

羔羊瘤胃微生物区系建立、发展与调控技术研究进展

马涛 张乃锋 屠焰 刁其玉*

(中国农业科学院饲料研究所,农业农村部饲料生物技术重点实验室,北京 100081)

摘要:我国是养羊大国,2019年我国绵羊和山羊存栏总量达3亿只,羊肉产量约485万t,均居世界首位。肉羊产业对于我国乡村振兴、提高人民生活水平发挥着举足轻重的作用。对于反刍动物而言,成年阶段的高产与幼畜阶段密不可分,这是因为早期饲料或饲养管理等措施可以有效调控瘤胃微生物区系,起到长久提高反刍动物生产性能的效果。本文综述了近年来我国羔羊瘤胃微生物区系调控方面的研究进展,重点阐述了饲料对羔羊瘤胃微生物区系及发酵功能的调控研究,并对未来的研究方向进行了展望。

关键词:羔羊;瘤胃微生物;宿主;饲料;环境;调控

中图分类号:S826

文献标识码:A

文章编号:1006-267X(2020)10-4733-10

我国是养羊大国,养羊业具有悠久的历史,最早的养羊记录可以追溯到5 000~7 000年前,肉羊产业长期在我国畜牧业中具有重要地位。近年来,随着人们对羊肉等红肉作为一种优质蛋白质来源的需求量不断上升,以及政府将肉羊养殖确定为脱贫的重要手段之一^[1],我国肉羊产业快速发展,规模化、集约化程度不断提高。2019年,我国绵羊和山羊存栏总量达3亿只,羊肉产量约485万t,均居世界首位。预计到2025年,我国人均羊肉消费量将达到5 kg。未来在保证羊肉充分供给的同时,也要降低肉羊养殖对环境造成的压力,因此,一方面需要提高肉羊的饲料转化效率,即在保持较高或相等的生产性能的前提下,减少饲料消耗量,缓解“人畜争粮”问题;另一方面需要推动绿色健康养殖模式的发展,减少温室气体排放量以及治疗性抗生素的用量。实现上述目标的核心之一,就是对肉羊瘤胃微生物区系结构和功能进行有效调控^[2-3]。

瘤胃是反刍动物特有的消化器官之一,是天

然的厌氧发酵罐,生存着大量的微生物。瘤胃微生物群落是动物界消化道生态系统中最为复杂的微生物群落之一^[4],包括细菌($10^{10} \sim 10^{11}$ 个/mL)、古细菌($10^8 \sim 10^9$ 个/mL)、原虫($10^5 \sim 10^6$ 个/mL)、真菌($10^3 \sim 10^4$ 个/mL)以及病毒(主要为噬菌体)等。由于瘤胃微生物的存在,能够发酵低质粗饲料产生挥发性脂肪酸(VFA),VFA能够给反刍动物生长提供所需要能量的70%以上,这也是将其与单胃动物区分开来的本质特点。瘤胃微生物发酵产生VFA的同时,也会产生甲烷和二氧化氮等温室气体。家畜养殖是人类活动产生甲烷的最主要来源,而反刍动物的甲烷排放量占全部家畜甲烷排放量的96%^[5]。除加剧温室效应外,甲烷的产生也造成反刍动物饲料能量的损失,以甲烷能损失的能量约占总能摄入量的12%^[6]。因此,合理调控瘤胃发酵,降低甲烷产量,对于提高反刍动物对饲料的利用效率具有重要意义。

已有研究表明,刚出生的羔羊瘤胃中即有大量的微生物的定植。例如,2~4日龄的羔羊瘤胃

收稿日期:2020-08-03

基金项目:国家自然科学基金(41705129);国家重点研发计划(2018YFD0501902);现代农业产业技术体系(CARS-38)

作者简介:马涛(1987—),男,山东青岛人,副研究员,博士,从事肉羊营养研究。E-mail: matao@caas.cn

*通信作者:刁其玉,研究员,博士生导师,E-mail: diaoqiuyu@caas.cn

中就已经存在产甲烷古细菌,出生后 10 d 左右尚未采食粗饲料时,瘤胃中就存在与成年羊数量相当的细菌和产甲烷古细菌^[7]。瘤胃真核生物定植的时候与原核生物相比较晚,如羔羊出生 8~10 d 后瘤胃内出现了真菌的定植^[7],出生 15 d 后出现了纤毛虫的定植^[8]。上述研究表明,羔羊瘤胃微生物群落的建立和发展是一个非常迅速的过程。与成年阶段相比,新生或幼龄动物的消化道微生物更易受饲料等因素的影响,且该影响作用持续时间更长久^[9]。最新研究发现,反刍动物瘤胃调控的“黄金窗口期”可能只存在于出生后 3 周龄之内^[10]。因此,合理调控瘤胃微生物和宿主之间早期积极互作的建立,对于改善瘤胃发酵、提高能量利用率可能具有长效作用。本文首先总结了瘤胃微生物区系组成的最新研究进展,然后综述了近年来我国在羔羊瘤胃微生物调控方面的相关研究,最后对未来的研究方向进行了展望,旨在为合理有效调控羔羊瘤胃微生物群落和培育健康高产的肉羊提供参考。

1 反刍动物瘤胃微生物区系组成研究进展

“Hungate1000”计划促进了瘤胃微生物培养组学技术的应用及创新,基于该计划,已经实现了 486 种瘤胃微生物的培养,占测序结果报道的属水平 75% 以上,并已按其参与的主要微生物通路进行了分析^[11]。然而“Hungate1000”计划中可培养的细菌只占新组装的瘤胃微生物基因组的很小一部分比例,因此,需要进一步提升瘤胃细菌等微生物的体外培养技术,为研究其体外和体内的功能奠定基础。尽管古细菌的丰度要低于细菌,但人们同样致力于分离鉴定古细菌的新品种,目前已经有 21 个新菌种从“Hungate1000”计划中被分离鉴定出来^[12]。

