

# 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

王远亮<sup>1</sup> 杨瑞红<sup>2,3</sup> 毛爱军<sup>1</sup> 王加启<sup>2</sup> 董志扬<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 中国科学院微生物研究所 北京 100080)

(<sup>2</sup> 中国农业科学院畜牧研究所 北京 10093) (<sup>3</sup> 新疆农业大学农学院 乌鲁木齐 830052)

**摘 要** 采用未培养 (Culture independent) 技术直接从荷斯坦奶牛瘤胃液中提取瘤胃细菌微生物混合 DNA (也叫元基因组 DNA) 利用细菌 16S rDNA 通用引物 27F 与 1492R 扩增瘤胃混合微生物的 16S rDNA 根据 16S rDNA 序列对瘤胃细菌多样性进行初步分析。通过 16S rDNA 序列同源性分析,发现有多于一半以上的序列与可培养的菌株的同源性小于 90%,属于不可培养的菌株。选用 45 条测得序列与已知序列构建系统发育树,分析结果表明,它们分属于两大类 LGCGPB (the low G+C Gram positive bacteria) 和 CFB (Cytophaga-Flexibacter Bacteroides group),剩下的克隆尚难确定其分类地位,可能是代表新属和种的序列,这些序列已向 GenBank 提交并得到序列号 (AY986777-AY986791)。

**关键词** 瘤胃 微生物多样性 系统发育分析

中图分类号: Q938 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209 (2005) 06-0915-05

瘤胃是由大量的古菌、细菌、真菌和原生动动物组成的复杂的生态系统。瘤胃能在极短时间内降解 90% 以上秸秆纤维主要是靠生物作用<sup>[1,2]</sup>,这些生物包括细菌、原生动物、真菌等,其中主要是细菌与古菌,它们占瘤胃微生物的绝大部分,其代谢途径多种多样在瘤胃降解牧草的厌氧阶段起主要作用<sup>[3]</sup>,瘤胃中微生物代谢产生甲烷也成为目前国内外研究的热门<sup>[4]</sup>,此外瘤胃还是反刍动物营养代谢中最重要的环节,瘤胃微生物的生长代谢活动能够为宿主动物提供能量、蛋白质、必需氨基酸和维生素等营养物质<sup>[5]</sup>,随着世界能源危机的出现,瘤胃反应器的研究也成为目前的一项紧迫的工作<sup>[6]</sup>,而所有这些工作的开展都需要我们对瘤胃微生物的多样性有确切的了解。开展瘤胃微生物多样性研究,不仅对于瘤胃微生物资源开发和利用,对瘤胃功能的全面理解,为反刍动物营养研究都具有重要意义。由于微生物间的共生依赖性强和缺少专一性培养基,因此瘤胃中可培养微生物只占有很小的一部分,Bryant 和 Burkey 在 1953 年,从瘤胃内容物中分离出 896 个菌株,其中 98% 属于厌氧菌,不到整个瘤胃微生物的 10%<sup>[7-9]</sup>。可见传统培养对瘤胃的认识研究远远不够。

免培养技术的兴起和应用,为研究特殊环境微生物多样性提供了有效的手段,人们已经可以不依

赖微生物菌种分离培养,直接从分子水平上研究微生物资源。16S (18S) rDNA 分类方法被细菌学家和分类学家广泛接受,将该方法与免培技术结合起来,可以快速有效的分析一个特殊环境中的微生物多样性。目前,国内外对不同环境样品如土壤、海洋、淤泥等进行扩增 16S rDNA 序列和分析序列系统发育关系这方面已有大量报道<sup>[10-12]</sup>。现已向 GenBank 提交了大于 78000 条 16S rDNA 序列,发现了许多新的不可培养微生物新种<sup>[13]</sup>。目前已知的瘤胃微生物分属于 3000 种以上的基因组类型,基因资源非常丰富<sup>[14]</sup>。

