

特定氨基酸缺省底物对体外培养混合瘤胃微生物及其发酵的影响

王梦芝, 王洪荣, 曹恒春, 李国祥, 张洁

(扬州大学动物科学与技术学院, 江苏扬州 225009)

摘要: 【目的】研究特定氨基酸在人工瘤胃体外培养条件下如何影响瘤胃微生物群系特征及其发酵。【方法】研究中以3只矮管山羊作为瘤胃液供体, 采用底物去除技术, 底物设计分别为: 全量必需氨基酸组 (TEAA), 组氨酸、赖氨酸、蛋氨酸和支链氨基酸 (BCAA) 的缺省组。【结果】底物对培养液 pH 均值没有显著性影响, 但各组 pH 值随时间的变化模式有所不同; 培养液氨氮浓度较高, 在 10.99 ~ 30.51 mg/100 ml 范围变动, 各组氨氮浓度随时间的变化模式也有明显的不同; 特定氨基酸缺省对微生物蛋白产量限制程度不同, 以 BCAA 缺省对微生物蛋白产量的限制最大, 相对于全量组混合微生物蛋白下降了 44.52%。研究还发现底物对微生物区系也有一定的影响, 原虫与细菌比值以赖氨酸缺省组最低 (89.12%), BCAA 缺省组最高 (127.60%) ($P < 0.01$)。另外, 微生物的 PCR-SSCP 图谱显示微生物区系内的种属也因底物变化而发生了改变。【结论】底物氨基酸对瘤胃混合微生物群系及其发酵有一定的影响作用, 支链氨基酸是瘤胃混合微生物生长所必需的氨基酸。

关键词: 特定氨基酸; 瘤胃混合微生物; 瘤胃发酵; PCR-SSCP

Effects of Certain Amino Acids-Removal on the Rumen Mixed Microbes and Fermentation *in vitro*

WANG Meng-zhi, WANG Hong-rong, CAO Heng-chun, LI Guo-xiang, ZHANG Jie

(College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu)

Abstract: 【Objective】Experiments were conducted to investigate how rumen microbes and fermentation change with certain amino acids *in vitro*. 【Method】Three goats fitted with cannula were used to provide rumen liquor. The removal method was applied. Treatments of total essential amino acid (TEAA), His-removal, Lys-removal, Met-removal, and branch chain amino acids (BCAA)-removal were designed. 【Result】The substrates showed no significant influence on the average pH value, but each had a different pattern with time change. The recorded concentration of $\text{NH}_3\text{-N}$ ranged between 10.99 to 30.51 mg/100 ml, while observed to be much higher in incubation medium varied patterns with time change. Yields of microbial protein varied with treatments, with lowest decrease of 44.52% in the treatment with BCAA-removal ($P < 0.01$) compared to the group of TEAA. As for micro-flora, the protozoa to bacteria ratio was lowest for treatment group with Lys-removal (89.12%), while highest for the group with BCAA-removal (127.60%) ($P < 0.01$). Furthermore, PCR-SSCP analysis revealed microbial profile change within bacteria or protozoa group subjected to the substrates. 【Conclusion】Dietary amino acid influences both fermentation and microbial community. Branch chain AAs are essential AA for the growth of ruminal mixed microbes.

Key words: Certain amino acids; Rumen mixed microbes; Fermentation; PCR-SSCP

0 引言

【研究意义】瘤胃微生物蛋白质是反刍动物小肠

氨基酸的主要来源^[1,2]。如何充分利用反刍动物蛋白质营养生理特点, 使流向十二指肠的微生物蛋白质量最大, 是有效调控反刍动物蛋白质营养、节约蛋白质饲

收稿日期: 2007-04-23; 接受日期: 2007-07-19

基金项目: 国家自然科学基金项目 (2006-2008) (30571344)

作者简介: 王梦芝 (1972-), 女, 江苏徐州人, 博士研究生, 研究方向为反刍动物瘤胃微生态分子营养。E-mail: MengzhiWang@126.com; 通讯作者王洪荣 (1962-), 男, 内蒙古丰镇人, 教授, 博士, 研究方向为反刍动物蛋白质、肽和氨基酸的营养调控。E-mail: hrwang@yzu.edu.cn

