

# 现代分子生物学技术在瘤胃微生态系统研究中的应用

段智勇, 郭嫣秋, 刘建新\*

(浙江大学奶业科学研究所 杭州 310029)

**摘 要** 瘤胃中栖息着大量的微生物, 由于这些微生物组成复杂且有些细菌在体外无法培养, 目前对这些微生物的了解仍然很少。现代分子生物学技术的发展为研究瘤胃微生物提供了有效的方法, 利用核酸探针、基因序列分析、遗传指纹技术、全细胞杂交和实时定量 PCR 等技术可以对瘤胃微生物的分类及进化关系、区系结构图、重要酶的表达以及目的微生物的准确定量进行更为深入和透彻的研究。发展和利用这些技术不仅可以研究微生物之间的关系以及微生物与饲料颗粒之间时间与空间的关系, 还能直接在细菌自然生长的环境中对其各种特征进行研究。

**关键词** 微生物; 瘤胃; 分子生物学

中图分类号: Q78, Q938 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2006)01-0166-04

瘤胃中含有大量的细菌(约 200 种,  $10^{11}$  细胞/mL)、纤毛虫(25 个属,  $10^4 \sim 10^6$  细胞/mL)、厌氧瘤胃真菌(5 个属,  $10^3 \sim 10^5$  /mL)和噬菌体( $10^7 \sim 10^9$  /mL)<sup>[1]</sup>, 目前对瘤胃微生物的了解仍然很有限, 主要是受到下面条件的限制: (1) 某些微生物的不可培养性; (2) 体外培养与微生物真实生活环境的偏差, 即培养后会改变有关微生物群落原来的结构, 形成与之并不完全相同的新的群落结构<sup>[2]</sup>。

基于核酸序列分析的现代分子生物学技术为人们提供了有效的方法, 可以用来鉴定微生物的种类、完善微生物的分类系统。目前已较为成熟的技术有核酸探针、基因序列分析、遗传指纹技术、全细胞原位杂交和实时定量 PCR 技术等, 本文介绍了这些技术在瘤胃微生态系统方面的研究进展。

## 1 核酸探针

核酸探针即设计成目标基因的互补序列, 通过与目标基因杂交可以得到细菌在整个微生态系统中的信息。利用该技术, 首先要明确是要鉴定和计数微生物, 还是要监测微生物的活性或功能, 这决定了在实际操作中目标核酸的选择以及核酸探针的设计。核酸探针一般可以分为两类: 基于 DNA 和基于 RNA 方法的探针。

### 1.1 DNA 探针

Atwood 等<sup>[3]</sup>最早利用核酸分析技术研究了将细菌引入瘤胃后的存活问题, 标记布氏普雷沃氏菌(*Prevotella bryantii*)的染色体 DNA, 随机克隆, 以测定该细菌被引入到瘤胃后的存活时间。结果显示, B14 菌株在体外培养时的半衰期为 9h, 但接种到瘤胃后, 仅为 30min。Whitehead 和 Cotta<sup>[4]</sup>克隆了一种淀粉酶基因作为 DNA 探针, 可以快速而准确地检测人类或牛肠道中与人类结肠癌有关的牛链球菌(*Streptococcus bovis*)。Mannarelli 等<sup>[5]</sup>利用 DNA 探针研究了胃肠道中微生物种群的多样性, 如丝状杆菌(*Fibrobacter*), 反刍兽新月形单胞菌(*Selenomonas ruminantium*)和溶纤维丁酸弧菌(*Butyrivibrio fibrisolvens*)。现在大量的研究均采用质粒或染色体 DNA 的随

机克隆片段作为探针。

用基于 DNA 的方法研究胃肠道微生物的分子生态学具有很高的特异性和灵敏性, 该方法的不足在于需要纯培养的菌株, 而细菌体外培养与其真实生活环境中有一定的差异。此外, 与 RNA 技术相比, 该技术不适合用来细致地研究胃肠道微生物生态系统的群落结构, 但其可以用于功能基因的分析。

### 1.2 RNA 探针

16S rRNA 方法的理论和实际操作前人已大量的报道, 研究者完善地建立了利用小亚基(SSU)rRNA-16S rRNA 研究胃肠道微生态系统的方法。这些方法也适用于 23S rRNA, 由于其信息量很大(3000bp), 故在技术更为成熟时, 能得到更为广泛的应用。16S rRNA 保守区的互补寡核苷酸可用来设计通用探针, 而其可变区则用来设计成高特异性的探针, 用来鉴定微生物的属或种, 乃至某一菌株。

