细菌多样性比较的研究至今尚未见报道。

1 材料和方法

1.1 样品采集

青海省黄南藏族自治州河南蒙古族自治县牦牛屠宰厂 3 头 4 岁牦牛瘤胃内容物;舍饲牦牛瘤胃内容物取自青海省畜牧兽医科学院 3 头 4 岁舍饲牦牛瘤胃内容物。全放牧牦牛饲料为天然牧草(四川嵩草、细果苔草、高山早熟禾),舍饲牦牛饲料(精料:粗料=3:7,粗料为燕麦青干草,精料原料为玉米、大豆粕、菜籽粕、麸皮)。

1.2 试剂及培养基

1.2.1 试剂 引物由上海生工生物工程有限公司合成;CTAB(十六烷基三甲基溴化铵),EDTA(乙二胺四乙酸),

收稿日期:2015-03-18

基金项目:国家“973”计划前期研究专项(编号:2012CB722906);青海省科技支撑计划(编号:2014-NS-112)。

作者简介:曹连宾,硕士研究生,主要从事动物营养与饲料科学的研究。E-mail:caolianbin@163.com。

通信作者:刘书杰,研究员,主要从事动物营养与饲料科学的研究。E-mail:mkyshj@126.com。

加,从而提高猪对日粮蛋白质的消化率。小麦发芽后,导致籽粒中淀粉酶活性明显增加,降落值下降,淀粉水解成糊精、糖,淀粉黏度下降,可溶性戊聚糖大幅增加^[8],这有助于提高猪对日粮中淀粉的消化率^[9],可能是本试验各处理组小麦型日粮较对照组常规日粮能量消化率显著提高的主要因素。从动物生产角度看,日粮中添加 30% 发芽小麦,日粮能量、蛋白质和钙消化率最高;从环境磷减排效果考虑,日粮以添加发芽 20% 小麦的磷素消化率最高,猪粪中磷含量最低。

常规日粮中有效磷不足,必需补充磷酸钙钙等外源磷素,以满足猪生长中对磷素的需求。小麦经发芽处理后能够产生足够的植酸酶活性,增加动物对天然磷素的利用效率,实现日粮外源磷素的零添加,达到磷素减量化使用的目的。

参考文献:

[1]孙国锋,周炜,何加骏,等.猪粪沼液施用后土壤理化性状及小麦产量的变化[J].江苏农业学报,2012,28(5):1054-1060.

[2]巴祖埃洛希·林治庆.生物营养强化农产品开发和应用[M].尹雪斌,译.北京:科学出版社,2010:127-130.

[3]Whalen J K, Chang C. Phosphorus accumulation in cultivated soils from long-term annual applications of cattle feedlot manure[J]. Journal of Environmental Quality, 2001, 30(1): 229-237.

[4]兰云贤,林鹏,王宝全,等.小麦在发芽过程中植酸酶活性变化探讨[J].饲料工业,2001,22(4):31-32.

[5]吴庆伟,张勇,刘来亭,等.发芽小麦替代玉米对肉鸡生产性能、屠宰性能及肉品质的影响[J].饲料工业,2010,31(3):13-16.

[6]邹东月.不同筋性春小麦籽粒不同发芽程度下的品质分析[J].安徽农学通报:上半月刊,2012,18(3):33-35.

[7]魏雪芹,苏东李,李里特.发芽处理对小麦生物化学品质的影响[J].河南工业大学学报:自然科学版,2009,30(1):58-61,94.

[8]李清峰,马向东.发芽小麦的戊聚糖含量分析[J].江苏农业科学,2011(1):371-372.

[9]杨春,丁卫英,周柏玲,等.发芽对黑小麦、黑苦荞淀粉物理化学特性的影响[J].中国粮油学报,2011,26(12):5-10.

NaCl, Tris-HCl (pH 值为 8.0), RNase, 1 mol/L 的 IPTG (异丙基- β -D-硫代半乳糖苷), 20 mg/ μ L *X-gal* (β -半乳糖苷酶), 100 mg/mL 氨苄青霉素, 琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒 (QIAEX II Gel Extraction Kit) 购于 QIAGEN 公司; PMD18-T Vector 购自 TaKaRa 公司。

1.2.2 培养基 液体 LB 培养基: 1.0% 胰蛋白胨 (tryptone), 0.5% 酵母提取物 (yeast extract), 1.0% 氯化钠 (NaCl)。

固体 LB 培养基: 1.0% 胰蛋白胨 (tryptone), 0.5% 酵母提取物 (yeast extract), 1.0% 氯化钠 (NaCl), 1.0% 琼脂粉。

1.3 瘤胃微生物总 DNA 提取方法

称取 0.15 g 瘤胃内容物于研钵中, 加入 1.5 mL 1% CTAB 抽提液 (100 mmol/L Tris, HCl, pH 值为 8.0; 100 mmol/L EDTA; 100 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 值为 8.0; 1.5 mol/L NaCl; 1% CTAB), 倒入液氮迅速研磨, 始终保持研钵中存在液氮, 研磨 7~8 次至研钵内样品成白色粉末状, 等其融化后倒入 2 mL 离心管内, 加入 10 mg/mL 蛋白酶 K 20 μ L 和 250 μ L SDS (10%), 65 $^{\circ}$ C 水浴 2 h (每隔 20 min 颠倒混匀几次), 7 000 g, 离心 10 min, 取上清。避开上层漂浮物, 取中层溶液, 加入等体积酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1) 抽提, 12 000 g, 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min, 取上层溶液, 重复操作 1 次, 至上清不浑浊。然后用氯仿: 异戊醇 (24: 1) 抽提 1 次, 12 000 g、4 $^{\circ}$ C 离心 5 min, 取上清。加入 0.6 倍体积的异丙醇, 沉淀 2 h, 12 000 g, 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min, 弃上清。用 75% 的乙醇洗涤沉淀, 晾干, 用 50 μ L TE (pH 值为 8.0, 含 10 mg/ μ L RNase) 溶解, 37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min。

