

# 16S rDNA 克隆文库法分析生鲜牛乳中 细菌种群的多样性

张敏爱<sup>1</sup>, 张建军<sup>1\*</sup>, 王子亮<sup>2</sup>, 苑利<sup>1</sup>, 杨秀清<sup>3</sup>

(1. 山西出入境检验检疫局技术中心, 太原 030024; 2. 中国合格评定国家认可中心, 北京 100062;  
3. 山西大学生物技术研究所, 太原 030006)

**摘要:** **目的** 利用 16S rDNA 基因文库分析法, 对生鲜牛乳中微生物的种群多样性进行研究。**方法** 提取生鲜牛乳中总微生物基因组 DNA 为模板, 将扩增到的生鲜牛乳样品的 16S rDNA 的 PCR 产物与 pMD~18T 载体连接, 构建其菌群的 16S rDNA 文库。对随机选取的 56 个阳性克隆子进行序列测定和 BLAST 比对。**结果** 文库序列分析表明, 有 53 个克隆子分属 3 个不同的类群, 即厚壁菌类群、变形菌类群和异常球菌-栖热菌类群, 其余 3 个克隆子属于未知类群。其中, 优势细菌类群为厚壁菌类群(86%), 在该类群中, 尤以无乳链球菌为主要代表, 约占所有克隆子的 82%; 其他类群为  $\gamma$ -变形菌类群(7.1%)和异常球菌-栖热菌门类群(1.8%)。系统发育分析表明, 未知类群在分类地位上更接近与厚壁菌类群。**结论** 生鲜牛乳中微生物具有多样性, 无乳链球菌为其中的优势种群, 同时生鲜牛乳中还存在葡萄球菌等致病菌, 或不动杆菌和肠道菌等条件致病菌。

**关键词:** 16S rDNA; 克隆文库; 生鲜牛乳; 种群多样性; 致病菌

## Study on bacterial population diversity in raw milk with 16S rDNA library analysis method

ZHANG Min-Ai<sup>1</sup>, ZHANG Jian-Jun<sup>1\*</sup>, WANG Zi-Liang<sup>2</sup>, YUAN-Li,<sup>1</sup> YANG Xiu-Qing<sup>3</sup>

(1. Technical Center of Shanxi Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Taiyuan 030024, China;  
2. China National Accreditation Service for Conformity Assessment, Beijing 100062, China; 3. Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

**ABSTRACT: Objective** Using 16S rDNA gene clone library analysis method, the bacterial population diversity in raw milk was analyzed. **Methods** Microbial genomic DNA in raw milk was extracted and used as template to analysis. PCR products of 16S rDNA in raw milk were ligated with vector pMD~18T, constructing a bacterial gene clone library. 56 positive clones were picked randomly from the 16S rDNA library, followed by sequence analysis and BLAST comparison. **Results** Sequence analysis showed that 53 clones could be divided into 3 groups: *Firmicutes*, *Proteobacteria*, and *Deinococcus~Thermus*. The rest of 3 clones were uncultured bacteria. The dominant group belonged to *Firmicutes* (86%), in which *Streptococcus agalactiae* predominated, and possessed 82% of all clone in the library. Other groups were  $\gamma$ -*Proteobacteria* (7.1%) and *Dei-*

基金项目: 国家质检总局科技计划项目(2011IK228)

**Fund:** Supported by Science and Technology Planning Project of Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine(2011IK228)

\*通讯作者: 张建军, 高级工程师, 主要研究方向为微生物检测。E-mail: jianjunn@163.com

\*Corresponding author: ZHANG Jian-Jun, Senior Engineer, Technical Center of Shanxi Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, No.8 of Yifen Street, Taiyuan 030024, China. E-mail: jianjunn@163.com

*nococcus-Thermus* (1.8%). And the uncultured bacteria were closed to *Firmicutes* in the phylogenetic tree.

**Conclusion** The bacterial community composition in raw milk was of high diversity. *Streptococcus agalactiae* was dominant population while other pathogenic bacteria, such as *Staphylococcus* or conditioned pathogen, like *Acinetobacter sp.* and *Enterobacter sp.* were also existed in raw milk.

