

利用 PCR-SSCP 研究不同淀粉与滤纸纤维比例底物对瘤胃发酵和微生物的影响

王梦芝 王洪荣* 李国祥 张洁 曹恒春

(扬州大学动物科学与技术学院, 扬州, 225009)

摘要: 以三只瘿管山羊作为瘤胃液供体, 用体外法研究不同底物对瘤胃发酵及瘤胃微生物的影响。底物设计为: 可溶性淀粉/滤纸纤维(NSC/SC): 100:0, 70:30, 50:50, 30:70, 0:100。结果表明: 在 NSC/SC 的比例为 30:70 组微生物产量和纤维素降解率最高, 发酵状态最佳; 原虫与细菌的比例, 总体上有随 NSC/SC 下降先成上升后降低的趋势, 在 NSC/SC 的比例为 50:50 组达到最高峰; 细菌 16srRNA 的 V3 可变区 PCR-SSCP 各组图谱反映了细菌类群内部种属因底物的改变而发生了应变。原虫显微观察结果表明随 NSC/SC 下降, 内毛属与等毛虫原虫的比例下降, 而双毛属与头毛亚科原虫的比例增加, 即原虫类群内部种属也对底物变化的产生应变。结果表明不同淀粉与纤维素比例水平底物不仅影响了瘤胃发酵也瘤胃微生物的群系特征。

关键词: 可溶性淀粉/滤纸纤维、瘤胃发酵、瘤胃微生物、PCR-SSCP

近年来, 分子生物学手段在瘤胃混合微生物居群特征研究上的应用扩大了瘤胃中可研究微生物的范围, 而且直接将微生物的遗传物质作为研究对象其研究结果也更为客观可信。其中 1989 年 Orita^[1] 首先使用的 PCR-SSCP 遗传指纹技术, 其原理是将 PCR 产物变性成为单链 (Single-strand DNA, ssDNA), 由于单链的三维结构受分子内互作效应影响 (Lee *et al.*, 1996)^[2], 序列中的一个碱基的改变都将改变单链构象, 不同构象的短链 ssDNA 分子在非变性聚丙烯酰胺凝胶上的移动速度不同, 从而形成一个凝胶组带图案。利用之可将不同序列的单链分离, 该法经济简捷, 因而被广泛用于基因突变的检测, 在群体微生物的居群特征分析上也有越来越广的应用 (Junca *et al.*, 2004^[3]; Wenderoth *et al.*, 2005^[4]; Cécile Callon, 2006^[5])。

不同的日粮会引起瘤胃发酵状况的改变, 且不同的日粮对瘤胃微生物的区系也有一定的选择作用, 导致瘤胃微生物区系比例的改变及日粮的降解性能的改变, 进而改变移入宿主动物十二指肠的营养成分比例, 最终影响宿主的生长与生产 (Gerson *et al.*, 1988^[6]; Clark *et al.*, 1992^[7]; 王洪荣等, 1999^[8])。但日粮对瘤胃发酵和微生物的影响规律及分子机制并不完全明了, 本实验采用纯合日粮可溶性淀粉与滤纸纤维的不同比例水平底物进行体外培养, 利用免培养的分子生物学技术 PCR-SSCP 进一步分析培养液中微生物的居群应变特征, 旨在研究不同淀粉与纤维素比例水平底物对瘤胃发酵及微生物的影响规律及影响机制, 以求能为反刍动物微生态的研究提供一些基础资料及为生产实践提供一定的理论指导。

1 材料与方 法

1.1 试验动物

三只装有瘤胃瘿管山羊 (活重: 23.4 ± 2.2kg), 栓

系式饲养, 青刈牧草为日粮, 自由饮水, 用于采集瘤胃液。

1.2 试验原料与设计

可溶性淀粉: [(C₆H₁₀O₅)_x·(162)_x]; 滤纸: (浙江新华) 剪为 1mm 左右碎屑。可溶性淀粉/滤纸纤维比例为 (NSC/SC): A(100:0), B(70:30), C(50:50), D(30:70), E(0:100)。各 2 重复。

1.3 产气与体外培养实验

1.3.1 培养液配制

参考 Menke (1979)^[9] 配制培养液, 及进行产气和体外培养实验。

1.3.2 产气实验

取 200mg 底物, 20mL 培养液及 10mL 瘤胃液先后加入注射器, 39℃ 水浴震荡培养; 在 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 24, 36, 48, 72H 时读取产气量, 并注意注射器气体量达 50ml 后放掉气体。一个无底物的空白对照。