1.1 细菌

细菌是瘤胃微生物的主要组成部分,过去对于瘤胃细菌的研究是基于体外分离培养方法来开展,应用该方法实现了瘤胃中丰度较高的 200 多种细菌的分离培养。近年来,随着测序技术的发展,以扩增子 16S rRNA 测序为代表的测序技术不仅能够用于研究瘤胃中可培养的细菌,也为研究目前条件下无法实现体外培养的细菌提供了方法^[11]。近年来,国外研究人员利用宏基因组测序技术,结合基因组组装(metagenomic assembly ge-

nomes)技术,成功组装出了 4 900 种新的瘤胃微生物基因组^[13],一方面说明瘤胃微生物群落结构的复杂性;另一方面也说明我们先前对于瘤胃微生物结构和功能的认知还存在较大的局限性。

1.2 原虫

反刍动物通常从出生开始,瘤胃中就有不同的原虫群落且基本终生不变。瘤胃原虫的生物量能够占到瘤胃微生物总量的 50%,以纤毛虫为主,也有部分鞭毛虫,但原虫在瘤胃生态环境中的具体作用还不是很明确^[14]。光学显微镜是分析原虫群落组成的传统手段,18S rRNA 测序技术的应用不仅能够明确瘤胃原虫的进化分类情况,而且比传统的光学显微镜方法能够观察到更多的原虫种类^[15]。由于目前很难在无菌条件下培养原虫^[14],大部分体内或体外试验的研究对象都是和细菌共培养的原虫。因此,尽管已经开展了很多研究,仍然无法对瘤胃原虫的具体作用及其机制下定论。目前来看,瘤胃纤毛虫能够合成大部分纤维降解酶^[16]。去除瘤胃原虫对于反刍动物的存活不受影响,但会导致有机物降解率降低^[14],去除瘤胃原虫能够增加微生物蛋白质产量,降低甲烷排放,可能是纤毛虫吞噬了细菌或产甲烷古细菌,表明原虫与饲料蛋白质利用率以及甲烷产生存在直接或间接的关系,因为原虫附着在产甲烷古细菌的内外表面^[17]。最近通过对有尾内毛虫(*Entodinium caudatum*)巨核基因组测序,发现了这种瘤胃纤毛虫的基因组信息,为研究瘤胃中的原虫代谢提供了重要手段^[18]。

1.3 真菌

厌氧真菌是瘤胃真核微生物之一,但其具体生物量还存在争议。通过测定几丁质和 rRNA 转录子丰度,Huws 等^[19]研究发现厌氧真菌占瘤胃微生物生物量的 10%~20%,在反刍动物采食低质粗饲料时对于纤维降解具有重要作用。与原虫数量类似,真菌活性增强能够促进甲烷排放,说明瘤胃真菌与产甲烷古细菌联系密切^[20]。此外,瘤胃真菌的分类仍然存在着较大的争议,通常可见的 6 个属包括单中心的新丽鞭菌属(*Neocallimastix*)、盲肠鞭菌属(*Caecomyces*)、梨囊鞭菌属(*Piromyces*)和多中心的厌氧鞭菌属(*Anaeromyces*)、厌氧真菌属(*Orpinomyces*)和枝梗鞭菌属(*Cyllamyces*),但可能存在其他菌属^[20]。利用分子技术包括第一内转录间隔区(ITS-1)或是大亚基 rRNA 作

为标记物,进行瘤胃真菌基因组或转录组的研究也开始增多。

1.4 产甲烷古细菌

古细菌只占瘤胃微生物组成的 0.3% ~ 3.0%^[21],大部分能够产甲烷。产甲烷古细菌当中,有 78% 是亲氢离子型,而约 22% 是亲甲基型,能够利用甲基(如甲醛或甲胺)合成甲烷,只有非常少量的产甲烷菌古细菌利用乙酸为底物^[12]。产甲烷短杆菌(*Methanobrevibacter*)通常是瘤胃中丰度最高的产甲烷古细菌,其能够利用原虫、细菌和真菌生成的氢气(H₂)、二氧化碳(CO₂)和甲酸合成甲烷。其他重要的亲氢产甲烷古细菌包括甲烷球形菌属(*Methanosphaera*)、甲烷微球菌属(*Methanimicrococcus*)和甲烷杆菌属(*Methanobacterium*)^[17],亲甲基的产甲烷古细菌丰度较低,包括甲烷八叠球菌目(*Methanosarcinales*)、*Methanosphaera* 和 *Methanomassiliicoccaceae*; *Methanosarcinales* 可利用乙酸产生甲烷^[17]。产甲烷古细菌数量和甲烷产量之间的关系仍然存在争议。Danielsson 等^[22]研究发现,瘤胃甲烷产量与细菌和产甲烷古细菌丰度具有相关性;如前文所述,原虫栖居在产甲烷古细菌的内外表面,因此这些产甲烷古细菌的数量与游离的产甲烷古细菌的数量之间的相关性存在较大差异,且在不同原虫属间存在差异^[23],从而使不同原虫菌在总体甲烷产生过程中表现出不同的作用。

1.5 病毒

瘤胃微生物当中,病毒的研究相对较少,以噬菌体为主^[24]。直到近年来才研究报道了瘤胃噬菌体的基因组序列^[25],且开始有基于宏基因组的瘤胃病毒组研究^[26],为了解瘤胃病毒组成提供了重要手段。已有研究表明,能量是瘤胃噬菌体生长的主要驱动力^[27];瘤胃中的 RNA 病毒能够影响真菌生长^[28],但其对瘤胃真菌整体群落以及纤维降解作用的影响还有待于进一步研究。

2 宿主因素对羔羊瘤胃微生物的影响

2.1 日龄和性别

在山羊羔羊上的研究表明,随着日龄的升高,瘤胃液中的杆菌属(*Bacillus*)和乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)相对丰度逐渐降低,而普雷沃氏菌属(*Prevotella*)、密螺旋体菌属(*Treponema*)、瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)相对丰度逐渐升高^[29]。其

