

不同精粗比饲料条件下奶牛瘤胃细菌 菌群结构变化的研究

徐晓锋 胡丹丹 郭婷婷 张力莉

(宁夏大学农学院,银川 750021)

摘要: 本研究旨在揭示不同精粗比饲料条件下奶牛瘤胃细菌菌群结构的变化。选择 24 头健康、体重相近、胎次相同、产后 3 周左右的中国荷斯坦奶牛,随机分为 2 组(每组 12 头),分别饲喂高精粗比饲料(60:40, HC 组)和低精粗比饲料(40:60, LC 组),试验期为 45 d。运用 16S rDNA 高通量测序技术对奶牛瘤胃细菌菌群结构变化进行分析。结果表明:1) HC 组奶牛瘤胃液丙酸比例极显著高于 LC 组($P < 0.01$), 乙酸/丙酸极显著低于 LC 组($P < 0.01$)。2) HC 组奶牛瘤胃细菌操作分类单元数量极显著低于 LC 组($P < 0.01$)。3) LC 组的 Ace 指数、Chao1 指数显著高于 HC 组($P < 0.05$), Shannon 指数、Simpson 指数极显著高于 HC 组($P < 0.01$)。4) LC 组奶牛瘤胃中拟杆菌门、厚壁菌门、纤维杆菌门、疣微菌门、SR1、软壁菌门、TM7、黏胶球形菌门、迷踪菌门丰度极显著高于 HC 组($P < 0.01$), HC 组奶牛瘤胃中变形菌门、螺旋菌门丰度极显著高于 LC 组($P < 0.01$)。5) LC 组奶牛瘤胃中纤维杆菌属、瘤胃球菌属、琥珀酸菌属、甲烷短杆菌属、BF311 丰度极显著高于 HC 组($P < 0.01$), 丁酸弧菌属丰度显著高于 HC 组($P < 0.05$); HC 组奶牛瘤胃中密螺旋菌属、粪球菌属、Shuttleworthia 丰度极显著高于 LC 组($P < 0.01$), vadinCA11 丰度显著高于 LC 组($P < 0.05$)。由此可见,饲料精粗比显著影响了奶牛瘤胃中细菌总数和多样性。高精粗比饲料条件下,瘤胃中纤维降解菌的生长受到抑制,促进了瘤胃中产酸菌的增殖,从而改变了瘤胃发酵模式。

关键词: 精粗比;奶牛;瘤胃;细菌菌群

中图分类号: S823

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2019)12-5541-10

奶牛瘤胃是一个复杂的微生态系统,里面栖息着厌氧真菌、细菌和原虫,这些复杂的微生物之间通过相互作用、相互协调共同完成对饲料的降解与发酵,除此之外,这些菌群还能够在免疫反应和整体的健康水平方面发挥着重要的调节作用^[1]。据有关报道,瘤胃中这 3 种主要的微生物还存在数量上的差异,其中真菌的数量低于细菌和原生动物(包括原虫在内),数量最多的是细菌,因此细菌在瘤胃中发挥着主要的作用^[2-4]。大量研究表明,瘤胃微生物的多样性及组成结构处于

一个动态的平衡中,这种动态的变化主要受饲料结构的影响^[5-6]。当饲喂高精料饲料时,瘤胃中降解淀粉和产酸菌属会显著增加,提高饲料中淀粉的降解速率,生成大量乳酸和挥发性脂肪酸(VFA),导致瘤胃 pH 下降,长期低 pH 会导致奶牛患亚急性瘤胃酸中毒的概率增加^[7],改变奶牛瘤胃微生态,影响瘤胃发酵功能,降低奶牛对饲料的利用和转化,降低生产性能^[8]。饲料能够改变瘤胃微生物区系,使得瘤胃发酵模式发生改变,进而影响奶牛生产性能与健康。因此,本研究旨在

收稿日期:2019-05-23

基金项目:国家自然科学基金资助项目——寡糖对奶牛瘤胃纤维降解影响机制及乳脂下降综合征调控的研究(31460619)

作者简介:徐晓锋(1978-),男,蒙古族,内蒙古突泉人,副教授,博士,从事奶牛瘤胃发酵与乳脂合成调控的研究。E-mail: xuxiaofengnd@126.com

通过 16S rDNA 高通量测序的方法,研究不同精粗比饲料条件下奶牛瘤胃细菌多样性及菌群结构的差异。

1 材料与方法

1.1 试验动物与设计

试验采用单因子完全随机试验设计,将 24 头体重相近,健康状态良好、胎次相同、产后 3 周左右的中国荷斯坦奶牛随机分为 2 组(每组 12 头),分别饲喂高精粗比饲料(60:40,HC 组)和低精粗比饲料(40:60,LC 组),试验期为 45 d。根据 NRC (2001) 奶牛饲养标准配制饲料,饲料组成及营养水平见表 1,采用 AOAC (1990)^[9] 的方法测定粗蛋白质含量,采用 Van Soest 等^[10] 的方法测定中性洗涤纤维含量,采用乙二胺四乙酸络合快速滴定法(GB/T 6436—2002)测定钙含量,采用钼黄显色光度法(GB/T 6437—2002)测定磷含量。采用全混合日粮(TMR)饲喂方式,自由饮水。