1.3.3 体外培养

取 1.2g 底物, 放入培养瓶, 加入 80mL 培养液及 40mL 瘤胃液。在培养 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 24, 36h 各取 5mL 瘤胃液直接冻存, 36h 培养结束后立即测定 pH 值, 并测定纤维素的降解率, 分离微生物及测定微生物产量。

1.4 测定指标、分析项目与具体方法步骤

1.4.1 微生物的分离

综合参考^{[10][11]} 等方法。(1)原虫: 取瘤胃液加等体积生理盐水 39℃ 孵育 60min, 摇床 125r/min, 并辅以搅拌; 再经 4 层纱布过滤, 滤液离心 (150×g, 15min), 收集沉淀为原虫, 用生理盐水洗涤两次后用生理盐水悬浮, -20℃ 贮存待测。(2)细菌: 收集(1)离心上清, 离心 (22000×g, 15min), 收集沉淀为细菌, 其余处理同(1)。

1.4.2 纤维素(c)的降解率

计算公式: 纤维素(Dc)% = {[底物中 C 量(g)-降解后 C 量(g)]/底物中 C 量(g)} × 100。

1.4.3 瘤胃液 pH 值

收稿日期: 2007-02-02

基金项目: 国家自然科学基金 (No: 30571344)

作者简介: 王梦芝, 研究方向为反刍动物营养及瘤胃微生物。

Email: mengzhiwang@126.com

*通讯作者: 王洪荣, 教授, Email: hrwang@yzu.edu.cn

用 pHS-3C 型 pH 计于培养后立即测定。

1.4.4 瘤胃液氨氮浓度

采用氧化镁蒸馏滴定法。100ml 体积瘤胃液中所含 NH₃-N 量的计算公式: NH₃-N(mg/100ml) = 14 × (V₂-V₁) × C × 100/V₃。式中, V₁: 空白样品滴定所消耗的标准 HCl 体积(ml); V₂: 待测样品滴定所消耗的标准 HCl 体积(ml); V₃: 进行蒸馏的待测样品的体积(ml); C: 标准 HCl 的浓度(mol/L)。

1.4.5 微生物真蛋白的测定与计算

采用三氯醋酸沉淀蛋白法。取分离微生物样品经 22000 × g, 离心 10min, 弃上清液加入 5ml 10% TCA, 混匀后置室温 30min, 离心 (6000 × g, 10min), 弃上清液再加入 5ml 5% NaOH 混匀溶解后, 离心 (6000 × g, 10min), 取上清液用 756 型紫外分光光度计测定 OD280nm 和 OD260nm 值。微生物真蛋白含量 (Pr) 的计算公式:

Pr(mg/ml) = (1.45 × OD280 - 0.740 × OD260) × 稀释倍数。

1.4.6 微生物 DNA 的提取

参考 Zhou et al. (1996) [12], 稍改进。取原虫 (P) 和细菌 (B) 样品, 离心 (22000 × g, 10min), 弃上清, 加抽提液 5mL (100mmol/L Tris-Cl, 50mmol/L EDTA, 2% CTAB) 混匀; 加 100ul 5mg/mL 蛋白酶 K, 1/10 体积的 20% SDS, 完全冻至成冰后 55℃ 水浴 60min, 重复冻融 3 次。用等体积的苯酚/氯仿/异戊醇 (V/V/V=25/24/1) 先抽提一次, 离心 (15000 × g, 10min), 取上水相, 再用等体积的氯仿/异戊醇 (V/V=24/1) 抽提和离心数次至上水相澄清, 取水相加入 0.6 体积的异丙醇, 冰上静置沉淀 DNA 之后离心去上清, 70% 乙醇洗沉淀 2-3 次, 自然干燥, 适量 TE 溶解。紫外分析仪测定所提取 DNA 浓度和纯度, 0.7% 琼脂糖电泳检测 DNA 片断大小。