1.4 16S rRNA 基因扩增

以瘤胃总 DNA 逐级稀释 (稀释 5、10、25、50 倍) 作为模板, 使用 Premix Taq 进行 PCR 扩增, 反应体系为 50 μ L, 模板 0.5 μ L, 引物 (100 μ mol/L) 各 0.1 μ L, Premix Taq 25 μ L, ddH₂O 25 μ L。引物为细菌通用引物: 27 F 5'-AGAGTTGATCMTGGCTCAG-3' 和 1492 R 5'-GGTACCTTGT-TACGACTT-3'。PCR 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 DNA 的纯化回收、克隆以及测序

选择 1.5 kb 处条带最清晰的稀释倍数, 使用琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒回收、纯化其 PCR 产物。将纯化回收的目的 DNA 片段与 PMD18-T Vector 连接。连接体系: 1 μ L 载体, 5 μ L solution 1, 4 μ L DNA 样品, 16 $^{\circ}$ C 条件下 30 min。转化: 取感受态细胞, 冰上融化感受态 2 min, 将 10 μ L 上述连接体系加入到感受态中, 冰上放置 30 min, 42 $^{\circ}$ C 热激 90 s, 冰上放置 3~5 min, 加入 500~700 μ L 液体 LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C 摇床培养箱培养 1 h。取 AMP (氨苄青霉素) 抗性 LB 平板, 提前涂布 4 μ L 1 mol/L 的 IPTG 和 40 μ L 20 mg/ μ L 的 *X-gal* 于平板上, 无菌操作台上晾干。取转化好的感受态, 4 000 g 离心 3 min, 弃去部分上清液, 留 200 μ L。用移液器将感受态细胞吹打混匀, 取 100 μ L 涂布平板, 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱内过夜培养。氨苄青霉素抗性和蓝白斑对阳性克隆进行初选, 随机挑取 300 个白色单菌落于高频摇床上 6~8 h 氨苄青霉素抗性培养, 使用引物 M13F (-47) 5'-CGCCAGGGTTTCCCACT-CACGAC-3' 和 M13R (-48) 5'-AGCGGATAACAATTTC-

CACAGGA-3' 进行假阳性检验, 将验证后的阳性克隆菌液送交上海生工生物工程股份有限公司进行测序, 测序引物使用 M13F (-47) 5'-CGCCAGGGTTTCCCACTCACGAC-3' 和 M13R (-48) 5'-AGCGGA TAACAATTTCACAC AGGA-3'。

1.6 序列分析

使用 MEGA 6 软件中的 ClustalW 程序对所有序列进行比对, 去掉序列前后的载体序列。Bellerophon 软件检验嵌合体序列, 去除可能的嵌合体序列^[2]。使用 Mothur 软件划分序列 OTU 单位^[3], 选取 OTU 代表序列, 分类学上相似性大于 97% 的序列可看做为同一个 OTU 单位。使用 RDP11 软件^[4]中的 Classifier 程序^[5]对所有 OTU 代表序列进行分类。将 OTU 代表序列在 NCBI 的 Blast 程序中搜索相似性最高已知序列以及相似性最高的已知菌种序列^[6]。将所有 OTU 代表序列用 MEGA 6 软件中的 ClustalW 程序重新比对, 建树采用邻接法 (neighbor-joining, NJ)^[7] 和 Kimura 双参数距离模型, Bootstrap 设置为 1 000^[4], 以大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 作为外群^[8]。

2 结果与分析

2.1 OTU 操作单元划分

青海省河南县放牧牦牛瘤胃细菌 97 个序列划分为 83 个 OTUs, 青海省畜牧兽医科学院舍饲牦牛瘤胃细菌 118 个序列划分为 86 个 OTUs。

2.2 RDP 分类

青海省河南县牦牛瘤胃细菌有 66 个 OTUS 属于厚壁菌门 (Firmicutes), 占总 OTUS 的 79.52%。其中 1 个 OTUS 属于未分类的 Firmicutes 门; 61 个 OTUS 属于 Clostridia 纲 (占总 OTUS 的 73.49%), 除 22 个 OTUS 分属未分类的 Clostridiales 目外, 剩余的 39 个 OTUS 分属于 Clostridiales 目的 Clostridiales_Incertae Sedis X III 科 (2 个 OTUS)、Ruminococcaceae 科 (18 个 OTUS)、Eubacteriaceae 科 (1 个 OTU) 和 Lachnospiraceae 科 (18 个 OTUS); 4 个 OTUS 属于 Negativicutes 纲 (占总 OTUS 的 4.82%), 分属于 Selenomonadales 目的 Acidaminococcaceae 科 (3 个 OTUS) 和 Veillonellaceae 科 (1 个 OTU)。青海省河南县牦牛瘤胃细菌有 16 个 OTUS 属于拟杆菌门 (Bacteroidetes), 占总 OTUS 的 19.27%。其中 2 个 OTUS 属于未分类的 Bacteroidetes 门; 14 个 OTUS 属于 Bacteroidia 纲 (占总 OTUS 的 16.87%), 这 14 个 OTUS 中 13 个 OTUS 属于未分类的 Bacteroidales 目, 剩余的 1 个 OTU 属于 Bacteroidales 目的 Prevotellaceae 科。青海省河南县牦牛瘤胃细菌有 1 个 OTU 属于黏胶球形菌门 (Lentisphaerae), 归类于 Oligosphaeria 纲 (占总 OTUS 的 1.20%) 的 Oligosphaerales 目 Oligosphaeraeaceae 科。