料，缓解蛋白质资源短缺的重要途径之一。【前人研究进展】瘤胃微生物的生长同样需要必需氨基酸及限制性氨基酸。Kajikawa 等报道^[3]在去除亮氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸等氨基酸的培养液中，瘤胃微生物的生长受到限制，提示瘤胃微生物需要某个或某些特定氨基酸。【本研究切入点】有关氨基酸对瘤胃微生物影响的研究相对较少，其结果也远不足以解析氨基酸影响瘤胃微生物生长的规律以及调控微生物蛋白而促进宿主生产。因此，本研究以瘤胃混合微生物的必需氨基酸组成比例为全量对照，分别设赖氨酸、蛋氨酸和支链氨基酸等的缺省底物进行体外培养，利用 PCR-SSCP 技术分析微生物群落的动态变化。【拟解决的关键问题】探讨特定氨基酸影响瘤胃微生物及其发酵的规律和机制，并比较各种特定氨基酸对瘤胃微生物生长的限制程度，为瘤胃微生态研究、宿主氨基酸营养研究与调控等方面提供信息和支持。

表 1 全量必需氨基酸组底物比例 (% EAA)

Table 1 The composition of the diet with total essential amino acid (%EAA)

项目 Item	精氨酸 Arg	组氨酸 His	异亮氨酸 Ile	亮氨酸 Leu	赖氨酸 Lys	蛋氨酸 Met	苯丙氨酸 Phe	苏氨酸 Thr	色氨酸 Trp	缬氨酸 Val
比例 Composition	10.2	4.0	11.5	16.3	15.8	5.2	10.2	11.4	2.7	12.5

参考 Abdulrazak 等的方法^[4]。配制培养液并充 CO₂、39℃水浴预热备用。取 1.2 g 底物放入培养瓶，加入 120 ml 培养液，39℃水浴震荡培养。在培养 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16 h 时点测定 pH，同时取 5 ml 瘤胃液直接冻存待测液氨氮浓度，16 h 培养结束后立即分离微生物，进行指标测定。

1.4 测定指标及其具体方法步骤

1.4.1 培养液 pH 用 pHS-3C 型 pH 计于各取样时间点立即测定。

1.4.2 培养液氨氮浓度 氧化镁蒸馏滴定法^[5]。瘤胃液中所含 NH₃-N 量计算公式 (mg/100 ml)： $NH_3-N=14 \times (V_2 - V_1) \times C \times 100 / V_3$ 。式中：V₁ 为空白样品滴定所消耗的标准 HCl 体积 (ml)；V₂ 为待测样品滴定所消耗的标准 HCl 体积 (ml)；V₃ 为进行蒸馏的待测样品的体积 (ml)；C 为标准 HCl 的浓度 (mol·L⁻¹)。

1.4.3 微生物的分离 综合参考 Martín-Orúe^[6]、Ranilla 等^[7]的方法，稍改动。(1) 原虫：取瘤胃液加等体积生理盐水 39℃孵育 60 min，摇床 125 r/min，并辅以搅拌；再经 4 层纱布过滤，滤液离心 (150×g，

1 材料与方法

1.1 试验动物

3 只装有瘤胃瘘管山羊[活重：(23.4±2.2) kg]，栓系饲养，饲喂青刈牧草，自由饮水，用于采集瘤胃液。

1.2 底物设计

全量必需氨基酸组 (TEAA，皆为分析纯氨基酸，A 组)，参考 Clark 等^[1]进行配比 (表 1)。组氨酸缺省组，命名为 OHis (含义为 His omitted，B 组，其它组含义同)、赖氨酸缺省组 (OLys，C 组)、蛋氨酸缺省组 (OMet，D 组)、支链氨基酸 (BCAA：包括异亮氨酸、亮氨酸和缬氨酸) 缺省组 (OBCAA，E 组)，在各缺省组中均以味精 (谷氨酸钠盐) 替代缺省的氨基酸。每种底物设 2 个重复。

1.3 体外培养

15 min)，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) 中离心的上清，再离心 (22 000×g，15 min)，收集沉淀为细菌，其余处理同 (1)。

