

饲料非纤维性碳水化合物/中性洗涤纤维 对卡拉库尔羊营养物质消化和 瘤胃菌群结构的影响

普宣宣¹ 郭雪峰^{1,2*} 蒋辰宇¹ 刘俊峰^{1,2} 张秀萍^{1,2} 张苏江^{1,2}

(1.塔里木大学动物科学学院,阿拉尔 843300;2.新疆生产建设兵团塔里木畜牧科技重点实验室,阿拉尔 843300)

摘要: 本试验旨在研究饲料非纤维性碳水化合物/中性洗涤纤维(NFC/NDF)对卡拉库尔羊营养物质消化率和瘤胃菌群结构的影响。试验选取18月龄、体况良好、体重[(35.0±3.3) kg]相近、装有永久性瘤胃瘘管的卡拉库尔羊(去势公羊)12只,随机分为4组,每组3只,分别饲喂4种饲料,饲料NFC/NDF分别为0.54(1组)、0.96(2组)、1.37(3组)、1.90(4组)。试验分为4期,Ⅰ期(1~26 d)、Ⅱ期(27~52 d)、Ⅲ期(53~78 d)和Ⅳ期(79~104 d)。试验每期均为预试期15 d,正试期11 d,其中消化试验8 d,瘤胃内容物收取3 d。各期均测定营养物质表观消化率和瘤胃菌群结构。结果表明:1)4期试验中,3组和4组干物质(DM)表观消化率显著高于1组和2组($P<0.05$),有机物(OM)表观消化率除Ⅰ期3组和4组显著高于1组和2组($P<0.05$)外,其余3期组间差异均不显著($P>0.05$),NDF和酸性洗涤纤维(ADF)表观消化率均为3组最高,但组间差异不显著($P>0.05$)。2)4期试验中,2组瘤胃菌群结构均与1组、3组和4组差异较大,不同时期同组的菌群结构分布相对集中。纤维降解菌属、半纤维降解菌属和淀粉降解菌属的相对丰度分别在2组、3组和4组达到最高。由此可知,饲料NFC/NDF为1.37时,可提高营养物质消化率;NFC/NDF为0.96时,菌群结构改变较大,同组饲料菌群结构未随试验期数发生太大改变;4期试验中,纤维降解菌、半纤维降解菌和淀粉降解菌在属水平上的相对丰度分别在NFC/NDF为0.96、1.37和1.90时达到最高。

关键词: NFC/NDF;表观消化率;细菌;卡拉库尔羊

中图分类号:S826

文献标识码:A

文章编号:1006-267X(2020)01-0285-10

改善反刍动物瘤胃内的营养物质消化率从而提高饲料的利用效率和动物的生产性能是反刍动物营养学主要研究的问题^[1]。反刍动物瘤胃可发酵饲料中80%的淀粉、50%的纤维物质和60%的有机物等,进而为机体提供能量^[2],瘤胃发酵主要依靠瘤胃微生物(细菌、真菌、原虫和古生菌等^[3-5])相互作用进行的,瘤胃微生物是迄今为止已知的降解转化植物纤维素类物质效率最高的天

然体系^[6],它们相互协同作用,将纤维类物质快速降解转化为营养物质,进而生产出肉、奶等产品。因此,改善瘤胃微生物结构对反刍动物生长和生产具有重要意义。研究表明,饲料精粗比对营养物质消化率^[7-8]和微生物菌群结果^[9-10]具有一定影响。陈宁^[11]研究表明,饲料精粗比60:40时,干物质(DM)和中性洗涤纤维(NDF)降解率显著高于70:30和50:50组。魏德泳等^[12]研究表明,随

收稿日期:2019-07-09

基金项目:国家自然科学基金项目(31760680)

作者简介:普宣宣(1997—),女,河南周口人,硕士研究生,研究方向为动物营养与饲料科学。E-mail: 2924197349@qq.com

*通信作者:郭雪峰,副教授,硕士生导师,E-mail: gxfdky@126.com

着饲料非纤维性碳水化合物/中性洗涤纤维(NFC/NDF)的升高,瘤胃微生物总量降低,菌群结构发生改变。Song等^[13]研究表明,饲喂黑山羊高NFC/NDF饲料时,DM、NDF和酸性洗涤纤维(ADF)表观消化率显著升高,纤维降解菌中除产琥珀酸丝状杆菌(*Fibrobacter succinogenes*)相对丰度显著降低外,其他菌相对丰度均无显著变化。目前关于饲料NFC/NDF对卡拉库尔羊营养物质消化率和瘤胃细菌多样性的研究较少,而且瘤胃菌群非常复杂,很有可能会随时间的延长而再次发生改变化。因此,本试验旨在通过4期长期试验,研究饲料NFC/NDF对卡拉库尔羊瘤胃营养物

质消化率和菌群结构的影响,进而为提高营养物质消化率和改善菌群结构提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验饲料

试验根据《肉羊饲养标准》(NY/T 816—2004)^[14]设计4种饲料,原料均购买于阿克苏天康饲料股份有限公司,按照精粗比分别为37:63、50:50、60:40和63:37进行饲料配制,经常规养分分析后得到饲料NFC/NDF分别为0.54、0.96、1.37和1.90,饲料组成及营养水平见表1。

表1 饲料组成及营养水平(风干基础)

Table 1 Composition and nutrient levels of diets (air-dry basis)