青海省畜牧兽医科学院舍饲牦牛瘤胃细菌的 86 个 OTUs 有 54 个 OTUs (占总 OTUs 的 62.79%) 属于 Firmicutes 菌门, 其中 48 个 OTUs 属于 Clostridia 菌纲, 除 6 个 OTU 属于未分类的 Clostridia 菌纲外, 其余 42 个 OTUs 分属于 Clostridiales 目的 Ruminococcaceae 科 (18 个 OTUs)、Lachnospiraceae 科 (21 个 OTUs) 和 Clostridiales_Incertae Sedis X III 科 (3 个 OTUs), 其中 5 个 OTUs 属于 Negativicutes 菌纲, 分属于 Selenomonadales 目的 Veillonellaceae 科 (1 个 OTU) 和 Acidaminococcaceae 科 (4 个 OTUs); 86 个 OTUs 有 22 个 OTUs (占总 OTUs 的 25.58%) 属于 Bacteroidetes 菌门, 其中 8 个 OTUs 不

能确定分类,剩余的 14 个 OTUs 分属于 Bacteroidales 目的 Prevotellaceae 科(8 个 OTUs)和 Porphyromonadaceae 科(6 个 OTUs);86 个 OTUs 中剩余的 10 个 OTUs 有 7 个 OTUs(占总 OTUs 的 8.14%)属于 Proteobacteria 菌门,1 个 OTU 属于 Verrucomicrobia 菌门,1 个 OTU 属于 Synergistetes 菌门,还有 1 个 OTU 在细菌中不能确定其分类地位可能为尚未发现的新属。

RDP 分类结果中显示,青海省河南县放牧牦牛瘤胃 Firmicutes 类所占比例(79.52%)比之舍饲牦牛瘤胃 Firmicutes 类所占比例(62.79%)要高,Bacteroidetes 类在瘤胃内所占比例放牧牦牛(19.27%)比之舍饲牦牛(25.58%)要低。舍饲牦牛 RDP 分类结果比之放牧牦牛要丰富。

2.3 16S rRNA 基因序列系统进化分析

2.3.1 青海省河南县全放牧牦牛瘤胃细菌 16S rRNA 基因序列系统进化树分析 83 个 OTUs 中有 6 个 OTUs 与已培养细菌的相似性 $\geq 97\%$,占总 OTUs 的 7.23%;20 个 OTUs 与已培养细菌的相似性在 90%~96%之间,占总 OTUs 的 24.10%;57 个 OTUs 与已培养细菌的相似性大于 90%,占总 OTUs 的 68.67%。

将 83 个 OTUs 代表序列 Blast 后,取相似性 $\geq 97\%$ 的已知

序列(53 个序列)以及已培养瘤胃细菌序列(6 个序列)与这 83 个 OTUs 代表序列以大肠杆菌(*Escherichia coli*)为外群构建系统发育进化树。由图 1 可以看出,系统发育进化树上把所有序列分为 3 个部分:厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、黏胶球形菌门(Lentisphaerae)。同时,83 个 OTUs 中有 66 个 OTUs 属于 Firmicutes,其中 1 个 OTU(YAK-A91)与瘤胃解琥珀酸菌(*Succiniblasticum ruminis*)相似性 97%,1 个 OTU(YAK-A30)与瘤胃假丁酸弧菌(*Pseudobutyrvibrio ruminis*)相似性 99%,2 个 OTUs(YAK-A36、YAK-A80)与溶纤维丁酸弧菌(*Butyrvibrio fibrisolvens*)相似性 98%~99%,1 个 OTU(YAK-A2)与亨氏丁酸弧菌(*Butyrvibrio hungatei*)相似性 99%;83 个 OTUs 中有 16 个 OTUs 属于 Bacteroidetes,其中 1 个 OTU(YAK-A96)属于帕莱斯氏血矛线虫(*Haemonchus placei*)相似性 97%;83 个 OTUs 中有 1 个 OTU 属于 Lentisphaerae。

YAK-A82 序列属于 Firmicutes 类,但是从图 1 系统发育进化树上可以看出其并没有与 Firmicutes 类的其他序列归在一起,其进化距离较远。因此,YAK-A82 可能是目前尚未发现的新的菌属。