1.2 试验样品采集与处理

晨饲后 2 h,通过奶牛的口腔采集瘤胃液,4 层纱布过滤并分装至 5 mL 离心管中,置于-80 °C 冻存储备用。瘤胃液氨态氮含量的测定参考冯宗慈等^[11] 的方法,瘤胃液 VFA 含量的测定采用曹庆云等^[12] 的方法。将过滤后的瘤胃液以 10 000×g 离心 10 min;取离心后的瘤胃液 1 mL,加入现配 25% 的偏磷酸溶液 200 μL,再以 10 000×g 离心 10 min,然后使用气相色谱仪(GC-2020,武汉恒信世纪科技)测定瘤胃液 VFA 含量。

1.3 试验样品的 DNA 提取

利用 AxyPrep Bacterial Genomic DNA Mini-prep Kit 试剂盒(南京建成生物工程研究所)提取试验样品 DNA。

1.4 PCR 扩增引物

细菌 16S rDNA 序列的 V3+V4 区引物序列如下:上游引物 341F,5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3';下游引物 806R,5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3'。

1.5 测序

用带有条形码(barcode)的特异引物扩增 16S rDNA 序列的 V3+V4 区,将扩增的 PCR 产物切胶回收,用 QuantiFluorTM 荧光计进行定量,将纯化的扩增产物进行等量混合,连接测序接头,用 PCR Free 进行构建文库,最终在 Illumina PE250 上机测序。

表 1 饲料组成及营养水平(干物质基础)

Table 1 Composition and nutrient levels of diets (DM basis)

项目 Items	组别 Groups	
	LC	HC
原料 Ingredients		
精料补充料 Concentrate supplement ¹⁾	22.500	23.300
压片玉米 Tablet corn	13.840	26.550
甜菜颗粒 Beet granules	2.000	4.500
啤酒糟 Beer slack	1.530	5.000
苜蓿青贮 Alfalfa silage	4.120	2.000
苜蓿干草 Alfalfa hay	10.320	3.020
全株玉米青贮 Whole corn silage	45.060	35.000
脂肪酸钙 Fatty acid calcium	0.090	0.090
棕榈脂肪粉 Palm fat powder	0.180	0.180
小苏打 NaHCO ₃	0.166	0.166
百霉清 Mycofix plus ²⁾	0.014	0.014
益康 XP Yikang XP ³⁾	0.135	0.135
尿素 Urea	0.045	0.045
合计 Total	100.000	100.000
营养水平 Nutrient levels ⁴⁾		
粗蛋白质 CP	17.42	17.50
产奶净能 NE _L /(MJ/kg)	5.94	6.48
钙 Ca	0.76	0.71
磷 P	0.40	0.44
中性洗涤纤维 NDF	35.65	31.20

¹⁾精料补充料主要原料:豆粕、棉籽粕、石粉、氯化钠、维生素 A、维生素 D₃、硫酸铜、硫酸锰、硫酸锌。产品主要成分保证值:粗蛋白质≥20%,赖氨酸≥0.3%,钙 0.5%~2.0%,总磷≥0.3%,氯化钠 0.5%~2.0%,粗纤维≤15%,粗灰分≤15%,水分≤14%。The major materials of concentrate supplement: soybean meal, stone powder, NaCl, VA, VD₃, CuSO₄, MnSO₄, ZnSO₄. Guarantee values of major components of product: CP ≥ 20%, Lys ≥ 0.3%, Ca 0.5% to 2.0%, TP ≥ 0.3%, NaCl 0.5% to 2.0%, CF ≤ 15%, ash ≤ 15%, moisture ≤ 14%.

²⁾百霉清为霉菌毒素脱毒剂,主要由菊苣、海藻酸钠、硅藻土、黏土组成。Mycofix plus was a mycotoxin purification agent, which was mainly composed of chicory, sodium alginate, diatomite and clay.

³⁾益康 XP 为酵母培养物产品,主要成分为酵母培养物。Yikang XP was a yeast culture product, and the main component was yeast culture.

⁴⁾产奶净能为计算值,其他营养水平为实测值。NE_L was a calculated value, while other nutrient levels were measured values.

1.6 序列分析

样品经 16S rDNA 测序得到的 PE reads 通过 Overlap 关系进行拼接得到 Tags 序列,为了更好地获得样品物种的多样性信息,首先对序列进行质控和过滤,将得到的平均优质序列按照 $>0.97\%$ 的相似度计算操作分类单元(OTU)数量,然后对 OTU 聚类、物种分类学、多样性指数、群落结构进行统计分析。

1.7 数据处理

对组间的 OTU 数量、alpha 多样性指标及 Raw Tags、Clean Tags 数量先用 Excel 2003 进行数据预处理,然后利用 SAS 8.2 中完全随机的方差分析,

并采用 LSD 法进行差异显著性比较, $P<0.05$ 为差异显著, $P<0.01$ 为差异极显著, $0.05\leq P<0.10$ 为趋势显著。

2 结果与分析

2.1 不同精粗比饲料对奶牛瘤胃发酵参数的影响

由表 2 可知,2 组奶牛瘤胃液总挥发性脂肪酸(TVFA)含量、乙酸比例均差异不显著($P>0.05$)。HC 组奶牛瘤胃液丙酸比例极显著高于 LC 组($P<0.01$),乙酸/丙酸极显著低于 LC 组($P<0.01$)。与 LC 组相比,HC 组奶牛瘤胃液氨态氮含量有增加的趋势($P=0.052$)。

表 2 不同精粗比饲料对奶牛瘤胃发酵参数的影响

Table 2 Effects of different concentrate to roughage ratio diets on rumen fermentation parameters of dairy cows

项目 Items	组别 Groups		P 值 P-value
	LC	HC	
总挥发性脂肪酸 TVFA/(mmol/L)	71.07±5.19	71.38±6.31	0.898
乙酸 Acetic acid/%	79.73±0.85	73.77±0.94	0.083
丙酸 Propionic acid/%	9.37±1.22 ^A	15.35±1.53 ^B	0.004
丁酸 Butyric acid/%	10.85±0.84	10.52±0.72	0.943
乙酸/丙酸 Acetic acid/propionic acid	8.68±1.35 ^B	4.91±0.99 ^A	0.008
氨态氮 NH ₃ -N/(mg/dL)	11.16±1.53	18.99±2.12	0.052

同行数据肩标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$),无字母表示差异不显著($P>0.05$)。下表同。

In the same row, values with different small letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$), and with different capital letter superscripts mean significant difference ($P<0.01$), while with no letter superscripts mean no significant difference ($P>0.05$). The same as below.