中,普雷沃氏菌属是瘤胃最主要的微生物之一,能够利用淀粉、非纤维性碳水化合物以及单糖产生琥珀酸,还具有分解蛋白质的作用,其相对丰度的提高与瘤胃氨态氮、乙酸和丁酸浓度升高有密切联系^[30]。密螺旋体菌属^[31]和瘤胃球菌属^[32]均是瘤胃中起重要作用的纤维分解菌。与瘤胃液中的微生物相比,附着在瘤胃上皮的微生物与宿主功能密切相关^[33]。通过分析附着在山羊羔羊瘤胃上皮的微生物组成发现,随着日龄的升高,在门水平上,变形菌门(*Proteobacteria*)相对丰度逐渐降低,而拟杆菌门(*Bacteroidetes*)和厚壁菌门(*Firmicutes*)相对丰度逐渐升高;在属水平上,埃希氏菌属(*Escherichia*)在羔羊刚出生时相对丰度最高,随着日龄的增长,普雷沃氏菌属和产丁酸弧菌属(*Butyrivibrio*)相对丰度逐渐升高^[34],其中丁酸弧菌属也是一种重要的结构性碳水化合物分解菌,广泛存在于鹿、奶牛和羊的瘤胃中,具有利用纤维和淀粉产生丁酸的能力^[32]。此外,我国学者研究了日龄和性别对藏羊瘤胃微生物组成的影响,结果表明不同性别的藏羊瘤胃微生物组成存在显著差异。例如,在门水平上,母羊拟杆菌门、公羊厚壁菌门相对丰度随日龄增加不断升高,而母羊螺旋体菌门(*Spirochates*)、公羊蓝细菌门(*Cyanobacteria*)相对丰度随日龄增加不断降低;在纲水平上,母羊变形菌纲(*Bacteroidales*)、公羊梭菌纲(*Clostridiales*)相对丰度随日龄增加不断升高^[35]。上述研究表明,瘤胃微生物随日龄的变化与瘤胃功能(如降解结构性碳水化合物和蛋白质等)的建立密切相关;性别可能是影响羔羊瘤胃微生物群落发展的一个重要因素,但其具体作用机制还不明确。

2.2 瘤胃液移植

近年来,瘤胃液移植逐渐成为调控反刍动物瘤胃微生物组成的一项有效手段,但大多数研究都集中在牛上^[36]。我国学者使用新生羔羊为研究对象,在其断奶前及断奶过程中分别口服新鲜^[37]或冻干^[38]的成年绵羊瘤胃液,随后利用对 16S rRNA 基因扩增子测序技术进行分析,结果发现瘤胃液移植会影响羔羊瘤胃微生物群的组成,具体体现在:接种新鲜的瘤胃液促进了羔羊产琥珀酸菌属(*Succiniclasticum*)、普雷沃氏菌属和变形菌纲 S24-7 等菌属的定植,且与断奶期间进行瘤胃液移植相比,断奶前瘤胃液移植能够促进更多微生物的定植^[37];接种冻干的瘤胃液则改变了埃氏巨球

菌(*Megasphaera elsdenii*)和反刍兽新月单胞菌(*Seimonas ruminantium*)的组成,降低了黄色瘤胃球菌(*Ruminococcus flavefaciens*)相对丰度^[38]。产琥珀酸菌属可通过琥珀酸去甲基产生丙酸^[39],后者是供能的主要挥发性脂肪酸。上述研究也从侧面说明了早期对瘤胃微生物区系进行干预的重要性。

3 饲粮对羔羊瘤胃微生物的影响

研究发现,饲粮(包括粗饲料来源、精粗比以及饲料添加剂的使用等)是影响瘤胃微生物组成的重要因素^[40]。因此,本文重点对我国近年来在饲粮调控羔羊瘤胃微生物方面的研究进展进行了综述。

3.1 代乳粉

对于羔羊来说,早期断奶(母乳)饲喂代乳粉是现代羔羊培育的重要方式之一,能够大大缩短母羊繁殖周期,通过增加产羔频率提高羊群的生产率。近年来,我国学者研究了饲喂代乳粉的日龄对羔羊瘤胃微生物群落的影响,并比较了随母哺乳和饲喂代乳粉2种不同饲喂方式对微生物区系建立的影响。例如,在羔羊10日龄开始饲喂代乳粉,拟杆菌门成为优势菌群,并且普雷沃氏菌属等有益菌相对丰度逐渐增加^[41];在羔羊21和35日龄时断母乳并分别按照2%和4%体重饲喂代乳粉,结果表明断母乳日龄和代乳粉饲喂量对厚壁菌门等一些瘤胃微生物存在交互作用,此外,21日龄断母乳组羔羊瘤胃球菌属相对丰度显著高于35日龄断母乳组。但总体来看,断母乳时间和代乳粉的饲喂量对羔羊瘤胃微生物区系组成的影响相当有限^[42],主要原因可能是在这一阶段羔羊以采食液体饲料为主,液体饲料大部分直接进入皱胃,对瘤胃微生物区系及发酵功能的影响极其有限。

3.2 开食料

在断奶前尽早给羔羊补饲开食料,不仅能够更好地满足其营养需求,而且促进瘤胃发育,提高生产性能。通过比较只吃母乳和饲喂开食料的羔羊瘤胃转录组以及微生物区系组成,发现尽早饲喂有利于羔羊瘤胃发育和生理功能,潜在的机制可能是开食料通过3-羟甲基-3-甲基戊二酰辅酶A裂合酶(*HMGCL*)和3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A合成酶2(*HMGCS2*)基因刺激瘤胃生酮作用和丁酸酯代谢,以及瘤胃微生物群诱导的发酵类型

