

藏系绵羊瘤胃细菌数量及其放牧地 牧草养分随季节变化的研究

淡瑞芳¹, 张海涛¹, 龙瑞军^{2,3*}, 丁学智⁴, 张欣⁵

(1. 江苏畜牧兽医职业技术学院, 江苏 泰州 225300; 2. 兰州大学青藏高原生态系统管理国际中心, 甘肃 兰州 730020; 3. 兰州大学草地农业科技学院, 甘肃 兰州 730020; 4. 中国科学院西北高原生物所, 青海 西宁 810008; 5. 天津农学院基础科学系, 天津 300384)

摘要: 试验分别于春、夏、秋和冬季, 随机选择3只同群常年放牧健康的藏系绵羯羊(2岁), 屠宰后采集瘤胃内容物。采用瘤胃细菌通用引物和实时定量PCR技术, 研究瘤胃细菌数量随季节的动态变化。结果表明, 1) 夏季瘤胃细菌数量显著($P < 0.05$)高于其他3个季节, 分别是春季、秋季、冬季细菌数量的5.56、2.35和2.49倍; 秋、冬季是春季细菌数量的2.38和2.23倍; 而秋和冬季瘤胃细菌的数量差异不显著($P > 0.05$)。2) 夏季藏系绵羊采食量分别为春季、冬季和秋季的1.98、1.61和1.80倍, 饲料中的纤维性物质含量增高, 采食量也随着降低, 瘤胃细菌的数量也相应降低; 3) 实时定量PCR技术能准确的反映出放牧藏系绵羊瘤胃细菌数量随季节的动态变化。

关键词: 实时定量PCR; 藏系绵羊; 季节; 瘤胃细菌数量

中图分类号: S826 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-5759(2009)01-0100-05

* 在瘤胃微生态环境中, 细菌的数量非常大, 并在瘤胃发酵中起着决定性作用。反刍动物瘤胃微生态受日粮、年龄、抗生素、寄主动物的体况及地域、季节和饲养方式的影响。藏系绵羊是一种适应高原的特殊环境下生长的动物, 以自然牧草为唯一的饲料原料, 其瘤胃微生物区系及数量随季节变化的研究鲜见报道, 仅见姚军等^[1]对藏系绵羊瘤胃纤毛虫种群动态受季节影响的报道。实时定量PCR技术是以分子为基础的研究方法, 用于重要菌群和菌种的量化, 常用来定量瘤胃细菌的单一菌种^[2~4]和瘤胃原虫^[5,6]。其原理是利用能特异标记PCR产物的荧光物质, 显示PCR产物的动态累积, 得到S型的扩增曲线; 假设该曲线的前期PCR符合指数性扩增, 于是在单纯指数方程的基础上, 通过比较产物积累的速度(时间)来间接比较(进而确定)初始模板的分子数。本试验以藏系绵羊瘤胃细菌为研究对象, 通过实时定量PCR技术来探讨藏系绵羊瘤胃细菌数量随季节的动态变化, 为高寒草地放牧动物的补饲及瘤胃营养调控提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料来源 试验羊来自于青海省三角城种羊场。

1.1.2 标准DNA来源及PCR扩增引物 标准DNA与PCR扩增引物均来源于国际原子能机构。PCR引物:

前引物: 5'-TTC GGT GGA TCD CAR AGR GC-3'

后引物: 5'-GBA RGT CGW AWC CGT AGA ATC C-3'

1.2 试验设计

分别于2004-2005年的春季(5月)、夏季(8月)、秋季(10月)和冬季(1月), 随机选择3只同群常年放牧健康的藏系绵羯羊(2岁), 屠宰后采集瘤胃内容物。采集的瘤胃液样品置于一70℃冻存; 分析时, 解冻样品, 用于DNA的提取; 同时采集牧草样本, 备测定。