2.2 瘤胃细菌 OTU 聚类

利用 Mothur v.1.34.0 计算 0.03 距离下(97%

的相似度)的 OTU 数量,由表 3 可知,HC 组奶牛瘤胃细菌 OUT 数量极显著低于 LC 组($P<0.01$)。

表 3 瘤胃细菌 OTU 数量

Table 3 OTU number of rumen bacteria

项目 Item	组别 Groups		P 值 P-value
	HC	LC	
OTU 数量 OTU number	7 710±947 ^A	9 476±543 ^B	0.001

2.3 瘤胃细菌菌群多样性的变化

2.3.1 alpha 多样性分析

Ace 指数、Chao1 指数代表菌群丰富度,指数越大表明物种总数越多;Shannon 指数、Simpson 指数代表菌群多样性,指数越大表明物种多样性越

高,各物种分配越均匀,而 Simpson 指数代表不同物种的概率,概率越接近于 1,表明物种多样性越高。由表 4 可知,LC 组的 Ace 指数、Chao1 指数显著高于 HC 组($P<0.05$),Shannon 指数、Simpson 指数极显著高于 HC 组($P<0.01$)。

表 4 alpha 多样性指数
Table 4 Diversity index of alpha

项目 Items	组别 Groups		P 值 P-value
	HC	LC	
Ace 指数 Ace index	37 831.68±6 111.35 ^a	44 410.22±5 544.36 ^b	0.02
Chao1 指数 Chao1 index	38 994.92±7 054.58 ^a	46 524.76±4 816.84 ^b	0.01
Shannon 指数 Shannon index	8.36±0.72 ^A	10.80±0.13 ^B	<0.01
Simpson 指数 Simpson index	0.89±0.04 ^A	1.00±0.01 ^B	<0.01

2.3.2 beta 多样性分析

主坐标分析 (PCoA) 是通过考虑进化关系, 将进化结构中聚类相近的物种结合在一起, 反映的是样品间的差异, 选取贡献率最大的第一主成分和第二主成分进行作图展示, 群落结构相似度高

的样品倾向于聚集在一起, 群落差异很大的样品则会距离较远。由图 1 可知, 在第一主成分 (贡献率为 85.9%) 时, HC 组和 LC 组之间分布距离较远, 组间的细菌多样性差异较大, HC 组奶牛瘤胃样品细菌群落差异要小于 LC 组。

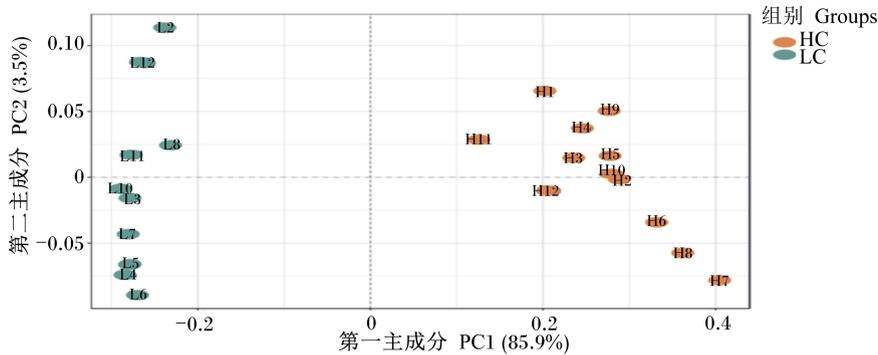


图 1 细菌区系 PCoA 图

Fig.1 PCoA picture of bacterial district

2.4 奶牛瘤胃细菌菌群结构的变化

2.4.1 门水平

本研究结果共涉及 33 种细菌门, 表 5 仅列出了丰度较高的 16 个门。由表 5 可知, LC 组奶牛瘤胃中拟杆菌门、厚壁菌门、纤维杆菌门、疣微菌

门、SR1、软壁菌门、TM7、黏胶球形菌门、迷踪菌门丰度极显著高于 HC 组 ($P < 0.01$), HC 组奶牛瘤胃中变形菌门、螺旋菌门丰度极显著高于 LC 组 ($P < 0.01$); 与 LC 组相比, HC 组广古菌门丰度有降低的趋势 ($P = 0.07$)。