本研究采用免培技术对常规饲养条件下奶牛瘤胃微生物多样性进行了初步分析,通过对瘤胃微生物 16S rDNA 序列的分析,初步构建了部分瘤胃微生物的系统发育树,为更好的利用瘤胃微生物基因资源和奶牛营养研究提供了一些基本数据和材料。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品的采集** 样品采自荷斯坦奶牛瘤胃的 5 个不同的位置 (上、中、下、左、右),采样量为 500mL,采样时间为 2004 年 5 月。篓管牛是日粮精粗比为 50:50 (羊草 5kg、苜蓿 5kg、精料 9kg、膨化大豆 1.5kg。精料配方为:玉米 63.6%,小麦麸 7.5%,

基金项目: 国家“863 计划” (2004AA214080)

\* 通讯作者。Tel/Fax: 86-10-62551206; E-mail: Dongzy@sun.im.ac.cn

作者简介: 王远亮 (1977-) 男,山东省莒南县,博士研究生,主要研究方向为微生物生态。E-mail: ylwang@sun.im.ac.cn

收稿日期: 2005-04-15,修回日期: 2005-09-11

大豆粕 14.5%, 棉籽粕 7.3%, 鱼粉 1.5%, 石粉 0.6%, 磷酸氢钙 1.0%, 食盐 0.8%, 预混料 1.0%, 植物油 1.0%,  $MgO$  0.4%,  $NaHCO_3$  0.8%), 可自由饮水的荷斯坦黑白花牛。

在清晨饲喂前, 从瘤胃的不同位点采集新鲜的瘤胃液原样品。打开瘘管盖立即进行, 在酒精灯边上操作。取样人员使用一次性无菌手套, 瘤胃液经灭菌四层纱布过滤后, 立即放入液氮罐中冷冻, 随后贮存在  $-80^{\circ}C$  保存备用<sup>[15]</sup>。

**1.1.2 菌种:** 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  由本实验室保存。

**1.1.3 主要试剂和仪器:** *Taq* DNA 聚合酶和 pGEM-T Easy Vector 载体购自 Promega 公司; 蛋白酶 K 购自 Merk 公司; T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司; PCR 引物由上海 Genecore 公司合成; 其它试剂购自 Sigma 等公司。PTC-150 Programmable Thermal Controller (MJ Research Inc., Watertown, Mass.)

## 1.2 DNA 的提取

参考最新国内外相关报道<sup>[15, 20]</sup>, 结合瘤胃样品本身的特殊性质, 我们建立了一套提取有效的瘤胃样品混合基因组 DNA 的方法。取室温解冻的瘤胃液 30mL,  $1000 \times g$  离心 10min, 弃去沉淀(饲料, 原虫等大颗粒),  $12000 \times g$  离心 10min 弃去上清, 用 5mL TE 缓冲液悬浮沉淀。取上述处理的瘤胃微生物样品 1mL, 加入 DNA 抽提液 5mL (Tris-HCl 100mmol/L, EDTA 50mmol/L, 十二烷基肌氨酸 2%), 在振荡器上充分混匀, 加入 50mg/mL 蛋白酶 K 100 $\mu$ L, 液氮中速冻 5min, 然后  $65^{\circ}C$  水浴溶解 10min, 重复 3 次; 再加入 1/5 体积的 20% SDS,  $65^{\circ}C$  温浴 10min, 室温静置 5min, 离心收集上清液, 向上清液中加入 NaCl 溶液至 1mol/L, CTAB 至 1%,  $65^{\circ}C$  温浴 10min, 置于冰上加入等体积苯酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1) 氯仿各抽提一次; 加入 1/10 体积的 3mol/L 乙酸钠溶液 (pH5.2) 2 倍体积的无水乙醇, 冰上放置 15min 以上;  $12000 \times g$  离心 10min 后收集沉淀, 最后以 75% 乙醇洗涤 2~3 次, 干燥, 溶解于适量的 TE 缓冲液。