利用 16S rRNA 寡核苷酸探针研究牛瘤胃中产琥珀酸丝状杆菌(*Fibrobacter succinogenes*)和多毛螺菌(*Laetospira multiparus*)的数量与变化及其在复杂的微生物区系中的活性, 结果表明, 相关种的 *F. succinogenes* 具有遗传多样性<sup>[6]</sup>, 在该试验中, 传统的培养计数法没有获得成功。群特异性的 16S rRNA 寡核苷酸探针可以用来研究不同家畜(牛、绵羊、山羊、猪)胃肠道中细菌、真核生物和古细菌的数量, 试验发现这三类微生物数量的变化范围分别为 60%~90%、3%~30%和 0.5%~3%, 且发现不同动物消化道中占优势的甲烷菌是不同的<sup>[7]</sup>。Krause 和 Russell<sup>[8]</sup>利用探针研究了莫能霉素添加水平对瘤胃中氨基酸利用菌及其脱氨作用的影响, 探针还被用于白色瘤胃球菌(*Ruminococcus albus*)和黄色瘤胃球菌(*Ruminococcus flavefaciens*)在发酵纤维二糖、纤维素及碱处理麦秸时细菌间相互关系的动力学研究。结果表明, 16S rRNA 寡核苷酸探针能有效地鉴定培养物中特定的细菌, 而且还能提供细菌间竞争作用的一些信息<sup>[9]</sup>。这些探针还被用来研究 *R. albus*、*R. flavefaciens* 和 *F. succinogenes* 在底物充

基金项目: 国家杰出青年科学基金(30325033)

\* 通讯作者。Tel/Fax: 86-571-86971097; E-mail: liujx@zju.edu.cn

作者简介: 段智勇(1978-), 男, 湖北北京山人, 博士研究生, 从事反刍动物营养的研究。zyduan@zju.edu.cn

收稿日期: 2005-06-10 接受日期: 2005-08-01 修回日期: 2005-10-12

足或不足的环境中对纤维二糖和纤维素的竞争现象<sup>[10]</sup>。黄庆生等<sup>△</sup>利用探针研究了酵母培养物对瘤胃细菌的影响,发现添加酵母培养物能显著提高黄化瘤胃球菌的相对比例。

Finlay 等<sup>[11]</sup>利用荧光标记的 16S rRNA 寡核苷酸探针研究了瘤胃中的古细菌,证实内毛亚科(*Entodinium*)和反刍厚毛虫(*Dasytricha ruminantium*)的细胞液泡外含有内共生的甲烷菌。Sharp<sup>[12]</sup>等利用 SSU rRNA 探针研究瘤胃和体外连续培养系统中的微生物区系,均发现原虫和产甲烷菌之间有很强的互作关系:甲烷杆菌科(*Methanobacteriaceae*)是瘤胃古细菌中最大的一类,占 89.3%,而且在 99.2% 的原虫碎片均有发现,体外培养 48h 后,随着原虫数量的下降,*Methanobacteriaceae* 占古细菌的比例降为 54%,但占古细菌的 12.1% 的甲烷微菌科(*Methanomicrobiale*)在原虫碎片中没有检测到,这说明 *Methanomicrobiale* 是游离在原虫外的。

## 2 基因序列分析

随着方便实用的 DNA 克隆技术及 PCR 技术的发展,通过 SSU rRNA 序列的分析比较,已能对复杂的微生物系统进行研究。该技术还没有广泛地应用到肠道生态系统的分析,目前有白蚁肠道、人类结肠的研究报道,也有对瘤胃生态系统的研究报道,这些试验结果都表明肠道生态系统具有高度的多样性。Whitford 等<sup>[13]</sup>从饲喂全混合日粮(26% 苜蓿,30% 青贮玉米和 35% 精料)的奶牛瘤胃液中制备了两个基因克隆库,通过分析发现 133 个序列中有 101 个与瘤胃普雷沃氏菌(*Prevotella ruminicola*)是同源的,但大部分是以前从未培养或分离成功的细菌。Tajima 等<sup>[14]</sup>从饲喂全混合日粮牛的瘤胃液相、固相和饲喂高粗料(苜蓿、猫尾草)的瘤胃液中制备了 3 种 SSU rDNA 基因克隆库,这 3 个基因克隆库几乎包含了所有的 SSU rDNA 全序列(1.5kp),通过分析(161 个克隆),只有 10 个序列(6.2%)与已知的细菌一致,34.6% 的序列与已知细菌具有 90%~98% 的同源性,其余的与现已知细菌的同源性均小于 90%。与体内试验结果相反,体外培养得到的细菌与现已知的细菌高度一致。Koike 等<sup>[17]</sup>利用该技术研究了绵羊瘤胃中附着在鸭茅和苜蓿秆上的微生物区系,结果发现 91 个克隆中有 38 个克隆与已知的细菌同源性低于 90%。这些试验表明有很多微生物在体外培养不能成活,从而得不到彻底的研究。