1.4.4 微生物真蛋白的测定与计算 三氯醋酸沉淀蛋白法^[8]。取分离微生物样品经 22 000×g，离心 10 min，弃上清液加入 5 ml 10% TCA，混匀后置室温 30 min，离心 (6 000×g，10 min)，弃上清液再加入 5 ml 5% NaOH 混匀溶解后，离心 (6 000×g，10 min)，取上清液用 756 型紫外分光光度计测定 OD₂₈₀ 和 OD₂₆₀。微生物真蛋白含量 (Pr) 计算公式为： $Pr (mg \cdot ml^{-1}) = (1.45 \times OD_{280} - 0.740 \times OD_{260}) \times \text{稀释倍数}$ 。

1.4.5 PCR-SSCP 微生物 DNA 提取参考 Zhou^[9]，稍改进。瘤胃液离心 (22 000×g，10 min)，弃上清，加抽提液 5 ml (100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl，50 mmol·L⁻¹ EDTA，2% CTAB) 混匀；加 100 μl 5 mg·ml⁻¹ 蛋白酶 K，1/10 体积的 20% SDS，完全冻至成冰后 55℃水浴 60 min，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 1 次，离心

(15 000×g, 10 min), 取上清液, 再用等体积的氯仿: 异戊醇 (V: V =24: 1) 抽提和离心数次至上清液澄清, 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 片段大小。

PCR 扩增: 细菌 (B), 以提取的 DNA 为模板, 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))^[10] 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 (50 μl): PCR 即用试剂盒 (Songon) 25 μl Master Mix, 模板 5 μl, 前后引物各 1 μl, 18 μl ddH₂O; 反应参数: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 50 s, 54℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 45 s, 33 个循环后 72℃ 再延伸 5 min, 取扩增产物 10 μl, 2% 琼脂糖凝胶电泳检测、拍照。原虫 (P), 从 Genbank 获取纤毛虫 rDNA 序列设计 ITS1 引物 F1738 (5'AAC AAG GTT TCC GTA GGT 3') 与 R1951 (5' ACT TCG CTG CGT TCT TCA 3') 进行 PCR 扩增, PCR 反应体系 (50 μl): PCR 即用试剂盒 25 μl PCR Master Mix, 模板 5 μl, 前后引物各 1 μl, 18 μl ddH₂O; 反应参数: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 50 s; 52℃ 退火 45 s; 72℃ 延伸 45 s; 35 个循环后 72℃ 再延伸 5 min, 检测同上。

SSCP 检测: 10 μl PCR 产物, 加 10 μl 变性剂 (95% 去离子甲酰胺, 10 mmol·L⁻¹ EDTA, 0.02% 溴酚蓝), 30 μl 石蜡油, 煮沸 10 min, 取出立刻放入冰浴中 10 min, 将上清液全部上样, 10~15℃ 下 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE), 150V 30 min 后 80V 16 h, 银染、拍照。

SSCP 指纹图谱分析: 将 SSCP 谱图数字化, 对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 (C_j)。C_j 计算公式: $C_j = j / (a + b - j)$, 式中: j 为两泳道共有条带数; a、b: 两泳道各自的条带总数。

1.5 数据处理

采用 Excel 软件整理数据, SPSSv11.5 统计分析软件的 One-way-ANOVA 进行方差分析和 LSD 多重比较, 差异显著水平为 $P < 0.05$, 差异极显著水平为 $P < 0.01$ 。

2 结果与分析

2.1 培养液 pH

不同时间点的各组 pH 在 5.9~6.8 之间变化 (表

2), pH 均值 B 组最低 (6.42), E 组最高 (6.54), 但差异不显著。从图 1 可知, 各组起始点 pH 都稳定在 6.5 左右, 然后升高, 除 A 组在 4 h 达到最高点外, 其它 4 组都在 2 h 达到最高点, 而后随时间延长各组变化趋势有所不同, A 组在最高点相对稳定至 6 h 后迅速下降, 下降幅度较大; 其它 4 组在峰值后都呈下降趋势, 幅度较 A 组小; 其中 E 组下降幅度最小, 而且在培养过程中 pH 始终维持在 6.4 之上。

