

# 甘露寡糖对高精料诱导的低乳脂奶牛瘤胃细菌菌群调控的研究

徐晓锋 郭婷婷 郭成 吉武龙 张力莉

(宁夏大学农学院,银川 750021)

**摘要:** 本文旨在揭示甘露寡糖(MOS)对高精料诱导的低乳脂奶牛瘤胃细菌菌群结构的调控作用。选择泌乳阶段相近、胎次相同的中国荷斯坦奶牛4头,利用自身对照试验,在基础饲料(对照组)的饲喂基础上,通过淀粉诱导奶牛低乳脂(诱导组),然后添加MOS进行瘤胃发酵与乳脂调控(调控组)。结果表明:MOS对高精料诱导的低乳脂奶牛瘤胃细菌菌群结构产生了积极影响。在门水平上,与诱导组相比,低乳脂奶牛瘤胃中拟杆菌门( $P<0.05$ )、螺旋体门( $P>0.05$ )和放线菌门( $P>0.05$ )的丰度降低;厚壁菌门的丰度显著提高( $P<0.05$ ),且丰度显著高于对照组( $P<0.05$ );与诱导组和对照组相比,调控组纤维杆菌门的丰度极显著增加( $P<0.01$ )。在属水平上,与诱导组相比,调控组普雷沃氏菌属\_1、普雷沃氏菌属\_7、乳杆菌属和乳球菌属的丰度均极显著降低( $P<0.01$ );调控组普雷沃氏菌属\_UCG-001和普雷沃氏菌属\_UCG-003的丰度增加,其中普雷沃氏菌属\_UCG-001的丰度极显著高于对照组( $P<0.01$ ),普雷沃氏菌属\_UCG-003的丰度极显著高于对照组和诱导组( $P<0.01$ );调控组解琥珀酸菌属的丰度显著增加( $P<0.05$ )。对瘤胃菌群进行功能预测发现,低乳脂奶牛饲料添加MOS降低了参与淀粉和蔗糖代谢的菌群丰度。由此可见,添加MOS可以调控瘤胃中细菌菌群的结构,缓解因饲喂大量淀粉而造成的纤维降解菌丰度的下降,对提高瘤胃对纤维素的降解率有一定的作用;还可以降低产酸菌属的丰度,对稳定瘤胃pH具有积极的作用。

**关键词:** 奶牛;低乳脂;甘露寡糖;瘤胃菌群;调控

**中图分类号:** S823

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1006-267X(2019)11-5245-11

在高精料条件下,由于淀粉降解产生大量的葡萄糖,为瘤胃微生物的生长提供了大量碳源,短时间内瘤胃微生物会大量的繁殖,瘤胃中挥发性脂肪酸会大量累积,导致瘤胃pH下降,不耐酸的菌群大量死亡<sup>[1]</sup>,引起奶牛肠道环境出现紊乱,瘤胃微生物区系发生改变<sup>[2]</sup>。瘤胃菌群结构的合理性和稳定性直接影响到奶牛机体各方面的健康状况。有研究证明,乳脂的合成与瘤胃菌群结构存在一定的关系<sup>[3]</sup>。Pitta等<sup>[4]</sup>通过饲喂低纤维、高淀粉和高不饱和脂肪酸诱导荷斯坦奶牛乳脂下

降,结果发现低乳脂奶牛模型瘤胃中拟杆菌门(Bacteroidetes)的丰度显著降低,厚壁菌门(Firmicutes)和放线菌门(Actinobacteria)的丰度显著增加,其中拟杆菌门和厚壁菌门是哺乳动物胃肠道的优势菌群<sup>[5]</sup>。Heinrichs等<sup>[6]</sup>报道,甘露寡糖(MOS)能够优化牛的胃肠道微生态环境,促进双歧杆菌等有益菌的增殖,降低大肠杆菌等致病菌的数量。因此,本研究通过淀粉诱导构建低乳脂奶牛模型,探讨MOS对高精料诱导的低乳脂奶牛瘤胃细菌菌群的调控作用。