%

项目 Items	非纤维性碳水化合物/中性洗涤纤维 NFC/NDF			
	0.54	0.96	1.37	1.90
原料 Ingredients				
玉米 Corn	20.00	35.40	45.00	54.00
豆粕 Soybean meal	2.00	2.00	2.00	2.00
麦麸 Wheat bran	12.70	10.30	10.70	4.70
氯化钠 NaCl	0.80	0.80	0.80	0.80
碳酸钙 CaCO ₃	0.50	0.50	0.50	0.50
预混料 Premix ¹⁾	1.00	1.00	1.00	1.00
棉籽壳 Cottonseed hulls	30.00	20.00	15.00	13.00
苜蓿颗粒 Alfalfa grain	33.00	30.00	25.00	24.00
合计 Total	100.00	100.00	100.00	100.00
营养水平 Nutrient levels ²⁾				
干物质 DM	95.54	95.74	96.30	95.55
总能 GE/(MJ/kg)	15.88	16.44	16.88	16.98
粗蛋白质 CP	14.76	14.96	14.10	13.43
粗脂肪 EE	2.08	2.11	2.33	2.58
粗灰分 Ash	8.85	7.62	6.86	6.35
钙 Ca	0.74	0.73	0.72	0.75
磷 P	0.26	0.25	0.24	0.22
非纤维性碳水化合物 NFC ³⁾	26.11	36.98	44.41	50.84
中性洗涤纤维 NDF	48.20	38.33	32.30	26.80
酸性洗涤纤维 ADF	31.75	28.73	23.80	21.41
非纤维性碳水化合物/中性洗涤纤维 NFC/NDF	0.54	0.96	1.37	1.90

1) 预混料为每千克饲料提供 The premix provided the following per kilogram of diets: VA 1 800 IU, VD₃ 600 IU, VE 30 mg, Fe 65 mg, Se 0.15 mg, I 0.6 mg, Cu 10 mg, Mn 28 mg, Zn 45 mg, Cu 12 mg。

2) 非纤维性碳水化合物为计算值,其余均为实测值。NFC was a calculated value, while the others were measured values.

3) 非纤维性碳水化合物(%)=(1-中性洗涤纤维-粗蛋白质-粗脂肪-粗灰分)×100。NFC(%)=(1-NDF-CP-EE-Ash)×100。

1.2 试验动物与饲养管理

试验在塔里木大学动科试验站进行。试验选取 18 月龄、体况良好、体重 $[(35.0 \pm 3.3) \text{ kg}]$ 相近、装有永久性瘤胃瘘管的卡拉库尔羊(去势公羊) 12 只, 随机分为 4 组(1~4 组), 每组 3 只, 单笼饲养于消化代谢笼中, 分别饲喂上述配制的 4 种 NFC/NDF 饲料。试验前驱虫, 每天 09:00 和 20:00 分 2 次定量饲喂, 自由饮水。

1.3 试验设计

试验分为 4 期, I 期(1~26 d)、II 期(27~52 d)、III 期(53~78 d) 和 IV 期(79~104 d)。试验每期均为预试期 15 d, 正试期 11 d, 其中消化试验 8 d, 采用全收粪法, 将 8 d 的粪样混合均匀后, 烘干称重后粉碎过 40 目网筛, 以备后续分析。试验正试期的第 9、10、11 天, 于晨饲前取 1 组 3 只羊的混合瘤胃液 50 mL, 迅速带回实验室, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻保存, 连取 3 d, 送至北京诺禾致源科技股份有限公司进行 16S rDNA 高通量测序。

1.4 测定指标及方法

饲料和粪便中 DM 含量参照 GB/T 6435—1986 的方法进行测定, 粗蛋白质(CP) 含量参照 GB/T 6432—1994 的方法进行测定, ADF 和 NDF 含量采用 Van Soest 等^[15]的方法进行测定, 并计算其表观消化率。粗灰分(Ash) 含量参照 GB/T 6438—1992 的方法进行测定, 饲料样品原重量减去 Ash 含量即为有机物(OM) 含量, 并计算 OM 表观消化率。饲料中钙(Ca)、磷(P) 含量参照 AOAC(2000)^[16]的方法测定, 饲料总能(GE) 利用氧弹式热量测定仪(C200, 广州仪科实验室技术有限公司) 进行测定。

DNA 提取和 PCR 扩增: 样品采用 Stool DNA 提取试剂盒(QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit) 进行瘤胃液总 DNA 提取, 步骤参照试剂盒说明。提取产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度和浓度。根据细菌 16S rDNA 基因 V1~V9 区, 合成带有 Barcode 的特异引物, 通用引物序列为 F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; R: 5'-GN-TACCTTGTTACGACTT-3'。引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。PCR 产物使用 2% 浓度的琼脂糖凝胶进行电泳检测。根据 PCR 产物浓度进行等量混样, 充分混匀后使用浓度 2% 的琼脂糖胶电泳纯化 PCR 产物, 剪切回收目标条带。产

物纯化使用的是 Qiagen 公司提供的胶回收试剂盒回收产物。

文库构建和上机测序: 将扩增好的 DNA 片段两端用 DNA 黏合酶连接, 用 AMPure PB 磁珠对 DNA 片段进行纯化选择, 进行 SMRT Bell 文库构建, 文库构建好后用 Qubit 浓度定量和检测是否合格, 最后用 PacBio 平台进行测序。

生物信息和统计分析: 用 Cutadapt^[17] 得到原始数据, 经去除嵌合体序列处理, 得到有效数据。以 97% 的一致性将序列聚类成为操作分类单元(OTUs), 利用 Uparse 软件^[18] 对所有样品的进行聚类, 然后进行物种注释, 采用 Mothur 方法与 SILVA^[19] 的 SSUrRNA 数据库^[20] 进行物种注释分析, 进而获得样本的群落组成。