变化^[43];在饲喂代乳粉基础上补饲开食料,与只饲喂代乳粉的湖羊羔羊相比,显著提高了瘤胃乳头长度和总挥发性脂肪酸的浓度,且提高了微生物多样性^[44]。本团队研究发现,补饲开食料使山羊羔羊瘤胃挥发性脂肪酸产量显著增加,普雷沃氏菌属和毛螺菌科(*Lachnospiraceae*)相对丰度显著升高,两者可能是粗饲料引起瘤胃功能变化的主要微生物^[45]。De Filippis等^[46]通过宏基因组分析发现,人体普氏菌(*Prevotella copri*)的不同菌株可能与饲喂高纤维饲粮时对碳水化合物代谢能力提高相关;毛螺菌科的微生物包含多种与降解植物成分相关的产丁酸菌^[47]。为深入研究开食料刺激羔羊瘤胃发育的微生物机制,我国学者对饲喂开食料后绵羊羔羊瘤胃微生物和宿主转录组谱变化进行了综合分析,结果发现开食料提高了绵羊羔羊瘤胃上皮包括拟杆菌属(*Bacteroides*)、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)和巨球菌属(*Megasphaera*)等多种微生物的相对丰度,降低了弯曲杆菌属(*Campylobacter*)等潜在病原微生物的相对丰度^[48],其中双歧杆菌属于放线菌门,具有降解饲料葡聚糖以及淀粉和与淀粉结构类似的寡糖的作用^[49];开食料还降低了瘤胃上皮白细胞介素-6(*IL-6*)、白细胞介素-10(*IL-10*)以及干扰素- γ (*IFN- γ*)等与免疫功能相关基因的表达量,说明开食料能够调控瘤胃上皮微生物组成和基因表达,使绵羊羔羊更好地适应断奶^[48]。进一步通过转录组分析发现,瘤胃上皮与细胞生长相关的基因包括丝裂原活化蛋白激酶(*MAPK*)、磷酸肌醇-3-激酶催化亚基 β 肽(*PIK3CB*)、肿瘤坏死因子超家族成员10(*TNFSF10*)等上调,与细胞死亡的基因如B淋巴细胞瘤-2基因相关启动子(*BAD*)下调;网络关系分析发现,饲喂开食料后瘤胃乙酸和丁酸浓度与上述基因表达量显著相关,从而明确了开食料饲喂通过影响瘤胃微生物与宿主互作,从而刺激瘤胃上皮细胞发育的机制^[50]。

3.3 营养水平

目前,能量和蛋白质需要量是反刍动物饲粮配制时需要考虑的主要因素。本团队以17日龄断母乳的绵羊羔羊为研究对象,分别比较了饲喂基础饲粮(代乳粉+开食料)、低蛋白质饲粮(基础饲粮水平上降低20%的蛋白质)、低能量饲粮(基础饲粮水平上降低20%的能量)以及低蛋白质低能量饲粮(基础饲粮水平上同时降低20%的蛋白

质和 20% 的能量)对羔羊生长发育和微生物群落的影响,结果表明,饲粮能量或蛋白质水平降低均会降低羔羊的平均日增重、瘤胃重量和黏膜厚度,也降低了瘤胃总挥发性脂肪酸(TVFA)和丙酸浓度。低能量水平提高了纤维菌门以及丁酸弧菌属(*Butyrivibrio*)相对丰度,后者与羔羊瘤胃的丙酸摩尔浓度呈显著负相关^[51],该研究结果表明,饲粮能量相比蛋白质对于羔羊瘤胃微生物的影响作用更显著。另外有学者研究了不同饲喂水平对滩羊瘤胃微生物的影响,发现随着饲喂水平的提高,变形菌门和拟杆菌门相对丰度逐渐升高,而厚壁菌门相对丰度逐渐降低;在种水平上,栖瘤胃普雷沃氏菌(*Prevotella ruminicola*)、黄色瘤胃球菌和溶琥珀酸弧菌(*Succinivibrio dextrinosolvens*)相对丰度线性增加^[52]。上述结果表明了饲粮营养水平与羔羊瘤胃微生物区系的联系,为通过饲粮手段调控羔羊瘤胃发酵提供了依据。

提高饲粮中的精饲料(如高谷物饲料)也是反刍动物生产中常见的策略之一,能够有效提高动物生产性能。然而高谷物饲料会导致瘤胃VFA产量升高,动物唾液分泌量降低,导致瘤胃液pH下降并最终引起亚急性瘤胃酸中毒(SARA)等症^[53]。与持续性的SARA相比,突发的SARA副作用对动物的危害更高,可能是由于瘤胃没有足够的时间适应饲粮的变化^[54]。在羔羊上的研究表明,增加高谷物饲料的比例,显著降低了瘤胃微生物群落的丰富度和多样性^[55-56];此外,瘤胃上皮包括未分类的瘤胃球菌科、未分类的克里斯腾森菌科(*Christensenellaceae*)等分解结构性碳水化合物的微生物相对丰度随高谷物饲料比例的增加而显著降低^[57]。上述研究从瘤胃微生物角度阐明了实际生产中逐步提高谷物饲料用量的必要性。

3.4 补饲优质粗饲料

补饲粗饲料提高反刍动物生产性能的一种有效方式,对于幼龄反刍动物如羔羊,补饲粗饲料有利于促进瘤胃发育。本团队研究了补饲苜蓿对山羊羔羊瘤胃微生物区系组成和功能的影响,利用随机森林分类模型揭示了补饲苜蓿草的山羊羔羊核心微生物群,包括纤维杆菌属(*Fibrobacter*)、密螺旋体菌属、丁酸弧菌属和产琥珀酸弧菌属(*Succinivibrio*)等。产琥珀酸弧菌属是降解多糖的微生物,发酵底物包括乙酸和乳酸^[58];密螺旋体菌属不能够利用纤维,但可以帮助其他细菌分解纤维性