收稿日期:2019-05-08

基金项目:国家自然科学基金项目(31460619)

作者简介:徐晓锋(1978—),男,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

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物与设计

试验选择4头泌乳阶段相近、胎次相同、体况良好、体重为650 kg左右的经产(2胎)中国荷斯坦奶牛作为试验动物。试验期共56 d,分为3个阶段,第1阶段:奶牛饲喂基础饲粮作为对照组,试验期为14 d(1~14 d);第2阶段:低乳脂奶牛模型构建期作为诱导组,试验期为28 d(15~42 d);第3阶段:添加MOS期作为调控组,试验期为14 d(43~56 d)。

低乳脂奶牛模型构建主要通过灌注玉米面,使奶牛饲粮淀粉含量达到27%左右;MOS(购自河南三化生物科技公司,纯度为99%)的添加量为200 g/(d·头),基础饲粮组成及营养水平见表1。每个试验期的最后3 d为瘤胃液的正式采样期。

### 1.2 瘤胃液的采集

通过牛口腔导管采集瘤胃液,准备牛鼻夹把牛头固定,在口腔放入硬管(木头、硬塑胶均可,内径要超过取样软管),插入深度不要超过咽部,外面露出20 cm左右,工作人员能够用手把其固定,然后把软管(2.5 m左右)通过口腔硬管内径逐步送入瘤胃,将牛头压低,在牛的咀嚼过程中瘤胃液自然流出。用充有CO<sub>2</sub>的保温瓶盛放瘤胃液,并迅速转移至实验室,用4层纱布过滤,等量混匀,将混合好的瘤胃液分别装入50 mL离心管中,置于-80℃冻存备用。

### 1.3 样品测定

#### 1.3.1 pH的测定

利用pH计对瘤胃液pH进行测定。

#### 1.3.2 挥发性脂肪酸含量的测定

将过滤后的瘤胃液以10 000 r/min离心10 min;取离心后的瘤胃液1 mL,加入现配的25%偏磷酸溶液200 μL,再以10 000 r/min离心10 min,然后使用气相色谱仪(GC-2020,武汉恒信世纪科技有限公司)测定瘤胃挥发性脂肪酸含量。

#### 1.3.3 瘤胃细菌菌群的分析测定

##### 1.3.3.1 菌群DNA提取试剂

菌群DNA采用试剂盒提取,试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

Buffer W2:在瓶内加入体积为56 mL的无水

乙醇并混合均匀。

Buffer DV:按照2 mL Buffer DV-A与125 mL异丙醇和75 mL异丁醇的比例混合均匀。

溶菌酶:用50%的甘油溶解,使其浓度为50 mg/mL。

表1 基础饲粮组成及营养水平(干物质基础)

Table 1 Composition and nutrient levels of the basal diet (DM basis) %

项目 Items	含量 Content
原料 Ingredients	
苜蓿青贮 Alfalfa silage	4.12
苜蓿 Alfalfa	10.32
玉米青贮 Corn silage	45.56
甜菜颗粒 Beet grain	2.49
啤酒糟 Brewer's grain	3.16
玉米 Corn	11.06
浓缩料 Concentrate <sup>1)</sup>	22.09
小苏打 NaHCO <sub>3</sub>	0.30
氯化钠 NaCl	0.30
氧化镁 MgCl <sub>2</sub>	0.50
脱霉素 Demycin	0.10
合计 Total	100.00
营养水平 Nutrient levels <sup>2)</sup>	
粗蛋白质 CP	17.58
中性洗涤纤维 NDF	34.54
钙 Ca	0.74
磷 P	0.47
产奶净能 NE <sub>L</sub> /(MJ/kg)	6.14
诱导前淀粉 Starch before the induction	24.55
诱导后淀粉 Starch after the induction	27.30

<sup>1)</sup>浓缩料主要原料:豆粕、棉籽粕、石粉、氯化钠、维生素A、维生素D<sub>3</sub>、硫酸铜、硫酸锰、硫酸锌。产品主要成分分析保证值: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 main raw materials of the concentrate: soybean meal, cottonseed meal, limestone, sodium chloride, vitamin A, vitamin D<sub>3</sub>, copper sulfate, manganese sulfate and zinc sulfate. Product main component analysis guaranteed values: crude protein≥20%, lysine≥0.3%, calcium 0.5% to 2.0%, total phosphorus≥0.3%, sodium chloride 0.5% to 2.0%, crude fiber≤15%, ash≤15%, moisture≤14%.