细菌结构分析: 试验采用无度量多维标度法(non-metric multi-dimensional scaling, NMDS)^[21] 和 Beta Diversity 指数研究饲料 NFC/NDF 对瘤胃菌群结构的影响。无度量多维标度法为非线性模型, 适用于生态学研究, 克服了线性模型(包括 PCA、PCoA) 的缺点, 能更好地反映生态学数据^[22]。Beta Diversity 指数中用 Weighted Unifrac 距离衡量 2 个样品之间的相异系数, 其值越小, 表示 2 个样品物种多样性的差异越小, 两两样本间的距离以数字的形式标示出来制成热图。

1.5 数据统计分析

用 Excel 2003 对数据进行初步整理, SPSS 17.0 软件中单因素方差分析进行显著性检验, Duncan 氏法多重比较其差异性, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 饲料 NFC/NDF 对 DM、OM、NDF 和 ADF 表观消化率的影响

由表 2 可知, 4 期试验中, DM 和 OM 表观消化率均为: 3 组 > 4 组 > 2 组 > 1 组, 其中 3 组和 4 组 DM 表观消化率显著高于 1 组 ($P < 0.05$)。除 I 期 3 组和 4 组 OM 表观消化率显著高于 1 组和 2 组 ($P < 0.05$) 外, 其余 3 期组间差异均不显著 ($P > 0.05$)。4 期试验中, NDF 表观消化率均为: 3 组 > 2 组 > 4 组 > 1 组, 但组间差异均不显著 ($P > 0.05$), ADF 表观消化率为: 3 组 > 2 组 > 1 组 > 4 组, 组间差异也不显著 ($P > 0.05$)。

表2 饲粮 NFC/NDF 对营养物质表观消化率的影响

Table 2 Effects of dietary NFC/NDF on nutrient apparent digestibility

%

项目 Items	组别 Groups				SEM	P 值 P-value
	1	2	3	4		
I 期 Period I						
干物质 DM	56.12 ^c	63.15 ^b	70.76 ^a	70.24 ^a	1.85	0.008
有机物 OM	50.74 ^b	51.08 ^b	52.52 ^a	52.99 ^a	1.04	0.006
中性洗涤纤维 NDF	43.27	46.76	51.37	46.05	1.96	0.513
酸性洗涤纤维 ADF	35.22	35.77	38.64	36.74	2.97	0.970
II 期 Period II						
干物质 DM	56.87 ^b	63.68 ^{ab}	71.76 ^a	70.66 ^a	2.03	0.007
有机物 OM	50.11	51.38	52.79	52.53	0.51	0.233
中性洗涤纤维 NDF	43.97	46.07	51.49	45.07	2.11	0.702
酸性洗涤纤维 ADF	34.87	36.31	39.16	32.98	2.07	0.808
III 期 Period III						
干物质 DM	55.38 ^b	63.51 ^{ab}	71.05 ^a	70.23 ^a	2.26	0.017
有机物 OM	50.38	51.43	52.43	51.54	0.32	0.152
中性洗涤纤维 NDF	44.02	45.49	51.21	44.11	2.02	0.643
酸性洗涤纤维 ADF	35.28	37.95	39.33	36.26	1.81	0.751
IV 期 Period IV						
干物质 DM	55.47 ^b	63.34 ^{ab}	71.39 ^a	70.30 ^a	2.24	0.010
有机物 OM	50.24	51.26	52.62	52.33	0.37	0.062
中性洗涤纤维 NDF	42.20	44.94	52.36	43.75	2.06	0.345
酸性洗涤纤维 ADF	34.63	36.59	39.49	34.93	2.45	0.893

同行数据肩标不同字母表示差异不显著 ($P < 0.05$)。下表同。

In the same row, values with different letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$). The same as below.

2.2 饲粮 NFC/NDF 对瘤胃菌群结构的影响

NMDS 结果如图 1 所示,同期同组的 3 个样品除 IV 期 1 组外,均至少有 2 个样品在同一界限内,即同组样品菌落结构差异性不大。I ~ IV 期样品中,1 组均与 2 组、3 组、4 组距离相接近,2 组与 3 组、4 组距离较远,即同期试验内,2 组饲粮菌群结构变化较大。同组在不同期间的点分布也具有一定距离,但相对而言较为集中,即同组饲粮下菌群结构随试验期数的变化不大。

Beta Diversity 指数热图如图 2 所示, I 期 2 组与 1 组、3 组、4 组距离分别为 0.441、0.422、0.400, 1 组与 3 组、4 组距离分别为 0.121、0.195, 3 组与 4 组距离为 0.154; II 期 2 组与 1 组、3 组、4 组距离分别为 0.414、0.399、0.410, 1 组与 3 组、4 组距离分别为 0.113、0.313, 3 组与 4 组距离为 0.291; III 期 2 组与 1 组、3 组、4 组距离分别为 0.398、0.392、0.407, 1 组与 3 组、4 组距离分别为 0.222、0.183, 3 组与 4 组距离为 0.307; IV 期 2 组与 1 组、3 组、4 组距离分别为 0.495、0.488、0.479, 1 组与 3 组、4 组

距离分别为 0.089、0.413, 3 组与 4 组距离为 0.385, 由此可知同期内, 1 组与 3 组、4 组的距离较近, 2 组与 1 组、3 组、4 组距离较远, 即 NFC/NDF 为 0.96 时, 菌群变化较大, 这与 NMDS 分析结果基本相一致。