1.4.7 PCR

以分离提取的细菌 DNA 为模板, 采用细菌 V3 引物 F338: 5' CCT ACG GGA GGC AGC AG 3' (S-D-B-338-a-S-17) 与 R518: 5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3' (S-D-B-518-b-A-17) (Muyzer et al., 1993) [13] 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 (50uL): PCR 即用试剂盒 (Songon) 的 25uL PCR Master, 模板 5uL, 前后引物各 1uL, 18uL ddH₂O。反应参数: 94℃ 预变性 5min; 94℃ 变性 50s; 54℃ 退火 40s; 72℃ 延伸 45s; 33 个循环后, 72℃ 再延伸 5min, 取扩增产物 10uL, 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 片断大小、拍照。

1.4.8 SSCP 检测与 SSCP 指纹图谱分析

SSCP 检测参考 Schmalenberger et al. (2003) [14]。10uL PCR 产物, 加 10uL 变性剂 (95% 去离子甲酰胺, 10mmol/L EDTA, 0.02% 溴酚蓝), 30uL 石蜡油, 煮沸 10min, 取出立刻放入冰浴中 10min, 将水相全部上样, 10-15℃ 下 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 150V (30min) 后 80V (16h), 银染、拍照。将 SSCP 谱图数字化, 给图谱中每个清晰可辨的条带依次命名, 并计算不同的泳道 (底物) 之间 Jaccard 相似性指数 (Cj) 以比较其相似程度。Cj 计算公式: Cj = j / (a + b - j), 式中 j: 两泳道共有

条带数; a, b: 两泳道各自条带总带数。

1.4.9 原虫分类计数

原虫用 MFS 染液染色, 血细胞计数板显微镜分类计数 (10 × 40)。计算公式: 1mL 样品液中的总数 = A/4 × 16 × 10⁴ × B = 40000A · B (个)。式中: A 为计数的四个中方格中的总数, B 为样品液稀释倍数。

1.5 数据处理

Excel 软件整理数据, SPSS11.5 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 产气量

由表 1、图 1 可知, 72 小时累积产气量 A 组最高, E 组最低, 差异极显著 (P < 0.01)。随着时间推移, 各组均呈上升的趋势, A, B, C 组在 2-12h 期间产气量急剧上升, 在 12-18h 期间上升幅度趋缓, 在 18-24h 间又加快上升, 在 24-72h 期间产气量曲线趋于平缓; D, E 组在 2-12h 期间产气量上升幅度较小, 在 12-72h 期间上升幅度有所增加。瘤胃液终 pH 在 5.75-6.75 变动, 且随 NSC/SC 上升而下降, 但适合于微生物生长。

2.2 NH₃-N 浓度

瘤胃液氨氮浓度变动范围为 5.79-11.07mg/100ml, 由表 1 可知, 平均值 A 组最低为 7.19mg/100ml, E 组最高为 8.40mg/100ml (P < 0.01)。从图 2 可知, 随时间推移, 各组液氨氮浓度在 2h 达最大, 然后缓慢下降, A, B, D 组在 16h, C 组在 14h, E 组 18h 时达最小值, 然后回升。培养液终 pH 值在 5.65-6.90 之间变化, 同样适合于微生物生长。

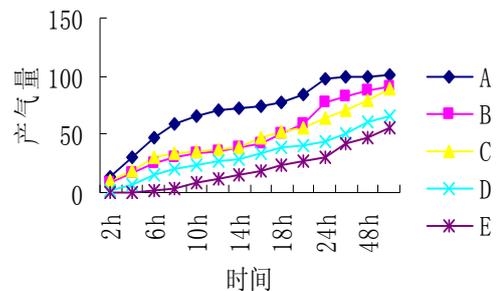


图 1 累积产气量变化规律图 Fig.1 The accumulative gas production

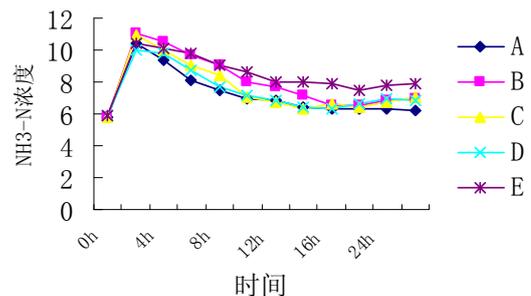


图 2 NH₃-N 浓度变化规律图 Fig.2 NH₃-N concentration in incubation medium

表 1 pH 值, 累积产气量, NH₃-N 浓度, 滤纸纤维降解率, 微生物真蛋白产量、区系比例

Table 1 The pH-value, the accumulative gas production, NH₃-N concentration, the degradability of filter paper, the production of microbial protein and the ratio of protozoa to bacteria (ml, mg/100ml, %, mg/ml)