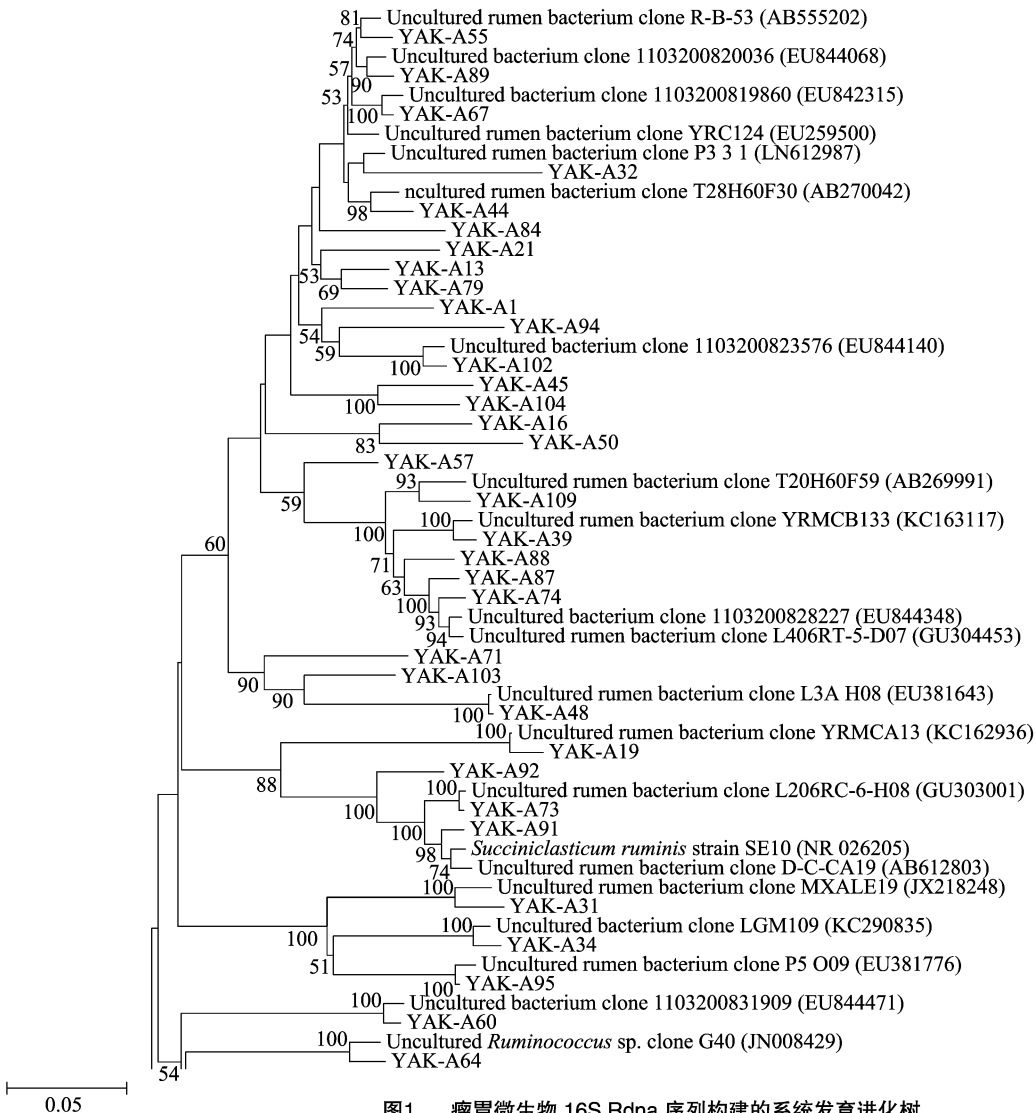
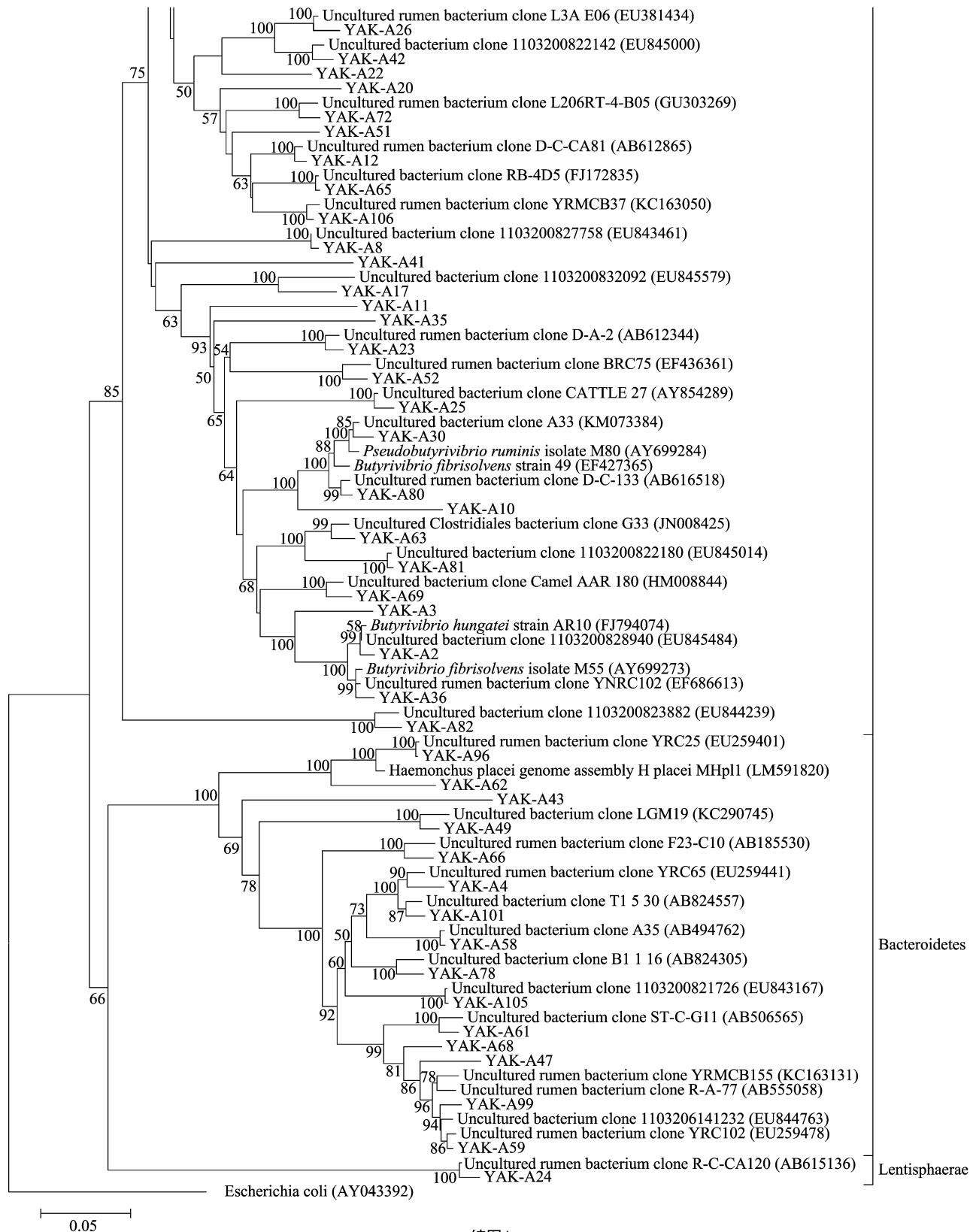