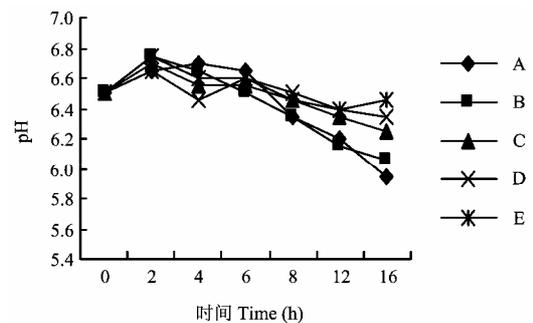


图 1 pH 随时间变化

Fig. 1 Changes of pH with time change

2.2 培养液 NH₃-N 浓度

各组氨氮浓度变动范围为 10.99~30.51 mg/100 ml。均值以 D 组最低 (15.74 mg/100/ml), A 组最高 (17.85 mg/100 ml), 但差异不显著 (表 2)。从图 2 可见, 随时间延长, 各组液氨氮浓度变化规律不尽一致, 其中 A 组起始点氨氮浓度就远远高于其它 4 组, 上升至 2 h 时达到最高点, 而后迅速下降, 在 12 h 达到最低点, 之后又稍有回升, 其下降幅度最大; 其它 4 组变化趋势则较为一致, 都在 2 h 内上升并达到最高点, 而后随时间延长持续下降, 以 E 组下降幅度最小。

2.3 微生物蛋白产量

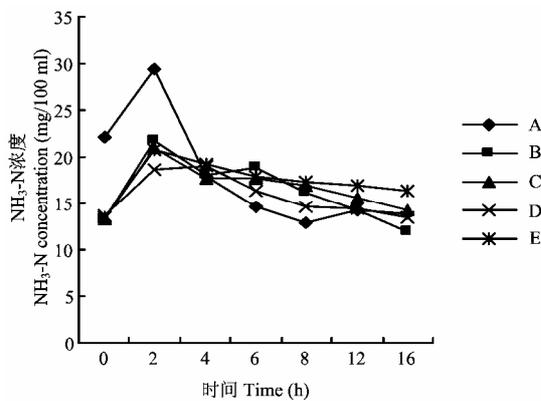
由表 2 可知, 细菌与原虫及混合微生物蛋白产量在各组间差异显著或极显著 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), E 组产量最低。各处理组混合微生物蛋白产量由小到大的排列次序为 OBCAA < OMet < OLys < OHis < TEAA 组; 以 A 组为参照计算各底物对微生物生长的限制程度, OBCAA、OMet、OLys 和 OHis 组的混合微生物蛋白产量分别下降了 44.52%、23.55%、12.58% 和 4.32%。

2.4 微生物区系比例及 PCR-SSCP

由表 2 可知, 微生物区系比例 (本研究中以原虫

表 2 特殊氨基酸缺省底物对微生物蛋白产量、P/B 值、pH、NH₃-N 浓度的影响Table 2 The effects of special amino acid-removal on production of microbial protein, P/B ratio, pH value, NH₃-N concentration in the culture medium

项目 Items	A TEAA	B OHis	C OLys	D OMet	E OBCAA	标准误 SEM	P 值 P value
细菌蛋白量 Bacterial protein (mg·ml ⁻¹)	0.2874D	0.2690C	0.2633C	0.2206B	0.1389A	0.00366	0.000
原虫蛋白量 Protozoal protein (mg·ml ⁻¹)	0.2824E	0.2762D	0.2347C	0.2150 B	0.1772A	0.00644	0.000
混合微生物蛋白量 Mixed microbial protein (mg·ml ⁻¹)	0.5698E	0.5452D	0.4981C	0.4356B	0.3161A	0.00950	0.000
混合微生物蛋白下降率 Mixed microbial protein increase ment ratio (%)	-	4.32	12.58	23.55	44.52	-	-
P/B 值 Protozoa/bacteria (P/B, %)	98.27B	102.70B	89.12A	97.49B	127.60C	0.02036	0.000
pH-value 均值 Average pH	6.43	6.42	6.48	6.49	6.54	0.03435	0.0920
NH ₃ -N 浓度均值 Average NH ₃ -N concentration (mg/100 ml)	17.85	16.32	16.62	15.74	17.40	0.8311	0.2240