项目 Items	A (100:0)	B(70:30)	C(50:50)	D(30:70)	E(0:100)	SEM	P
累积产气量 Gas production	101.5 ^A	91.0 ^B	88.5 ^B	65.5 ^D	55.5 ^E	.8367	.000
产气实验 pH 值 Gas pH value	5.75 ^A	5.9 ^{AB}	6.35 ^C	6.15 ^{BC}	6.75 ^D	.1265	.003
NH ₃ -N 均值 NH ₃ -N concentration	7.19 ^A	7.99 ^E	7.60 ^C	7.44 ^{BC}	8.40 ^G	.0892	.000
培养实验 pH 值 Culture pH value	5.65 ^A	6.15 ^B	6.40 ^{BC}	6.55 ^C	6.90 ^{CD}	.1517	.003
滤纸纤维降解率	---	23.73 ^C	24.61 ^E	26.15 ^G	21.75 ^A	.00144	.000
Filter cellulose degradability							
细菌产量 Bacterial protein	0.3084 ^E	0.2525 ^C	0.2629 ^C	0.3099 ^E	0.2285 ^A	.00481	.000
原虫产量 Protozoal protein	0.2785 ^D	0.2349 ^{BC}	0.2530 ^C	0.2945 ^E	0.2095 ^A	.00934	.000
原虫/细菌 Protozoa/Bacteria	90.30	93.05	95.23	95.03	91.68	4.9691	.775

同行字母相同或不标注者差异不显著 ($P>0.05$), 相邻差异显著 ($P<0.05$), 相隔差异极显著 ($P<0.01$)。

The same superscript within the same row indicate that the means were not significantly different ($P>0.05$); neighbor letters indicate that the means were significantly different ($P<0.05$); parted letters indicate that the means were extremely different ($P<0.01$).

2.3 纤维素的降解率、微生物产量与区系比例

由表 1 可知, 滤纸纤维的降解率的变化范围为 21.75-26.15%, 并随 NSC/SC 的降低而提高, 在 NSC/SC 为 30:70 时达到最高 26.15%; 但纯滤纸纤维 E 组最低, 而且与其他组差异显著 ($P<0.05$)。

由表 1、图 3 可知, 原虫、细菌产量在五组间差异显著或极显著 ($P<0.05$, $P<0.01$); 随 NSC/SC 的下降, 成上升趋势, 在 NSC/SC 的比例为 30:70 组细菌与原虫产量都达到最高峰 (0.3099, 0.2945mg/ml); 而 E 组的细菌与原虫产量皆最低 (0.2285, 0.2095 mg/ml)。

由表 1、图 4 可知, 微生物区系比例 (原虫与细菌比值即 P/B): 随 NSC/SC 的下降, P/B 总体上有先上升后下降的趋势, 在 NSC/SC 的比例为 50:50 组 (95.23%) 达到最高峰。

2.4 PCR-SSCP 分析

紫外分析仪和 0.7%、2% 的琼脂糖凝胶电泳检测结果表明: 所有样品提得 DNA 的 OD260/OD280 在 1.68-1.91 之间, 片断大小在 20kb 以上 (约为 30kb), 质量较好; PCR 扩增片段大小为 200bp 的预期条带。

从 SSCP 图谱中可以清晰可辨的条带共有 13 条 (a-m) (图 5), 各组特有带 A 为: m; D 为: j, 其中各组的优势条带 A 为: m; B、C、D 和 E 为: f。

相似性指数矩阵表 2 可知相临组之间有较高的相似指数, 而相隔组之间的相似指数较低, 由此可知底物相差越大则微生物的种属变化也越大; 但相隔组 A 与 E 组之间相似性较相临组 A 与 B、D 与 E 为高, 可能是由于 A 与 E 组的条带数都较少, 而相似性指数的计算受总条带数的制约所致。