目前利用该方法研究瘤胃中的原虫和真菌还不如细菌深入和成熟。Embley 等<sup>[15]</sup>通过分析多泡多甲虫(*Polyplastron multivesiculatum*)和 *D. ruminantium* 的 18S rRNA 序列,对其进行了分类。Dore 和 Stahl<sup>[16]</sup>通过对 18S rRNA 序列的分析和比较,将 *Neocallimastix* 属分类于壶菌纲(*Chytridiomycete*);研究者还对四种瘤胃真菌进行了 18S rRNA 序列分析,数据与前人研究结果一致,而且还发现瘤胃真菌也具有同源性。

以上研究发现了一些新的有用信息,但也有些问题需要得到解决。这些问题主要体现在核酸的抽提、PCR 及克隆过程中所产生的一些偏差和假象。例如,在数据库的建立过程中,由于检测手段的限制,将一些人工合成的序列录入了数据库,从而导致样品的基因克隆库和凝胶电泳图谱很难分析甚至得出错误的结果<sup>[18]</sup>。

## 3 遗传指纹技术

基因指纹技术为研究菌群结构及其动态变化提供了有效的手段。Muyzer 等<sup>[19]</sup>首次将遗传指纹技术引入微生物生态学研究中,利用 rDNA PCR 扩增后的片段进行变性梯度凝胶电泳(DGGE),分析研究了环境中微生物区系的变化。利用 DGGE 和温度梯度凝胶电泳技术(TGGE)可以将长度相同但序列不同的 DNA 片段分开,其原理是在线性梯度变性或线性温度变性的聚丙烯酰胺凝胶上,DNA 双链分子会逐步解链,迁移率也随之下降。DNA 序列不一样,其解链的温度和所需的变性浓度也不一样,最终各种不同的 DNA 片段会在凝胶上呈现不同的条带,然后通过 EB、SYBR Green I 或银离子染色即可成像,进而进行分析,通过对电泳图谱的直接分析可以对微生态系统中的各种细菌进行相对定量。该技术已经广泛地用来研究复杂的环境微生态系统、监测其区系组成变化、分离细菌、比较各种 DNA 抽提方法的效率以及检测 PCR 和克隆过程中产生的偏差等。但由于肠道系统中微生物种类繁多,产生的条带也多,而且很复杂,会对分析造成很大的困难,这在一定程度上限制了该技术在肠道生态系统上的应用。

Cann 等<sup>[20]</sup>利用该方法纯化了瘤胃液中的纤维素利用菌:*F. succinogenes*, *R. albus* 和 *R. flavefaciens*。DGGE 图谱显示:*R. flavefaciens* 9 个菌株的 16S rRNA 的 V3 区经过 PCR 扩增后,在凝胶上处于同一个位置,这表明 *R. flavefaciens* 的 16S rRNA 的 V3 区没有多样性,而 *R. albus* 则相反,9 种菌株的该区呈现出高度的多样性。*Ruminococcus* 两个种的电泳图谱与 *F. succinogenes* 有很大的不同,在电泳图谱上,可以很容易地将 *F. succinogenes*, *R. albus* 和 *R. flavefaciens* 的 PCR 产物区分开。这表明,DGGE 可以将分类相近的菌株进行分离,故该技术可以用来分析瘤胃液中纤维素利用菌的多样性及其动态变化。