表 5 细菌门水平丰度
Table 5 Bacterial abundances at phylum level

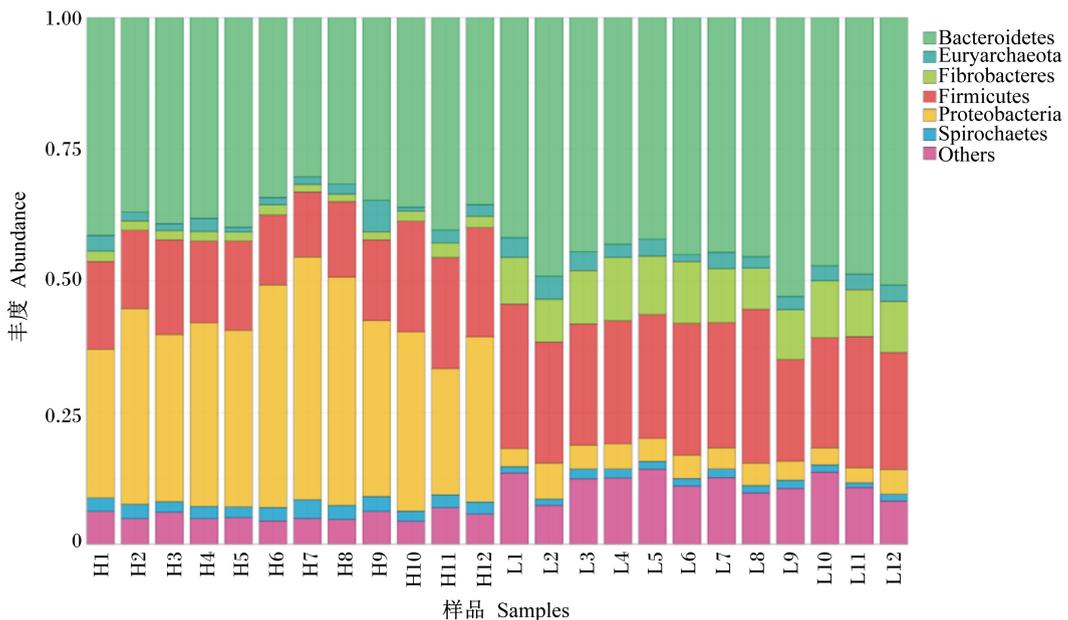
门水平 Phylum levels	组别 Groups		P 值 P-value
	LC	HC	
拟杆菌门 Bacteroidetes	23.15 ^B	18.27 ^A	<0.01
厚壁菌门 Firmicutes	11.89 ^B	8.34 ^A	<0.01
纤维杆菌门 Fibrobacteres	4.95 ^B	0.93 ^A	<0.01
变形菌门 Proteobacteria	2.12 ^A	17.49 ^B	<0.01
广古菌门 Euryarchaeota	1.48	1.06	0.07
螺旋菌门 Spirochaetes	0.73 ^A	1.25 ^B	<0.01
疣微菌门 Verrucomicrobia	0.57 ^B	0.05 ^A	<0.01

续表 5

门水平 Phylum levels	组别 Groups		P 值 P-value
	LC	HC	
SR1	0.44 ^B	0.23 ^A	<0.01
软壁菌门 Tenericutes	0.44 ^B	0.29 ^A	<0.01
蓝藻门 Cyanobacteria	0.33	0.29	0.26
TM7	0.27 ^B	0.16 ^A	<0.01
黏胶球形菌门 Lentisphaerae	0.12 ^B	0.01 ^A	<0.01
放线菌门 Actinobacteria	0.16	0.12	0.50
迷踪菌门 Elusimicrobia	0.08 ^B	0.03 ^A	<0.01

利用 Metastats 分析比较 2 组之间菌门差异, 由图 2 可知, LC 组奶牛瘤胃中纤维杆菌门、厚壁

菌门和拟杆菌门丰度较 HC 组明显增加, 而 HC 组奶牛瘤胃中变形菌门丰度较 LC 组明显增加。



H1~H12 代表 HC 组的 12 个样品, L1~L12 代表 LC 组的 12 个样品。下图同。H1 to H12 represent 12 samples in HC group, L1 to L12 represent 12 samples in LC group. The same as below.

Bacteroidetes 拟杆菌门; Euryarchaeota 广古菌门; Fibrobacteres 纤维杆菌门; Firmicutes 厚壁菌门; Proteobacteria 变形菌门; Spirochaetes 螺旋菌门; Others 其他。

图 2 细菌门水平堆叠图

Fig.2 Stack diagram in bacterial phylum level

2.4.2 属水平

本研究结果共涉及 206 个细菌属, 表 6 仅列出了丰度较高的 16 个属。由表 6 可知, LC 组奶牛瘤胃中纤维杆菌属、瘤胃球菌属、琥珀酸菌属、甲烷短杆菌属、BF311 丰度极显著高于 HC 组 ($P < 0.01$), 丁酸弧菌属丰度显著高于 HC 组 ($P <$

0.05); HC 组奶牛瘤胃中密螺旋菌属、粪球菌属、*Shuttleworthia* 丰度极显著高于 LC 组 ($P < 0.01$), *vadinCA11* 丰度显著高于 LC 组 ($P < 0.05$); 与 LC 组相比, HC 组奶牛瘤胃中 *Moryella* 丰度有降低的趋势 ($P = 0.08$)。