物质^[59];亨氏丁酸弧菌属(*Butyrivibrio hungatei*)是瘤胃主要的产丁酸菌,能够有效降解半纤维素^[60]。补饲苜蓿草可通过调控核心微生物组成,使后者发酵产生更多的挥发性脂肪酸,从而促进瘤胃的发育并最终发挥宿主的功能^[45]。另一项研究中,给10日龄的湖羊羔羊补饲苜蓿草,分别研究其断奶前(17、24和38日龄)和断奶后(45和66日龄)瘤胃微生物定植的特点,结果表明,补饲苜蓿组的羔羊在38日龄时瘤胃普雷沃氏菌属、产琥珀酸弧菌、双歧杆菌属和产丁酸菌的相对丰度都显著高于对照组;这与本团队在山羊羔羊上的研究结果类似,断奶后补饲苜蓿组的羔羊瘤胃未分类的梭菌纲(*Clostridia*)相对丰度高于对照组。Spearman相关性分析表明,未分类的梭菌纲、密螺旋体属、粪球菌属(*Coprococcus*)与粗蛋白质、中性洗涤剂纤维(NDF)摄入量以及血浆 β -羟基丁酸酯含量之间呈正相关。上述研究结果表明,补饲苜蓿在断奶前和断奶后可刺激瘤胃微生物群的变化,并且与瘤胃发育相一致,从而使羔羊在断奶前后均具有更好的采食量和生产性能^[61]。

除苜蓿外,也有学者比较研究了荞麦和玉米秸秆不同比例对5月龄杜寒杂交羔羊瘤胃微生物的影响,结果表明,羔羊饲料转化效率随荞麦秸秆的添加呈曲线变化,荞麦秸秆为中等水平时,饲料转化效率越高。普雷沃氏菌属、丁酸弧菌属、粪球菌属、瘤胃球菌属相对丰度线性降低,而一些有害细菌如萨特氏菌属(*Sutterella*)、螺旋杆菌属(*Helicobacter*)、艾克曼菌属(*Akkermansia*)相对丰度线性升高^[62]。

3.5 添加剂

近年来,植物提取物、益生菌等添加剂在羔羊培育过程中被广泛应用,然而其调控羔羊瘤胃微生物区系组成的研究相对较少。其中,白藜芦醇作为一种植物多酚,主要存在于葡萄、虎杖、花生等植物中^[63]。本团队近期研究发现,天然植物提取物白藜芦醇^[64]、大蒜素^[65]、桑叶黄酮^[66]、茶皂素^[67]等都具有改善瘤胃发酵和降低甲烷排放的效果。以白藜芦醇为例,添加后能够降低羔羊瘤胃液甲烷短杆菌属的相对丰度,提高普雷沃氏菌属和脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)的相对丰度^[68],后者是瘤胃中还原硫酸盐的主要细菌,能够将硫酸盐还原为硫化氢^[69],在此过程中需要和产甲烷菌竞争利用氢气。上述研究揭示了植物提取物调控羔

羊瘤胃发酵和甲烷的生物机理。

随着饲用抗生素的全面禁用,迫切需要寻求抗生素替代品来提高动物生产力,保持其健康。本团队在羔羊上的研究发现,地衣芽孢杆菌和酿酒酵母等益生菌在促进羔羊生长方面具有和莫能菌素(一种抗生素)同样的潜力,这些益生菌能够有效改善羔羊的生长性能、抗氧化能力以及瘤胃发酵功能。通过对瘤胃微生物组成分析发现,益生菌主要提高了瘤胃中降解结构性碳水化合物的纤维杆菌属(*Fibrobacter*)相对丰度,从而解释了羔羊对于饲料 NDF 和酸性洗涤纤维消化率的提升的机理^[70]。

此外,有学者研究了饲料中添加低(10 g/kg DM)和高(30 g/kg DM)水平的尿素对湖羊羔羊瘤胃微生物的影响,结果表明,添加低水平尿素能够提高总原虫数量,但总体来看,尿素添加水平对于瘤胃微生物区系影响不显著,说明瘤胃微生物能够较好地适应不同添加水平的尿素^[71]。

4 其他因素对羔羊瘤胃微生物的影响

4.1 饲喂方式

本团队研究了不同饲喂方式(随母哺乳 vs. 人工饲喂代乳粉)对羔羊消化道微生物定植的影响,结果发现人工饲喂组的羔羊消化道微生物物种丰富度显著高于随母哺乳组的羔羊,人工饲喂显著增加了羔羊肠道中大肠杆菌/志贺氏菌属(*Escherichia-Shigella*)、丁酸弧菌属和梭菌属(*Clostridium*)的相对丰度,显著降低了羔羊肠道中梭菌 X I 的相对丰度。此外,不同饲喂方式也影响了微生物从母体和环境向新生羔羊肠道的直接传递:随母哺乳组的羔羊早期消化道微生物主要来自母体乳头皮肤(43%)、环境空气(28%)、母体产道(7%)、母体腹部皮肤(6%)和母体口腔(5%);而人工饲喂组的羔羊肠道微生物则主要来自母体产道(46%)、环境空气(31%)和羊圈地板(12%)^[72]。

4.2 养殖条件

通过内转录间隔区 rDNA 测序技术,有学者分析了放牧滩羊与舍饲滩羊羔羊哺乳期真菌多样性及结构的变化,结果表明,放牧组滩羊瘤胃羔羊中真菌多样性极显著高于舍饲组,其中新丽鞭毛菌门(*Neocallimastigomycota*)的相对丰度显著高于舍饲组,而舍饲组羔羊瘤胃子囊菌门(*Ascomycota*)

的相对丰度极显著高于放牧组;放牧组滩羊瘤胃液中优势菌门为子囊菌门和新丽鞭毛菌门,舍饲组滩羊瘤胃液中优势菌门为子囊菌门;在属水平上,舍饲组的赤霉菌属(*Gibberella*)、酵母属(*Saccharomyces*)和香蘑属(*Lepista*)等相对丰度显著高于放牧组;而 *Piromyces*、*Caecomyces*、*Neocallimastix* 等相对丰度显著低于放牧组^[73]。上述研究结果表明,饲养方式对滩羊羔羊瘤胃真菌菌群构建具有显著影响。