Kocherginsdaya 等<sup>[21]</sup>利用该技术分析了饲喂不同日粮肉牛的瘤胃液微生物区系。提取总染色体 DNA,扩增 16S rDNA 的 V3 或 V9 区,结果发现,饲喂干草日粮的肉牛其图谱相似,共出现了 16 条明显的带,其中 5 条占优势,但饲喂精料为主的结果与前者不同,每头牛的图谱都不一样。Zhu 等<sup>[22]</sup>利用 DGGE 分析了断奶仔猪粪样体外培养甜菜渣时细菌区系的变化情况,发现体外培养后,DGGE 图谱的电泳条带会出现 3 条优势条带,通过 16S rDNA 的序列分析,这 3 种菌中两种与挑剔真杆菌(*Eubacterium eligens*)和裂果胶毛螺菌(*Lachnospira pectinoschiza*)具有 92% 和 96% 的同源性,另外一种与 *L. pectinoschiza* 具有 95% 的同源性。他们还利用该技术研究了山羊瘤胃细菌的多样性,发现在山羊饲料中添加大豆黄酮后,DGGE 谱带会发生不同程度的变化(30%~46%)<sup>[23]</sup>。

这些试验结果表明,DGGE 能有效地分析瘤胃微生物生态系统的多样性、监测其种群的变化,但微生态系统中有些微生物含量很少,若其 DNA 占总 DNA 量不足 1% 时,利用该技术仍然很难检测到,有待于分子生物学技术的进一步发展和完善得以解决。

<sup>△</sup>黄庆生,王加启. 酵母培养物对瘤胃纤维分解菌的影响. 动物营养代谢研究(2002 年度论文集). 农业部动物营养学重点实验室, 2002, 263-269.

## 4 全细胞原位杂交

全细胞原位杂交主要是指寡核苷酸探针与从样品中富集到的细胞进行杂交,其中最为常用的方法是用互补的荧光标记的寡核苷酸探针与细胞内的 rRNA 杂交,然后通过荧光显微镜就可以观察到样品中特定微生物的存在,该技术最早由 Delong 等提出<sup>[24]</sup>。Poulsen 等<sup>[25]</sup>利用该技术研究了用链霉素处理的大鼠大肠中的微生物区系,得到了肠组织中大肠杆菌(*Escherichia coli*)的分布情况。该方法还能快速检测体外不能培养的一些细菌的情况以及它们与宿主或其他细菌细胞之间的关系,通过分析单细胞中 DNA 或 RNA 可得到细菌的原位生长速度,例如,附着在肠壁上的细菌的传代时间为 30~80 min,而肠腔中的细菌则要慢得多<sup>[26]</sup>。

利用 16S rRNA 寡核苷酸探针全细胞荧光原位杂交可以对单细胞进行定性和计数,Franks 等<sup>[27]</sup>设计特异性的探针研究了人类粪便中厌氧菌的情况,结果发现,脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*)和吉氏拟杆菌(*Bacteroides distasonis*)特异性探针检测到的细菌为  $5.4 \times 10^{10}$  细胞/克干物质, *Streptococcus-Lactobacillus* 和 *Clostridium coccoides-Eubacterium rectale* 特异性探针检测到的细菌分别为  $1.7 \times 10^7$ 、 $7 \times 10^8$  和  $7.2 \times 10^{10}$  细胞/克干物质。

这种结合了现代分子生物学和图像分析学的技术可以在单细胞水平上分析胃肠道中细菌的结构和功能。

## 5 实时荧光定量 PCR 技术

实时荧光定量 PCR 技术(real-time PCR, RT-PCR),是指在 PCR 反应体系中引入荧光标记,利用荧光信号的积累实时监测 PCR 反应过程,对未知模板进行定量分析。与传统的 PCR 定量方法相比,该技术测定的不是 PCR 终产物,而是由本底进入指数增长阶段的拐点所对应的循环次数(Ct 值),由于终产物量与起始模板量之间没有线性关系,而 Ct 值与模板 DNA 的起始拷贝数成反比,故 RT-PCR 更能反应真实情况和准确定量。

Tajima 等<sup>[28]</sup>利用该技术研究了日粮变化对瘤胃微生物区系的影响,发现当荷斯坦奶牛日粮从干草型转为谷物型时,纤维素利用菌 *F. succinogenes* 和 *R. flavefaciens* 的数量均会大幅下降。本实验室研究发现,当稻草纤维与玉米淀粉发生正组合效应时,*F. succinogenes*、*R. flavefaciens* 和真菌均会上升,这表明与纤维素消化有关的微生物数量的增加有可能是纤维类饲料与淀粉类饲料发生正组合效应的机制之一(未发表资料)。此外,我们还研究了体外培养苜蓿时添加二溴乙烷磺酸钠(BES)对瘤胃微生物的影响,发现 BES 添加对瘤胃产甲烷菌和真菌有抑制作用,但会提高 *F. succinogenes* 的数量,该结果表明 BES 在减少瘤胃甲烷产量的同时,有可能影响瘤胃中的其他微生物。