图1 瘤胃微生物 16S Rdna 序列构建的系统发育进化树

Firmicutes



续图1

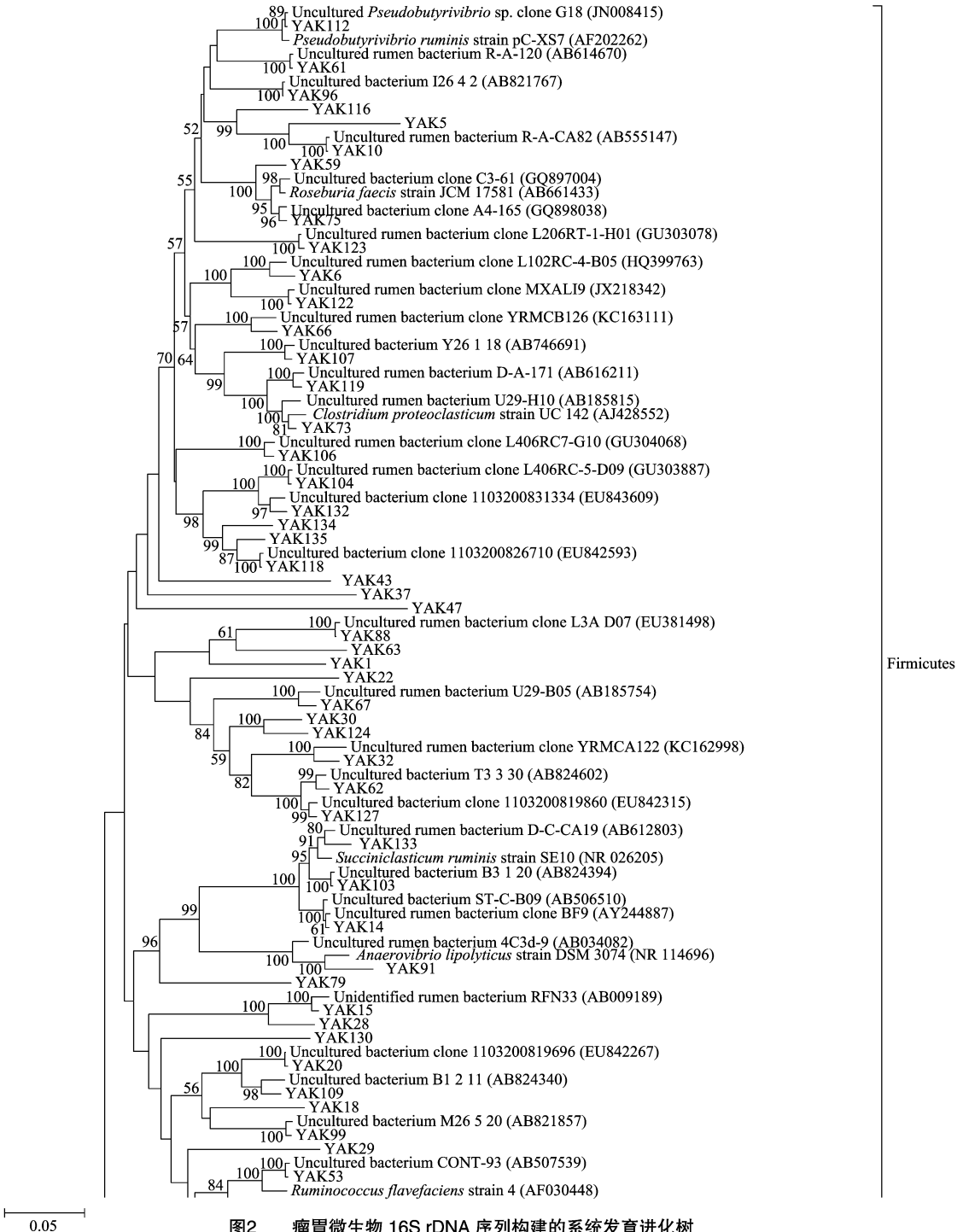
2.3.2 青海省舍饲牦牛瘤胃细菌 16S rRNA 基因序列系统进化树分析 86 个 OTUs 中有 8 个 OTUs 与已培养细菌的相似性 $\geq 97\%$, 占总 OTUs 的 9.30%; 34 个 OTUs 与已培养细菌的相似性在 90% ~ 96% 之间, 占总 OTUs 的 39.53%; 44 个

