

台灣水牛瘤胃微生物多樣性分析⁽¹⁾

廖仁寶⁽²⁾⁽³⁾ 黃文瑛⁽²⁾ 吳明哲⁽²⁾ 李佳音⁽³⁾ 程梅萍⁽⁴⁾⁽⁵⁾

收件日期：97年9月28日；接受日期：97年11月24日

摘要

瘤胃為一特殊複雜的厭氧環境，內含之微生物包括細菌、古細菌、真菌、原蟲，且 85-95% 尚未能以人工分離培養。本研究採集水牛瘤胃液樣品（pH5.6），將其中之微生物核酸分別以細菌、古細菌、真菌及原蟲小次單位核糖體核酸基因專一性之引子進行 PCR 增幅放大，並進行 DNA 定序與多樣性分析。結果顯示在細菌多樣性分析中，84 個株系中分屬 7 個菌門 *Bacteroidetes* (55/84)、*Firmicutes* (17/84)、*Verrucomicrobia* (4/84)、*Proteobacteria* (2/84)、*Spirochaetes* (1/84)、*Tenericutes* (1/84)、*Lentisphaerae* (1/84) 及 unclassified Bacteria (3/84)。在古細菌多樣性分析中，84 個株系中主要屬 *Thermoplasmata* 菌綱 (77/84)，只有 1 個株系為 *Methanobacteria* 菌綱，另外 6 株則屬於 unclassified *Euryarchaeota* 菌門。在真菌多樣性分析中，40 個株系中有 36 個為 *Neocallimastix frontalis*，二株各分屬於 *Aspergillus penicillioides* 與 *Paecilomyces* sp., 另二株則屬於未培養的真菌。在原蟲多樣性分析中，42 個株系分屬於 6 種原蟲。瘤胃中細菌之多樣性頗為豐富，應可從其中藉由多源基因體學方式找到實用性之新穎酵素基因。

關鍵詞：瘤胃、微生物、多樣性。

緒言

隨著人類的過度開發，導致地球上生物多樣性 (biodiversity) 逐漸喪失，其主要因為直接與間接地破壞物種與生態。因此近幾年來，生物多樣性的保護成為世界各國重視議題之一，生物多樣性包括了遺傳多樣性 (genetic diversity)、物種多樣性 (species diversity) 及生態系多樣性 (ecosystem diversity) 三個部分，而且三者關係密切不可分。生物遺傳多樣性之產生係因物種為適應生存環境演化而成，遺傳多樣性愈豐富，則物種適應環境的潛力愈大，因此是一座寶藏，將可對未來人類與生物延續提供幫助。根據紀錄顯示目前全世界約有 140 萬種物種 (Wilson, 1988)，但亦有研究預

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1484 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所遺傳育種組。

(3) 國立台灣大學農業化學系。

(4) 行政院農業委員會畜產試驗所經營組。

(5) 通訊作者，E-mail: mpcheng@mail.tlri.gov.tw。

估地球上可能有三千萬種物種 (Erwin, 1983)，而微生物的種類則至少應該有 10^6 - 10^7 之譜 (Bull *et al.*, 1992)，但由於很多的微生物無法經由人類的培養分類，因此目前已知的微生物僅約 12 萬種而已 (Bull *et al.*, 1992)。微生物對地球生態的平衡有不可取代的地位，又由於存在於地球上的時間久遠，經歷了不同的環境變遷，因此含有非常豐富的遺傳多樣性。

微生物充滿在生物圈中，但絕大部份尚未被研究，因為大部分的微生物無法以傳統的培養方式，而可培養的僅佔其中的 1% 而已 (Amann *et al.*, 1995; Torsvik and Øvreås, 2002)。為了要探討微生物的多樣性，則必須發展一套不需培養微生物的步驟即可進行評估的技術，通常是採用分子演化遺傳法，而探討微生物的標的是小次單位核糖體核酸 (small subunit ribosomal ribonucleic acid, ssu rRNA) 基因，利用退化性引子以 PCR 增幅後之產物選殖於載體上，再進行 DNA 序列解析，依據各個不同的 16S rRNA 基因序列做演化分析，即可發現許多預期之外的演化類緣，即使其中之某些類緣與已知生物差距很遠，但對生物圈的影響一提供了某些程度的貢獻 (Pace, 1997)。