## 6 小结和展望

分子生物学技术的发展为微生物学和营养学科研人员研究瘤胃微生态系统提供了有力的方法。核酸探针技术是研究胃肠道微生态系统方法上的一次革命,利用该技术使人们首次完整地解胃肠道微生物区系的复杂性,核酸(DNA 或 RNA)序列分析技术则可用于研究微生物的分类及其进化

关系,遗传指纹技术则提供了生态环境中微生物区系的结构图,而全细胞原位杂交可用来研究微生物中一些重要酶的表达,实时定量 PCR 能对微生物系统中的目的微生物准确的定量。利用这些技术不仅可以研究微生物之间的互作关系以及微生物与饲料颗粒之间时间和空间的关系,还能直接在细菌自然生长的环境中对其各种特征进行研究。

## 参 考 文 献

- [1] Williams AG, Coleman GS. The rumen protozoa. In: Hobson PN, Stewart CS. The Rumen Microbial Ecosystem. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Chapman and Hall, 1997, 73-139.
- [2] Stahl DA. Molecular approaches for the measurement of density, diversity and phylogeny. In: McInerney MJ, et al. ed. Manual of Environmental Microbiology. Washington: ASM Press, 1997, 102-114.
- [3] Attwood G, Lockington RA, Xue GP, et al. Use of a unique gene sequence as a probe to enumerate a strain of *Bacteroides rumenicola* introduced into the rumen. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **54**: 535-539.
- [4] Whitehead TR, Cotta MA. Development of a DNA probe for *Streptococcus bovis* by using a cloned amylase gene. *J Clin Microbiol*, 1993, **31**: 2387-2391.
- [5] Mannarelli B, Stack RJ, Lee D, et al. Taxonomic relatedness of *Butyrivibrio*, *Lachnospira*, *roseburia*, and *Eubacterium* species as determined by DNA hybridization and extracellular-polysaccharide analysis. *Intel J Syst Bacteriol*, 1990, **40**: 370-378.
- [6] Ogata K, Aminov RI, Nagamine T, et al. Construction of a *Fibrobacter succinogenes* genomic map and demonstration of diversity at the genomic level. *Curr Microbiol*, 1997, **35**: 22-27.
- [7] Lin CZ, Raskin L, Stahl DA. Microbial community structure in gastrointestinal tracts of domestic animals: Comparative analyses using rRNA-targeted oligonucleotide probes. *FEMS Microbiol Ecol*, 1997, **22**: 281-294.
- [8] Krause DO, Russell JB. An rRNA approach for assessing the role of obligate amino acid-fermenting bacteria in ruminal amino acid deamination. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**: 815-821.
- [9] Odenyo AA, Mackie RI, Stahl DA, et al. The use of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes to study competition between ruminal fibrolytic bacteria: pure-culture studies with cellulose and alkaline peroxide-treated wheat straw. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**: 3697-3703.
- [10] Shi Y, Odt CL, Weimer PJ. Competition for cellulose among three predominant ruminal cellulolytic bacteria under substrate-excess and substrate-limited conditions. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 734-742.
- [11] Finlay BJ, Esteban G, Clarke KJ, et al. Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. *FEMS Microbiol Lett*, 1994, **117**: 157-162.
- [12] Sharp R, Zermer CJ, Stern MD, et al. Taxon-specific associations between protozoal and methanogen populations in the rumen and a model rumen system. *FEMS Microbiol Ecol*, 1998, **26**: 71-78.
- [13] Whitford MF, Forster RJ, Beard CE, et al. Phylogenetic analysis of rumen bacteria by comparative sequence analysis of cloned 16S rRNA genes. *Anaerobe*, 1998, **4**: 153-163.
- [14] Tajima K, Aminov RI, Nagamine T, et al. Molecular bacteria diversity of the rumen as determined by sequence analysis of 16S rRNA libraries. *Microbiol Ecol*, 1999, **27**: 150-169.