**KEY WORDS:** 16S rDNA; clone library; fresh milk; population diversity; pathogenic bacteria

## 1 引言

随着我国经济高速发展,我国乳品业保持快速增长,人们对牛奶的需求量也在不断攀升。目前,奶牛业已逐步成为我国农业中相对独立且最具活力、发展前景巨大的支柱性产业,对于我国农业结构调整、促进农民增收以及提高人民生活水平都具有重要意义。然而,随着奶牛数量的增加,奶牛乳房炎也成为一种常见的多发病,由此造成了严重的经济损失。奶牛业发达的美国现有 1100 万头泌乳牛,患有隐形乳房炎的达 50 万头<sup>[1]</sup>。我国北京、上海等地调查也表明,隐形乳房炎发病率在 60%左右<sup>[2]</sup>。乳房炎不仅影响牛奶的产量和品质,而且危及人类健康。因此,奶牛乳房炎的早期预警就显得非常重要。

引起奶牛乳房炎的病原微生物主要是多种非特定微生物,其中主要的病原为无乳链球菌、停乳链球菌、金黄色葡萄球菌、乳房链球菌,大肠杆菌等<sup>[3]</sup>。这些病原微生物的传统检测方法主要有纯培养法、计数法、血清检测法、特定引物的 PCR 检测等,这些方法都有其各自的优点。但是由于病原微生物种类繁多且某些种类含量极少,因此上述方法很难全面检测这类微生物。实际上,仅 1%甚至不到 1%的微生物可通过培养方法在培养皿上进行培养和进一步分离,而绝大多数微生物要求非常严格的营养条件或较难培养,若以这极少部分微生物来代表环境中的微生物群体将会导致较大的误差<sup>[4,5]</sup>。本文在提取生鲜牛乳微生物总 DNA 的基础上,扩增样品微生物的 16S rDNA,并建立了 16S rDNA 文库,进而通过测序及比对的方法,分析样品中微生物的种类和丰度,以期对奶牛乳房炎的早期预警提供理论参考。

## 2 材料与方法

### 2.1 实验材料

#### 2.1.1 DNA 模板

DNA 模板:太原市小店区某农场生鲜乳样品的

总基因组 DNA。

#### 2.1.2 主要试剂

引物:选择细菌 16S rDNA 序列的通用引物,见表 1,均由上海生工生物工程有限公司合成。

表 1 细菌 16S rDNA 序列通用引物

Table 1 Universal oligonucleotide primers used for amplification of bacterial 16S rDNA

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Reference
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	[6]
1541R	AAGGAGGTCATC CAGCCGCA	

#### 2.1.3 试剂盒

Real Times 琼脂糖凝胶回收试剂盒和质粒小量提取试剂盒,购自中科瑞泰(北京)生物科技有限公司。

2.1.4 Easy Taq DNA polymerase(5 units/ $\mu$ L)、dNTP(10 mmol/L)、DNA 相对质量标准品、Fast Digest *EcoR* I 限制性内切酶(FD 0274)、克隆载体 pEASY-T3、宿主感受态细胞 Trans 1-T1 Phage Resistant Chemically Competent Cell,均购自北京全式金生物技术有限公司。

2.1.5 氨苄青霉素、IPTG、X-Gal 均购自上海生工生物工程有限公司。

## 2.2 细菌 16S rDNA 文库的构建

### 2.2.1 细菌 16S rDNA 片段的 PCR 扩增

反应体系(50  $\mu$ L): 10 $\times$ Easy Taq Buffer, 5  $\mu$ L; dNTP, 2  $\mu$ L; 引物(20  $\mu$ mol/L)各 5  $\mu$ L; Easy Taq DNA polymerase, 1  $\mu$ L; DNA 模板, 1  $\mu$ L; dd H<sub>2</sub>O 补至 50  $\mu$ L。各试剂加好后,轻轻混匀,阴性对照不加模板。