雖然在大自然裡微生物含有豐富的遺傳資源可供吾人去挖掘，但目前標準的分離菌株技術，超過 99% 的微生物無法透過實驗室而單獨分離，因此，為了利用環境微生物的遺傳多樣性則必須開發新技術以省去分離菌株的步驟，而直接建構基因庫的方式最簡單可行，由環境樣品如土壤直接萃取其中微生物的 DNA，經由適當分切後接合於載體上，再轉形於宿主細胞中，其所成的基因庫稱為多源基因庫 (metagenome)，目前國外已經有很多研究採用這種多源基因庫的建構藉以篩選含有生物活性的株系，同時也發現了一些可供研究與利用的新物質 (amylase: Yun *et al.*, 2005, lipase: Henne *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005; Ranjan *et al.* 2005; Rhee *et al.*, 2005, protease: Gupta *et al.*, 2002, dehydrogenase: Wexler *et al.*, 2005, diol dehydratase: Knietzsch *et al.*, 2003, reductase: Eschenfeldt *et al.*, 2001, antibiotics: Gillespie *et al.*, 2002; Lim *et al.*, 2005)。在國內，這方面的研究剛起步，因此，為了從環境微生物中獲得一些對人類或其他生物有用的新穎資源，實在有必要投注更多的人力在此新的研究主題上。瘤胃為反芻動物重要的消化器官，亦為一種特殊複雜的厭氧環境，內含之微生物包括細菌、古細菌、真菌、原蟲及噬菌體，且 85-95% 的微生物尚未能以人工分離培養 (Tajima *et al.*, 1999; Whitford *et al.*, 2001; Shin *et al.*, 2004)。本研究以分子生物技術評估台灣水牛瘤胃微生物之多樣性，以了解瘤胃中細菌、古細菌、真菌及原蟲可能之種類與狀態，往後再應用多源基因體學方式，採取可應用的載體系統以建立多源基因庫，期能從中找到新穎酵素並應用於生物技術產業。

材料與方法

I. 瘤胃液採樣

自花蓮種畜繁殖場所取得之台灣水牛瘤胃液樣品，其 pH 值測定為 5.6，將樣品凍存於 -70°C 超低溫冷凍庫中，並將樣品冷凍乾燥，以備微生物 DNA 萃取之用。

II. 瘤胃微生物 DNA 之快速萃取

利用商業化套組 (PowerSoil DNA Isolation Kit, MOBIO) 進行瘤胃液中微生物 DNA 之萃取，依照廠商所提供的操作步驟進行萃取。

III. 瘤胃微生物多樣性分析

分別以細菌、古細菌、真菌及原蟲專一之 16S rDNA 或 18S rDNA 引子對 27F (5'-AGAGTTTGATC CTGGCTCAG-3', Edwards *et al.*, 1989) 和 1492R (5'-TACCTTGTACGACTT-3', Wilson *et al.*, 1990)、21F (5'-TTCCGGTTGAT CCGCCGGA-3') 和 958R (5'-YCCGGCGTTGAMTCCAATT-3') (DeLong,

1992.)、FF2 (5'-GGTCTATTTTGGTTTCTA-3') 和 FR1 (5'-CTCTCAATCTGTCAATCCTTATT-3') (Zhou *et al.*, 2000) 及 ProtoF (5'-TTTCGATGGTAGATTGGAC-3') 和 ProtoR (5'-CTTGTTACGACTTCTC CTTCC-3') (Karnati *et al.* 2003), 增幅放大菌株之 ssu rDNA 片段並選殖於 TA 選殖載體 (pCR2.1-TOPO, Invitrogen) 上, 再以定序試劑 BigDye Terminator 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 進行定序反應, 所使用之定序引子包括 T7、SP6、27F、519F (5'-GTGCCSGCMGCCGCGGTAA-3', Lane *et al.*, 1985)、519R (5'-GWATTACCGCGGCKGCTG-3', Lane *et al.*, 1985) 及 1492R, 之後以 DNA 自動定序儀 (Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer) 解序, 將所得之 DNA 序列貼於 NCBI 網頁 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 上, 以 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1997) 進行比對, 用以確認株系可能代表之菌種身分, 並至 RDP (Ribosomal Database Project) 網頁 (<http://rdp.cme.msu.edu>) 利用線上程式 Classifier (Naive Bayesian rRNA Classifier Version 2.0) 分析細菌與古細菌 16S rDNA 株系可能歸屬之菌門或菌綱, 再以線上程式 Fastgroup II 程式 (<http://biome.sdsu.edu/fastgroup/>) 分析所得 DNA 序列彼此間之相似度, 做為操作分類單位 (operational taxonomy unit, OTU) 計算之依據。