## 1.3 PCR 扩增 16S rDNA

以不同浓度(从原始 DNA 稀释 5、10、20、50 倍)的瘤胃微生物混合基因组 DNA 为模板, 以通用引物 27F 和 1492 R 进行扩增。通用引物序列为 27F: 5'-GAGTTTGATCMTGGCTCAG-3', 1492R: 5'-TACGGYTA CCTTGTACGACTT-3'; PCR 反应体系 (25 $\mu$ L):  $10 \times$  缓冲液 2.5 $\mu$ L, dNTP (2.5mmol/ $\mu$ L) 2.5 $\mu$ L, 引物 (10pmol/ $\mu$ L) 各 1 $\mu$ L,  $Mg^{2+}$  (25mmol/L) 2.5 $\mu$ L, 模板

DNA 2.5 $\mu$ L, *Taq* DNA 聚合酶 1U, ddH<sub>2</sub>O 12.5 $\mu$ L。反应条件:  $94^{\circ}C$  3min;  $94^{\circ}C$  40s,  $52^{\circ}C$  50s,  $72^{\circ}C$  2min, 35 个循环,  $72^{\circ}C$  10min。

## 1.4 克隆、测序与系统发育分析

用平行的 5 管反应体系(每管 25 $\mu$ L)进行 PCR 扩增。将 1.5kb 的条带用 PCR 产物纯化试剂盒回收和纯化。用 T4 DNA 连接酶将纯化的片段与 pGEM-T Easy Vector 载体连接, 转化 *E. coli* DH 5 $\alpha$  感受态细胞。以氨苄青霉素 (100 $\mu$ g/mL) 抗性和蓝白斑筛选选择阳性转化子, 并用碱裂解法提取质粒, 通过电泳进一步验证外源片段的插入。将插入外源片段的阳性质粒转化子送样测序, 测序在北京华大人类基因组中心完成, 用 CHECK-CHEMERA 程序检测人工嵌合序列并剔除。将所得到的序列与 GenBank/EMBL/DDBJ/RDP 数据库用 Blastn 软件在网上分析, 挑出相似性最高的序列, 用 CLUSTAL X 完成序列的多序列比对, 转换至 Phylip3.6, Bootstrap value 设为 1000, 得出的树文件用 Treeview 3.2 输出<sup>[16]</sup>。将序列相似性达到 97% 以上的 16S rDNA 克隆子定义为同一个操作分类单位 (Operational Taxonomic Units, OTU)。

## 2 结果和分析

### 2.1 瘤胃微生物元基因组 DNA 提取及 16S rDNA 的 PCR

从 30mL 瘤胃液中提取获得 40 $\mu$ L 瘤胃微生物元基因组 DNA, 直接以此粗提的 DNA 为模板, 进行 16S rDNA 的 PCR, PCR 产物与 pGEM-T Easy vector 连接, 转化获得 16S rDNA 的文库 (图 1)。

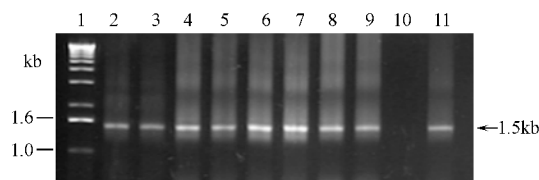


图 1 16S rDNA 的 PCR 扩增

Fig. 1 Amplification of 16S rDNA from total DNA

1. 1kb Ladder; 2-3. Diluted 5 times from total DNA; 4-5. Diluted 10 times; 6-7. Diluted 20 times; 8-9. Diluted 50 times; 10. Negative control for PCR; 11. Positive control.