表 6 细菌属水平丰度

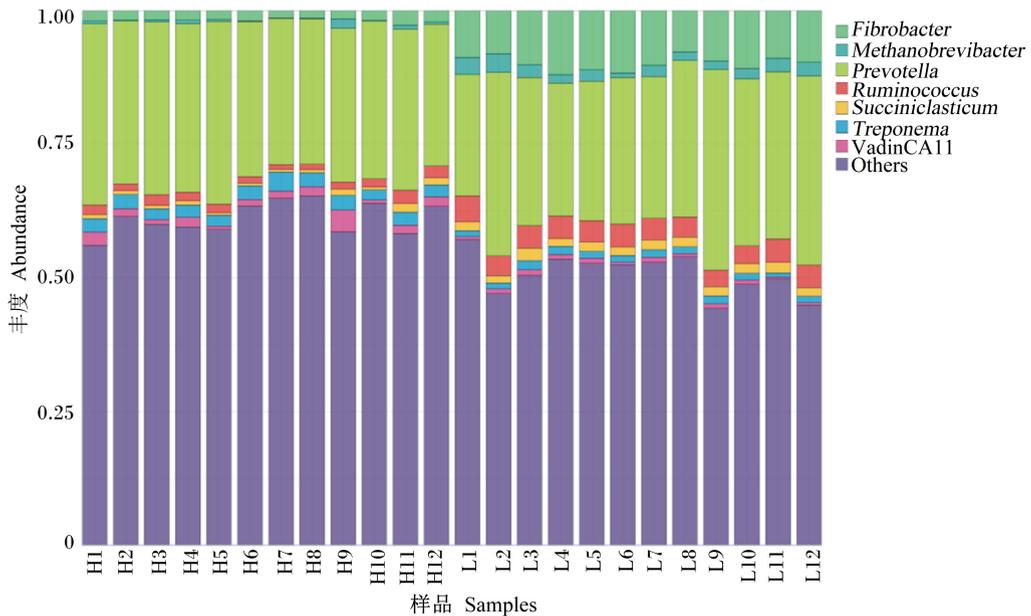
Table 6 Bacterial abundances at genus level

%

属水平 Genus levels	组别 Groups		P 值 P-value
	LC	HC	
普雷沃式菌属 <i>Prevotella</i>	29.51	30.05	0.05
密螺旋体属 <i>Treponema</i>	1.28 ^A	2.47 ^B	<0.01
纤维杆菌属 <i>Fibrobacter</i>	9.90 ^B	1.85 ^A	<0.01
vadinCA11	0.73 ^a	1.62 ^b	0.01
瘤胃球菌属 <i>Ruminococcus</i>	4.01 ^B	1.60 ^A	<0.01
粪球菌属 <i>Coprococcus</i>	0.58 ^A	1.17 ^B	<0.01
丁酸弧菌属 <i>Butyrivibrio</i>	0.97 ^b	0.79 ^a	0.02
琥珀酸菌属 <i>Succiniclacticum</i>	1.75 ^B	0.78 ^A	<0.01
YRC22	0.97 ^B	0.66 ^A	<0.01
<i>Shuttleworthia</i>	0.13 ^A	0.53 ^B	<0.01
甲烷短杆菌属 <i>Methanobrevibacter</i>	2.18 ^B	0.48 ^A	<0.01
CF231	0.86 ^B	0.40 ^A	<0.01
BF311	1.46 ^B	0.31 ^A	<0.01
RFN20	0.68	0.21	0.50
鞘氨醇单胞菌属 <i>Sphingomonas</i>	0.18	0.11	0.82
<i>Moryella</i>	0.18	0.11	0.08

由图 3 可知,LC 组奶牛瘤胃中与纤维降解有关的纤维杆菌属、瘤胃球菌属和丁酸弧菌属丰度

均明显高于 HC 组,与产酸有关的密螺旋体属丰度明显低于 HC 组。



Fibrobacter 纤维杆菌属; *Methanobrevibacter* 甲烷短杆菌属; *Prevotella* 普雷沃式菌属; *Ruminococcus* 瘤胃球菌属; *Succiniclacticum* 琥珀酸菌属; *Treponema* 密螺旋体属; Others 其他。

图 3 细菌属水平堆叠图

Fig.3 Stack diagram in bacterial genus level

3 讨论

3.1 不同精粗比饲料对奶牛瘤胃发酵参数的影响

瘤胃 VFA 含量与饲料结构紧密相关。张瑞阳等^[13]通过研究高精料饲料对奶牛瘤胃发酵的影响发现,高精料饲料能够显著提高丙酸、丁酸比例和 TVFA 含量,对乙酸比例影响不显著,但乙酸/丙酸显著降低,瘤胃 pH 极显著降低。Merchen 等^[14]通过研究高精料饲料和低精料饲料对羯羊瘤胃发酵指标的影响发现,TVFA 含量不受饲料结构的影响,但饲喂高精料饲料瘤胃中乙酸比例呈降低趋势。Giger-Reverdin 等^[15]通过研究饲料中精料水平提高对瘤胃发酵参数的影响,结果发现随着精料水平的提高,瘤胃 TVFA 含量及丙酸、丁酸比例极显著增加,而乙酸比例极显著降低。本试验结果表明,与 LC 组相比,HC 组的 TVFA 含量增加,乙酸比例降低,但均无显著差异;HC 组的丙酸比例极显著增加,但乙酸/丙酸极显著降低。综上所述,随着饲料中精粗比的增加,奶牛瘤胃发酵模式发生改变,以丙酸发酵为主,提高了丙酸比例,但降低了乙酸比例。

氨态氮也是反映瘤胃发酵指标的重要参数。Serment 等^[16]通过改变饲料中精料比例来研究饲料结构改变对泌乳中期山羊瘤胃发酵指标的影响,结果表明,随着精料比例的增加瘤胃中氨态氮含量呈降低趋势。但郭盼盼等^[17]通过研究不同精粗比饲料对延边黄牛瘤胃发酵的影响,结果发现随着饲料精粗比的增加,瘤胃中氨态氮含量极显著增加。本试验结果表明,HC 组和 LC 组瘤胃液氨态氮含量无显著差异,但随着饲料精粗比的增加,奶牛瘤胃液氨态氮含量呈现增加趋势。造成这种不一致的原因可能是由于饲喂饲料的不同,导致的饲料中蛋白质水平不同,造成氨态氮含量存在一定的差异。