IV. 核苷酸序列

將細菌 16S rDNA 序列送入 NCBI 資料庫 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 所得之 accession numbers 為 FJ028725~FJ028808。

結果與討論

I. 瘤胃微生物之小次單位核醣體核酸基因 PCR 產物

以商業套組萃取出台灣水牛瘤胃微生物之 DNA 溶液經觀察為透明狀, 再經由迷你電泳分析後, 其大小落於 23 kb 處, 由此可得知, 此 DNA 之品質至少可用於建構小片段 (2-9 kb) DNA 庫之需。將瘤胃液中萃取之微生物 DNA, 分別以細菌、古細菌、真菌及原蟲 ssu rRNA 基因專一性之引子進行 PCR 增幅放大, 其 PCR 產物如圖 1, 其分子大小皆符合設計增幅標的。

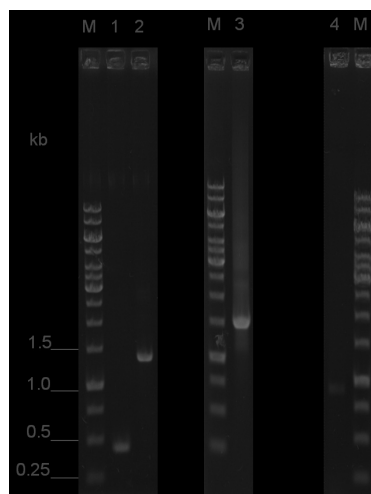


圖 1. 瘤胃微生物之小次單位核醣體核酸基因 PCR 產物。

Lane 1: 真菌專一性之片段, 2: 原蟲專一性片段, 3: 細菌專一性片段, 4: 古細菌專一性片段。

Fig. 1. The PCR products of ssu rRNA genes from rumen microbes.

Lane 1: fungi-specific fragment, 2: protozoa-specific fragment, 3: bacteria-specific fragment, 4: archaea-specific fragment.

II. 瘤胃細菌多樣性分析

瘤胃微生物中細菌多樣性分析結果如表 1，84 株系中分屬於 7 個菌門 *Bacteroidetes* (55/84, 65.5%)、*Firmicutes* (17/84, 19.0%)、*Verrucomicrobia* (4/84, 4.8%)、*Proteobacteria* (2/84, 2.4%)、*Spirochaetes* (1/84, 1.2%)、*Tenericutes* (1/84, 1.2%)、*Lentisphaerae* (1/84, 1.2%)；另有 4 株系為 unclassified Bacteria (4.8%) (表 1)。另外，以相似度 97% 以上之株系為同一 OTU，則共有 69 個 OTU，其中 *Bacteroidetes* 屬 55 個株系分為 44 個 OTU，*Firmicutes* 屬 17 個株系分為 15 個 OTU，其他屬之株系數與 OTU 數相同，表示瘤胃中細菌種類多樣性豐富，所選殖之株系 82.1% (69/84) 顯為不同之微生物個體而來。而文獻中乳牛瘤胃細菌多樣性分析結果，細菌中最多數之菌門亦為 *Bacteroidetes* (61.5%)，次多者為 *Firmicutes* (34.6%) (廖等，2006)，與本研究結果類似。此外，Whitford *et al.* (1998) 則發現乳牛瘤胃細菌株系以 *Firmicutes* 菌門為主 (55%)，*Bacteroidetes* 菌門次之 (30%)，與本研究相較，在菌門的種類相似，但株系在所佔菌門百分比則不同。與不同種類牛瘤胃細菌族群比較，則本研究水牛瘤胃菌門種類歧異度則較大。An *et al.* (2005) 研究不同牛 (犛牛: *Bos grunniens* and Jinnan cattle: *Bos taurus*) 瘤胃微生物多樣性分析，其中犛牛瘤胃細菌所屬菌門為 54.1% 之 LGCGPB (low G+C Gram-positive bacteria) 與 30.9% 之 *Bacteroidetes*，Jinnan 牛瘤胃細菌所屬菌門則分別為 *Bacteroidetes* (39.6%)， γ -*Proteobacteria* (26.9%) and LGCGPB (22.3%)。在同種牛隻瘤胃中所測得之細菌所屬菌門佔不同百分比，可能原因為飼餵之飼糧不同或是採集瘤胃液之時間不同，但在不同種之牛瘤胃液之細菌種類和所屬菌門不同，則可能為牛種不同，其瘤胃環境不同而造成其中微生物菌相之不同。