5 小结与展望

瘤胃微生物区系作为降解转化植物纤维类物质效率最高的天然体系,是反刍动物消化道必不可少的独特组成部分,而反刍动物的瘤胃为微生物提供了一个良好的栖息环境。瘤胃和栖居其间的微生物相辅相成,保证了反刍动物的健康和生长。虽然生物信息学技术和下一代扩增子测序技术的引入能够更好地帮助我们了解瘤胃微生物菌群,但是目前条件下仅能够做到对瘤胃微生物种群进行分类,对其功能的研究仍不够深入。目前,国外对于瘤胃微生物的研究主要集中在肉牛或奶牛,而羔羊瘤胃微生物的研究报道大多见于国内。基于现有研究,我们已经明确了羔羊阶段瘤胃的特征微生物及有效的调控方式,未来一方面需要基于多组学研究,从整体、系统的角度阐明瘤胃微生物在动物生产过程中发挥的作用;另一方面需要立足我国肉羊产业以舍饲为主、以农副产品为主要饲料来源的发展特点,有针对性地开展研究,更好地通过调控瘤胃微生物区系组成来改善瘤胃发酵,促进其健康和生产性能。

参考文献:

- [1] BRISKE D D, ZHAO M L, HAN G D, et al. Strategies to alleviate poverty and grassland degradation in Inner Mongolia: intensification vs production efficiency of livestock systems[J]. *Journal of Environmental Management*, 2015, 152: 177-182.
- [2] MIZRAHI I, JAMI E. Review: the compositional variation of the rumen microbiome and its effect on host performance and methane emission[J]. *Animal*, 2018, 12(Suppl.2): S220-S232.
- [3] HOLMAN D B, GZYL K E. A Meta-analysis of the bovine gastrointestinal tract microbiota[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2020, 95(6): 72.

- [4] WEIMER P J.Redundancy, resilience, and host specificity of the ruminal microbiota: implications for engineering improved ruminal fermentations[J].*Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 296.
- [5] CHANG J F, PENG S S, CIAIS P, et al.Revisiting enteric methane emissions from domestic ruminants and their $\delta^{13}\text{CCH}_4$ source signature[J].*Nature Communications*, 2019, 10: 3420.
- [6] JOHNSON K A, JOHNSON D E.Methane emissions from cattle[J].*Journal of Animal Science*, 1995, 73 (8): 2483–2492.
- [7] FONTY G, GOUET P, JOUANY J P, et al.Establishment of the microflora and anaerobic fungi in the rumen of lambs [J]. *Microbiology*, 1987, 133 (7): 1835–1843.
- [8] NAGA M A, AKKADA A A, EL-SHAZLY K.Establishment of rumen ciliate protozoa in cow and water buffalo (*Bos bubalus* L.) calves under late and early weaning systems[J].*Journal of Dairy Science*, 1969, 52(1) : 110–112.
- [9] YÁÑEZ-RUIZ D R, ABECIA L, NEWBOLD C J.Manipulating rumen microbiome and fermentation through interventions during early life: a review[J].*Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 1133.
- [10] O’ HARA E, KENNY D A, MCGOVERN E, et al.Investigating temporal microbial dynamics in the rumen of beef calves raised on two farms during early life [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2020, 96 (2): fiz203.
- [11] WILKINSON T J, HUWS S A, EDWARDS J E, et al.CowPI: a rumen microbiome focussed version of the PICRUSt functional inference software[J].*Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1095.
- [12] SESHADRI R, LEAHY S C, ATTWOOD G T, et al.Cultivation and sequencing of rumen microbiome members from the Hungate1000 collection[J].*Nature Biotechnology*, 2018, 36(4) : 359–367.
- [13] STEWART R D, AUFFRET M D, WARR A, et al.Compendium of 4, 941 rumen metagenome-assembled genomes for rumen microbiome biology and enzyme discovery[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37 (8): 953–961.
- [14] NEWBOLD C J, DE LA FUENTE G, BELANCHE A, et al.The role of ciliate protozoa in the rumen[J].*Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 1313.
- [15] MOON-VAN DER STAAY S Y, VAN DER STAAY G W M, MICHALOWSKI T, et al.The symbiotic intestinal ciliates and the evolution of their hosts[J].*European Journal of Protistology*, 2014, 50 (2): 166–173.
- [16] BÉRA-MAILLET C, DEVILLARD E, CEZETTE M, et al.Xylanases and carboxymethylcellulases of the rumen protozoa *Polyplastron multivesiculatum*, *Eudiplodinium maggii* and *Entodinium* sp. [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 244(1) : 149–156.
- [17] MORGAVI D P, FORANO E, MARTIN C, et al.Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants [J]. *Animal*, 2010, 4 (7): 1024–1036.
- [18] PARK T, WIJERATNE S, MEULIA T, et al.Draft macronuclear genome sequence of the ruminal ciliate *Entodinium caudatum*[J].*Microbiology Resource Announcements*, 2018, 7(1) : e00826–18.
- [19] HUWS S A, CREEVEY C J, OYAMA L B, et al.Addressing global ruminant agricultural challenges through understanding the rumen microbiome: past, present, and future [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2161.
- [20] EDWARDS J E, FORSTER R J, CALLAGHAN T M, et al.PCR and omics based techniques to study the diversity, ecology and biology of anaerobic fungi: insights, challenges and opportunities [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1657.
- [21] JANSSEN P H, KIRS M. Structure of the archaeal community of the rumen [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74 (12): 3619–3625.
- [22] DANIELSSON R, DICKSVED J, SUN L, et al.Methane production in dairy cows correlates with rumen methanogenic and bacterial community structure[J].*Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 226.
- [23] BELANCHE A, DE LA FUENTE G, NEWBOLD C J.Study of methanogen communities associated with different rumen protozoal populations [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2014, 90(3) : 663–677.
- [24] GILBERT R A, KLIEVE A V.Ruminal viruses (bacteriophages, archaeaphages) [M]//PUNIYA A, SINGH R, KAMRA D.Rumen microbiology: from evolution to revolution. New Delhi, India: Springer, 2015: 121–141.
- [25] GILBERT R A, KELLY W J, ALTERMANN E, et al.Toward understanding phage: host interactions in the rumen; complete genome sequences of lytic phages infecting rumen bacteria[J].*Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2340.
- [26] NAMONYO S, WAGACHA M, MAINA S, et al. A