反应条件为:预变性 94  $^{\circ}$ C、5 min;变性 94  $^{\circ}$ C、30 s;退火 55  $^{\circ}$ C、30 s;延伸 72  $^{\circ}$ C、90 s;35 个循环后,72  $^{\circ}$ C 保温 10 min。

### 2.2.2 PCR 回收产物与 pMD-18T 载体连接

用热激的方法转入大肠杆菌 DH 5,在含有 Amp、X-Gal 和 IPTG 的 LB 平板上培养 12~16 h,随

机挑取白色克隆子,保存并构建文库。

### 2.3 细菌 16S rDNA 文库的筛选

重组大肠杆菌的扩大培养: (1)挑取白色单菌落接种于试管中, 37 °C 下 200 r/min 振荡过夜培养。(2)将培养好的菌液分成两部分, 分别用 EP 管保存于 -20 °C。1 管提取质粒作鉴定用, 另 1 管留作测序用。

EcoR I 限制性内切酶酶切鉴定: 向无菌 EP 管中依次加入 7 μL dd H<sub>2</sub>O、0.5 μL EcoR I Buffer, 1 μL 质粒, 0.5 μL EcoR I, 于 37 °C 反应 2 h。反应结束后, 酶切反应产物经 0.7 % 琼脂糖凝胶电泳检测。

### 2.4 细菌 16S rDNA 序列测定及序列分析

阳性克隆测序: 选取不同酶切类型的阳性克隆进行测序, 直到所测的序列基本上都有被重复测定。测序由华大基因研究中心完成。将细菌文库序列用 CHECK-CHIMERA<sup>[7]</sup> 软件分析检查, 去除嵌合及怪异序列。其余序列输入 Genbank 以 BIAST 程序进行序列相似性比较分析。通过 Cluster W 程序<sup>[8]</sup> 对序列进行多重比对, 采用 MAGE3.1 程序, 使用 Neighbor-joining 法<sup>[9]</sup> 构建系统进化树, Bootstrap 法<sup>[10]</sup> 检测系统树, 自展系数为 1000。

### 2.5 序列登录号

将 FASTA 格式的 16S rDNA 序列用 SEQUIN 软件一次性提交到 NCBI 后统一获得 16S rDNA 序列登录号: JX841321~JX841334。

## 3 结果与分析

### 3.1 种群多样性分析

通过 DNAMAN 软件进行相互比较, 将序列相似性达到 97% 以上的 16S rDNA 克隆子定义为同一个操作分类单位 (Operational taxonomic unit, OTU), 即分子水平进行分类的“种”的概念。

(1) 采用覆盖率 Coverage C<sup>[11]</sup> 来评估文库对环境中微生物群落结构多样性的体现程度, 计算公式如下:

$$C = 1 - n_1/N$$

式中:  $N$  代表文库的克隆总数,  $n_1$  代表在该文库中仅有 1 个克隆的 OTU 的数量。

(2) 采用香依指数 (Shannon~Wiener index,  $H'$ ) 和均匀度指数 (Evenness,  $E$ ) 评价文库所反映的环境微生物

多样性程度<sup>[12]</sup>, 计算公式如下:

$$H' = -\sum_{i=1}^S P_i \ln P_i \quad P_i = n_i / N$$

$$E = H' / \ln S$$

式中:  $N$  为所分析的克隆总数,  $n_i$  为第  $i$  个克隆所代表的克隆数,  $P_i$  表示第  $i$  个 OTU 在文库中占的比例,  $S$  表示文库中 OTU 的个数。

### 3.2 生鲜乳微生物 16S rDNA 文库的筛选

将扩增到的生鲜乳微生物样品的 16S rDNA 的 PCR 回收产物与 T3 载体连接后, 成功构建 16S rDNA 文库。

随机挑选文库中的 22 个阳性克隆进行限制性酶切图谱分析, 酶切结果 (图 1) 表明, 所分析的 22 个阳性克隆, 插入片段图谱可分为四种类型, 连接子内部有 EcoR I 酶切位点, 1600 bp 大小的片段又被切成 700 bp 和 900 bp 或者被切成多个小片段。Lane 20 的连接产物未被完全切开, 所以条带在 4 kb 左右。