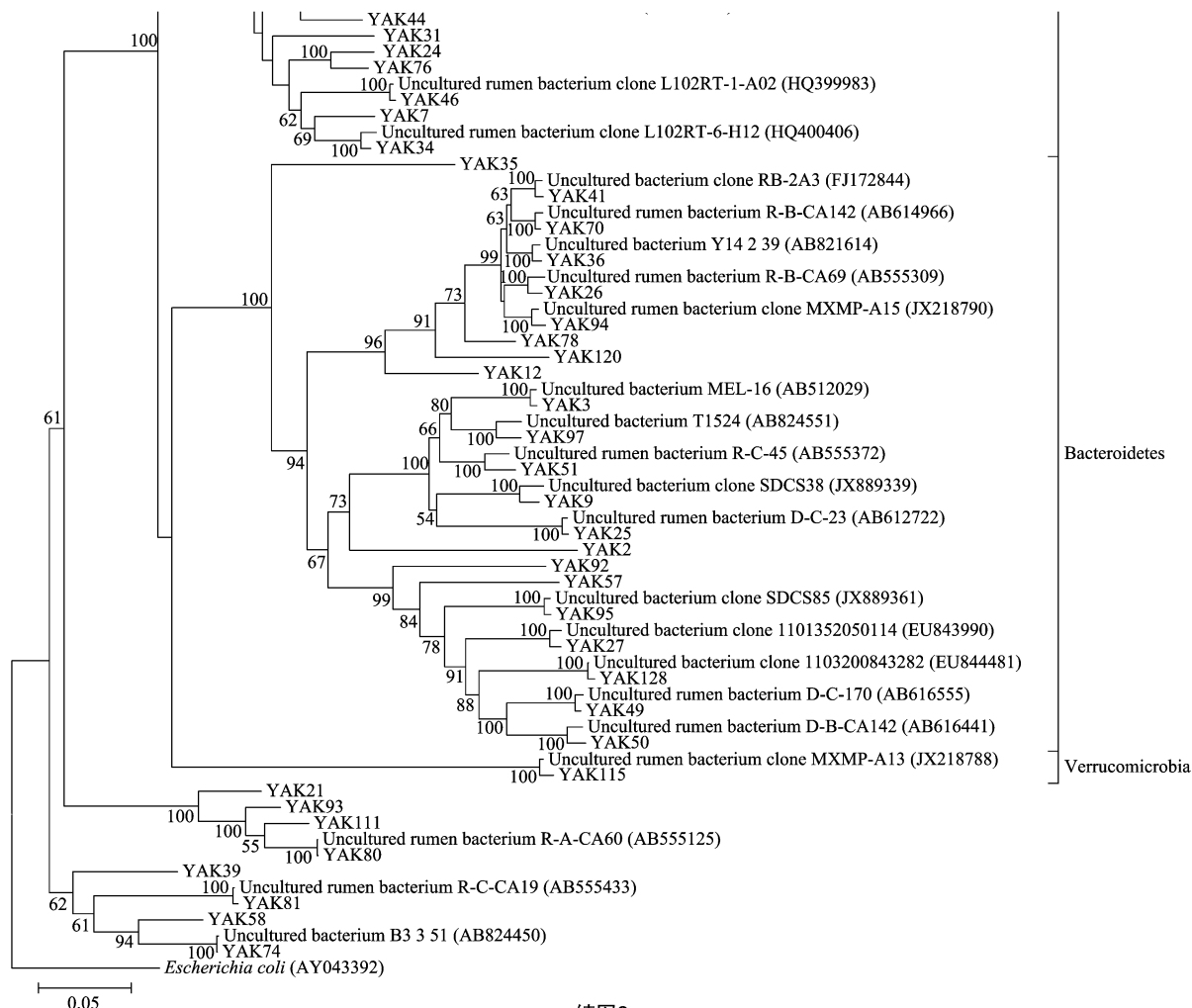
OTUs 与已培养细菌的相似性 $< 90\%$, 占总 OTUs 的 51.16%。

将 86 个 OTUs 代表序列 Blast 比对后, 取相似性 $\geq 97\%$ 的已知序列 (54 个序列) 以及已培养瘤胃细菌序列 (9 个序列) 与这 86 个 OTUs 代表序列以大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 为外