3.2 不同精粗比饲料对奶牛瘤胃细菌菌群多样性的影响

16S rDNA 高通量测序技术利用其在不同菌种中序列的多样性来鉴定菌种的类别^[18],奶牛瘤胃内栖息着主要包括细菌、真菌和原生动物(原虫)在内的微生物^[19]。通过瘤胃内微生物协合作用,将饲料中营养物质降解并利用,以维持机体的需要和进行各种生命活动^[20]。Ji 等^[21]研究表明,饲喂高精料组的羔羊较低精料组在瘤胃细菌总数

上显著降低。Benchaar 等^[22]研究表明,随着奶牛饲料中精料水平的提高,瘤胃中细菌数量显著降低。刘玉洁^[23]报道,高精料组山羊瘤胃菌群多样性指数较低精料组降低。本研究表明,高精料饲料条件下,奶牛瘤胃中细菌总数以及多样性显著降低,与上述研究结果一致。这表明瘤胃菌群多样性和总数改变的主要原因是由于大量精料在瘤胃中快速降解发酵,使得瘤胃 pH 大幅度降低,改变了瘤胃发酵模式,抑制了奶牛瘤胃中不耐酸的纤维降解菌等生长繁殖,打破了瘤胃中微生物的稳态平衡,导致奶牛瘤胃中微生物的多样性和总数下降。

3.3 不同精粗比饲料对奶牛瘤胃细菌菌群结构的影响

对于反刍动物瘤胃细菌多样性及结构特性,大量研究表明瘤胃细菌主要分布在拟杆菌门和厚壁菌门中,并且在瘤胃发酵过程中起着至关重要的作用。Kong 等^[24]通过研究饲喂不同粗饲料对奶牛瘤胃细菌菌群的多样性及结构的影响发现,厚壁菌门和拟杆菌门占整个细菌门水平的比例较大,这与 De Oliveira 等^[25]研究结果一致。有研究表明,草食家畜中拟杆菌门是碳水化合物降解的主要菌门,并且与摄入的纤维物质有直接的联系,因此瘤胃中拟杆菌门丰度的高低与纤维物质降解密切相关^[26]。本试验结果表明,HC 组瘤胃中拟杆菌门丰度较 LC 组极显著降低,说明低精粗比饲料下的瘤胃内环境更有利于促进瘤胃中细菌菌群对纤维物质的降解。厚壁菌门是动物胃肠道促进纤维分解的主要菌群,能够提高动物对纤维素的降解^[27]。本研究表明,HC 组瘤胃中厚壁菌门丰度较 LC 组极显著降低,说明高精粗比饲料降低了奶牛对纤维素的降解率。变形菌门作为肠道菌群失调的微生态的标志,其丰度的大量增加可以间接表明胃肠道微生态的平衡失调^[28]。本试验结果表明,饲料精粗比影响了瘤胃细菌菌群的结构组成,影响了瘤胃内环境稳态平衡。研究表明,黏胶球形菌门与纤维二糖的降解密切相关,其与纤维杆菌门均是绵羊瘤胃中的优势菌门,能够促进瘤胃对纤维物质的降解^[29-30]。本试验结果表明,LC 组瘤胃中纤维杆菌门和黏胶球形菌门丰度较 HC 组极显著增加,说明低精粗比饲料显著提高了纤维素的降解率。

在属水平上,普雷沃氏菌属是瘤胃中广泛存

在和数量最多的一类细菌属^[31]。普雷沃氏菌属是瘤胃中的优势菌群^[32]。本研究发现,2组之间瘤胃中普雷沃氏菌属丰度差异不显著,在2组中的丰度均最高。普雷沃氏菌属高活性的半纤维素降解功能,当与纤维降解菌共培养时,能够提高其对植物性半纤维素(果胶和木聚糖)的利用率,从而促进瘤胃中纤维物质的降解^[33],普雷沃氏菌属还对植物中非纤维性多糖和蛋白质降解也具有重要作用^[34]。本研究发现,HC组奶牛瘤胃中普雷沃氏菌属丰度较LC组高,但无显著差异。瘤胃球菌属、纤维杆菌属、丁酸弧菌属、琥珀酸菌属均有降解纤维物质的能力^[35-36]。本研究表明,LC组奶牛瘤胃中与纤维降解有关的纤维杆菌属、瘤胃球菌属和丁酸弧菌属丰度均显著或极显著高于HC组。通过瘤胃发酵参数可以看出,LC组奶牛瘤胃液乙酸/丙酸显著高于HC组,说明饲料精粗比改变了瘤胃发酵类型,通过瘤胃液氨态氮含量进一步可以看出瘤胃微生物合成也存在一定变化,发酵类型的改变主要源于饲料精粗比对瘤胃中普雷沃氏菌属、纤维杆菌属、瘤胃球菌属和丁酸弧菌属等主要瘤胃细菌丰度的影响。甲烷短杆菌属是产生甲烷的主要菌群,有研究表明,随着饲料中精料水平的增加,甲烷产量显著降低^[37-39]。本试验结果表明,HC组的瘤胃中甲烷短杆菌属丰度较LC组极显著降低,与上述研究结果一致。

4 小 结

① 饲料精粗比显著影响了奶牛瘤胃中细菌总数和多样性。

② 高精粗比饲料条件下,瘤胃中纤维降解菌的生长受到抑制,促进了瘤胃中产酸菌的增殖,从而改变了瘤胃发酵模式。

参考文献:

- [1] ZEBELI Q, METZLER-ZEBELI B U. Interplay between rumen digestive disorders and diet-induced inflammation in dairy cattle [J]. *Research in Veterinary Science*, 2012, 93 (3) : 1099-1108.
- [2] THEODOROU M K, LOWE S E, TRINCI A P J, et al. Anaerobic fungi and the rumen ecosystem [M]. New York: Marcel Dekker Publishers, 1992.
- [3] TRINCI A P J, DAVIES D R, GULL K, et al. Anaerobic fungi in herbivorous animals [J]. *Mycological Research*, 1994, 98 (2) : 129-152.
- [4] WRIGHT A D G, KLIEVE A V. Does the complexity of the rumen microbial ecology preclude methane mitigation? [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2011, 166-167: 248-253.
- [5] ZHOU M, HERNANDEZ-SANABRIA E, GUAN L L. Characterization of variation in rumen methanogenic communities under different dietary and host feed efficiency conditions, as determined by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis analysis [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76 (12) : 3776-3786.
- [6] ROMERO-PÉREZ G A, OMINSKI K H, MCALLISTER T A, et al. Effect of environmental factors and influence of rumen and hindgut biogeography on bacterial communities in steers [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77 (1) : 258-268.
- [7] BIPIN K C, RAMESH P T, YATHIRAJ S. Impact of subacute ruminal acidosis (SARA) on milk yield and milk fat content in crossbred dairy cows [J]. *Paripex-Indian Journal of Research*, 2016, 5 (4) : 290-292.
- [8] PLAIZIER J C, KRAUSE D O, GOZHO G N, et al. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: the physiological causes, incidence and consequences [J]. *The Veterinary Journal*, 2008, 176 (1) : 21-31.
- [9] AOAC. Official methods of analysis [S]. 15th ed. Arlington, Virginia: Association of Official Analytical Chemists, 1990.
- [10] 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.
- [11] 冯宗慈, 高民. 通过比色测定瘤胃液氨氮含量方法的改进 [J]. *畜牧与饲料科学*, 2010, 31 (6/7) : 37.
- [12] 曹庆云, 周武艺, 朱贵钊, 等. 气相色谱测定羊瘤胃液中挥发性脂肪酸方法研究 [J]. *中国饲料*, 2006 (24) : 26-28.
- [13] 张瑞阳, 王东升, 朱伟云, 等. 高精料对奶牛瘤胃发酵及异常代谢产物脂多糖变化的影响 [C] // 中国畜牧兽医学动物营养学分会第十一次全国动物营养学术研讨会论文集. 长沙: 中国畜牧兽医学动物营养学分会, 2012.
- [14] MERCHEN N R, FIRKINS J L, BERGER L L. Effect of intake and forage level on ruminal turnover rates, bacterial protein synthesis and duodenal amino acid flows in sheep [J]. *Journal of Animal Science*, 1986, 62 (1) : 216-225.

- [15] GIGER-REVERDIN S, RIGALMA K, DESNOYERS M, et al. Effect of concentrate level on feeding behavior and rumen and blood parameters in dairy goats: relationships between behavioral and physiological parameters and effect of between-animal variability [J]. *Journal of Dairy Science*, 2014, 97(7): 4367-4378.
- [16] SERMENT A, SCHMIDELY P, GIGER-REVERDIN S, et al. Effects of the percentage of concentrate on rumen fermentation, nutrient digestibility, plasma metabolites, and milk composition in mid-lactation goats [J]. *Journal of Dairy Science*, 2011, 94(8): 3960-3972.
- [17] 郭盼盼, 严昌国, 高青山, 等. 日粮精粗比对延边黄牛瘤胃发酵特性及微生物区系的影响 [J]. *饲料研究*, 2015(21): 36-41.
- [18] RAJENDHRAN J, GUNASEKARAN P. Microbial phylogeny and diversity: small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond [J]. *Microbiological Research*, 2011, 166(2): 99-110.
- [19] 赵广存. 牛瘤胃未培养微生物纤维素酶基因的克隆、鉴定及表达 [D]. 硕士学位论文. 南宁: 广西大学, 2005.
- [20] MULLINS C R, MAMEDOVA L K, CARPENTER A J, et al. Analysis of rumen microbial populations in lactating dairy cattle fed diets varying in carbohydrate profiles and *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product [J]. *Journal of Dairy Science*, 2013, 96(9): 5872-5881.
- [21] JI S K, JIANG C G, LI R, et al. Growth performance and rumen microorganism differ between segregated weaning lambs and grazing lambs [J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2016, 15(4): 872-878.
- [22] BENCHAAR C, LETTAT A, HASSANAT F, et al. Eugenol for dairy cows fed low or high concentrate diets: effects on digestion, ruminal fermentation characteristics, rumen microbial populations and milk fatty acid profile [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2012, 178(3/4): 139-150.
- [23] 刘玉洁. 高谷物日粮对山羊瘤胃微生物区系和瘤胃、血清、肝脏中代谢物组成的影响 [D]. 硕士学位论文. 南京: 南京农业大学, 2015.
- [24] KONG Y H, TEATHER R, FORSTER R. Composition, spatial distribution, and diversity of the bacterial communities in the rumen of cows fed different forages [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 74(3): 612-622.
- [25] DE OLIVEIRA M N V, JEWELL K A, FREITAS F S, et al. Characterizing the microbiota across the gastrointestinal tract of a Brazilian Nelore steer [J]. *Veterinary Microbiology*, 2013, 164(3/4): 307-314.
- [26] SPENCE C, WELLS W G, SMITH C J. Characterization of the primary starch utilization operon in the obligate anaerobe *Bacteroides fragilis*: regulation by carbon source and oxygen [J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(13): 4663-4672.
- [27] BRULC J M, ANTONOPOULOS D A, MILLER M E B, et al. Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases [J]. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(6): 1948-1953.
- [28] SHIN N R, WHON T W, BAE J W. *Proteobacteria*: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota [J]. *Trends in Biotechnology*, 2015, 33(9): 496-503.
- [29] LIMAM R D, BOUCHEZ T, CHOUARI R, et al. Detection of WWE2-related *Lentisphaerae* by 16S rRNA gene sequencing and fluorescence *in situ* hybridization in landfill leachate [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2010, 56(10): 846-852.
- [30] 郭威, 郭晓军, 周贤, 等. 复合菌剂发酵玉米秸秆对绵羊瘤胃液细菌多样性的影响 [J]. *畜牧兽医学报*, 2018, 49(4): 736-745.
- [31] SHARMA A, PRASAD S, SINGH Y, et al. Effect of polyherbal preparation supplementation on immunity and udder health of periparturient Karan-Fries crossbred dairy cows [J]. *Journal of Applied Animal Research*, 2014, 42(2): 217-221.
- [32] JAMI E, MIZRAHI I. Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals [J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e33306.
- [33] PURUSHE J, FOUTS D E, MORRISON M, et al. Comparative genome analysis of *Prevotella ruminicola* and *Prevotella bryantii*: insights into their environmental niche [J]. *Microbial Ecology*, 2010, 60(4): 721-729.
- [34] GRISWOLD K E, WHITE B A, MACKIE R I. Diversity of extracellular proteolytic activities among *Prevotella* species from the rumen [J]. *Current Microbiology*, 1999, 39(4): 187-194.
- [35] GRILLI D J, CERÓN M E, PAEZ S, et al. Isolation of *Pseudobutyrvibrio ruminis* and *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* from rumen of Creole goats fed native forage diet [J]. *Folia Microbiologica*, 2012, 58(5): 367-373.