### 3.3 阳性克隆子的测序结果

从转化平板上随机挑取 56 个克隆子, 送华大基因科技公司测序。序列经拼接比对后, 发现与 GenBank 数据库中最相似序列的相似率范围是 94%~100%, 其中有 4 个克隆的相似率 < 97%, 说明只有少部分属于目前尚未发现的基因型。

### 3.4 生鲜乳样品的序列测定和系统发育分析

微生物种群分析是根据 16S rDNA 序列同源性的结果, 按相似度进行归类, 在环境微生物多样性的研究中, 通常以 16S rDNA 序列同源性达到 97% (或以上) 定义为同一个 OTU, 即分子水平进行分类的“种”。16S rDNA 序列同源性达到 95% 则属于同一个属<sup>[13]</sup>。

56 个克隆中有 9 个 OTU 分别属于 3 大类群: 变形菌门 (Proteobacteria)、厚壁菌门 (Firmicutes) 和异常球菌-栖热菌门 (Deinococcus-Thermus), 另外有 2 个 OTU 属于尚不能确定其分类地位的类群。各 OTU 所属的细菌类群、代表克隆及其数目、与数据库中最相似序列的相似率见表 3, 系统发育树见图 2 16S rDNA 序列比对可知, 该生鲜乳样品中包含某些致病菌, 如停乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*), 肠杆菌 (*Buttiauxella* sp), 葡萄球菌 (*Jeotgalicoccus* sp), 或是条件致病菌, 如不动杆菌 (*Acinetobacter* sp) 等。

表 2 16S rDNA 文库种群多样性分析  
Table 2 Analysis of OTU diversity for 16S rDNA libraries

Clone No.	OTU No.	Coverage C (%)	Shannon~Wiener index (H')	Evenness (E)
56	11	86	1.374	0.573

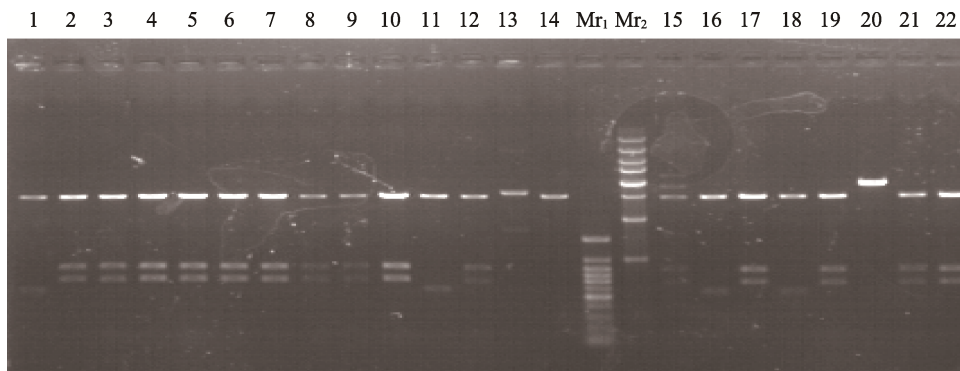


图 1 生鲜乳微生物 16S rDNA 阳性克隆酶切鉴定

Fig. 1 Identification of the positive clone in the microbial 16S rDNA library of raw milk  
Mr<sub>1</sub>: Marker, 100 bp DNA ladder; Mr<sub>2</sub>: Marker, 1 kp DNA ladder; lanes 1~12: 质粒酶切产物; lane 13: 阴性对照(载体自连酶切产物); lane 14: 阴性对照(载体); lanes 15~22 质粒酶切产物  
Mr<sub>1</sub>: Marker, 100 bp DNA ladder; Mr<sub>2</sub>: Marker, 1 kp DNA ladder; lanes 1~12: enzyme-digested products of plasmids; 13: negative control(enzyme-digested products of self-linked vectors); lane 14: negative control(vector); lanes 15~22 enzyme-digested products of plasmids