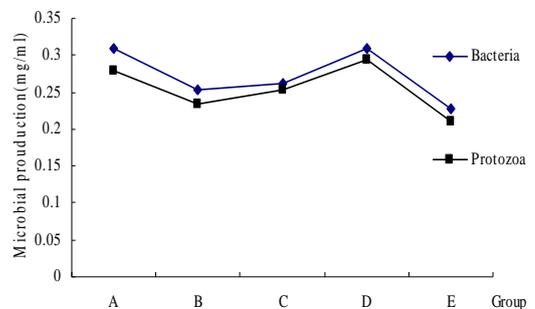


图 3 培养 36h 时微生物蛋白产量

Fig.3 The protein production of microorganism

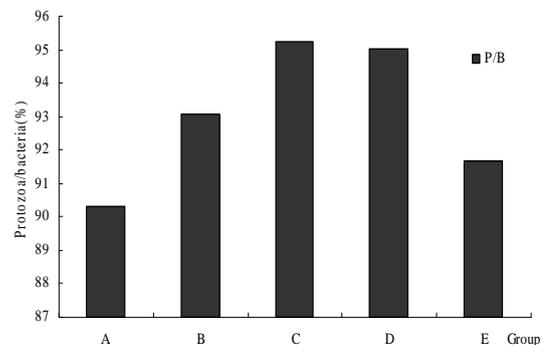


图 4 培养 36h 时微生物区系比例

Fig.4 The ratio of protozoa to bacteria

表 2 细菌相似性指数矩阵

Table2. The matrix of kindred index of bacteria

组别 Groups	B	C	D	E
A	0.50	0.46	0.54	0.56
B		0.91	0.83	0.90
C			0.92	0.82
D				0.75

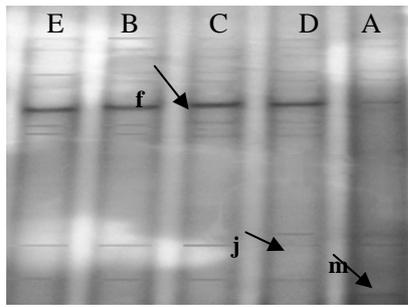


图 5 SSCP 凝胶图谱

Fig.5 The results of SSCP test

2.5 原虫分类计数

表 3 示原虫分类计数结果: 随 NSC/SC 下降, 内毛属与等毛属原虫的比例下降, 而双毛属、前毛属与头毛属原虫的比例增加, 不同底物原虫种属比例差异显著或极显著。

表 3 原虫分类计数比例表

Table3 The profile of protozoa community

(%)

项目 Items	A (100:0)	B(70:30)	C(50:50)	D(30:70)	E(0:100)	SEM	P
内毛属 <i>Entodinium</i>	65.93 ^I	63.42 ^G	61.15 ^E	58.28 ^C	56.58 ^A	0.295	<0.0001
双毛属 <i>Diplodinium</i>	12.64 ^A	14.10 ^C	15.81 ^E	15.94 ^E	17.49 ^G	0.156	<0.0001
等毛属 <i>Isotricha</i>	8.83 ^F	8.12 ^E	6.65 ^C	6.33 ^C	4.64 ^A	0.267	<0.0001
前毛属 <i>Epidinium</i>	1.95 ^A	2.57 ^C	3.54 ^E	3.75 ^F	4.35 ^H	0.068	<0.0001
头毛属 <i>Ophryoscolex</i>	1.51 ^A	2.14 ^C	3.02 ^E	2.91 ^E	3.59 ^G	0.078	<0.0001
合计 Total	90.8	90.3	90.3	87.3	86.6		

同行字母相同或不标注者差异不显著 ($P>0.05$), 相邻差异显著 ($P<0.05$), 相隔差异极显著 ($P<0.01$)。

The same superscript within the same row indicate that the means were not significantly different ($P>0.05$); neighbor letters indicate that the means were significantly different ($P<0.05$); parted letters indicate that the means were extremely different ($P<0.01$).

3 讨论

3.1 瘤胃发酵

瘤胃发酵中的气体由饲料发酵直接产生的 (主要 CO_2 和 CH_4), 或是伴随短链脂肪酸的产生从碳酸氢盐缓冲液中间产生释放 (主要 CO_2)。厌氧、温度、pH 值、缓冲液和可发酵能源等是影响体外培养瘤胃微生物对饲料发酵的一些重要因素, 进而影响产气量。本研究中随着底物中淀粉比例的增大, 产气量也随之增加, 这可能是因为底物中一定量的快速可利用能源利于瘤胃微生物的繁殖, 尤其是产甲烷菌生长物质的增加, 使产甲烷菌的数量迅速增多, 导致产气量也随之上升。纤维的发酵与淀粉相比虽然会因产乙酸较多而相伴产生更多的气体, 但本研究中滤纸纤维组的产气量最低提示体外纯培养条件下快速可发酵能源对微生物发酵及对底物利用的重要性。