### 2.2 16S rDNA 系统发育分析

将随机挑选的 130 个克隆的 16S rDNA 序列经过过去掉测序小于 500bp 的序列与 GenBank 数据库中的相关已知序列进行比对分析, 由 Blastn 去掉同源性比对结果相同的, 再用 CLUSTAL X 完成序列的多重排定剔除不能参与建树的序列, 最后选用剩下的

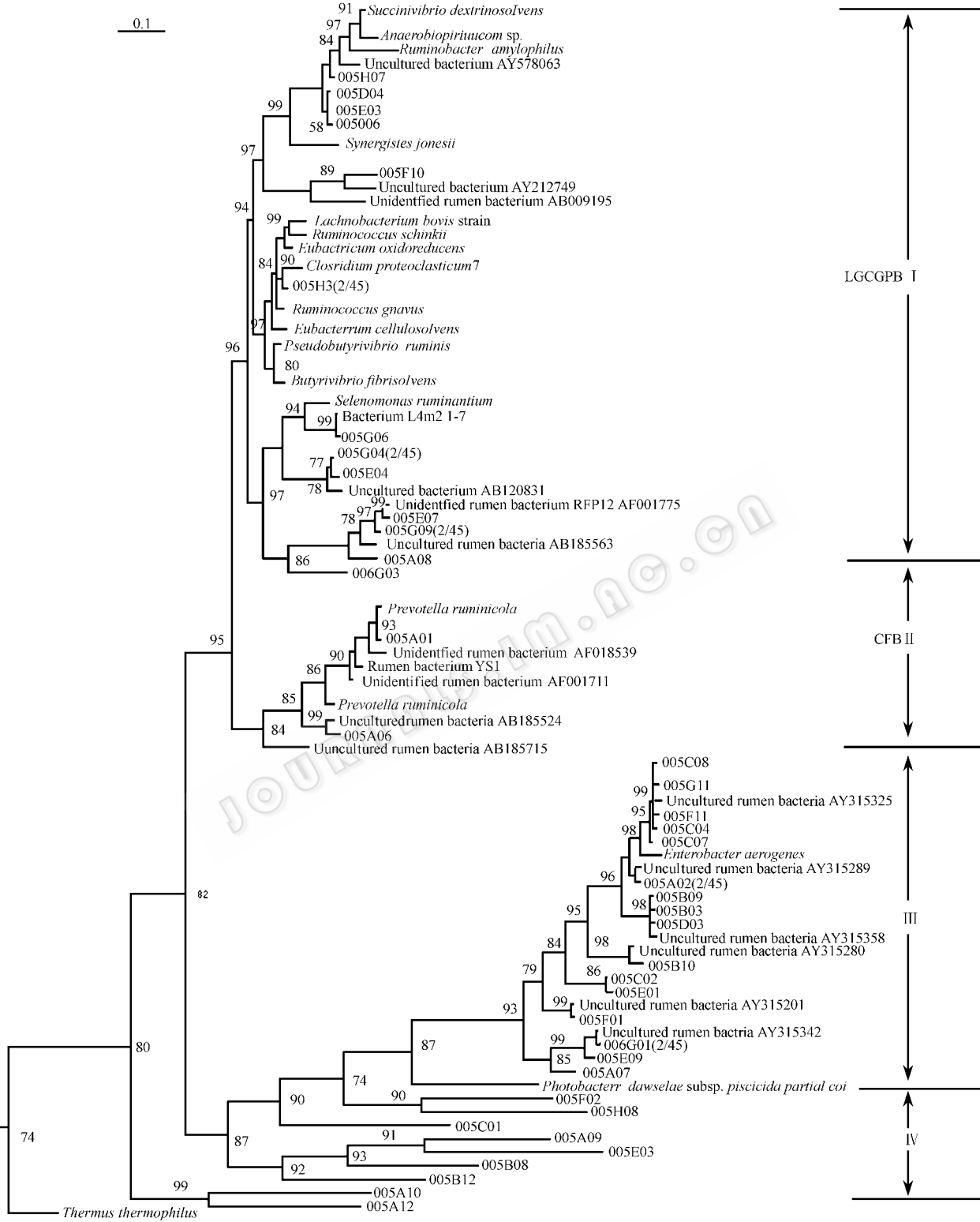


图 2 免培瘤胃微生物 16S rDNA 序列构建的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence of uncultured rumen microbe

Phylogenetic tree of the clones obtained from rumen based on the homology of partial 16S rDNA in length 510 bp. The statistical significance of the tree branches was evaluated by bootstrap analysis of 1000 trees. *Thermus thermophilus* was used as outgroup. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar ,10% sequence divergence. Numbers in brackets indicate the clone number out of the total clones others indicate only one time.