混合微生物为原虫与细菌相加; 同行字母相同表示差异不显著 ($P>0.05$), 相邻为差异显著 ($P<0.05$), 相隔为差异极显著 ($P<0.01$)Mixed microbes: the sum of protozoa and bacteria; The same letters within the same row represent no significant difference ($P>0.05$); neighboring letters represent significant difference ($P<0.05$); parted letters indicated that the means were extremely different ($P<0.01$)图 2 NH₃-N 浓度随时间变化Fig. 2 Changes of NH₃-N concentration with time change

与细菌蛋白产量比值表示区系比例, 并定义为 P/B 值) 在各组间差异显著或极显著 ($P<0.05$ 、 $P<0.01$), 以 OBCCA 组最高(127.60%), OLys 组最低(89.12%), TEAA、OHis 和 OMet 这 3 组间则无显著差异。

样品 DNA 经紫外分析 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 在 1.63~1.92 之间, 0.7% 的琼脂糖凝胶检验片段大小在 20 kb 以上, 表明 DNA 质量较好。2% 的琼脂糖凝胶检验 PCR 扩增片段大小为 200 bp 左右的预期条带。

细菌的 SSCP 图谱中共有 11 条清晰可辨的条带 (a-k, 图 3), 其中 A 组有 10 条, 其它 4 组为 7 或 8 条, 其中 B 和 C 组完全相同, 相似指数为 1 (表 3)。各组特征条带有所差异, 与 E 组相比 A、B、C 和 D 这 4 组都拥有 c 带为共同特征条带; 而 E 组则以 e 带

为特征条带。与 B、C 和 D 这 3 组相比, A 组多了特征条带 h、k。

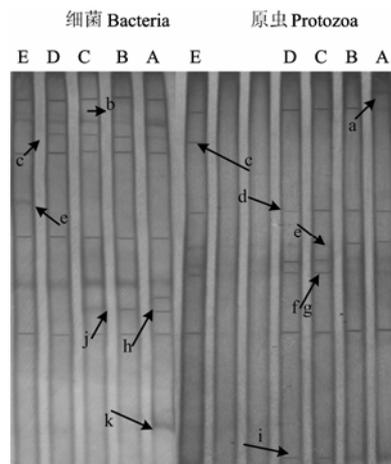


图 3 微生物 SSCP 凝胶图谱

Fig. 3 The results of SSCP test in microbes

原虫的 SSCP 图谱中共有 9 条清晰可辨的条带 (a~i, 图 3), 其中 A 组条带为 8 条, 其它 4 组皆为 7 条。B、C 和 D 这 3 组条带数完全相同, 两两之间相似指数为 1 (表 3), 但条带的强弱有所差异, 其中 B 以 f、g 为弱带、C 以 e 为弱带、而 D 以 d 为弱带。各组特征条带有所差异, 其中与 E 组相比 A、B、C 和 D 这 4 组都有 i 带为共同的特征条带, E 组的特征条带为 c; A 组比 B、C 和 D 这 3 组多出了特征条带 a。

表 3 相似性指数矩阵

Table 3 The matrix of kindred index of microbes

细菌 Bacteria	B	C	D	E	原虫 Protozoa	B	C	D	E
A	0.8	0.8	0.70	0.70	A	0.88	0.88	0.88	0.67
B		1	0.88	0.67	B		1	1	0.75
C			0.88	0.67	C			1	0.75
D				0.75	D				0.75

3 讨论

3.1 瘤胃内环境

pH 值是反映瘤胃发酵状况的综合指标。本试验各组培养液 pH 在 6.42~6.54 之间, 适合于微生物生长, 但总体上 pH 相对偏高, 而且各底物培养液氨氮浓度也相对较高, 可能是由于培养液中只有 N 源, 没有其它能源, 使得 N 源与能源的释放不同步^[11], 微生物的生长及对氨的利用受到限制, 导致氨氮浓度相对较高, 进而也影响了 pH 所致; 本研究氨氮浓度峰值 30.51 mg/100 ml 已略超过瘤胃微生物适宜氨氮浓度的上限, 而正常生长适宜氨氮浓度范围为 6~30 mg/100 ml。