1.3 主要试剂及仪器

聚乙烯吡咯烷酮(PVPP)、十六烷基三甲溴化胺(CTAB)和琼脂糖购自美国Sigma公司、荧光染料(TOYO-

* 收稿日期: 2008-05-09; 改回日期: 2008-11-12

基金项目: IAEA/FAO(CPR12666/RO)资助。

作者简介: 淡瑞芳(1974-), 女, 山西河曲人, 讲师, 博士。E-mail: danreifang@126.com

* 通讯作者。E-mail: longruijun@sina.com

BO CO., LTD. 日本)。其他国内生产的化学试剂均为分析纯级、实时定量 PCR 仪(BIO-RAD, 美国)。

1.4 测定方法

1.4.1 牧草营养成分的测定 利用放牧前后产草量的差额来计算每只羊的放牧采食量^[7];采用尼龙袋法^[8,9]和产气法^[7]测定牧草的消化率,消化能;根据文献^[10]测定方法对牧草样的 2 种营养成分进行分析[分别是粗蛋白质(CP)、酸性洗涤纤维(ADF)]。

1.4.2 瘤胃内容物 DNA 提取及定量 PCR 扩增 DNA 提取方法:冻融法,具体方法见瘤胃微生物总 DNA 快速提取法研究^[11],获得瘤胃微生物总 DNA。

定量 PCR 扩增:扩增反应总体积为 20 μL ,包含实时定量 PCR 荧光染料混合液(包括荧光染料、Taq 酶、dNTP、缓冲液)10 μL 、引物各(10 $\mu\text{mol/L}$)0.6 μL 、模板 DNA 4(稀释 100 倍后) μL 、ddH₂O 4.48 μL 。

PCR 循环参数为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,40 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 后延伸 7 min。

采用标准曲线法对瘤胃细菌数量进行绝对定量:用 Light Cycler software version 3.1 计算出样品瘤胃细菌 DNA 的循环值(*Ct*),以 *Ct* 值和由不同浓度的标准 DNA 基因质量数的对数为纵坐标和横坐标产生标准曲线。

1.5 数据分析

采用 SPSS 12.0 统计软件中 Compare Means 法对数据进行单因子方差分析,差异显著时用 LSD 法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 高寒草地牧草营养动态

随季节的变化,牧草营养成分 CP 夏季最高,达到 11.06%,极显著($P < 0.01$)高于春、冬季,显著($P < 0.05$)高于秋季;牧草的 DE 含量夏、秋季均显著($P < 0.05$)高于春季和冬季,而牧草的 ADF 春、冬季分别显著($P < 0.05$)、极显著($P < 0.01$)高于秋季和夏季,ADF 含量夏季最低,达到 37.78%,冬、春季节差异不显著($P > 0.05$) (表 1)。

表 1 不同季节牧草的养分

Table 1 Forage nutrition by grazing sheep in different periods

项目 Item	春季 Spring	夏季 Summer	秋季 Autumn	冬季 Winter
粗蛋白 CP (%)	4.94 \pm 0.69 C	11.06 \pm 1.24 Aa	8.91 \pm 1.34 Bb	6.30 \pm 0.18 C
消化能 DE (MJ/kg)	7.68 \pm 0.36 b	9.42 \pm 1.29 a	9.66 \pm 1.39 a	7.32 \pm 1.7 b
酸性洗涤纤维 ADF (%)	42.47 \pm 2.54 Aa	37.78 \pm 2.34 Bc	40.66 \pm 4.84 ABb	43.40 \pm 3.31 Aa

注:同行数字标注有不同大写字母为差异极显著($P < 0.01$),不同小写字母为差异显著($P < 0.05$),相同的大、小写字母为差异不显著($P > 0.05$)。下同。

Note: Values suffixed with different capital letters within one row mean significantly difference at $P < 0.01$, and different small letter within one row mean significantly difference at $P < 0.05$, and same capital letters and small letter within one row mean no significantly difference at $P > 0.05$ (LSD test). The same below.