氨是瘤胃中主要微生物生长的氮源 (Bandle *et al.*, 1997)^[15]。 $\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度也是反映日粮氮降解速度和微生物对氨利用的综合指标。本研究各组的 $\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度均值在 7.19-8.40mg/100ml 之间变动, 处于微生物正常生长对氨浓度耐受的临界范围内 (6-30mg/100ml) (Preston *et al.*, 1987)^[16]。由于培养液中没有外加 N 源, 各组 $\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度在培养 2h 后升至峰值后, 而后都呈下降趋势, 可以认为是瘤胃微生物利用氨所致。因此从其 $\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度高低可推测微生物对氨的利用和活力状况, $\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度 D 组较低 (微生物活力较高)、E 组最高 (微生物活力较低) 与微生物产量及纤维降解率测定结果 D 组最高、E 组最低基本吻合。

3.2 微生物产量与纤维素的降解率

瘤胃微生物的生长及对底物的发酵与利用与日粮类型密切相关, 淀粉水平高则其培养液 pH 值相对较低, 可能影响纤维降解菌和原虫的生长繁殖, 进而引起纤维的降解率降低。本研究中随着底物中的 SC 含量的提高, 培养液中的 pH 值增大, 纤维降解菌和原虫活性增强, 微生物 (细菌与原虫) 产量也有增加趋势, 滤纸纤维的降解率也相应提高, 但是纯滤纸纤维组的降解率反而最低, 可能是因为该组中缺乏可以快速利用能源, 造成能量与氮源的非同步均衡释放, 从而影响其瘤胃微生物的生长繁殖, 微生物 (细菌与原虫) 产量在该组也降到最低, 进而影响了滤纸纤维的降解。结合上述产气量及 $\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度结果可认为纯的滤纸纤维日粮不利于瘤胃微生物的生长及对底物的发酵与利用。而 NSC/SC 为 30:70 的组合其微生物产量、滤纸纤维降解率和 $\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度等指标的结果, 综合反应了此组合利于微生物的生长及对底物的发酵与利用。

pH 是原虫生长的主要限制因素。Hungate (1952), Oxford (1955) 和 Reid (1957) 等认为随 pH 下降原虫的产量减少, 甚至于消失。本研究中原虫的产量随着 NSC/SC 比例的下降, pH 的上升, 呈现上升的趋势的研究结果与前人的研究有一定的一致性。

3.3 微生物区系与区系内部种属的变换

培养液中一定范围比例的纤维素有利于原虫的生长 (冯仰廉, 2004)^[17], 同时原虫的存在也可以促进纤维类物质的降解与利用。原虫对纤维素降解的贡献多见报道。Demeyer (1981) 在混合培养中发现原虫的消化量占总纤维素消化量的 34%。Gijzen (1988) 报道人工瘤胃中原虫消化量占消化滤纸纤维消化量的 19-28%。本研究中微生物区系比例 (原虫/细菌) 因底物的不同而不同, 且随 NSC/SC 下降先上升后下降, 在 NSC/SC 的比例

为50:50组最大,即淀粉与纤维的比例变化使得培养液中原虫与细菌的比例的变化,揭示了特定底物的选择作用导致了微生物区系的变化,同时也提示纯的淀粉与纤维日粮都不利于原虫生长。

本研究利用通过 PCR-SSCP 遗传指纹技术展示了细菌类群的多样性,结果表明不同的底物其电泳图谱明显的不同,其相似指数各有不同,并且出现了不同的优势条带(优势群体)以及特征条带(特征群体)。提示细菌群体内部种属可能对底物变化产生了的响应性的变化。在此必须指出的相似性指数只是一个数值上的指标,它的计算受总条带数的制约,而且也不能反应所出现的优势条带(种属)和特有条带(种属)的情况,因此必须结合优势条带和特有条带才能较为客观的提供各底物条件下的菌群特征变化信息,若对分离条带测序可得具体种属鉴定的参考信息。