表 1. 台灣水牛瘤胃細菌多樣性分布

Table 1. Distribution of rumen bacteria in Taiwan water buffalo

Phylum	Number of clones	% of clones	Total OTUs	% of OTUs	Major Class (number of clones)	Major Order (number of clones)
<i>Bacteroidetes</i>	55	65.5	41	59.4	<i>Bacteroidetes</i> (53)	<i>Bacteroidales</i> (53)
<i>Firmicutes</i>	17	20.2	15	23.2	<i>Clostridia</i> (15)	<i>Clostridiales</i> (14)
<i>Verrucomicrobia</i>	4	4.8	4	5.8	<i>Verrucomicrobiae</i> (4)	<i>Verrucomicrobiales</i> (4)
<i>Proteobacteria</i>	2	2.4	2	2.9	<i>Gammaproteobacteria</i> (1) <i>Alphaproteobacteria</i> (1)	<i>Aeromonadales</i> (1) Unclassified(1)
<i>Spirochaetes</i>	1	1.2	1	1.4	<i>Spirochaetes</i>	<i>Spirochaetales</i>
<i>Tenericutes</i>	1	1.2	1	1.4	<i>Mollicutes</i>	<i>Anaeroplasmatales</i>
<i>Lentisphaerae</i>	1	1.2	1	1.4	<i>Lentisphaerae</i>	<i>Victivallales</i>
Unclassified Bacteria	3	3.6	3	4.3		
Total	84		69			

表 2. 台灣水牛瘤胃古細菌多樣性分布

Table 2. Distribution of rumen archaea in Taiwan water buffalo

Phylum	Class	Order	Number of clones	% of clones	Total OTUs	% of OTUs
	<i>Thermoplasmata</i>	<i>Thermoplasmatales</i>	77	91.7	7	63.6
<i>Euryarchaeota</i>	<i>Methanobacteria</i>	<i>Methanobacteriales</i>	1	1.2	1	9.1
	unclassified <i>Euryarchaeota</i>	-	6	7.1	3	23.3
Total			84		11	

III. 瘤胃古細菌多樣性分析

在古細菌多樣性分析中，84 個株系中所主要屬 *Thermoplasmata* 菌綱（77/84, 91.7%）與 *Methanobacteria*（1/84, 1.2%），另外三株（6/84, 7.1%）則屬於 unclassified *Euryarchaeota* 菌門（表 2）。77 個 *Thermoplasmata* 菌綱之株系皆為 *Thermoplasmatales* 菌目且僅分為 7 個 OTUs，另一株系則為 *Methanobacteria* 菌綱 *Methanobacteriales* 目 *Methanosphaera* 屬之甲烷菌，是瘤胃產生甲烷之來源。瘤胃中古細菌所選殖之 84 個株系僅分為 11 個 OTUs（11/84, 13.1%），多樣性較細菌（82.1%）小。An *et al.*（2005）則在犛牛瘤胃選殖出 14 個株系，分為 2 個 OTUs，皆屬 *Methanobrevibacter* sp.，比預期甲烷產生相關之古細菌種類數低，作者認為是實驗偏差導致。與本研究相較，其古細菌種類數少之因素，推測為使用之引子為通用引子（universal primer）而非古細菌專一引子，導致所選殖之株系中僅有 7.22% 為古細菌，其他皆為細菌。但由其研究結果亦可以得到與本研究相同之結果，即為瘤胃中古細菌多樣性較細菌小許多。此外，文獻中澳洲美麗奴羊（merino sheep）之瘤胃中，78 個古細菌株系中有 26 種不同序列（OTU），其中 8 個 OTUs（15 個株系）屬 *Methanobacteriales* 目，其他 18 個 OTUs（63 株系）72–75% 類似於 *Thermoplasma acidophilum* 與 *Thermoplasma volcanium*（Wright *et al.*, 2006），此結果與本研究結果相當一致。