2.2 不同季节放牧绵羊采食量动态

放牧藏系绵羊代谢体重夏、秋季显著($P < 0.05$)高于冬、春季节,秋季显著($P < 0.05$)高于夏季,而冬季与春季差异不显著($P > 0.05$)。但放牧的藏系绵羊采食量的最大值是在夏季,为 115.75 g/(kg W^{0.75} · d)(表 2),其采食量分别为春季、冬季和秋季的 1.98,1.61 和 1.80 倍。秋季采食量极显著($P < 0.01$)高于春季和冬季。而在春季和冬季绵羊的采食量分别为 58.51 和 64.32 g/(kg W^{0.75} · d),这 2 个季节绵羊的采食量很接近。而各季间,牧草干物质消化率差异不显著($P > 0.05$)。由于放牧草场的牧草种类和不同季节牧草养分差异,使的春季到冬季(从冬春季草场到夏秋草场)放牧绵羊采食量变异系数分别是 12.19%,11.12%,8.00%和 13.30%。

表 2 放牧绵羊采食量和消化率

Table 2 The DM intakes and the rata of digestibility by grazing sheep in different seasons (DM)

项目 Item	春季 Spring	夏季 Summer	秋季 Autumn	冬季 Winter
代谢体重 MW ($W^{0.75}$)	10.63±0.48 c	13.98±0.73 b	14.82±0.61 a	10.62±0.56 c
消化率 AD (%)	48.81±8.25 a	52.07±1.03 a	51.43±3.05 a	50.28±1.23 a
采食量 DM intakes (g/kg $W^{0.75} \cdot d$)	58.51±1.06 C	115.75±6.42 A	71.71±2.17 B	64.32±2.06 C
采食量变异系数 CV (%)	12.19	11.12	8.00	13.30

2.3 瘤胃细菌实时定量 PCR 标准曲线

以 C_t 值和由不同浓度的标准 DNA 基因质量数的对数为纵坐标和横坐标产生的标准曲线,二者的回归方程为: $y = -3.357x + 16.832$, 其相关回归系数(r)为 0.978, 斜率为 -3.357 , PCR 扩增效率为 98.6%。相关回归系数(0.983)、斜率(-3.357)与理想的的标准曲线十分接近。根据该标准曲线,样品定量范围大约在 $10^{-3} \sim 10^2$ ng。

2.4 不同季节瘤胃细菌数量的变化

通过实时定量 PCR 和 Light Cycler system 技术定量研究瘤胃细菌随季节的变化规律,结果表明,春、夏、秋和冬季瘤胃细菌扩增循环值(C_t)分别为 17.84, 16.64, 17.92 和 19.03(图 1), 瘤胃内细菌质量数分别为 (3.06 ± 0.08) , (17.00 ± 0.20) , (6.81 ± 0.03) 和 (7.24 ± 0.35) ng。夏季由于动物采食大量营养丰富的牧草,因而其瘤胃内细菌数量明显高于其他 3 个季节,分别是春季、冬季和秋季的 5.56, 2.35 和 2.49 倍;秋季和冬季瘤胃细菌数量变化不明显($P > 0.05$)。

在本次样品测定中,以 C_t 值和由不同浓度的标准 DNA 基因质量数的对数为纵坐标和横坐标产生的标准曲线,二者的回归方程为: $y = -3.356x + 16.818$, 其相关回归系数(r)为 0.983, 斜率为 -3.356 , PCR 扩增效率为 98.6%。斜率与理想的标准曲线斜率(-3.322)十分接近,说明用该标准曲线对未知浓度样品的定量结果十分可靠。结果显示,不同模板浓度均获得成功且有效的扩增。说明根据该标准曲线可对在 40 ng~100 fg 内模板量进行精确有效的定量。