- metagenomic study of the rumen virome in domestic caprids [J]. Archives of Virology, 2018, 163 (12) : 3415–3419.
- [27] ANDERSON C L, SULLIVAN M B, FERNANDO S C. Dietary energy drives the dynamic response of bovine rumen viral communities [J]. Microbiome, 2017, 5: 155.
- [28] HITCH T C A, EDWARDS J E, GILBERT R A. Metatranscriptomics reveals mycoviral populations in the ovine rumen [J]. FEMS Microbiology Letters, 2019, 366 (13) : fnz161.
- [29] LI B, ZHANG K, LI C, et al. Characterization and comparison of microbiota in the gastrointestinal tracts of the goat (*Capra hircus*) during preweaning development [J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2125.
- [30] CHIQUETTE J, ALLISON M J, RASMUSSEN M A. *Prevotella bryantii* 25A used as a probiotic in early-lactation dairy cows; effect on ruminal fermentation characteristics, milk production, and milk composition [J]. Journal of Dairy Science, 2008, 91 (9) : 3536–3543.
- [31] XIE X, YANG C L, GUAN L L, et al. Persistence of cellulolytic bacteria *Fibrobacter* and *Treponema* after short-term corn stover-based dietary intervention reveals the potential to improve rumen fibrolytic function [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1363.
- [32] FERNANDO S C, PURVIS II H T I, NAJAR F Z, et al. Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76 (22) : 7482–7490.
- [33] MALMUTHUGE N, GRIEBEL P J, GUAN L L. Taxonomic identification of commensal bacteria associated with the mucosa and digesta throughout the gastrointestinal tracts of preweaned calves [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80 (6) : 2021–2028.
- [34] JIAO J Z, HUANG J Y, ZHOU C S, et al. Taxonomic identification of ruminal epithelial bacterial diversity during rumen development in goats [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81 (10) : 3502–3509.
- [35] HAN X P, LIU H J, HU L Y, et al. Impact of sex and age on the bacterial composition in rumen of Tibetan sheep in Qinghai China [J]. Livestock Science, 2020, 238: 104030.
- [36] ZHOU M, PENG Y J, CHEN Y H, et al. Assessment of microbiome changes after rumen transfaunation; implications on improving feed efficiency in beef cattle [J]. Microbiome, 2018, 6: 62.
- [37] YU S B, ZHANG G Y, LIU Z B, et al. Repeated inoculation with fresh rumen fluid before or during weaning modulates the microbiota composition and co-occurrence of the rumen and colon of lambs [J]. BMC Microbiology, 2020, 20: 29.
- [38] YU S B, SHI W B, YANG B, et al. Effects of repeated oral inoculation of artificially fed lambs with lyophilized rumen fluid on growth performance, rumen fermentation, microbial population and organ development [J]. Animal Feed Science and Technology, 2020, 264: 114465.
- [39] MCCABE M S, CORMICAN P, KEOGH K, et al. Illumina MiSeq phylogenetic amplicon sequencing shows a large reduction of an uncharacterised *Succinivibrionaceae* and an increase of the *Methanobrevibacter gottschalkii* clade in feed restricted cattle [J]. PLoS One, 2015, 10 (7) : e0133234.
- [40] HENDERSON G, COX F, GANESH S, et al. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range [J]. Scientific Reports, 2015, 5: 14567.
- [41] 李永洙, 韩照清, 金太花, 等. 代乳粉对沂蒙黑山羊羔羊早期生长性能及其瘤胃微生物区系的影响 [J]. 动物营养学报, 2019, 31 (8) : 3600–3611.
- [42] ZHANG Q, LI C, NIU X L, et al. The effects of milk replacer allowance and weaning age on the performance, nutrients digestibility, and ruminal microbiota communities of lambs [J]. Animal Feed Science and Technology, 2019, 257: 114263.
- [43] WANG W M, LI C, LI F D, et al. Effects of early feeding on the host rumen transcriptome and bacterial diversity in lambs [J]. Scientific Reports, 2016, 6: 32479.
- [44] LV F, WANG X J, PANG X, et al. Effects of supplementary feeding on the rumen morphology and bacterial diversity in lambs [J]. PeerJ, 2020, 8 (8) : e9353.
- [45] LV X K, CHAI J M, DIAO Q Y, et al. The signature microbiota drive rumen function shifts in goat kids introduced to solid diet regimes [J]. Microorganisms, 2019, 7 (11) : 516.
- [46] DE FILIPPIS F, PASOLLI E, TETT A, et al. Distinct genetic and functional traits of human intestinal *Prevotella copri* strains are associated with different habitual diets [J]. Cell Host Microbes, 2019, 25 (3) : 444–453.e3.