<sup>2)</sup>产奶净能为计算值,其他均为实测值。NE<sub>L</sub> was a calculated value, while the others were measured values.

### 1.3.3.2 菌群 DNA 提取步骤

1) 用 2 mL 的离心管收集 1 mL  $OD_{600} = 1.0 \sim 1.5$  的瘤胃液,  $12\ 000 \times g$  离心 30 s, 弃上清加入 150  $\mu\text{L}$  的 Buffer S 悬浮液。

2) 将 20  $\mu\text{L}$  的溶菌酶贮存液加入步骤 1) 的离心管中, 混合均匀, 并室温下静置 5 min。

3) 加入 30  $\mu\text{L}$  0.25 mmol/L 乙二胺四乙酸 (EDTA), 混合均匀, 冰浴 5 min。

4) 加入 450  $\mu\text{L}$  Buffer G-A, 漩涡振荡 15 s, 于  $65\ ^\circ\text{C}$  水浴 10 min。

5) 加入 400  $\mu\text{L}$  Buffer G-B 和 1 mL Buffer DV 混合均匀,  $12\ 000 \times g$  离心 2 min。

6) 弃上清, 保留沉淀和下相, 加入 1 mL Buffer DV 混合均匀,  $12\ 000 \times g$  离心 2 min。

7) 弃上相, 将下相转移至滤器 (滤器置于 2 mL 离心管中),  $12\ 000 \times g$  离心 1 min。

8) 弃滤器, 在滤液中加入 400  $\mu\text{L}$  的 Buffer BV, 混合均匀。

9) 将制备管置于 2 mL 离心管中, 将步骤 8) 的液体转入制备管,  $12\ 000 \times g$  离心 1 min。

10) 弃滤液, 将制备管放入原 2 mL 离心管中, 加入 500  $\mu\text{L}$  Buffer W1,  $12\ 000 \times g$  离心 1 min。

11) 弃滤液, 将制备管放到原 2 mL 离心管中, 加入 700  $\mu\text{L}$  Buffer W2,  $12\ 000 \times g$  离心 1 min, 重复这个步骤。

12) 弃滤液, 将制备管放回原 2 mL 的离心管中,  $12\ 000 \times g$  离心 1 min。

13) 将制备管置于另一洁净的 1.5 mL 的离心管中, 在制备管膜中加入 150  $\mu\text{L}$  洗脱液, 室温静

置 1 min,  $12\ 000 \times g$  离心 1 min, 用于洗脱基因组 DNA。

### 1.3.3.3 PCR 扩增

PCR 扩增前用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 样品的纯度和浓度。取适量检测合格的样品于离心管中进行稀释, 将稀释后的基因组 DNA 作为模板。DNA 扩增目的片段为 V3+V4 区, 大概长度 468 bp, 引物序列 341F: 3'-CCTAYGGGRBGCAS-CAG-5'; 806R: 3'-GGACTACNNGGGTATCTA-AT-5'<sup>[8]</sup>。

### 1.3.3.4 Illumina MiSeq 测序

测序服务由广州基迪奥生物科技有限公司提供, 其测序采用 MiSeq 2500 PE 250 平台。

## 1.4 数据统计与分析

数据采用 Excel 2007 进行初步处理, 采用 SAS 8.2 软件中的完全随机设计的方差分析 (one-way ANOVA) 进行统计。数据由平均值  $\pm$  标准差表示。以  $P < 0.05$  作为差异显著判定标准,  $P < 0.01$  作为差异极显著判定标准。