氨是瘤胃中主要微生物生长的氮源, 氨氮浓度也是反映日粮氮降解和微生物氨利用的综合指标。Atapóulu^[12]研究表明氨氮浓度对 *Prevotella bryantii*B14, *Selenomonas ruminantium* HD4 和 *Streptococcus bovis* ES1 这 3 种瘤胃细菌蛋白的合成有重要影响。本研究表明各组氨氮浓度随时间延长变化模式不同(图 2), 反映出微生物对不同底物氮降解和氨利用的不同。NH₃-N 浓度峰值出现在 TEAA 组培养后 2 h, 可能是由于培养底物是以微生物可发酵氨基酸为主, 微生物的脱氨基作用使得氨基酸迅速脱氨基而达此峰值, 之后随着微生物的迅速繁殖及对 NH₃ 利用的加速, 氨氮浓度又迅速下降, 其下降幅度在 5 组中最大, 提示该组微生物的繁殖速度较高(这与该组微生物产量最高一致)。这可能是由于该组为全量必需氨基酸, 与不同氨基酸缺省的其它组相比较, 底物对微生物的生长限制性较小, 微生物的活力强, 生长旺、繁殖快, 对 NH₃-N 利用较多所致。

不同瘤胃微生物脱氨基活性不同, 研究表明原虫脱氨基活性高于细菌^[13,14]。瘤胃细菌群系中有脱氨基活性不同的两类菌群, 一类由数量多而脱氨基活性较低(如栖瘤胃普雷沃氏菌等)的菌群组成, 另一类是由数量较少但脱氨基活性较高(如消化链球菌等)的菌群组成。瘤胃原虫群系中不同种属的脱氨基活性也

不同, 以尾状内毛虫 (*E.caudatum*) 和单尾内毛虫 (*E.simplex*) 的脱氨酶 (deaminase) 活性最高。OBCAA 组 NH₃-N 浓度相对较高, 且随时间延长其下降幅度较小, 推测其原因一方面是支链氨基酸的缺省可能限制了部分微生物的生长, 尤其是瘤胃球菌、产琥珀酸丝状杆菌等 NH₃ 利用菌的生长, 进而影响了微生物对 NH₃ 的利用; 另一方面可能由于该组底物引起了微生物区系的变化, 脱氨基作用强的微生物区系或区系内类群活力更强, 使得游离氨基酸的脱氨基迅速, 该组 P/B 值最高也是佐证之一。Falconer^[15]也曾报道用不同日粮(草料)饲喂绵羊, 其瘤胃微生物蛋白酶在 SDS-PAGE 上的酶谱有很大的差别。

3.2 微生物蛋白产量与氨基酸对其的限制性

Kajikawa 等^[3]报道当 Leu、Trp、Tyr、Glu、Met、Phe、Val 等氨基酸从 20 种混合氨基酸中去除后, 微生物蛋白质的合成有所下降。本研究中 3 种支链氨基酸从培养液中移除后混合微生物蛋白产量下降幅度最大, 仅相当于全量必需氨基酸组的一半左右, 与 Kajikawa 等的报道相一致。蛋氨酸可刺激瘤胃微生物的生长, 提高纤维在瘤胃中的消化率。MoCracken 等^[16]报道饲喂低质干草加棉籽饼日粮的肉牛, 添加蛋氨酸后瘤胃内嘌呤浓度显著增加。本研究中也发现去除 Met 后微生物蛋白产量有较大幅度的下降, 提示 Met 可能是继 BCAA 之后的微生物生长潜在的限制因子。也有报道认为有些氨基酸如 Leu 和 Ile, 比其它氨基酸更难以合成微生物蛋白质^[17], 因此有关特殊氨基酸对微生物蛋白产量的影响还需进一步的探索, 进行更深入的研究。