IV. 瘤胃真菌與原蟲多樣性分析

在真菌多樣性分析中，40 個株系中有 36 個屬於 *Neocallimastix frontalis*（36/40, 90.0%），二株各分屬於 *Aspergillus penicillioides* 與 *Paecilomyces* sp.（2/40, 5.0%），另二株則屬於未培養的真菌（2/40, 5.0%），此與乳牛瘤胃真菌多樣性分析結果類似（廖等，2006），*Neocallimastix* 屬之真菌佔絕大部分（98.7%）。在原蟲多樣性分析中，42 個株系分屬於 6 種原蟲（表 3），包括 *Epidinium caudatum*（4/42, 9.5%）、*Eudiplodinium maggii*（10/42, 23.8%）、*Diplodinium dentatum*（15/42, 35.7%）、*Cycloposthium ishikawai*（6/42, 14.3%）、*Polyplastron multivesiculatum*（5/42, 11.9%）、*Dasytricha ruminantum*（2/42, 4.8%），而 Shin *et al.*（2004）在乳牛瘤胃中發現之原蟲歸於二屬 *Entodinium*（69.6% of clones）and *Epidinium*（31.4% of clones），與本研究之結果相較後得知，其差異性相當大。

表 3. 台灣水牛瘤胃中原蟲多樣性分析

Table 3. Distribution of rumen protozoa in Taiwan water buffalo

Species	Number of clones	% of clones
<i>Diplodinium dentatum</i>	15	35.7
<i>Eudiplodinium maggii</i>	10	23.8
<i>Cycloposthium ishikawai</i>	6	14.3
<i>Polyplastron multivesiculatum</i>	5	11.9
<i>Epidinium caudatum</i>	4	9.5
<i>Dasytricha ruminantum</i>	2	4.8

綜合以上分析得知，水牛瘤胃中大於 90% 的細菌之屬於未被培養或是未被鑑定者，且多樣性豐富，分別屬於 7 個菌門 *Bacteroidetes*、*Firmicutes*、*Verrucomicrobia*、*Proteobacteria*、*Spirochaetes*、*Tenericutes*、*Lentisphaerae*；而古細菌多屬嗜熱酸菌 *Thermoplasmata*；真菌類則以 *Neocallimastix frontalis* 為主；原蟲則以 *Diplodinium dentatum* 及 *Eudiplodinium maggii* 佔半數以上。因此可知，瘤胃中細菌之多樣性頗為豐富，應該可從其中藉由多源基因體學方式找到新穎之酵素基因。

誌謝

承蒙行政院農業委員會經費支持（96 農科 -11.1.4- 畜 -L1），復承本所花蓮種畜繁殖場提供台灣水牛瘤胃內容物樣品，本研究始得以完成，謹致謝忱。

參考文獻

- 廖仁寶、江家豐、黃文瑛、謝昭賢、蕭宗法、吳明哲、李佳音。2006。乳牛瘤胃微生物多樣性分析。中畜會誌 35（增刊）：123。
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Amann, R. I., W. Ludwig and K. H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143-169.
- An D., X. Dong and Z. Dong. 2005. Prokaryote diversity in the rumen of yak (*Bos grunniens*) and Jinnan cattle (*Bos taurus*) estimated by 16S rDNA homology analyses. *Anaerobe* 11: 207-215.
- Bull, A. T., M. Goodfellow and J. H. Slater. 1992. Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. *Annu. Rev. Microbiol.* 46: 219-252.
- DeLong, E. F. 1992. Archaea in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5685-5689.
- Edwards, U., T. Rogall, H. Blocker, M. Emde and E. C. Bottger. 1989. Isolation and direct complete