## 2 结果与分析

### 2.1 MOS 对高精料诱导的低乳脂奶牛瘤胃 pH 的影响

由表 2 可知, 诱导组奶牛瘤胃 pH 较对照组极显著降低了 8.89% ( $P < 0.01$ ), 添加 MOS 后奶牛瘤胃 pH 提高了 8.78%, 且差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 调控组瘤胃 pH 仍略低于对照组, 但差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

表 2 MOS 对高精料诱导的低乳脂奶牛瘤胃 pH 的影响

Table 2 Effects of MOS on rumen pH of low-fat dairy cows induced by high concentrate

项目 Item	对照组 Control group	诱导组 Induction group	调控组 Regulatory group
pH	6.75 $\pm$ 0.04 <sup>Aa</sup>	6.15 $\pm$ 0.01 <sup>Bb</sup>	6.69 $\pm$ 0.15 <sup>Aa</sup>

同行数据肩标相同小写字母或无字母表示差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 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 ( $P < 0.01$ )。下表同。

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

### 2.2 MOS 对高精料诱导的低乳脂奶牛瘤胃主要挥发性脂肪酸含量的影响

由表 3 可知, 与对照组相比, 诱导组乙酸和丁酸的含量略有降低, 差异均不显著 ( $P > 0.05$ ); 丙酸

的含量显著增加了 27.03% ( $P < 0.05$ )。调控组奶牛瘤胃中乙酸的含量较诱导组和对照组显著提高了 14.97%、14.15% ( $P < 0.05$ ); 调控组奶牛瘤胃中丙酸的含量较诱导组显著降低了 17.83% ( $P <$

0.05), 较对照组增加了 4.37%, 但差异不显著 ( $P>0.05$ ); 调控组乙酸/丙酸较诱导组显著提高了

37.04% ( $P<0.05$ ), 较对照组提高了 7.12%, 但差异不显著 ( $P>0.05$ )。

表 3 MOS 对高精料诱导的低乳脂奶牛瘤胃主要挥发性脂肪酸含量的影响

Table 3 Effects of MOS on rumen major VFA contents of low-fat dairy cows induced by high concentrate

项目 Items	对照组 Control group	诱导组 Induction group	调控组 Regulatory group
乙酸 Acetic acid/(mmol/L)	46.21±3.30 <sup>b</sup>	45.88±1.92 <sup>b</sup>	52.75±1.51 <sup>a</sup>
丙酸 Propionic acid/(mmol/L)	12.58±2.14 <sup>b</sup>	15.98±3.20 <sup>a</sup>	13.13±3.50 <sup>b</sup>
丁酸 Butyric acid/(mmol/L)	18.93±2.24	18.38±0.75	18.84±8.07
乙酸/丙酸 Acetic acid/propionic acid	3.80±0.57 <sup>ab</sup>	2.97±0.63 <sup>b</sup>	4.07±1.97 <sup>a</sup>

## 2.3 MOS 对高精料诱导的低乳脂奶牛瘤胃细菌菌群结构的影响

### 2.3.1 操作分类单元(OTU)分析

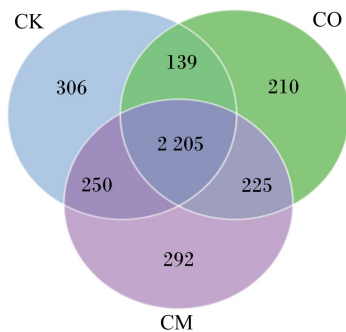
经 Illumina Miseq 测序结束后, 除去低质量序列, 通过序列拼接, 应用 Mothur 根据 97% 的序列相似度, 对序列进行 OTU 划分, 对样品进行 OTU 的统计, 见表 4, 并根据 OTU 聚类分析结果, 分析不同样品的聚类信息, 依照其共有、特有的 OTU

信息绘制韦恩图, 见图 1。诱导组奶牛瘤胃细菌 OTU 数要略低于对照组, 但差异不显著 ( $P>0.05$ ); 调控组奶牛瘤胃细菌 OTU 数较诱导组增加了 8.72%, 且差异极显著 ( $P<0.01$ ), 瘤胃细菌 OTU 数略高于对照组 ( $P>0.05$ ), 说明高精料诱导奶牛会导致瘤胃细菌的总数降低, 饲料添加 MOS 可以提高奶牛瘤胃细菌的总数。