45 条序列构建系统发育树,把序列相似性大于 99.5% 的归结为同一个细菌的序列,发现这 45 个序列可以代表 40 个不同的细菌。其中 70% (31/45) 的克隆序列与已报道的未培养或未鉴定菌株的 16S rDNA 序列同源性达到 97% 以上,10% (4/45) 的克隆与已鉴定的细菌同源性达到 98% 以上,20% (9/45) 的克隆不能和任何报道的细菌 16S rDNA 序列相似大于 80%。用这 45 个克隆的 16S rDNA 序列、已知瘤胃细菌的 16S rDNA 和已提交的不可培养菌的 16S rDNA 的部分序列,并以 *Thermus thermophilus* 的 16S rDNA 为外群进行构建系统发育树,可以看出这些序列属于 28 个 OTU 单位(在分类学上将序列相似性大于 97% 的不同生物定义为同一个 OTU 单位)。其中属于已经鉴定的种的有 3 个 OTU,余下的是未培养的 OTU。由系统发育关系分析,可将此系统发育树分成四部分(I、II、III、IV)(图 2)。

在所有的 40 个菌株(图中以 005 \* \* ,006 \* \* 命名)中,16 个(I)属于低 GC 含量的 G<sup>+</sup> 菌,其中 2 个(005H03、005B04)属于厌氧的 *Clostridium* 属。2 个(II)属于 CFB(the *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* group)菌。1 个(005A01)属于 *Prevotella* 属。005H03 与具有高分解蛋白性的菌株 *Clostridium proteoclasticum* 同源性达到 99%<sup>[17]</sup>。005G06 与 bacterium L4M2 1-7 同源性为 98%,此菌可以降解一种家畜饲草(牧草场)中都含有的略有苦味的碱。005A01 与消化道内最为常见的 *Prevotella ruminicola* 同源性 99%,Martin 报道此菌含有 xylan hydrolase A 基因<sup>[18]</sup>。005G04、005H04、005E04、005E07、005G09、005A08 和 005G03 与 Tajima<sup>[15]</sup> 发现的瘤胃微生物 16S rDNA 序列同源性高 97% 以上。III 中几乎全都为不可培养和待鉴定的序列,说明代表了一些新的不可培养的一大类。005C08 等聚在一起,同源性大于 97%,属于一种。005F02、005C01、005A09 等 7 个序列不能和任何已报道的微生物序列比对上,单独形成几小支有别于三大类其它的任何一种,可能代表新的种。005A10 和 005A12 克隆之间序列的相似性高达 99% 单独形成另外不同于 005F02 等的一支,可能代表潜在的新属。新的序列已向 GenBank 提交,序列号为 AY986777-AY986791。

### 3 讨论

本篇的分析结果与 Edwards 等<sup>[19]</sup> 的文献报道用 364 个来自 Tajima<sup>[15,20]</sup> 和 Whitford<sup>[21]</sup> 的不可培养瘤胃菌和已知瘤胃菌的 16S rDNA 序列构建系统发育树