2.3 饲粮 NFC/NDF 对瘤胃纤维降解菌、半纤维降解菌和淀粉降解菌相对丰度(属水平)的影响

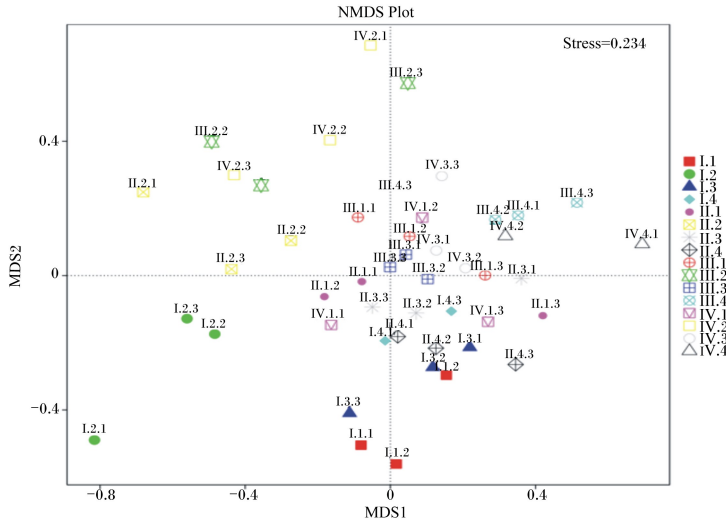
由表 3 可知, 试验中分离的纤维降解菌主要有纤维杆菌属 (*Fibrobacter*)、假丁酸弧菌属 (*Pseudobutyribrio*)、未定义的瘤胃球菌科 (unidentified-Ruminococcaceae) 和未定义的梭菌目 (unidentified-Clostridiales), 主要的半纤维降解菌有未定义的毛螺菌科 (unidentified-Lachnospiraceae) 和琥珀酸弧菌属 (*Succinivibrio*), 主要的淀粉降解菌有链球菌属 (*Streptococcus*) 和未定义的普雷沃氏菌科 (unidentified-Prevotellaceae)。

纤维降解菌: 4 期结果中未定义的瘤胃球菌科相对丰度 (0.10% ~ 1.60%) 均为最高, 其次为纤维杆菌属。4 期试验中纤维杆菌属、假丁酸弧菌属和

未定义的瘤胃球菌科的相对丰度均为 2 组最高, 未定义的梭菌目的相对丰度则为 3 组最高, 但组间差异均不显著 ($P>0.05$)。

半纤维降解菌: 半纤维降解菌中未定义的毛螺菌科的相对丰度最高, 为 0.01% ~ 16.70%, 4 期

试验中其相对丰度均在 3 组达到最高, 2 组最低, 但组间差异均不显著 ($P>0.05$)。琥珀酸弧菌属的相对丰度则较小, 各期均在 2 组达到最高, 其中 I 期 2 组相对丰度显著高于其他 3 组 ($P<0.05$), 其余各期组间差异均不显著 ($P>0.05$)。

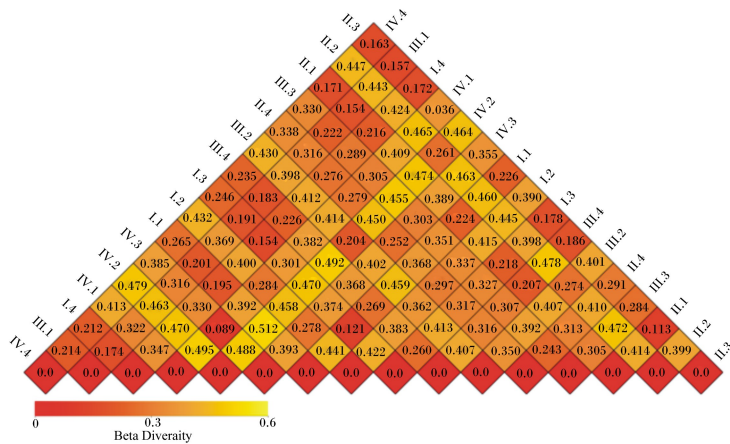


图中的每个点表示一个样品, 点与点之间的距离表示差异程度, 同一个组的样品使用同一种颜色表示。I、II、III 和 IV 分别代表试验期数。1、2、3 和 4 代表分别饲喂 4 组饲粮。图 2 同。

Each point in the figure represents a sample, and the distance between the points represents the degree of difference, and the samples in the same group are represented with the same color. I, II, III and IV represent experimental periods; 1, 2, 3, 4 mean four groups. The same as Fig.2.

图 1 NMDS 分析

Fig.1 Analysis of NMDS



图中方格中的数字是样品两两之间的相异系数, 相异系数越小的 2 个样品, 物种多样性的差异越小。

The digit in the square represents the dissimilarity coefficient between the two samples. The smaller the dissimilarity coefficient is, the smaller the difference in species diversity is.