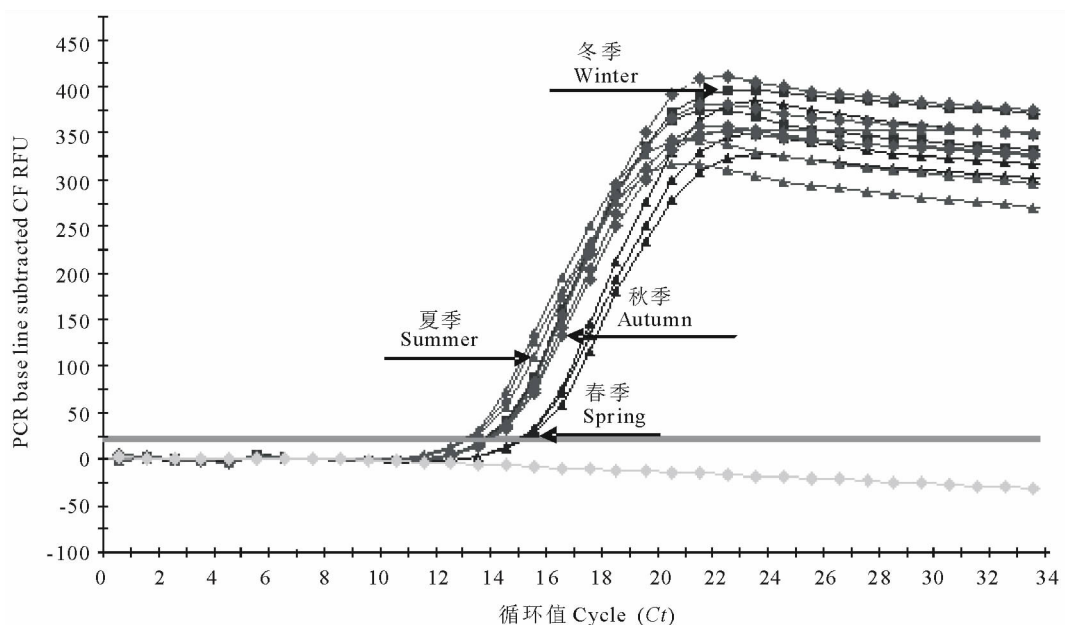


图 1 瘤胃细菌通用引物扩增瘤胃细菌 DNA 曲线

Fig. 1 Differential amplification of rumen bacteria DNA templates with broad bacteria primers

3 讨论

3.1 标准曲线的制备对瘤胃细菌数量的影响

本研究中 Ct 值和由不同浓度的标准 DNA 基因质量数的对数为纵坐标和横坐标产生的标准曲线,所得的回归公式中,相关回归系数(0.983)、斜率(-3.357)与的理想的标准曲线十分接近。一般理想的标准曲线是,线性范围广,13~33 个循环都能测出,相对量覆盖 $1 \sim 10^6$ 。斜率越接近 -3.322,越理想;PCR 扩增效率越接近 100%,越准确;一致系数越接近 1.000,此曲线越可信。一般标准曲线的斜率值在 -3.0~-3.6、PCR 扩增效率在 90%~100%、一致系数在 0.90 以上,均可接受。

由对数输入和循环阈值产生的标准曲线显示出二者的线性关系,线性范围虽然在 $10^{-3} \sim 10^2$,但标准点有 7 个,使得这个范围内的定量更可靠。这表明该曲线和产生该标准曲线的体系完全符合本试验的要求。

3.2 不同季节牧草营养对微生物数量的影响

瘤胃中的氨浓度、能量浓度、基质特性、稀释率及能量与氨的同步释放等是影响瘤胃微生物合成强度的主要因素,而季节对瘤胃微生物的影响实际上仍是饲料对其的影响,由于不同季节的饲料成分不同,从而影响瘤胃微生物合成强度,导致微生物群落和组成的变化。试验结果表明,夏季瘤胃中的细菌数量是春、秋、冬的 5.56, 2.49 和 2.35 倍。这是由于夏季牧草中粗蛋白水平和植物组织中非结构性碳水化合物含量高于秋季和冬季,尤其是禾本科植物^[12],放牧藏系绵羊在夏季采食含较高能量(DE 为 9.42 MJ/kg)和蛋白质(CP 为 11.06%)的牧草,当瘤胃中有充足的易利用的碳水化合物时,瘤胃中氨的利用率高,蛋白质合成强度大,微生物生长增殖速度快。随着季节的变化,秋、冬季由于动物采食的饲草养分含量低(DE 分别为 9.66 和 7.32 MJ/kg, CP 含量分别为 8.91% 和 6.30%),不能供给瘤胃细菌足够的能量和蛋白质,影响能量和氨的同步释放,抑制了微生物的生长繁殖,因而细菌数量明显低于夏季。