- determination of entire genes. *Nucleic Acids Res.* 17: 7843-7853.
- Erwin, T. L. 1983. Beetles and other insects of tropical forest canopies at Manaus, Brazil, sampled by insecticidal fogging. pp. 59-75 in S. L. Sutton, T. C. Whitmore, and A. C. Chadwick, eds. *Tropical Rain Forest: Ecology and Management*. Blackwell, Edinburgh.
- Eschenfeldt, W. H., L. Stols, H. Rosenbaum, Z. S. Khambatta, E. Quate-Randall, S. Wu, D. C. Kilgore, J. D. Trent and M. I. Donnelly. 2001. DNA from uncultured organisms as a source of 2, 5-diketo-D gluconic acid reductases. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4206-4214.
- Ferrer M., O. V. Golyshina, T. N. Chernikova, A. N. Khachane, D. Reyes-Duarte, V. A. P. Martins Dos Santos, C. Strompl, K. Elborough, G. Jarvis, A. Neef, M. M. Yakimov, K. N. Timmis and P. N. Golyshin. 2005. Novel hydrolase diversity retrieved from a metagenome library of bovine rumen microflora. *Environ. Microbiol.* 7 (12): 1996-2010.
- Gillespie, D. E., S. F. Brady, A. D. Bettermann, N. P. Cianciotto, M. R. Liles, M. R. Rondon, J. Clardy, R. M. Goodman and J. Handelsman. 2002. Isolation of antibiotics turbomycin A and B from a metagenomic library of soil microbial DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4301-4306.
- Henne, A., R. A. Schmitz, M. Bomeke, G. Gottschalk and R. Daneil. 2000. Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes confer ring lipolytic activity on *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3113-3116.
- Karnati, S. K. R., Z. Yu, J. T. Sylvester, B. A. Dehority, M. Morrison and J. L. Firkins. 2003. Technical note: specific PCR amplification of protozoal 18S rDNA sequences from DNA extracted from ruminal samples of cows. *J. Anim. Sci.* 81: 812-815.
- Kim, Y. J., G. S. Choi, S. B. Kim, G. S. Yoon, Y. S. Kim and Y. W. Ryu. 2006. Screening and characterization of a novel esterase from a metagenomic library. *Protein Expr. Purif.* 45: 315-323.
- Knietsch, A., S. Bowien, G. Whited, G. Gottschalk and R. Daniel. 2003. Identification and characterization of coenzyme B12-dependent glycerol dehydratase- and diol dehydratase-encoding genes from metagenomic DNA libraries derived from enrichment cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3048-3060.
- Lane, D. J., B. Pace, G. J. Olsen, D. A. Stahl, M. L. Sogin and N. R. Pace. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 6955-6959.
- Lee, S. W., K. Won, H. K. Lim, J. C. Kim, G. J. Choi and K. Y. Cho. 2004. Screening for novel lipolytic enzymes from uncultured soil microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65: 720-726.
- Lim, H. K., C. E. J. Hung, J. C. Kim, G. J. Choi, K. S. Jang, Y. R. Chung, K. Y. Cho and S. W. Lee. 2005. Characterization of a forest soil metagenome clone that confers indirubin and indigo production on *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 7768-7777.
- Pace, N. R. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276: 734-740.
- Ranjan, R., A. Grover, R. K. Kapardar and R. Sharma. 2005. Isolation of novel lipolytic genes from uncultured bacteria of pond water. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335: 57-65.
- Rhee, J. K., D. G. Ahn, Y. G. Kim and J. W. Oh. 2005. New thermophilic and thermostable esterase with sequence similarity to the hormone-sensitive lipase family, cloned from a metagenomic library. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 817-825.
- Shin, E. C., K. M. Cho, W. J. Lim, S. Y. Hong, C. L. An, E. J. Kim, Y. K. Kim, B. R. Choi, J. M. An, J. M. Kang, H. Kim and H. D. Yun. 2004. Phylogenetic analysis of protozoa in the rumen contents of cow based on the 18S rDNA sequences. *J. Appl. Microbiol.* 97: 378-383.