图 2 Beta 多样性指数热图

Fig.2 Heat map of Beta diversity index

淀粉降解菌:未定义的普雷沃氏菌科的相对丰度在0~0.3%,4期试验中其相对丰度均在4组达到最高,I、II和IV期中4组的未定义的普雷沃氏菌科相对丰度均显著高于其他3组($P<0.05$)。链球菌属的相对丰度在0~2.5%,但在I期和III期

均未检测到,在II和IV期中4组链球菌属的相对丰度显著高于其他3组($P<0.05$)。

综上可知,瘤胃纤维降解菌、半纤维降解菌和淀粉降解菌的相对丰度分别在NFC/NDF为0.96、1.37和1.90时达到最高。

表3 饲料NFC/NDF对瘤胃纤维降解菌、半纤维降解菌和淀粉降解菌相对丰度(属水平)的影响

Table 3 Effects of dietary NFC/NDF on relative abundance of cellulose-degrading, semi-cellulose-degrading bacteria and starch-degrading bacteria (genus level) in rumen

项目 Items	组别 Groups				SEM	P 值 P-value
	1	2	3	4		
I 期 Period I						
纤维杆菌属 <i>Fibrobacter</i>	0.182	0.295	0.127	—	0.182	0.629
假丁酸弧菌属 <i>Pseudobutyrvibrio</i>	—	1.509	—	—		
未定义的瘤胃球菌科 Unidentified-Ruminococcaceae	0.329	1.454	0.330	0.110	0.218	0.114
未定义的梭菌目 Unidentified-Clostridiales	0.082	0.165	0.247	—	0.337	0.077
未定义的毛螺菌科 Unidentified-Lachnospiraceae	4.088	2.853	6.600	6.200	0.609	0.206
琥珀酸弧菌属 <i>Succinivibrio</i>	0.037 ^b	0.138 ^a	—	—	0.030	0.034
链球菌属 <i>Streptococcus</i>	—	—	—	—		
未定义的普雷沃氏菌科 Unidentified-Prevotellaceae	—	0.027 ^c	0.082 ^b	0.190 ^a	0.021	0.017
II 期 Period II						
纤维杆菌属 <i>Fibrobacter</i>	0.224	1.756	0.192	0.137	0.334	0.260
假丁酸弧菌属 <i>Pseudobutyrvibrio</i>	0.054	0.527	—	—	0.014	0.565
未定义的瘤胃球菌科 Unidentified-Ruminococcaceae	0.384	1.015	0.466	0.160	0.118	0.055
未定义的梭菌目 Unidentified-Clostridiales	0.055	0.065	0.137	0.050	0.026	0.552
未定义的毛螺菌科 Unidentified-Lachnospiraceae	6.036	2.930	10.970	7.320	1.800	0.523
琥珀酸弧菌属 <i>Succinivibrio</i>	—	0.055	—	—		
链球菌属 <i>Streptococcus</i>	—	—	—	0.250		
未定义的普雷沃氏菌科 Unidentified-Prevotellaceae	0.027 ^c	0.037 ^c	0.067 ^b	0.240 ^a	0.043	0.034
III 期 Period III						
纤维杆菌属 <i>Fibrobacter</i>	0.110	0.137	0.110	—	0.095	0.336
假丁酸弧菌属 <i>Pseudobutyrvibrio</i>	0.127	0.895	0.054	0.020	0.214	0.056
未定义的瘤胃球菌科 Unidentified-Ruminococcaceae	0.329	0.411	0.330	0.330	0.247	0.886
未定义的梭菌目 Unidentified-Clostridiales	0.027	0.038	0.078	0.020	0.011	0.345
未定义的毛螺菌科 Unidentified-Lachnospiraceae	7.760	1.860	10.530	4.960	1.142	0.053
琥珀酸弧菌属 <i>Succinivibrio</i>	0.027	0.055	—	—	0.050	0.501
链球菌属 <i>Streptococcus</i>	—	—	—	—		
未定义的普雷沃氏菌科 Unidentified-Prevotellaceae	0.025 ^c	0.047 ^c	0.082 ^b	0.220 ^a	0.025	0.010
IV 期 Period IV						
纤维杆菌属 <i>Fibrobacter</i>	0.521	0.619	0.127	—	0.108	0.332
假丁酸弧菌属 <i>Pseudobutyrvibrio</i>	0.189	0.356	0.109	—	0.018	0.052
未定义的瘤胃球菌科 Unidentified-Ruminococcaceae	0.360	0.494	0.364	0.302	0.091	0.926
未定义的梭菌目 Unidentified-Clostridiales	0.027	0.037	0.065	—	0.009	0.596
未定义的毛螺菌科 Unidentified-Lachnospiraceae	15.845	3.156	16.681	9.470	2.712	0.276
琥珀酸弧菌属 <i>Succinivibrio</i>	—	0.054	—	—	0.032	0.052
链球菌属 <i>Streptococcus</i>	—	—	0.027 ^b	2.330 ^a	0.481	0.006
未定义的普雷沃氏菌科 Unidentified-Prevotellaceae	0.055 ^c	0.082 ^c	0.127 ^b	0.270 ^a	0.046	0.003

“—”表示未检测到。“—” means not detected.