- [47] HAAS K N, BLANCHARD J L. *Kineothrix alysoides*, gen. nov., sp. nov., a saccharolytic butyrate-producer within the family *Lachnospiraceae* [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2017, 67(2):402–410.
- [48] LIU J, BIAN G, SUN D, et al. Starter feeding altered ruminal epithelial bacterial communities and some key immune-related genes' expression before weaning in lambs [J]. *Journal of Animal Science*, 2017, 95(2):910–921.
- [49] DURANTI S, MILANI C, LUGLI G A, et al. Evaluation of genetic diversity among strains of the human gut commensal *Bifidobacterium adolescentis* [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6:23971.
- [50] LIN L M, XIE F, SUN D M, et al. Ruminal microbiome-host crosstalk stimulates the development of the ruminal epithelium in a lamb model [J]. *Microbiome*, 2019, 7:83.
- [51] CUI K, QI M L, WANG S Q, et al. Dietary energy and protein levels influenced the growth performance, ruminal morphology and fermentation and microbial diversity of lambs [J]. *Scientific Reports*, 2019, 9:16612.
- [52] WANG Y Y, CAO P H, WANG L, et al. Bacterial community diversity associated with different levels of dietary nutrition in the rumen of sheep [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(9):3717–3728.
- [53] KLEEN J L, HOOIJER G A, REHAGE J, et al. Subacute ruminal acidosis (SARA): a review [J]. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 2003, 50(8):406–414.
- [54] POURAZAD P, KHIAOSA-ARD R, QUMAR M, et al. Transient feeding of a concentrate-rich diet increases the severity of subacute ruminal acidosis in dairy cattle [J]. *Journal of Animal Science*, 2016, 94(2):726–738.
- [55] ZHANG R Y, LIU Y J, YIN Y Y, et al. Response of rumen microbiota, and metabolic profiles of rumen fluid, liver and serum of goats to high-grain diets [J]. *Animal*, 2019, 13(9):1855–1864.
- [56] BO TRABI E, SEDDIK H, XIE F, et al. Effect of pelleted high-grain total mixed ration on rumen morphology, epithelium-associated microbiota and gene expression of proinflammatory cytokines and tight junction proteins in Hu sheep [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2020, 263:114453.
- [57] SEDDIK H, XU L, WANG Y, et al. A rapid shift to high-grain diet results in dynamic changes in rumen epimural microbiome in sheep [J]. *Animal*, 2019, 13(8):1614–1622.
- [58] BRYANT M P. *Succinivibrio bergey's manual of systematic archaea and bacteria* [M]. [s. l.]: [s. n.], 2015.
- [59] ZHANG L, CHUNG J, JIANG Q Q, et al. Characteristics of rumen microorganisms involved in anaerobic degradation of cellulose at various pH values [J]. *RSC Advance*, 2017, 7(64):40303–40310.
- [60] PAILLARD D, MCKAIN N, CHAUDHARY L C, et al. Relation between phylogenetic position, lipid metabolism and butyrate production by different *Butyrivibrio*-like bacteria from the rumen [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2007, 91(4):417–422.
- [61] YANG B, LE J Q, WU P, et al. Alfalfa intervention alters rumen microbial community development in Hu lambs during early life [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9:574.
- [62] MU C T, DING N, HAO X Y, et al. Effects of different proportion of buckwheat straw and corn straw on performance, rumen fermentation and rumen microbiota composition of fattening lambs [J]. *Small Ruminant Research*, 2019, 181:21–28.
- [63] SEDLAK L, WOJNAR W, ZYCH M, et al. Effect of resveratrol, a dietary-derived polyphenol, on the oxidative stress and polyol pathway in the lens of rats with streptozotocin-induced diabetes [J]. *Nutrients*, 2018, 10(10):E1423.
- [64] MA T, CHEN D D, TU Y, et al. Effect of dietary supplementation with resveratrol on nutrient digestibility, methanogenesis and ruminal microbial flora in sheep [J]. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2015, 99(4):676–683.
- [65] MA T, CHEN D D, TU Y F, et al. Effect of supplementation of allicin on methanogenesis and ruminal microbial flora in Dorper crossbred ewes [J]. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2016, 7:1.
- [66] MA T, CHEN D D, TU Y, et al. Dietary supplementation with mulberry leaf flavonoids inhibits methanogenesis in sheep [J]. *Animal Science Journal*, 2017, 88(1):72–78.
- [67] LIU Y L, MA T, CHEN D D, et al. Effects of tea saponin supplementation on nutrient digestibility, methanogenesis, and ruminal microbial flora in dorper crossbred ewe [J]. *Animals*, 2019, 9(1):29.

- [68] MA T, WU W, TU Y, et al. Resveratrol affects *in vitro* rumen fermentation, methane production, prokaryotic community composition in a time- and diet-specific manner [J]. *Microbial Biotechnology*, 2020, 13 (4) : 1118–1131.
- [69] ZHANG R, ZHANG W B, BI Y L, et al. Sanguinarine and resveratrol affected rumen fermentation parameters and bacterial community in calves [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2019, 251 : 64–75.
- [70] JIA P, CUI K, MA T, et al. Influence of dietary supplementation with *Bacillus licheniformis* and *Saccharomyces cerevisiae* as alternatives to monensin on growth performance, antioxidant, immunity, ruminal fermentation and microbial diversity of fattening lambs [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8 : 16712.
- [71] LI Z P, MU C L, XU Y X, et al. Changes in the solid-, liquid-, and epithelium-associated bacterial communities in the rumen of *Hu* lambs in response to dietary urea supplementation [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11 : 244.
- [72] BI Y L, COX M S, ZHANG F, et al. Feeding modes shape the acquisition and structure of the initial gut microbiota in newborn lambs [J]. *Environmental Microbiology*, 2019, 21 (7) : 2333–2346.
- [73] 李娜, 张洁, 郭婷婷, 等. 基于内转录间隔区测序分析不同饲养方式对滩羊羔羊瘤胃真菌组成及多样性的影响 [J]. *动物营养学报*, 2020, 32 (2) : 784–794.

Research Advance in Establishment, Development and Regulation Technology of Rumen Microbiota in Lambs

MA Tao ZHANG Naifeng TU Yan DIAO Qiyu*

(Key Laboratory of Feed Biotechnology of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Feed Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: China has the world's largest sheep and goat flocks, which sum up to 300 million and produce approximately 4.85 million ton of meat by the end of 2019. The sheep/goat industry plays an important role in rural vitalization and development of people's living standard. There is close connection between early life and adult stage of ruminants, as the dietary or management interventions in early life imprint a desirable and persistent rumen microbial community, which has a long-lasting effect on improving ruminant production. In this review, we summarized the recent advance in the manipulation of rumen microbial community in lambs and goat kits in China, with a special focus on the effect of diets on rumen microbiota and fermentation capacity, and also highlight the specific areas of research in the future. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020, 32 (10) : 4733-4742]

Key words: lambs; rumen microbiota; host; diet; environment; regulation