群构建系统发育进化树,从系统发育关系分析上可以发现所有序列主要分为 2 个部分:厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)。有 1 个序列归类到了 Verrucomicrobia 菌门。YAK39、YAK58、YAK74、YAK 80、YAK 81、YAK 93、YAK 111 在 RDP 分类中归于 Proteobacteria 菌门,但从进化树上可以发现,这 7 个序列并没有聚在一起,且进化距离较远,不能确定这 7 个系列的分类地位。YAK21 在 RDP 分类中归于 Firmicutes 这一类,但从树图上发现,这一序列距离 Firmicutes 其他序列的进化距离较远,未归于 Firmicutes 这一类。由图 2 系统发育进化树可以看出 86 个 OTUs 中有 54 个 OTUs 属于 Firmi-

cutes,其中 1 个 OTU(YAK112)与瘤胃假丁酸弧菌(*Pseudobutyrvibrio ruminis*)相似性 99%,2 个 OTUs(YAK59、YAK75)与罗斯伯里氏菌(*Roseburia faecis*)相似性 97%~98%,1 个 OTU(YAK73)与蛋白溶解梭菌(*Clostridium proteoclasticum*)相似性 98%,1 个 OTU(YAK119)与溶纤维丁酸弧菌(*Butyrvibrio fibri-solvens*)相似性 97%,1 个 OTU(YAK53)与黄色瘤胃球菌(*Ru-minococcus flavefaciens*)相似性 98%,2 个 OTUs(YAK103、YAK133)与瘤胃解琥珀酸菌(*Succiniclasticum ruminis*)相似性 97%~98%,1 个 OTU(YAK91)与 *Anaerovibrio lipolyticus* 相似性 97%;86 个 OTUs 中有 22 个 OTUs 属于 Bacteroidetes。





续图2

3 讨论

本研究发现全放牧牦牛(97个序列共属于83个OTUs),舍饲牦牛(118个序列共属于86个OYUs)说明不管放牧牦牛还是舍饲牦牛瘤胃微生物都非常丰富,比刘利等报道的广西水牛瘤胃中的细菌多样性(74个16S rRNA基因序列分属于51个OTUs分类单位)^[9]和王远亮等报道的荷斯坦奶牛瘤胃细菌多样性(45个16S rRNA序列分属于28个OTUs分类单位)^[10]更丰富多样。

由RDP分类结果可以看出,放牧牦牛与舍饲牦牛瘤胃细菌都主要分为2大类:Firmicutes类和Bacteroidetes类。这与Edwards等阐述的牛瘤胃细菌^[11]和Koike等阐述的羊瘤胃细菌^[12]主要分为2大类LGCGPB类和CFB类结果相同。Yang等曾报道,荷斯坦奶牛、大额牛、水牛瘤胃细菌主要分为LGCGPB和CFB2大类^[13]。Monica等也曾报道鹿鹿瘤胃细菌主要分为LGCGPB和CFB2大类^[14]。但青海省河南县放牧牦牛瘤胃Firmicutes类所占比例(79.52%)比舍饲牦牛瘤胃Firmicutes类所占比例(62.79%)要高,Bacteroidetes类在瘤胃内所占比例放牧牦牛(19.27%)比舍饲牦牛(25.58%)要低。An等曾报道的甘肃放牧牦牛(54.89%)比晋南舍饲黄牛(16.97%)瘤胃内Firmicutes类所占比例要高,而Bacte-

roidetes类所占比例晋南舍饲黄牛(38.99%)比甘肃放牧牦牛(34.78%)要高^[1]。本试验结果与这一观点相符。Fernando等也曾报道反刍家畜在饲喂精料时,瘤胃内Bacteroidetes类占优势^[15]。同时,在RDP分类上,舍饲牦牛(归类于4个菌门)的分类结果比放牧牦牛(归类于3个菌门)更加丰富,An等曾报道由于舍饲黄牛的日粮成分比放牧牦牛日粮成分更为复杂,使其瘤胃微生物更加复杂多样^[1]。

溶纤维丁酸弧菌、白色瘤胃球菌、黄色瘤胃球菌、产琥珀酸丝状杆菌是瘤胃内主要的纤维降解菌,而后三者又是公认的瘤胃内纤维降解的优势菌群;同时溶纤维丁酸弧菌还与瘤胃内蛋白质的降解有关系;瘤胃解琥珀酸菌可以将瘤胃内的琥珀酸转化为丙酸,是瘤胃内的优势菌种^[15];瘤胃假丁酸弧菌、罗斯伯里氏菌的主要作用是发酵瘤胃各种碳水化合物,主产物为丁酸^[16];Anaerovibrio lipolyticus菌是瘤胃内主要淀粉降解菌之一^[17];亨氏丁酸弧菌能进行少量的乳酸发酵,且是瘤胃内生成乙酸的重要微生物之一^[18];蛋白溶解梭菌有降解瘤胃蛋白质的作用。由图1系统进化树上可以看出,放牧牦牛瘤胃内共检测到6株已培养细菌分别为1株瘤胃解琥珀酸菌、1株瘤胃假丁酸弧菌、2株溶纤维丁酸弧菌、1株亨氏丁酸弧菌、1株帕莱斯氏血矛线虫;由图2可以看出,舍饲牦牛瘤胃内9株已培养细菌分别为1株瘤胃假丁酸弧菌、2株罗斯

伯里氏菌、1株蛋白溶解梭菌、1株溶纤维丁酸弧菌、1株黄色瘤胃球菌、2株瘤胃解琥珀酸菌、1株 *Anaerovibrio lipolyticus*。由此可以发现放牧牦牛与舍饲牦牛瘤胃内都检测到了纤维降解菌的存在,其差别不明显。但是舍饲牦牛瘤胃内检测到了1株主要蛋白降解菌(蛋白溶解梭菌)和1株降解淀粉的细菌(*Anaerovibrio lipolyticus*),这2种细菌在放牧牦牛瘤胃内未检测到。这是因为舍饲牦牛的日粮中添加有精料,而精料中蛋白质和淀粉含量比之天然牧草要高,致使瘤胃内蛋白质降解菌和淀粉降解菌的菌群数量增加。Coe等曾报道当给反刍家畜饲料喂精料时,其瘤胃内淀粉降解菌的数量和种类会增加^[19-21]。同时,舍饲牦牛瘤胃内检测到的产丁酸菌的种类(1株瘤胃假丁酸弧菌、2株罗斯伯里氏菌)比放牧牦牛瘤胃内检测到的产丁酸菌的种类(1株瘤胃假丁酸弧菌)要多。溶纤维丁酸弧菌在舍饲牦牛瘤胃内(1株溶纤维丁酸弧菌)和放牧牦牛瘤胃(2株溶纤维丁酸弧菌)内都有检测到且差别不明显,这可能是因为溶纤维丁酸弧菌除了降解纤维素外,对于瘤胃蛋白的降解也有作用有关,致使这2种条件下日粮的不同对溶纤维丁酸弧菌的影响不大。