表 3 样品中乳房炎相关菌株 16S rDNA 序列比对结果  
Table 3 Identification of the bacteria strains isolated from samples of the 16S rDNA

Group	Clone (No.)	Closest relative (Accession No.)	Identity (%)
Firmicutes	M11(31)	<i>Streptococcus agalactiae</i> (AF459432)	99
	M52(15)	<i>Streptococcus agalactiae</i> (AB297817)	99
	M10(1)	<i>Lactococcus piscium</i> (JN226483)	97
	M51(1)	<i>Jeotgaliococcus</i> sp. (NR025644)	99
	M22(1)	<i>Enterobacter</i> sp. (JF939050)	98
γ-Proteobacteria	M1(1)	<i>Acinetobacter</i> sp. (EU252078)	98
	M50(1)	<i>Pseudomonas</i> sp. (EU747693)	99
Deinococcus~Thermus	M21(1)	<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. (JQ795999)	96
	M8(1)	<i>Thermus</i> sp. (AF448817)	99
Unidentified	M5(1)	Uncultured rumen bacterium (DQ394638)	95
	M9(2)	Uncultured bacterium (AB494956)	94

3.4.1 变形菌门

有 4 个克隆(7%)全部归为变形菌门(Proteobacteria) γ-Proteobacteria 亚群, 分别属于肠杆菌属 (*Enterobacter*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 和假黄色单胞菌属

(*Pseudoxanthomonas*)。假黄色单胞菌属的 M 21 与 *Pseudoxanthomonas* sp. (JQ795999)的相似度为 96%, 可能是新种。

3.4.2 异常球菌-栖热菌门

该门只含有 1 个克隆, 归为栖热菌属(*Thermus*),

是该门唯一的种。该菌与分离自澳大利亚大喷泉盆地的一株栖热菌 16S rDNA 相似性为 99%。

### 3.4.3 厚壁菌门

厚壁菌是第一优势类群, 包含 48 个克隆 (85.7%), 归为 4 个 OTU(44%), 包括以下 3 个属: 链球菌属 (*Streptococcus*)、乳球菌属 (*Lactococcus*) 和 *Jeotgalicoccus* 属, 其中链球菌属是牛乳中的最优势菌属。链球菌属的 M 11 代表 31 个克隆(55%), 在系统学上与 *Streptococcus agalactiae* (AF 459432) 关系密切, 是牛乳中的绝对优势种。乳球菌属的 M52 代表 15 个克隆(15%), 是牛奶中的次优势种群, 与分离自日本内浦马鲛鱼体内的 *Streptococcus agalactiae* 的序列相似率为 99% (AB 297817)。