同时,本研究中的显微形态观察对原虫分类计数结果表明,不同的底物引起原虫内部种属比例的消长,即也对底物变化的产生应变。随 NSC/SC 下降,内毛属(*Entodinium*)与等毛属(*Isotricha*)原虫的比例下降,而双毛属(*Diplodinium*)与头毛亚科(*Ophryoscolecinae*)原虫的比例增加,与韩春艳等(2002)报道的头毛亚科前毛属与头毛属纤毛虫降解纤维素能力较强,而内毛属与全毛目纤毛虫对可溶性碳水化合物化合物的吞噬与降解能力较强一致。

3.4 单链构象多态性(SSCP)

Frank Schwieger (1998)^[18]等通过对根系微生物的分析表明 PCR-SSCP 可以很好的分析微生物群落的动态变化。Sabine Peters 等(2000)^[19]用该法研究群落的演替和菌种的多样性,并同传统的培养方法比较指出 PCR-SSCP 方法避免了传统培养的费时费力以及误差大的干扰,适合对微生物群落结构和演替的分析。FBattaglia-Brunet 等(2002)^[20]采用了 PCR-SSCP 成功地研究了间歇式浸出含钴黄铁矿过程中细菌菌群之间的进化关系。近年来 SSCP 越来越多的用于细菌群体特征研究(James *et al.*, 2001^[21]; Moletta *et al.*, 2001^[22]; Jenny *et al.*, 2003^[23])。本研究中 PCR-SSCP 也很好地展现了瘤胃混合细菌的多样性,确证了该方法在瘤胃微生物生态研究中的可行性。

4 结论

①不同淀粉与滤纸纤维比例底物对瘤胃发酵与微生物生长产生了影响:以 30:70 比例组的滤纸纤维的降解率与微生物产量最高,综合反应了此组合利于微生物的生长及对底物的发酵与利用。

②不同淀粉与滤纸纤维比例底物对微生物区系有一定的选择作用:微生物区系变化指标(原虫/细菌)以 50:50 比例组最高,纯的淀粉与纤维日粮都不利于原虫的生长。

③不同淀粉与滤纸纤维比例底物对微生物区系内部种属有选择作用:细菌的 PCR-SSCP 检测与原虫显微观察结果表明细菌和原虫区系内部种属都因底物的变化发生了应变。

④PCR-SSCP 应用于瘤胃混合微生物的居群特征的研究是可行的。

参考文献:

- [1] Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., Sekiya, T., Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms [J], *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 1989.86: 2766-2770.
- [2] Lee, D.H., Zo, Y.G., Kim, S.J., Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single strand conformation polymorphism [J], *Applied and Environmental Microbiology*, 1996.62: 3112-3120
- [3] Junca, H., Pieper, D.H., Functional gene diversity analysis in BTEX contaminated soils by means of PCR-SSCP DNA fingerprinting: comparative diversity assessment against bacterial isolates and PCR-DNA clone libraries [J], *Environmental Microbiology*, 2004.6: 95-110.
- [4] Wenderoth D.F., Abraham W.R., Microbial indicator groups in acidic mining lakes [J], *Environmental Microbiology*, 2005.7: 133-139.
- [5] Cécile Callon, Application of SSCP-PCR fingerprinting to profile the yeast community in raw milk Salers cheeses [J], *Systematic and Applied Microbiology*, 2006.29 (2):172-180.
- [6] Gerson T., King A.S.D., Kelly K.E., Kelly W.J. Influence of particle size and surface area on in vitro rates of gas production, lipolysis of triacylglycerol and hydrogenation of linoleic acid by sheep rumen digesta or *Ruminococcus flavefaciens* [J], *Journal of Agricultural Science*, 1988.110: 31-37.
- [7] Clark J.H., Klusmeyer T.H., Cameron M.R. Symposium: Nitrogen metabolism and amino acid nutrition in dairy cattle [J], *Journal of Dairy Science*, 1992.75:2304-2323.
- [8] 王洪荣, 卢德勋, 张海鹰, 赵秀英, 羿静, 白涛, 柏树, 饲喂豆饼、亚麻饼和血粉氮源日粮的生长绵羊限制性氨基酸研究[J], *动物营养学报*, 1999, 12月, 增刊, 11卷: 106-122.
- [9] Menke, K.H. The Gas Production Method [J], *Journal of Agricultural Science*, 1979.93: 217-222.
- [10] Czerkawshi J.W. Chemical composition of microbial matter in rumen [J], *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1976.27:621
- [11] Martín-Orúe S. M., Balcells J. Quantification and chemical composition of mixed bacteria harvested from solid fractions of rumen digesta: effect of detachment procedure Animal [J], *Feed Science and Technology*, 1998.4: 269-282.
- [12] Zhou J, Bruns M A, Tiedje J M. DNA Recovery from Soils of Diverse Composition [J]. *Applied and environmental microbiology*, 1996.V62 (2):316-322.
- [13] Muyzer G, deWaal E C, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16SrRNA [J], *Applied and Environmental Microbiology*, 1993.59:695-700
- [14] Schmalenberger A., Tebbe C.C., Bacterial diversity in maize rhizospheres: conclusions on the use of genetic profiles based on PCR-amplified partial small subunit rRNA genes in ecological studies [J], *Molecular Ecology*, 2003. 12: 251-262.
- [15] Bandle Srinivas, B.N. Gupta. Rumen fermentation, bacterial and total volatile fatty acid (TVFA) production rates in cattle fed on urea-molasses-mineral block licks supplement [J], *Animal Feed Science and Technology*, 1997.275-286.
- [16] Preston, T.R. Leng, K. A. Matching ruminant production system with available resources in the tropics and subtropics [M], Penambul Books, Armidale. 1987. 20-25.
- [17] 冯仰廉, 反刍动物营养学[M], 北京: 科学出版社, 2004,