表 4 奶牛瘤胃细菌 OTU 数

Table 4 Number of rumen bacteria OTU in dairy cows

项目 Item	对照组 Control group	诱导组 Induction group	调控组 Regulatory group
OTU 数 Number of OTU	3 024±304 <sup>ABab</sup>	2 844±81 <sup>Bb</sup>	3 092±163 <sup>Aa</sup>



CK: 对照组 control group; CO: 诱导组 induction group; CM: 调控组 regulatory group。

图 1 奶牛瘤胃细菌菌群 OTU 韦恩图

Fig.1 Venn graph of rumen bacterial flora OTU in dairy cows

### 2.3.2 细菌菌群 alpha 多样性分析

由表 5 知, 诱导组奶牛瘤胃菌群的 ACE 和 Chao1 指数均低于对照组 ( $P>0.05$ ), Shannon 和

Simpson 指数均略低于对照组 ( $P>0.05$ )。调控组奶牛瘤胃细菌的 Chao1、ACE、Shannon 和 Simpson 指数均高于诱导组和对照组 ( $P>0.05$ ), 说明饲料添加 MOS 在一定程度上提高了高精料诱导的低乳脂奶牛瘤胃细菌的总数和多样性。

### 2.3.3 菌群结构分析

#### 2.3.3.1 门水平

试验共检测到 22 个菌门(表 6), 其中拟杆菌门、厚壁菌门和变形菌门(Proteobacteria)占到总菌的 90% 以上。与对照组相比, 诱导组奶牛瘤胃中浮霉菌门(Planctomycetes)和放线菌门的丰度极显著增加 ( $P<0.01$ ), 分别增加了 75.00%、125.00%; 螺旋菌门(Spirochaetae)的丰度增加了 37.97% ( $P<0.05$ ); 软壁菌门(Tenericutes)和黏胶球形菌门(Lentisphaerae)的丰度均显著降低 ( $P<0.05$ ), 分别降低了 39.29%、22.22%; 其余菌门与对照组相比均无显著差异 ( $P>0.05$ )。

表 5 细菌菌群 alpha 多样性指数

Table 5 Alpha diversity indexes of bacterial flora

项目 Items	对照组 Control group	诱导组 Induction group	调控组 Regulatory group
丰富度指数 Richness index			
ACE 指数 ACE index	3 780.21±353.78	3 642.19±207.05	3 868.56±269.94
Chao1 指数 Chao1 index	3 866.46±363.77	3 753.57±210.26	3 945.88±287.11
多样性指数 Diversity index			
Shannon 指数 Shannon index	8.37±0.87	8.35±0.35	8.48±0.81
Simpson 指数 Simpson index	0.99±0.04	0.99±0.00	0.99±0.04
覆盖率 Coverage/%	99.29±0.00	99.28±0.00	99.25±0.00

饲料添加 MOS 使奶牛瘤胃中拟杆菌门的丰度降低,与诱导组相比差异显著( $P<0.05$ ),但与对照组相比差异不显著( $P>0.05$ );厚壁菌门的丰度较对照组和诱导组均显著增加( $P<0.05$ ),且在瘤胃菌门中占比最高;Saccharibacteria 的丰度增加,较诱导组显著增加( $P<0.05$ ),其丰度较诱导组增

加了 123.26%,但与对照组相比差异不显著( $P>0.05$ );纤维杆菌门(Fibrobacteres)的丰度较对照组和诱导组极显著增加( $P<0.01$ );梭杆菌门(Fusobacteria)的丰度与对照组和诱导组相比均显著增加( $P<0.05$ )。

表 6 MOS 对奶牛瘤胃细菌菌群在门水平上丰度的影响

Table 6 Effects of MOS on abundance of rumen bacterial flora in dairy cows at phylum level