- [ 15 ] Embley TM, Finlay BJ, Dyal PL, *et al.* Multiple origins of anaerobic ciliates with hydrogenosomes within the radiation of aerobic ciliates. *Proc Royal Soc London*, 1995, **262**: 87 – 93.
- [ 16 ] Dore J, Stahl DA. Phylogeny of anaerobic rumen Chytridiomycete inferred from small subunit ribosomal RNA sequence comparisons. *Can J Bot*, 1991, **69**: 1964 – 1971.
- [ 17 ] Koike S, Yoshitani S, Kobayashi Y, *et al.* Phylogenetic analysis of fiber-associated rumen bacterial community and PCR detection of uncultured bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 2003, **229**: 23 – 30.
- [ 18 ] Hunter-Cevera. The value of microbial diversity. *Curr Opin Microbiol*, 1998, **1**: 275 – 285.
- [ 19 ] Muyzer G, Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**: 695 – 700.
- [ 20 ] Cann IKO, Kocherginskaya SA, White BA. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain-reaction amplified genes coding for 16S rRNAs from ruminal fibrolytic bacteria. *Proc Jap Soc Rumen Metabol Physiol*, 1996, **7**: 10.
- [ 21 ] Kocherginskaya SA, Simpson JM, White BA. Microbial community structure of the rumen as assessed by denaturing gradient gel electrophoresis of polymerase chain-reaction amplified 16S rDNA genes. *Evolution of the Rumen Microbial Ecosystem, RRI-INRA Rumen Microbiology Symposium*, 1997, 37.
- [ 22 ] Zhu WY, Williams BA, Konstantinov SR, *et al.* Analysis of 16S rDNA reveals bacterial shift during *in vitro* fermentation of fermentable carbohydrate using piglet faeces as inoculum. *Anaerobe*, 2003, **9**: 175 – 180.
- [ 23 ] 姚文, 朱伟云, 韩正康, 等. 应用变性梯度凝胶电泳和 16S rDNA 序列分析对山羊瘤胃细菌多样性的研究. *中国农业科学*, 2004, **37**: 1374 – 1378.
- [ 24 ] Delong EF, Wickham GS, Pace NR. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of microbial cells. *Science*, 1989, **243**: 1360 – 1363.
- [ 25 ] Poulsen LK, Lon F, Kristensen CS, *et al.* Spatial distribution of *Escherichia coli* in the mouse large intestine inferred from rRNA *in situ* hybridization. *Infect Immunol*, 1994, **62**: 5191 – 5194.
- [ 26 ] Poulsen LK, Licht TR, Rand C, *et al.* The physiological state of *E. coli* growing in the large intestine of streptomycin-treated mice. *J Bacteriol*, 1995, **177**: 5840 – 5845.
- [ 27 ] Franks AH, Harmsen HJM, Raangs GC, *et al.* Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent *in situ* hybridization with group specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**: 3336 – 3345.
- [ 28 ] Tajima K, Aminov RI, Nagamine T, *et al.* Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**: 2766 – 2774.

## Application of modern molecular biology techniques to study micro-ecosystem in the rumen

DUAN Zhi-yong, GUO Yan-qiu, LIU Jian-xin\*

(*Institute of Dairy Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China*)

**Abstract:** The microbial community inhabiting in the rumen is characterized by its high population density, wide diversity and interactive complexity. However, until recently our knowledge of rumen microbiology was primarily based on classical culture based techniques (isolation, enumeration and nutritional characterization) which probably only account for 10% to 20% of the rumen microbial population. Modern molecular biology techniques provide effective methods to study the micro-ecosystem in the rumen. The use of molecular techniques based on nucleic acid probes is likely to revolutionize the approach to microbial ecology in the rumen and provide, not simply a refinement or increased understanding but a complete description of rumen community for the first time. Modern molecular techniques based on sequence comparisons of nucleic acids may be used to explore molecular characterization and provide a classification scheme which predicts natural evolutionary relationships. Genetic fingerprinting techniques that provide a pattern or profile of genetic diversity have been applied in a variety of environmental studies for the analysis of microbial communities. Whole-cell hybridization is a powerful technique which may be used to study the structure and function of microbial communities *in situ* and describe the expression of key enzymes. Real-time quantitative PCR technique may be conducted to accurately quantify the target microorganisms in the rumen. Development of these procedures and techniques will result in greater insights into community structure and activity of rumen microbial communities in relation to functional interactions, spatial and temporal relationships between different microorganisms and between microorganisms and feed particles. The successful development and application of these methods promise to provide the first opportunity to link distribution and identity of rumen microbes in their natural environment with their genetic potential and *in situ* activities.

**Keywords:** Microbial community; Molecular biology; Rumen

Foundation item: National Science Foundation for Distinguished Young Scholars of China (30325033)

\* Corresponding author. Tel/Fax: 86-571-86971097; E-mail: liujx@zju.edu.cn

Received: 10 June 2005/Accepted: 1 August 2005/Revised: 12 October 2005