3 讨论

3.1 饲粮 NFC/NDF 对营养物质表观消化率的影响

NDF 对 DM 采食量和饲粮消化率具有重要影响^[23-24], NFC 也是影响采食量的重要因素, Hall 等^[24]报道指出 NFC 在瘤胃中降解速度很快。研究表明, 提高饲粮精粗比例时, 易消化碳水化合物含量增加, 营养物质消化率升高, 但超过一定比例时, 精料对瘤胃内饲粮的消化具有一定的负作用, 营养物质消化率有所下降^[25-26]。本试验 4 期试验结果中, 饲粮 DM 和 OM 表观消化率在 NFC/NDF 为 1.37 时, 达到最高, 超过 1.37 时, 则有所下降, NDF 和 ADF 表观消化率在 NFC/NDF 为 1.37 时, 达到最高, 0.96 组次之, 这与 Song 等^[13]试验结果相一致。而张雪娇等^[27]研究表明, 饲喂山羊 NDF 水平在 35%~45% 变化时, 高 NDF 组 NDF 表观消化率显著升高, DM 和 OM 表观消化率则差异不显著, 李斌昌等^[28]研究表明, 饲粮 DM 和 OM 表观消化率随精粗比增加无显著变化, NDF 和 ADF 表观消化率则显著下降, 这可能是由于试验动物、饲粮精粗水平不同等所导致的。

3.2 饲粮 NFC/NDF 对瘤胃菌群结构的影响

瘤胃细菌每克内容物数量能达到 $10^{10} \sim 10^{11}$ 个, 瘤胃细菌组成受饲粮影响较大^[29], 饲喂适宜的精料有提高瘤胃内细菌多样性的趋势。韩旭峰等^[4]研究表明, 不同精粗比饲粮可显著影响陕北白绒山羊瘤胃菌群组成, 由本试验结果可知, 饲粮 NFC/NDF 为 0.96 时与其他 3 组的菌群结构差异较大。

3.3 饲粮 NFC/NDF 对瘤胃纤维降解菌、半纤维降解菌及淀粉降解菌相对丰度(属水平)的影响

纤维降解菌: 瘤胃内的产琥珀酸拟杆菌(活性最强^[30])、黄色瘤胃球菌和白色瘤胃球菌被认为是 3 种主要的纤维分解细菌, 它们在瘤胃降解中起着重要的作用。林波等^[31]饲喂水牛不同精粗比的饲粮, 结果表明全粗料饲粮有提高瘤胃中纤维降解相关细菌比例的趋势, 但降低了细菌的多样性; Pitta 等^[32]研究表明, 饲喂水牛全粗料饲粮时, 瘤胃内瘤胃球菌属和黄杆菌门相对丰度较高。由本试验结果可知, 检测出的纤维降解菌属相对丰度较低, 这与 Zened 等^[33]试验结果相一致。Yang 等^[34]研究表明, 瘤胃中的黄色瘤胃球菌是白色瘤

胃球菌相对丰度的 100 倍, 但是在本研究中, 被检测到的黄色瘤胃球菌菌群的相对丰度几乎和白色瘤胃球菌相同, 这可能是由于物种差异、测序方法不同造成的。本试验纤维降解菌属相对丰度随饲粮 NFC/NDF 的升高, 呈先升高后降低, 其比例为 0.96 时, 纤维降解菌属的相对丰度达到最大, 这可能由于饲粮中精料添加超过一定水平时, 瘤胃发酵产生的挥发性脂肪酸(VFA)增多, 造成瘤胃 pH 降低, 瘤胃 pH 对纤维降解菌和纤维素酶活性具有一定影响, 孙云章等^[35]研究表明, 高精料引起瘤胃 pH 的急剧下降, 进而抑制纤维降解菌数量生长, Schwarz^[36]、Russell 等^[37]研究表明, pH 低于 6.0 时, 纤维素酶活性降低。因此需进一步研究饲粮 NFC/NDF 影响纤维物质消化时, 对两者影响的差异。

半纤维降解菌: 所有纤维降解菌均具有降解半纤维素的能力, 另外还有些具有降解半纤维素能力的菌如毛螺旋菌属、琥珀酸弧菌属等。本试验结果中未定义的毛螺菌科相对丰度随饲粮 NFC 的增高呈先增加后降低趋势, 各期均在 3 组达到最高, 这与饲粮 NFC/NDF 为 1.37 时, NDF 和 ADF 表观消化率达到最高相一致。

淀粉降解菌: 一些纤维降解菌也能降解淀粉, 如产琥珀酸丝状杆菌(*Fibrobacteria succinogenes*)、溶纤维丁酸弧菌(*Butyrivibrio fibrisolvens*)等, 主要能降解淀粉的非纤维降解菌属有链球菌属、未定义的普雷沃氏菌科和瘤胃杆菌属(*Ruminobacter*)等。许多研究表明, 普雷沃氏菌属(*Prevotella*)为瘤胃的优势菌群^[38-39], 由本试验检测到的淀粉降解菌属有链球菌属和未定义的普雷沃氏菌科, 它们的相对丰度均降低, 这可能是由于测序方法和测定区域不同所导致的。NFC 中淀粉含量是影响 DM 采食量和消化率的重要因素, 哺乳期奶牛添加谷物饲粮时, 奶牛 DM 采食量增加^[40]。淀粉降解则与瘤胃中淀粉降解菌紧密相关, 王尧悦等^[41]饲喂宁夏滩羊不同营养水平饲粮时, 发现随着饲粮营养水平的提高, 溶纤维丁酸弧菌、溶糊精琥珀酸弧菌、黄色瘤胃球菌和产甲烷菌数量显著上升。本试验研究结果显示淀粉降解菌属的相对丰度随着饲粮 NFC/NDF 的升高而提高, 这与上述结果相一致。Huo 等^[42]研究发现, 山羊采食干草后普雷沃氏菌属的相对丰度增加, 这可能是由于动物品种、饲粮成分和测序方式等不同造成的差异。

4 结 论

① 由营养物质表观消化率可知, 饲料 NFC/NDF 为 1.37 时营养物质消化率最高。

② 饲料 NFC/NDF 为 0.96 时, 瘤胃菌群结构变化较大。不同时期同组饲料下, 菌群结构分布相对集中。

③ 纤维降解菌、半纤维降解菌和淀粉降解菌在属水平上的相对丰度分别在 NFC/NDF 为 0.96、1.37 和 1.90 时达到最高。

参考文献:

[1] 柴巍中. 瘤胃发酵调控的理论、方法、研究现状及最新进展[J]. 草食家畜, 1994, (2): 37-43.