分析几乎一致,可以将瘤胃微生物主要分为两大类 LGCGPB(the low G + C Gram positive bacteria)和 CFB(the *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* group)(图 2 中的 I、II)。还有一些序列与已经发现的不可培养菌的序列同源性很高(图 2 中的 III)。由于不同的日粮会导致瘤胃微生物多样性的不同,天然牧放的牛由于日粮单一<sup>[22]</sup>,其瘤胃微生物的种类就少,而饲喂饲料的奶牛日粮成分相对复杂,导致瘤胃中的微生物种类较多。本研究研究发现了一些新的序列,从序列上不能确定其属,说明它们可能是潜在的新属或新的种(图 2 中的 IV)。可见,对瘤胃微生物的多样性分析,存在着一定的共性(都可分为两大类),但由于每次研究的瘤胃样品的个体差异等因素,分析结果又有自己的不同点(发现一些新的种类),这说明了瘤胃微生物的复杂性和动态变化性。

由可比对上的已知的菌种功能可以再次的证明瘤胃微生物在纤维素等物质降解过程中的重要作用。由微生物系统分析可以看出,免培养法根据 16S rDNA(rRNA)研究环境微生物的组成、分布及功能结构的初步尝试是非常成功。但瘤胃微生物种类繁多和复杂,要弄清楚环境中微生物的真实情况,仅靠 16S rDNA 序列分析是不够的,因为在 DNA 提取、PCR 以及克隆筛选中会产生种种偏差,而且由于 GenBank 数据库中的数据没有囊括自然界中所有的微生物的 16S rDNA 序列,因此,非常有必要在进行免培养法分析的时候,使用直接形态观察、原位杂交等来加以补充,只有得到纯培养,结合形态、生理等进行的多相分类,才能真正表明一个物种的存在,才能够对其进行彻底研究<sup>[23]</sup>。到目前为止,从整体来看瘤胃微生物至今几乎还是属于一个未知的微生物生态体系,对它的认识和开发有待于继续研究。致谢 在本文研究及数据分析等方面得到中国科学院微生物研究所的东秀珠、黄力等老师的大力帮助和支持,特此表示衷心感谢。

### 参 考 文 献

- [1] Akin D E, Borneman W S. Role of rumen fungi in fiber degradation. *J Dairy Sci*, 1990, **73**: 3023 - 3032.
- [2] Hungate R. The rumen and its microbes. New York: Academic Press, 1966.
- [3] Raizada N, Sonakya V, Dalhoff R, et al. Population dynamics of rumen microbes using modern techniques in rumen enhanced solid incubation. *Water Sci Technol*, 2003, **48**(4): 113 - 119.
- [4] Eun J S, Fellner V, Gumpertz M L. Methane production by mixed ruminal cultures incubated in dual-flow fermentors. *J Dairy Sci*, 2004, **87**(1): 112 - 121.