3.3 采食量和饲料的物理状态对微生物数量的影响

采食量和饲料的物理状态,能影响瘤胃的排空速度和发酵类型,因而影响瘤胃中微生物的生长增殖和数量。随着牧草日渐成熟,牧草的消化率及被放牧家畜的采食量都会下降^[13,14]。试验中,藏系绵羊干物质的平均采食量,夏季草场分别为春、冬和秋季的 1.98, 1.61 和 1.80 倍。与上述资料报道相一致。这主要是由于春、秋、冬、季牧场牧草处于枯黄期,牧草消化能、粗蛋白质含量都较低,当饲料中粗蛋白质含量低于 8% 时,反刍动物的采食量即会降低^[15,16]。当纤维性物质含量增高(春、秋、冬的 ADF 含量分别为 42.47%, 40.66% 和 43.40%),使得牧场牧草干物质消化率低,质硬,适口性差,这可能是干物质采食量低的原因之一。由此可看出,随着藏系绵羊采食饲料中的纤维性物质含量增高,采食量也随着降低,瘤胃细菌的数量变化也相应降低(图 1),夏季瘤胃内细菌数量分别是春、冬和秋季的 5.56, 2.35 和 2.49 倍;秋季和冬季瘤胃细菌数量变化不明显($P > 0.05$)。冬季寒冷,也是影响采食量的因素之一^[17,18]。据报道,在冷应激状态下,温度每下降 1°C ,绵羊对干物质的消化率下降 0.31%^[16],这也是导致秋、冬季节瘤胃微生物数量低于夏季的一个原因。

3.4 实时定量 PCR 技术对微生物数量的监测

通过实时定量 PCR 技术定量研究瘤胃细菌随季节的变化规律,表明春、夏、秋和冬季瘤胃内细菌质量数分别为 3.06, 17.00, 6.81 和 7.24 ng,证明实时定量 PCR 技术能准确的反映出放牧藏系绵羊瘤胃细菌数量随季节的动态变化,夏季其瘤胃内细菌数量明显高于其他 3 个季节,秋季和冬季瘤胃细菌数量变化不明显,而冬春瘤胃细菌数量低;从研究结果看,对于高寒草地放牧的藏系绵羊,在冬、春季节应给予补饲。

参考文献:

- [1] 姚军, 郭健, 赵晋军, 等. 青藏高原草地营养与牦牛和藏羊瘤胃纤毛虫种群动态相关分析[J]. 中国草食动物专辑, 2002, 22(4): 162-163.
- [2] Tajima K, Nagamine T, Matsui H, *et al.* Phylogenetic analysis of archaeal 16S rRNA libraries from the rumen suggests the existence of a novel group of archaea not associated with known methanogens[J]. FEMS Microbiology Letters, 2001, 200: 67-72.