[2] 杨硕. 养殖方式和绒山羊类型对瘤胃产甲烷菌及相关微生物区系的影响[D]. 硕士学位论文. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018.

[3] ROSS E M, MOATE P J, BATH C R, et al. High throughput whole rumen metagenome profiling using untargeted massively parallel sequencing [J]. BMC Genetics, 2012, 13: 53.

[4] 韩旭峰. 日龄、日粮精粗比对陕北白绒山羊瘤胃微生物区系影响的研究[D]. 博士学位论文. 杨凌: 西北农林科技大学, 2015.

[5] 杨凤. 动物营养学[M]. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 1993.

[6] 刘开朗, 王加启, 卜登攀. 2008—2009 年反刍动物营养研究进展 I. 瘤胃微生物多样性与功能[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(2): 5-14.

[7] 王加启, 冯仰廉. 日粮精粗比对瘤胃微生物合成效率的影响[J]. 畜牧兽医学报, 1995, 26(4): 301-307.

[8] 刘清清. 日粮精粗比对绵羊消化和瘤胃消化代谢的影响[D]. 硕士学位论文. 晋中: 山西农业大学, 2014.

[9] KUMAR S, INDUGU N, VECCHIARELLI B, et al. Associative patterns among anaerobic fungi, methanogenic archaea, and bacterial communities in response to changes in diet and age in the rumen of dairy cows [J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 781.

[10] HAN X F, YANG Y X, YAN H L, et al. Rumen bacterial diversity of 80 to 110-day-old goats using 16S rRNA sequencing [J]. PLoS One, 2015, 10(2): e0117811.

[11] 陈宁. 日粮精粗比对断奶初期犊牛瘤胃内环境及粗饲料降解的影响[D]. 硕士学位论文. 重庆: 西南大学, 2006.

[12] 魏德泳, 朱伟云, 毛胜勇. 日粮不同 NFC/NDF 比对

山羊瘤胃发酵与瘤胃微生物区系结构的影响[J]. 中国农业科学, 2012, 45(7): 1392-1398.

[13] SONG S D, CHEN G J, GUO C H, et al. Effects of exogenous fibrolytic enzyme supplementation to diets with different NFC/NDF ratios on the growth performance, nutrient digestibility and ruminal fermentation in Chinese domesticated black goats [J]. Animal Feed Science and Technology, 2018, 236: 170-177.

[14] 中华人民共和国农业行业标准—肉羊饲养标准 (NY/T 816—2004) [J]. 湖南饲料, 2006(6): 9-15.

[15] VAN SOEST P J, ROBERTSON J B, LEWIS B A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition [J]. Journal of Dairy Science, 1991, 74(10): 3583-3597.

[16] AOAC. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists [S]: 17th ed. Arlington: AOAC, 2000.

[17] QIN J J, LI Y R, CAI Z M, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes [J]. Nature, 2012, 490(7418): 55-60.

[18] ROGNES T, FLOURI T, NICHOLS B, et al. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics [J]. PeerJ, 2016, 4: e2584.

[19] HAAS B J, GEVERS D, EARL A M, et al. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons [J]. Genome Research, 2011, 21(3): 494-504.

[20] EDGAR R C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads [J]. Nature Methods, 2013, 10(10): 996-998.

[21] KRUSKAL J B. Nonmetric multidimensional scaling: a numerical method [J]. Psychometrika, 1964, 29(2): 115-129.

[22] WARTON D I, WRIGHT S T, WANG Y. Distance-based multivariate analyses confound location and dispersion effects [J]. Methods in Ecology and Evolution, 2012, 3(1): 89-101.

[23] BOWMAN J G P, SOWELL B F, SURBER L M M, et al. Nonstructural carbohydrate supplementation of yearling heifers and range beef cows [J]. Journal of Animal Science, 2004, 82(9): 2724-2733.

[24] HALL M B. Challenges with nonfiber carbohydrate methods [J]. Journal of Animal Science, 2003, 81(12): 3226-3232.