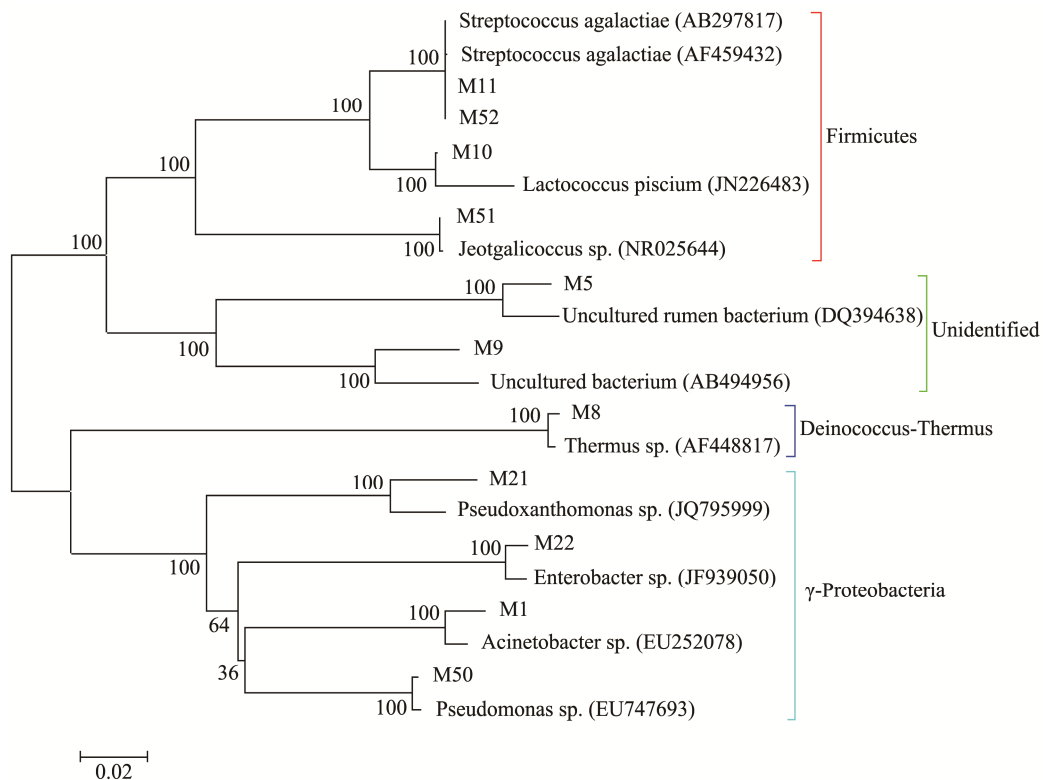
### 3.4.4 其他克隆

未确定分类地位的克隆数为 3 个(5%), 分别属于 2 个 OTU, 代表克隆为 M 5 和 M 9。M 5 与 Uncultured rumen bacterium 的 16S rDNA 序列相似度仅为 95%。

该序列来自挪威斯瓦尔巴特群岛夏末野生牧场驯鹿 (DQ394638)<sup>[14]</sup>。M9 与来自日本札幌羊瘤胃的 Uncultured bacterium 16S rDNA 序列相似度 (AB494956) 为 94%。

## 4 讨论

奶牛乳腺炎是目前影响奶业发展的第一大疾病, 每年导致巨大的经济损失, 是乳业发展的巨大障碍。奶牛乳房炎主要是由病原微生物引起, 包括细菌、真菌、病毒、支原体等上百种病原微生物, 常见病菌有链球菌、葡萄球菌、大肠杆菌和支原体, 约占感染数的 70%, 因而, 生鲜乳中相关微生物的检测就显得尤为重要。目前对链球菌、葡萄球菌等病原菌的检测, 大多数都是对其中一种或是简单的几种病原菌进行检测, 而且检测方法中, 传统的培养方法占大多数<sup>[15-17]</sup>。16S rDNA 文库法是近年来发展迅速的一种



M1: *Acinetobacter* sp.; M5: Uncultured rumen bacterium; M8: *Thermus* sp.; M9: Uncultured bacterium; M10: *Lactococcus piscium*; M11: *Streptococcus agalactiae*; M21: *Pseudoxanthomonas* sp.; M22: *Buttiauxella* sp.; M50: *Pseudomonas* sp.; M51: *Jeotgalicoccus* sp.

图 2 生鲜牛乳样品测序克隆与 Genbank 最相似序列的同源性关系

Fig.2 Phylogenetic trees showing relationships between cloned 16S rDNA sequences that were from the raw milk and the closest relatives in Genbank

分析群落生境中多种微生物的方法<sup>[18]</sup>, 该法不仅能准确、客观地反映微生物的组成, 而且对环境样品中的不可培养微生物也能够进行分析和检测。

本研究针对某农场健康奶牛生产的生鲜乳样品建立了 16S rDNA 文库, 并对其中部分阳性克隆进行了测序和分析。结果表明, 该生鲜乳样品中绝大部分的测序克隆是病原菌, 如停乳链球菌、肠杆菌、葡萄球菌, 或是条件致病菌, 如不动杆菌等。结果表明, 产该牛乳的奶牛已被感染了乳房炎的病原菌, 而且是混合感染。