- 66-69.
- [18] Schwieger F., Tebbe C.C., A new approach to utilize PCR single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene based microbial community analysis [J], *Applied and Environment Microbiology*, 1998.64: 4870-4876
- [19] Sabine Peters, Stefanie K, Frank S, *et al.* Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR- Single-Strand-Conformation Polymorphism-Based genetic profiles of small-subunit rRNA genes[J], *Applied and Environment Microbiology*, 2000.66(3): 930-936.
- [20] Battaglia-Brunet F., Clarens M., d'Hugues P. Monitoring of apyrite-oxidising bacterial population using DNA single-strand conformation polymorphism and microscopic techniques [J], *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002.60:206-211.
- [21] James E., Stach M., PCR-SSCP comparison of 16S rDNA sequence diversity in soil DNA obtained using different isolation and purification methods [J], *FEMS Microbiology Ecology*, V36 (2-3), 2001.7: 139-151
- [22] Moletta, R., Godon, J.J., Single strand conformation polymorphism monitoring of 16S rDNA Archaea during start-up of an anaerobic digester [J], *FEMS Microbiology Ecology*, 2001.34: 213-220.
- [23] Jenny S. K. Bäckman Liming induces growth of a diverse flora of ammonia-oxidising bacteria in acid spruce forest soil as determined by SSCP and DGGE [J], *Soil Biology and Biochemistry*, 2003.V35 (10):1337-1347.

Effects of Rations in Different Starch to Filter Paper Ratio on Rumen Fermentation and Microbes by PCR-SSCP Technique

WANG Meng-zhi WANG Hong-rong* LI Guo-xiang ZHANG Jie CAO Heng-chun
(College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou, 225009, China)

Abstract: Three goats fitted with cannulas were used to investigate the effects of rations in different starch to filter paper ratio on rumen fermentation and microbes in vitro. The dietary ratio starch to filter cellulose (NSC/SC) was designed as follows: 100:0, 70:30, 50:50, 30:70, 0:100. The experimental results showed: Cellulose degradability and microbial biomass were highest when NSC/SC ratio in the culture was set to 30:70; it was further observed that, The index in protozoa/bacteria (P/B) had a tendency of increase firstly, followed with decline when NSC/SC ratio decreased, P/B was highest in the group whose NSC/SC ratio in the culture was 50:50; PCR-SSCP analysis of V3 in bacteria 16sRNA showed that the profile of bacteria was subjected to substrates. In additional, Cell-counting results showed: *Entodinium* and *Isotricha* decreased, whereas *Diplodinium* and *Ophryoscolecinae* increased when NSC/SC ratio decreased, revealed that, the profile of protozoa was subjected to substrates too. It was therefore concluded that composition of the diet influenced both fermentation and microbial characteristics.

Key words: Rumen fermentation, Rumen microbes, PCR-SSCP, Cell-counting.

*Corresponding author: professor, Tel: 05147997196, E-mail: hrwang@yzu.edu.cn