4 结论

放牧牦牛与舍饲牦牛瘤胃细菌都主要分为2大类:Firmicutes类和Bacteroidetes类。放牧牦牛瘤胃 Firmicutes类所占比例(79.52%)比舍饲牦牛瘤胃 Firmicutes类所占比例(62.79%)要高,Bacteroidetes类在瘤胃内所占比例放牧牦牛(19.27%)比舍饲牦牛(25.58%)要低。放牧牦牛与舍饲牦牛瘤胃内纤维降解菌的差别不大,都为瘤胃内优势菌群,但舍饲牦牛瘤胃内比放牧牦牛瘤胃内的蛋白质降解菌和淀粉降解菌更丰富。

参考文献:

- [1] An D, Dong X, Dong Z. Prokaryote diversity in the rumen of yak (*Bos grunniens*) and Jinnan cattle (*Bos taurus*) estimated by 16S rDNA homology analyses[J]. *Anaerobe*, 2005, 11(4): 207-215.
- [2] Huber T, Faulkner G, Hugenholtz P. Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments [J]. *Bioinformatics*, 2004, 20(14): 2317-2319.
- [3] Schloss P D, Westcott S L, Ryabin T, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(23): 7537-7541.
- [4] Cole J R, Wang Q, Cardenas E, et al. The ribosomal database project: improved alignments and new tools for rRNA analysis[J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(Database Issue): D141-D145.
- [5] Wang Q, Garrity G M, Tiedje J M, et al. Naive bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(16): 5261-5267.
- [6] Altschul S F, Madden T L, Schaffer A A, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(17): 3389-3402.
- [7] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406-425.
- [8] Matsui H, Kato Y, Chikaraishi T, et al. Microbial diversity in ostrich ceca as revealed by 16S ribosomal RNA gene clone library and detection of novel *Fibrobacter* species[J]. *Anaerobe*, 2010, 16(2): 83-93.
- [9] 刘利, 唐纪良, 冯家勋, 等. 广西水牛瘤胃中的细菌多样性[J]. *微生物学报*, 2009, 49(2): 251-256.
- [10] 王远亮, 杨瑞红, 毛爱军, 等. 采用未培养技术对荷斯坦奶牛瘤胃细菌多样性进行初步分析[J]. *微生物学报*, 2005, 45(6): 915-919.
- [11] E Edwards J, R Mcewan N, J Travis A, et al. 16S rDNA library-based analysis of ruminal bacterial diversity [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2004, 86(3): 263-281.
- [12] Koike S, Yoshitani S, Kobayashi Y, et al. Phylogenetic analysis of fiber-associated rumen bacterial community and PCR detection of uncultured bacteria[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 229(1): 23-30.
- [13] Yang S, Ma S, Chen J, et al. Bacterial diversity in the rumen of Gayals (*Bos frontalis*), Swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*) and Holstein cow as revealed by cloned 16S rRNA gene sequences[J]. *Molecular Biology Reports*, 2010, 37(4): 2063-2073.
- [14] Sundset M A, Praeteng K E, Cann I K, et al. Novel rumen bacterial diversity in two geographically separated sub-species of reindeer [J]. *Microbial Ecology*, 2007, 54(3): 424-438.
- [15] Fernando S C, Purvis H T, Najjar F Z, et al. Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(22): 7482-7490.
- [16] van Gylswyk N O, Hippe H, rainey F A. *Pseudobutyrvibrio ruminis* gen. nov., sp. nov., a butyrate-producing bacterium from the rumen that closely resembles *butyrvibrio fibrisolvens* in phenotype [J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1996, 46(2): 559-563.
- [17] Prins R A, Lankhorst A, van der Meer P, et al. Some characteristics of *Anaerovibrio lipolytica* a rumen lipolytic organism [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1975, 41(1): 1-11.
- [18] Kopečný J, Zorec M, Mrázek J, et al. *Butyrvibrio hungatei* sp. nov. and *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* sp. nov., butyrate-producing bacteria from the rumen[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, 53(Pt 1): 201-209.
- [19] Coe M L, Nagaraja T G, Sun Y D, et al. Effect of virginiamycin on ruminal fermentation in cattle during adaptation to a high concentrate diet and during an induced acidosis[J]. *Journal of Animal Science*, 1999, 77(8): 2259-2268.
- [20] Goad D W, Goad C L, Nagaraja T G. Ruminal microbial and fermentative changes associated with experimentally induced subacute acidosis in steers[J]. *Journal of Animal Science*, 1998, 76(1): 234-241.
- [21] Tajima K, Arai S, Ogata K, et al. Rumen bacterial community transition during adaptation to high-grain diet [J]. *Anaerobe*, 2000, 6(5): 273-284.