文库分析结果表明, 无乳链球菌占样品中微生物总数的 78%, 表明该菌是生鲜乳样品中的主要病原菌。而其他病原菌, 如葡萄球菌、肠杆菌等只占极少数, 与李玉等<sup>[19]</sup>对呼和浩特市某奶牛场牛奶样品分离的病原菌相似。而与代敏<sup>[20]</sup>等人报道的四川成都等地区分离的奶牛乳腺炎病原菌不相符, 该作者用 VITEK 全自动分析系统的鉴定结果发现主要致病菌是葡萄球菌、大肠杆菌等。郭春燕<sup>[21]</sup>也报道了锡林浩特市某农场的生鲜乳病原菌以葡萄球菌为主。分析其原因除与地域、环境、季节和饲养管理等因素有关外, 还可能与细菌鉴定方法有关。目前对于乳腺炎病原菌的鉴定方法主要采用传统常规的生化鉴定法, 其结果易受方法本身的局限性等多方面因素的影响。而本试验采用 16S rDNA 序列分析技术作为研究微生物多样性的有力工具, 不仅提供了一个区别于传统伯杰氏细菌分类系统的新分类系统, 而且弥补了沿用已久的传统培养法分析微生物群落的缺陷和不足, 具有成熟、快速、准确的优点, 是一种具有广阔应用前景的方法。

本实验除分离到一些常规的奶牛乳腺炎相关的病原菌外, 还检测到有栖热菌、假黄单胞菌的存在, 此外还检测到两株不可培养的细菌, 它们的分类地位接近与停乳链球菌和葡萄球菌所在的厚壁菌门。其中 M5 菌株与分离自堆肥、粪便和肠道的不可培养菌最相似, 相似性达到 95%。由此可见, 与其他分离和检测方法相比, 16S rDNA 能够检测到生鲜乳中一些稀有的微生物, 更能够全面真实地反映环境中的微生物多样性。

#### 参考文献

- [1] 李洪杰. 应用高新技术诊断和治疗奶牛乳房炎[J]. 兽医导刊, 2011, 31(4): 41-43.
- [2] 苏莹, 李峰. 奶牛乳房炎的成因及防治[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2011, (2): 16-17.
- [3] Su Y, Li F. Cause, prevention and cure of bovine mastitis [J]. Shanghai J Anim Husbandry Vet Med, 2011, (2): 16-17.
- [4] Suraj G, Dulari T. Risk factors for bovine mastitis in the central province of Sri Lanka [J]. Trop Anim Health and Pro, 2014, (6): 23-29.
- [5] Alexander L, Michael P. Probing identity and physiology of uncultured microorganisms with isotope labeling techniques [J]. Geomicrobiol Mol Environ Persp, 2010, (6): 127-145.
- [6] Han J, Wang LY, Cai BY. Bacterial diversity in antibiotic wastewater treatment [J]. Water Sci Technol, 2013, 68(12): 2676-2682.
- [7] Min KK, Weon TS, Yong BL. Analyses of archaeal communities in Doenjang and Ganjang using a culture-independent manner based on 16S rRNA sequences [J]. Food Sci Biotechnol, 2013, 22(2): 449-454.
- [8] Maidak BL, Cole JR, Lilburn TG, et al. The RDP(RibosomalDatabase Project)continues [J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(1): 173-174.
- [9] Tompson JD, Higgins DG, Gibson TJ Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice [J]. Nucleic Acids Res, 1994, 22(22): 4673-4680.
- [10] Juan DH, Rincón SM, Filgueira DJJ. "Head to Tail" tool analysis through ClustalW alignment algorithms and construction of distance method neighbor-joining trees based on genus fusarium genomic distances [J]. Advances Comput Biology, 2014, 232: 97-102.
- [11] Andrew R. Randomization, bootstrap and Monte Carlo methods in biology [J]. J Royal Stat Soc: Series A (Stat Soc), 2007, 170(3): 856.
- [12] 安金霞, 王国庆, 李树芳, 等. 基于多维度覆盖率的软件测试动态评价方法[J]. 软件学报, 2010, 21(9): 2135-2147.
- [13] An JX, Wang GQ, Li SF, et al. Dynamic evaluation of software testing based on multiple dimensions coverage ratio [J]. J Software. 2010, 21(9): 2135-2147.
- [14] 陈梦. 对生态系统及生物多样性等理论问题的探讨[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2003, 27(5): 30-34.
- [15] Chen M. Discuss on theoretical problems of ecosystem diversity and biodiversity etc [J]. J Nanjing Forestry Univ, Nat Sci Edit, 2003, 27(5): 30-34.
- [16] 雷正玉, 张晓. 16S rDNA 序列分析技术在微生物检测中的应用[J]. 农业科学与技术, 2014, 15(4): 4-6.
- [17] Lei ZY, Zhang X. Application of 16S rDNA sequence analysis