- [3] Klieve A V, Hennessey D, Ouwerkerk D, *et al.* Establishing populations of *Megasphaera elsdenii* YE34 and *Butyrivibrio fibrisolvens* YE44 in the rumen of cattle fed high grain diets[J]. Journal Applied Microbiology, 2003, 95: 621-630.
- [4] Petroni G, Rosati G, Vannini C, *et al.* In situ identification by fluorescently labeled oligonucleotide probes of morphologically similar, closely related ciliate species[J]. Microbiology Ecology, 2003, 45:156-162.
- [5] 淡瑞芳, 张海涛, 龙瑞军, 等. 瘤胃微生物生态研究方法评述[J]. 草业科学, 2007, 24(7): 77-81.
- [6] John T, Sylvester, Sanjay K R, *et al.* Development of an assay to quantify rumen ciliate protozoal biomass in cows using real-time PCR[J]. Nutritional Methodology, 2004, 134(12): 3378-3384.
- [7] 龙瑞军, 董世魁, 王元素, 等. 反刍动物采食量的概念与研究方法[J]. 草业学报, 2003, 12(5): 8-17.
- [8] 丁学智, 龙瑞军, 阳伏林, 等. 体外产气法评定天祝几种高山植物的抗营养因子及饲用潜力[J]. 草业学报, 2007, 16(1): 24-29.
- [9] 汤少勋, 姜海林, 周传社, 等. 不同牧草品种对体外发酵产气特性的影响[J]. 草业学报, 2005, 14(3): 72-77.
- [10] 杨诗兴. 饲料养分评定方法[M]. 兰州: 甘肃民族出版社, 1982. 170-190.
- [11] 淡瑞芳, 龙瑞军, 杨玉海. 瘤胃微生物总 DNA 快速提取法研究[J]. 家畜生态学报, 2006, 27(1): 18-21.
- [12] 刘金祥, 胡自治, 任继周, 等. 高山草原绵羊放牧生态及消化代谢系列研究 II. 放牧绵羊排尿量收集的新改进[J]. 草业学报, 2000, 9(2): 72-76.
- [13] Cordovass F J. Forage intake by grazing livestock[J]. Journal of Range Management, 1978, 31(6): 430-438.
- [14] 吴天星, 杨诗兴, 彭大惠. 食道瘘管体外消化和 Cr_2O_3 三合一法测定放牧采食量[J]. 浙江农业大学学报, 1995, 21(3): 239-242.
- [15] 郝正里, 刘世民, 孟宪政. 反刍动物营养学[M]. 兰州: 甘肃民族出版社, 2000. 112-156.
- [16] 刘金祥, 胡自治, 梁秀, 等. 高山草原绵羊放牧生态及消化代谢系列研究 III. 放牧绵羊食入牧草消化率动态及其限制性因素分析[J]. 草业科学, 2001, (2): 28-31.
- [17] National Research Council. Effect of Environment on Nutrient Requirements of Domestic Animal[M]. Washington: National Academy Press, 1981. 85-89.
- [18] 林慧龙, 侯扶江, 任继周. 放牧家畜的践踏强度指标探讨[J]. 草业学报, 2008, 17(1): 85-92.

Seasonal shift of rumen bacteria quantity of grazing Tibetan sheep and forage nutrition by grazing sheep

DAN Rui-fang¹, ZHANG Hai-tao¹, LONG Rui-jun^{2,3}, DING Xue-zhi⁴, ZHANG Xin⁵

(1. Jiangsu Animal Husbandry & Veterinary College, Taizhou 225300, China; 2. International Centre for Tibetan Ecosystem Management, Lanzhou University, Lanzhou 730020, China; 3. College of Pastoral Agriculture Science and Technology, Lanzhou University, Lanzhou 730020, China; 4. Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Science, Xining 810001, China; 5. Department of Basic Science, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China)

Abstract: In this study, real time PCR were used to monitor changed quantity of bacteria in rumens of 12 Tibetan sheep with seasonal shift, by collecting rumen content of grazing Tibetan sheep in alpine meadow in spring, summer, autumn and winter, respectively. 1) The quantity of bacteria in grazing Tibetan sheep rumen did not have a significantly change between winter and autumn, and that of spring decreased 2.38, 2.23-fold of autumn and winter, meanwhile, that of summer was significantly higher 5.56-fold, 2.35-fold and 2.49-fold than that of autumn, winter and spring; 2) Intake of the grazing sheep in summer was significantly higher 1.98-fold, 1.61-fold and 1.80-fold than that of spring, winter, autumn. Intake of the grazing sheep and quantity of bacteria in rumens of the grazing sheep were decreased with fibre increased of fodder. The quantity of bacteria in rumens of Tibetan sheep changed, which result from fodder, season shift. 3) Real time PCR validated for specific detection and quantification of bacteria in rumens of Tibetan sheep with seasonal shift.

Key words: real time PCR; Tibetan sheep; season; rumen bacteria