[25] 魏全意, 吴金龙, 丁永忠, 等. 预混料及不同精料给量对舍饲小尾寒羊育肥效果的研究 [J]. 饲料研究,

- 2003(1):5-7.
- [26] 王志有,侯生珍,范永涛.日粮精粗比对藏羔羊增重的影响[J].中国畜牧兽医,2011,38(7):233-235.
- [27] 张雪娇,王立志,王之盛,等.饲粮 NDF 水平对山羊营养物质表观消化率及瘤胃古菌结构与组成的影响研究[J].四川农业大学学报,2018,36(4):542-548.
- [28] 李斌昌,董利锋,王贝,等.日粮不同精粗比对 9 月龄后备奶牛甲烷排放与生长性能及营养物质消化率的影响[J].饲料工业,2019,40(11):12-18.
- [29] DEHORITY B A, ORPIN C G. Development of, and natural fluctuations in, rumen microbial populations [M]//HOBSON P N, STEWART C S. The rumen microbial ecosystem. Dordrecht: Springer, 1997: 196-245.
- [30] SATOSHI K, YASUO K. Fibrolytic rumen bacteria: their ecology and functions [J]. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2009, 22(1):131-138.
- [31] 林波,梁辛,李丽莉,等.饲粮精粗比对泌乳水牛瘤胃细菌和甲烷菌区系的影响[J].动物营养学报,2016,28(10):3101-3109.
- [32] PITTA D W, KUMAR S, VEICCHARELLI B, et al. Bacterial diversity associated with feeding dry forage at different dietary concentrations in the rumen contents of Mehshana buffalo (*Bubalus bubalis*) using 16S pyrotags[J]. Anaerobe, 2014, 25:31-41.
- [33] ZENED A, COMBES S, CAUQUIL L, et al. Microbial ecology of the rumen evaluated by 454 GS FLX pyrosequencing is affected by starch and oil supplementation of diets[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2012, 83(2):504-514.
- [34] YANG S L, BU D P, WANG J Q, et al. Soybean oil and linseed oil supplementation affect profiles of Ruminant microorganisms in dairy cows [J]. Animal, 2009, 3(11):1562-1569, doi: 10.1017/S1751731109990462.
- [35] 孙云章,毛胜勇,姚文,等.不同精粗比底物下瘤胃真菌和纤维降解细菌共培养发酵特性及菌群变化[J].微生物学报,2006,46(3):422-426.
- [36] SCHWARZ W. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001, 56(5/6):634-649.
- [37] RUSSEL J B, WILSON D B. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? [J]. Journal of Dairy Science, 1996, 79(8):1503-1509.
- [38] 郭婷婷,胡丹丹,付子琳,等.基于 16S rDNA 高通量测序分析技术研究甘露寡糖对奶牛瘤胃菌群结构的影响[J].动物营养学报,2018,30(10):4048-4058.
- [39] 李岚捷,成述儒,刁其玉,等.不同 NFC/NDF 水平饲粮对犊牛瘤胃发酵参数和微生物区系多样性的影响[J].畜牧兽医学报,2017,48(12):2347-2357.
- [40] OBA M, ALLEN M S. Evaluation of the importance of the digestibility of neutral detergent fiber from forage: effects on dry matter intake and milk yield of dairy cows [J]. Journal of Dairy Science, 1999, 82(3):589-596.
- [41] 王尧悦,赵钊艳,王兴涛,等.日粮营养水平对 150~180 日龄滩羊瘤胃相关微生物菌群数量、pH 和 VFA 含量的影响[J].畜牧兽医学报,2016,47(10):2060-2070.
- [42] HUO W J, ZHU W Y, MAO S Y. Impact of subacute ruminal acidosis on the diversity of liquid and solid-associated bacteria in the rumen of goats [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2014, 30(2):669-680.

Effects of Dietary Non-Fiber Carbohydrate/Neutral Detergent Fiber on Nutrient Digestion and Rumen Bacterial Structure of Karakul Sheep

PU Xuanxuan¹ GUO Xuefeng^{1,2*} JIANG Chenyu¹ LIU Junfeng^{1,2}
ZHANG Xiuping^{1,2} ZHANG Sujiang^{1,2}

(1. College of Animal Science, Tarim University, Alar 843300, China; 2. Key Laboratory of Tarim Animal Husbandry Science and Technology, Alar 843300, China)

Abstract: The aim of the experiment was to investigate effects of dietary non-fiber carbohydrate/neutral detergent fiber (NFC/NDF) on nutrient digestibility, bacterial structure of Karakul sheep. Twelve 18-month-old Karakul sheep with healthy condition, similar weight [(35.0 ± 3.3) kg] and permanent fistula were randomly divided into four groups, each group with three replicates. They were fed four diets with different NFC/NDF at 0.54 (group 1), 0.96 (group 2), 1.37 (group 3) and 1.90 (group 4), respectively. The experiment was designed for four periods, periods I (1 to 26 d), II (27 to 52 d), III (53 to 78 d) and IV (79 to 104 d). During each period, the first 15 days was used for adaption, and the trial period was 11 days including 8 days for digestion test, and 3 days for rumen digesta collection. The apparent digestibility of nutrients and structure of bacteria were measured for four periods. Results showed as follows: 1) through four periods, the apparent digestibility of dry matter (DM) in groups 3 and 4 was significantly higher than that in groups 1 and 2 ($P < 0.05$), the apparent digestibility of organic matter (OM) in groups 3 and 4 was significantly higher than that in groups 1 and 2 ($P < 0.05$) in period I, while the difference among groups was not significant in other periods ($P > 0.05$), and the apparent digestibility of NDF and acid detergent fiber (ADF) in group 3 was the highest but the difference was not significant ($P > 0.05$). 2) Through four periods, the difference of bacterial structure between groups 2 and 1, 3, 4 was larger, and the distribution of bacteria structure was relatively concentrated in the same diet under different periods. The relative abundance of cellulose-degrading bacteria, semi-cellulose-degrading bacteria and starch-degrading bacteria genus reached the highest in groups 2, 3 and 4, respectively. In conclusion, the digestibility of nutrients is improved when dietary NFC/NDF is 1.37; the bacteria structure changes largely when dietary NFC/NDF is 0.96 and the structure of rumen bacteria in the same group does not change much with the prolong of experimental periods; through four periods, the relative abundance of cellulose-degrading bacteria, semi-cellulose-degrading bacteria and starch-degrading bacteria at genus level is the highest when NFC/NDF are 0.96, 1.37 and 1.90, respectively. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020, 32(1):285-294]

Key words: NFC/NDF; apparent digestibility; bacteria; Karakul sheep