- technique in microbial detection[J]. *Agr Sci Technol*, 2014, 15(4): 4–6.
- [14] Sundset MA, Praesteng KE, Cann IK, *et al.* Novel rumen bacterial diversity in two geographically separated sub-species of reindeer [J]. *Microb Ecol*. 2007, 54(3): 424–438.
- [15] 崔一喆, 张秀英, 王新, 等. 奶牛乳房炎主要致病菌的分离与鉴定及体外抑菌实验[J]. *中国兽医杂志*, 2008, 44(3): 46–47.  
Cui YZ, Zhang XY, Wang X, *et al.* Isolation and identification and in vitro bacteriostasis experiment of major pathogenic bacteria causing bovine mastitis [J]. *Chin J Vet Med*, 2008, 44(3): 46–47.
- [16] 郭春燕, 吴树清, 海岩, 等. 春季某牛场奶牛乳房炎与环境主要致病菌相关性研究[J]. *中国奶牛*, 2011, 18: 38–41.  
Guo CY, Wu SQ, Hai Y, *et al.* Relevant research of bovine mastitis and major pathogenic bacteria of environment in certain cattle farm in spring [J]. *China Dairy Cattle*, 2011, 18: 38–41.
- [17] 张勇, 贾秀芳, 雅梅, 等. 奶牛乳房炎病原菌分离鉴定及药敏试验[J]. *中国畜牧兽医*, 2009, 36(7): 36–140.  
Zhang Y, Jia XF, Ya M, *et al.* Isolation and identification and drug sensitive test of pathogenic bacteria from bovine mastitis [J]. *Chin Anim Husbandry Vet Med*, 2009, 36(7): 36–140.
- [18] Ranjard L, Poly F, Nazaret S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment research in microbiology [J]. *Res Microbiol*, 2000, 151(3): 167–177.
- [19] 李玉, 敖日格乐, 王纯洁, 等. 临床型奶牛乳房炎致病菌的分离与鉴定[J]. *畜牧与兽医*, 2011, 43(3): 78–81.  
Li Y, Ao Ri GL, Wang CJ, *et al.* Isolation and identification of clinical-pathogenic bacteria from bovine mastitis[J]. *Anim Husbandry Vet Med*, 2011, 43(3): 78–81.
- [20] 代敏, 彭城, 陈丹丹, 等. 全自动微生物分析系统和 16S rDNA 序列分析技术对奶牛乳腺炎病原菌的鉴定[J]. *畜牧与兽医*, 2011, 43(3): 28–32.  
Dai M, Peng C, Chen DD, *et al.* The identification of using automated microbiological analysis system and 16S rDNA sequence analysis technique for bovine mastitis pathogenic bacteria [J]. *Anim Husbandry Vet Med*, 2011, 43(3): 28–32.
- [21] 郭春燕, 吴树清, 海岩, 等. 奶牛乳房炎主要致病菌的分离鉴定及药敏实验[J]. *中国草食动物*, 2011, 31(4): 77–80.  
Guo CY, Wu SQ, Hai Y, *et al.* Isolation and identification and drug sensitive test of major pathogenic bacteria from bovine mastitis [J]. *China Herbivores*, 2011, 31(4): 77–80.

(责任编辑: 白洪健)

### 作者简介



张敏爱, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品微生物检测。  
E-mail: zmaama2005@163.com



张建军, 学士, 高级工程师, 主要研究方向为微生物检测。  
E-mail: jianjunn@163.com