3.3 微生物区系的变化

黄色瘤胃球菌、白色瘤胃球菌和产琥珀酸丝状杆菌等结构性碳水化合物(SC)分解菌的生长都需要支链 VFA 的存在^[18]。支链氨基酸可被发酵成为支链 VFA, 为 SC 分解菌所利用, 而支链 VFA 的缺乏将导致生物量的下降, 继而影响细菌群系的生物量。本研究中 OBCCA 组的 P/B 值最高, 说明其细菌群系的生物量相对较小, 与上述观点相一致。研究中还发现 OLys 组的 P/B 值最低, 可能由于原虫蛋白质的赖氨酸含量较高^[19], 培养液中赖氨酸的缺省在一定程度上限制了原虫的生长, 导致其群系的生物量降低。本研究中 P/B 值因底物氨基酸的不同而不同, 揭示了特定底物对原虫与细菌区系有影响, 其中支链氨基酸是细菌群系生长的必需因子之一, 而赖氨酸的移除则有可能限制原虫群系的生长。关于特殊 AA 对微生物群系影

响的研究报道较少, 本试验的结果与推测还有待于进一步研究和验证。

3.4 微生物区系内类群结构的变化

细菌和原虫群系内部不同种属对氨基酸的代谢特点不同。如 SC 分解菌、溶纤丁弧菌和新月单胞菌对氨基酸的代谢有选择性, 原虫对外源氨基酸的代谢与其对氨基酸的转运有关^[18]。本研究中 PCR-SSCP 谱图展示了特定底物体外培养条件下细菌和原虫内部类群结构的变化情况。其中细菌的 PCR-SSCP 图谱组间相似指数多有不同, 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), 说明底物的变化引起细菌区系内部种属的变化, 特定的底物选择了特殊的种属而形成特征群体, 更利于某特定种属的生长而形成优势群体, 进一步揭示了细菌群系内部不同的种属是受底物氨基酸影响的。原虫的图谱在各组间有更高的相似性, 可能是由于本试验并未进行纯培养, 而是与细菌混合培养, 原虫除了利用底物氨基酸并受其影响外, 还吞噬利用细菌蛋白, 而细菌已将部分底物氮源转化为菌体蛋白被原虫所利用, 因此削弱了底物外源氨基酸对原虫群系的影响。

Schwieger 等^[20]等通过对根系微生物的分析表明, PCR-SSCP 可以很好地检测微生物群落的动态变化, Peters 等^[21]用该法研究群落的演替和菌种的多样性, 并认为 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。Battaglia-Brunet 等^[22]采用了 PCR-SSCP 成功地研究了间歇式浸出含钴黄铁矿中细菌菌群之间的进化关系。本研究采用 PCR-SSCP 也很好地展现了不同底物条件下瘤胃微生物的变化特征, 说明 PCR-SSCP 可用于瘤胃微生物群体多样性的研究。

4 结论

4.1 特定氨基酸缺省底物对培养液 pH 与氨氮浓度均值没有显著性影响, 但不同氨基酸缺省组的培养液 pH 与氨氮浓度随时间动态变化模式明显不同。

4.2 特定氨基酸缺省底物对瘤胃微生物的生长有影响, 其中支链氨基酸缺省组的微生物产量最小, 在本试验条件下可认为, 支链氨基酸是瘤胃混合微生物生长所必需的氨基酸, 而蛋氨酸则可能是继支链氨基酸之后潜在的生长限制因子。

4.3 特定氨基酸缺省底物对瘤胃混合微生物区系和区系内部种属都有一定的影响, 不同氨基酸底物条件下微生物的 P/B 值和 SSCP 遗传指纹图谱都有所差异;