- [ 5 ] Roderick I, Bryan A. Recent advances in rumen microbial ecology and metabolism: potential impact on nutrient output. *J Dairy Sci*, 1990, **73**: 2971 – 2995.
- [ 6 ] Barnes S P, Keller J. Anaerobic rumen SBR for degradation of cellulosic material. *Water Sci Technol*, 2004, **50**( 10 ): 305 – 311.
- [ 7 ] Hungate R, Bryant M P, Mah R A. The rumen bacteria and protozoa. *J Annu Rev Microbiol*, 1964, **18**: 131 – 166.
- [ 8 ] Bryant M P. Bacterial species of the rumen. *J Bacteria Rev*, 1959, **23**: 125 – 153.
- [ 9 ] Caldwell D R, Bryant M P. Medium without rumen fluid for nonselective enumeration and isolation of rumen bacteria. *J Appl Microbiol*, 1966, **14**( 5 ): 794 – 801.
- [ 10 ] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *J Microbiol Rev*, 1995, **59**: 143 – 149.
- [ 11 ] Giovannoni S J, Britschgi T B, Moyer C L, et al. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature*, 1990, **345**: 60 – 63.
- [ 12 ] Ward D M, Weller R, Bateson M M, et al. 16S rRNA reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature*, 1990, **345**: 63 – 65.
- [ 13 ] Schloss P D, Handelsman J. Status of the microbial census. *J Microbiol Mol Biol Rev*, 2004, **68**( 4 ): 686 – 691.
- [ 14 ] Firkins J L, Yu Z. Characterization and quantification of the microbial populations of the rumen. <http://ansci.osu.edu/firkins/ISRP.pdf>.
- [ 15 ] Tajima K, Arai S, Ogata K, et al. Rumen bacterial community transition during adaptation to high-grain diet. *J Anaerobe*, 2000, **6**: 273 – 284.
- [ 16 ] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *J Nucleic Acids Res*, 1994, **22**: 4673 – 4680.
- [ 17 ] Attwood G T, Reilly K, Patel B K. *Clostridium proteoclasticum* sp. nov., a novel proteolytic bacterium from the bovine rumen. *J Syst Bacteriol*, 1996, **46**: 753 – 758.
- [ 18 ] Martin J, Daniel A S, Flint H J. A xylan hydrolase gene cluster in *Prevotella ruminicola* B(1)4: sequence relationships, synergistic interactions, and oxygen sensitivity of a novel enzyme with exoxylanase and beta-(1,4)-xylosidase activities. *J Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**( 8 ): 2958 – 2964.
- [ 19 ] Edwards J, Ewan N, Wallace R, et al. 16S rDNA library-based analysis of ruminal bacterial diversity. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2004, **86**( 3 ): 263 – 281.
- [ 20 ] Tajima K, Aminov R I, Nagamine T, et al. Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries. *J Microbiol Ecol*, 2001, **29**: 159 – 169.
- [ 21 ] Whitford M F, Forster R J, Beard C E, et al. Phylogenetic analysis of rumen bacteria by comparative sequence analysis of cloned 16S rRNA genes. *Anaerobe*, 1999, **4**: 153 – 163.
- [ 22 ] An D, Dong X, Dong Zh. Prokaryote diversity in the rumen of yak (*Bos grunniens*) and Jinnan cattle (*Bos taurus*) estimated by 16S rDNA homology analyses. *Anaerobe* 2005, **11**( 4 ): 207 – 215.
- [ 23 ] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, 1995, **59**: 143 – 169.

## Phylogenetic diversity analyse of Rumen Bacteria using culture independent method

WANG Yuan-liang<sup>1</sup> YANG Rui-hong<sup>2,3</sup> MAO Ai-jun<sup>1</sup> WANG Jia-qi<sup>2</sup> DONG Zhi-yang<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

(<sup>2</sup> Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 10093, China)

(<sup>3</sup> Agriculture College, Xinjiang Agriculture University, Urumqi 830052, China)

**Abstract**: Culture independent method was used to study the diversity of rumen bacteria. Molecular diversity of rumen bacteria was analyzed by PCR amplification and sequencing of 16S rDNA clone libraries prepared from the rumen content of Holstein cows. The total DNA directly extracted from rumen fluid was used as PCR template. Bacteria universal primer 27F and 1492R was used as primer. Random clones, containing almost full size 16S rDNA sequences (about 1.5 kb long), were sequenced and subjected to an on line similarity search. The 16S rDNA sequence analysis indicated that more than half of the sequences belonged to the not-yet-cultured groups. The 16S rDNA similarity levels with cultured species was less than 90%. The bacterial community structure was also revealed by phylogenetic tree of known sequences and selected sequence. In the library from the rumen fluid, the sequences were mainly affiliated with the following major phyla: low G + C Gram-positive bacteria, *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*, and the remaining sequences were placed within not-yet-uncultured groups that had an uncertain affiliation. These several sequences are likely to represent novel taxonomic groupings. The nucleotide sequences have been submitted to the GenBank/EMBL/DDBJ databases under accession numbers AY986777-AY986791.

**Key words**: Rumen, Microbiology diversity, Phylogenetic analysis

Foundation item: National Programs for High Technology Research and Development of China (2004AA214080)

\* Corresponding author: Tel/Fax: 86-10-62551206; E-mail: zlongzy@sun.im.ac.cn

Received date 04-15-2005