- [36] KOIKE S, KOBAYASHI Y. Fibrolytic rumen bacteria; their ecology and functions [J]. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2009, 22(1): 131-138.
- [37] 何玉鹏, 郭艳丽, 鞠九洲, 等. 不同精粗比饲料中添加壳聚糖对体外瘤胃发酵甲烷产量和发酵特性的影响 [J]. *动物营养学报*, 2014, 26(11): 3433-3442.
- [38] 崔安, 李振, 曹阳春, 等. 不同精粗比日粮对秦川肉牛甲烷产量和瘤胃发酵的影响 [J]. *家畜生态学报*, 2016, 37(9): 35-40.
- [39] 崔安. 不同精粗比日粮对舍饲秦川肉牛甲烷产量和瘤胃发酵的影响 [D]. 硕士学位论文. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016.

Structure Changes of Rumen Bacterial Flora of Dairy Cows under Different Concentrate to Roughage Ratio Diets

XU Xiaofeng HU Dandan GUO Tingting ZHANG Lili

(College of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract: The aim of this study was to reveal the changes of rumen bacterial flora structure of dairy cows under different concentrate to roughage ratio diets. Twenty-four healthy Chinese Holstein dairy cows with similar body weight, same parity and about 3 weeks postpartum were randomly divided into two groups (12 cows per group), and cows in two groups were fed with high concentrate to roughage ratio diet (60:40, HC group) and low concentrate to roughage ratio diet (40:60, LC group), respectively. The experiment lasted for 45 days. The structure changes of rumen bacterial flora of dairy cows were analyzed by 16S rDNA high-throughput sequencing technology. The results showed as follows: 1) the rumen fluid propionic acid percentage of dairy cows of HC group was significantly higher than that of LC group ($P < 0.01$), and the acetic acid/propionic acid was significantly lower than that of LC group ($P < 0.01$). 2) The number of bacterial operational classification unit in rumen of dairy cows of HC group was significantly lower than that of LC group ($P < 0.01$). 3) The indexes of Ace and Chao1 of LC group were significantly higher than those of HC group ($P < 0.05$), and the indexes of Shannon and Simpson were significantly higher than those of HC group ($P < 0.01$). 4) The abundances of Bacteroidetes, Firmicutes, Fibrobacteres, Verrucomicrobia, SR1, Tenericutes, TM7, Lentsphaerae and Elusimicrobia in rumen of dairy cows of LC group were significantly higher than those of HC group ($P < 0.01$), and the abundances of Proteobacteria and Spirochaetes of dairy cows of HC group were significantly higher than those of LC group ($P < 0.01$). 5) The abundances of *Fibrobacter*, *Ruminococcus*, *Succiniclaticum*, *Methanobrevibacter* and BF311 in rumen of dairy cows of LC group were significantly higher than those of HC group ($P < 0.01$), and the *Butyrivibrio* abundance was significantly higher than that of HC group ($P < 0.05$); the abundances of *Treponema*, *Coprococcus* and *Shuttleworthia* in rumen of dairy cows of HC group were significantly higher than those of LC group ($P < 0.01$), and the vadinCA11 abundance was significantly higher than that of LC group ($P < 0.05$). In conclusion, dietary concentrate to roughage ratio significantly affect the total number and diversity of bacteria in rumen of dairy cows. Under the condition of high concentrate to roughage ratio diet, the growth of fiber-degrading bacteria in rumen is restrained, which promote the proliferation of acid-producing bacteria in rumen, thus changing the rumen fermentation mode. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2019, 31(12): 5541-5550]

Key words: concentrate to roughage ratio; dairy cows; rumen; bacterial flora