研究同时还表明 PCR-SSCP 适合于瘤胃混合微生物多样性的研究。

References

- [1] Clark J H, Klusmeyer T H, Cameron M R. Symposium: Nitrogen metabolism and amino acid nutrition in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 1992, 75: 2304-2323.
- [2] Stern M D, Varga G A, Clark J H, Firkins J L, Huber J T, Palmquist D L. Evaluation of chemical and physical properties of feeds that affect protein metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science*, 1994, 77: 2762-2786.
- [3] Kajikawa H, Mitsumori M, Ohmomo S. Stimulatory and inhibitory effects of protein amino acids on growth rate and efficiency of mixed ruminal bacteria. *Journal of Dairy Science*, 2002, 85: 2015-2022.
- [4] Abdulrazak S A, Fujihara T. *Animal Nutrition: A Laboratory Manual*. KASHIWAGI Printing Co. Mvatsue-shi, Japan, 1999: 15-20.
- [5] 杨 胜. 饲料分析及饲料质量检测技术. 北京: 北京农业大学出版社, 1996: 171-172.
Yang S. *Technology of Feeding Stuffs-Analysis and Determination*. Beijing: Beijing Agricultural University Press, 1996, 171-172. (in Chinese)
- [6] 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 Feed Science and Technology*, 1998, 4: 269-282.
- [7] Ranilla M J, Carro M D. Diet and procedures used to detach particle-associated microbes from ruminal digesta influence chemical composition of microbes and estimation of microbial growth in Rusitec fermenters. *Journal of Animal Science*, 2003, 81: 537-544
- [8] 王宁娟. 人工瘤胃法研究矿物质元素及非蛋白氮对瘤胃发酵的影响. 西北农林科技大学硕士学位论文, 2003.
Wang N J. Effects of Mineral and NPN on Rumen Fermentation Using Artificial Rumen. Master's Thesis of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, 2003. (in Chinese)
- [9] Zhou J, Bruns M A, Tiedje J M. DNA Recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62: 316-322.
- [10] Muyzer G, deWaal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16SrRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59: 695-700.
- [11] Henning P H, Steyn D G, Mrissner H H. Effect of synchronization of

- energy and nitrogen supply on animal characteristics and microbial growth. *Journal of Animal Science*, 1993, 71: 2516-2528.
- [12] Atapóulu C, Wallace R J. Influence of ammonia concentration on ¹⁵N-ammonia incorporation and de novo amino acid synthesis by the non-cellulolytic ruminal bacteria, *Prevotella bryantii* B14, *Selenomonas ruminantium* HD4 and *Streptococcus bovis* ES1. *Turk Journal of Veterinary and Animal Science*, 2002, 26: 389-395.
- [13] Forsberg C W, Lovelock L K, Krumholz L, Buchanan-Smith J G. Protease activities of rumen protozoa. *Applied and Environment Microbiology*, 1984, 1: 101-110.
- [14] Hino T, Russell J B. Effect of reducing-equivalent disposal and NADH/NAD on deamination of amino acids by intact rumen microorganisms and their cell extracts. *Applied and Environment Microbiology*, 1985, 50: 1368-1374.
- [15] Falconer M L, Wallace R J. Variation in proteinase activities in the rumen. *Journal of Applied Microbiology*, 1998, 84: 3377-3382.
- [16] MoCraken B A, Judkins M B, Krysl L J, Holcombe D W, Park K K. Supplemental methionine and time of supplementation effects on ruminal fermentation, digesta kinetics, and *in situ* dry matter and neutral detergent fiber disappearance in cattle. *Journal of Animal Science*, 1993, 71: 1932-1939.
- [17] Bach A, Calsamiglia S, Stern M D. Nitrogen metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science*, 2005, 88: E9-E21.
- [18] 朱伟云. 第一章: 瘤胃微生物. 冯仰廉主编. 反刍动物营养学. 北京: 科学出版社, 2004: 2-4, 98-104.
- Zhu W Y. Rumen Microbiology. In: Feng Y L. *Ruminant Nutrition*. Beijing: Science Press, 2004: 2-4, 98-104. (in Chinese)
- [19] Storm E, Ørskov E R. The nutritive value of rumen micro-organisms in ruminants. I. Large scale isolation and chemical composition of rumen micro-organisms. *British Journal of Nutrition*, 1983, 50: 463-470.
- [20] Schwieger F, Tebbe C C. A new approach to utilize PCR single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene based microbial community analysis. *Applied and Environment Microbiology*, 1998, 64: 4870-4876.
- [21] Peters S, Koschinsky S, Schwieger F, Tebbe C C. Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-single-strand-conformation polymorphism-based genetic profiles of small-subunit rRNA genes. *Applied and Environment Microbiology*, 2000, 66: 930-936.
- [22] Battaglia-Brunet F, Clarens M, d'Hugues P. Monitoring of apyrite-oxidising bacterial population using DNA single-strand conformation polymorphism and microscopic techniques. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 60: 206-211.

(责任编辑 高 雨, 林鉴非)