- Tajima K., T. Nagamine, H. Matsui, M. Nakamura and R. I. Aminov. 2001. Phylogenetic analysis of archaeal 16S rRNA libraries from the rumen suggests the existence of a novel group of archaea not associated with known methanogens. *FEMS Microbiol Lett.* 200: 67-72.
- Torsvik V. and L. Øvreås. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* 5: 240-245.
- Whitford, M. F., R. J. Foster, C. E. Beard, J. Gong and R. M. Teather. 1998. Phylogenetic analysis of rumen bacteria by comparative sequence analysis of cloned 16S rRNA genes. *Anaerobe* 4: 153-163.
- Wilson, E. O. 1988. The current state of biological diversity. In *Biodiversity*, ed. E. O. Wilson, 3-18. Washington, D.C.: National Academy Press.
- Wilson, K. H., R. B. Blitchington and R. C. Green. 1990. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1942-1946.
- Wright, A. G., A. F. Toovey and C. L. Pimma. 2006. Molecular identification of methanogenic archaea from sheep in Queensland, Australia reveal more uncultured novel archaea. *Anaerobe*.12: 134-139.
- Yun, J., S. Kang, S. Park, H. Yoon, M. J. Kim, S. Heu and S. Ryu. 2004. Characterization of a novel amylolytic enzyme encoded by a gene from a soil-derived metagenomic library. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 7229-7235.
- Zhou, G., W. Z. Whong, T. Ong and B. Chen. 2000. Development of a fungus-specific PCR assay for detecting low-level fungi in an indoor environment. *Mol. Cell Probes.* 14: 339-348.

Microbial diversity in the rumen of Taiwan water buffalo ⁽¹⁾

Ren-Bao Liaw⁽²⁾⁽³⁾ Wen-Yin Huang⁽²⁾ Ming-Che Wu⁽²⁾

Chia-Yin Lee⁽³⁾ and Mei-Ping Cheng⁽⁴⁾⁽⁵⁾

Received : Sep. 28, 2008 ; Accepted : Nov. 24, 2008

Abstract

Rumen is a special, complicated, and anaerobic environment consisting of different microorganisms such as bacteria, archaea, fungi, and protozoa. About 85% to 95% of these microbes are very hard to cultivate individually in the lab. In this study, the rumen fluid (pH 5.6) from Taiwan water buffalo was collected to extract microbial DNA and to amplify the small subunit rRNA genes of bacteria, archaea, fungi and protozoa with their specific sets of primers, respectively. The amplicons were then ligated into TA cloning vector for DNA sequencing and microbial diversity analyses. The results indicated that there were 7 bacterial phyla among 84 bacterial clones, including *Bacteroidetes* (55/84), *Firmicutes* (17/84), *Verrucomicrobia* (4/84), *Proteobacteria* (2/84), *Spirochaetes* (1/84), *Tenericutes* (1/84), *Lentisphaerae* (1/84), and unclassified Bacteria (3/84). The *Thermoplasmata* Class (77/84) was the most abundant and diversified phylogenetic group, followed by the *Methanobacteria* (1/84) Class, according to archaea diversity analysis of 84 clones. The other 6 clones belonged to Phylum of unclassified *Euryarchaeota*. In fungal diversity analysis, 36 of 40 clones were identified as *Neocallimastix frontalis* and two clones as *Paecilomyces* sp. and *Aspergillus penicillioides*. The other two clones were recognized as uncultured fungi. Besides, 6 species of protozoa were found in protozoan diversity analysis of 42 clones. Based upon the results above, the bacterial diversity of rumen was the most abundant among the four kinds of microbes. Therefore, it is possible to discover some novel enzyme genes through the metagenomic approach.

Key words : Rumen, Microorganism, Diversity.

(1) Contribution No. 1484 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Animal Breeding Division, COA-LRI, Hsinhua, Tainan, 712, Taiwan, R.O.C.

(3) Department of Agricultural Chemistry, National Taiwan University, Taipei, 106, Taiwan, R.O.C.

(4) Animal Management Division, COA-LRI, Hsinhua, Tainan, 712, Taiwan, R.O.C.

(5) Corresponding author, E-mail: mpcheng@mail.tlri.gov.tw