%

项目 Items	对照组 Control group	诱导组 Induction group	调控组 Regulatory group
拟杆菌门 Bacteroidetes	52.73±5.56 <sup>ab</sup>	54.78±2.18 <sup>a</sup>	45.56±2.27 <sup>b</sup>
厚壁菌门 Firmicutes	34.89±2.92 <sup>b</sup>	37.90±1.91 <sup>b</sup>	46.27±2.16 <sup>a</sup>
变形菌门 Proteobacteria	5.27±1.04	1.34±0.07	1.48±0.19
疣微菌门 Verrucomicrobia	0.85±0.12	0.88±0.26	0.66±0.37
Saccharibacteria	0.75±0.15 <sup>ab</sup>	0.43±0.10 <sup>b</sup>	0.96±0.07 <sup>a</sup>
螺旋体门 Spirochaetae	0.79±0.12 <sup>b</sup>	1.09±0.03 <sup>a</sup>	0.92±0.07 <sup>ab</sup>
浮霉菌门 Planctomycetes	0.64±0.10 <sup>Bc</sup>	1.12±0.18 <sup>Aa</sup>	1.07±0.37 <sup>Ab</sup>
软壁菌门 Tenericutes	0.56±0.10 <sup>a</sup>	0.34±0.08 <sup>b</sup>	0.34±0.02 <sup>b</sup>
放线菌门 Actinobacteria	0.40±0.08 <sup>Bb</sup>	0.90±0.17 <sup>Aa</sup>	0.85±0.21 <sup>Aa</sup>
蓝藻门 Cyanobacteria	0.38±0.06	0.39±0.13	0.38±0.07
广古菌门 Euryarchaeota	0.17±0.04	0.07±0.03	0.62±0.30
黏胶球形菌门 Lentisphaerae	0.09±0.02 <sup>a</sup>	0.07±0.03 <sup>b</sup>	0.09±0.00 <sup>ab</sup>
未注释菌门 Bacteria_NA	0.06±0.01	0.06±0.01	0.10±0.01
纤维杆菌门 Fibrobacteres	0.03±0.00 <sup>Bb</sup>	0.02±0.00 <sup>Bb</sup>	0.06±0.01 <sup>Aa</sup>
互养菌门 Synergistetes	0.02±0.00	0.03±0.00	0.02±0.00
SR1	0.01±0.00	0.01±0.00	0.02±0.00
迷踪菌门 Elusimicrobia	0.01±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00
装甲菌门 Armatimonadetes	0.00±0.00	0.00±0.00	0.01±0.00
梭杆菌门 Fusobacteria	0.01±0.00 <sup>b</sup>	0.01±0.00 <sup>b</sup>	0.02±0.00 <sup>a</sup>

### 2.3.3.2 属水平

属水平上总共检测到 389 个菌属,由表 7 可知,普雷沃氏菌属的占比最高,大概占到总菌属的

40%。与对照组相比,诱导组瘤胃中普雷沃氏菌属\_7(*Prevotella\_7*)、普雷沃氏菌属\_UCG-001(*Prevotellaceae\_UCG-001*)、乳杆菌属(*Lactobacil-*

lus)和乳球菌属(*Lactococcus*)的丰度极显著增加( $P<0.01$ ),分别增加了1.60%、65.71%、1.20%和970.59%;真杆菌属\_group(*Coprostanoligenes\_group*)和密螺旋体属\_2(*Treponema\_2*)的丰度显著增加( $P<0.05$ ),分别增加了55.56%和44.78%;肠球菌属(*Enterococcus*)和瘤胃菌属\_UCG-010(*Ruminococcaceae\_UCG-010*)的丰度极显著降低( $P<0.01$ ),分别降低了95.52%和42.85%;克里斯滕森菌属\_R-7\_group(*Christensenellaceae\_R-7\_group*)和丁酸弧菌属\_2(*Butyrivibrio\_2*)的丰度显著降低( $P<0.05$ ),分别降低了27.27%、37.14%。

与诱导组相比,饲粮添加MOS后奶牛瘤胃中丰度增加的菌属有普雷沃氏菌属\_UCG-003( $P<0.01$ )、瘤胃球菌属\_2( $P<0.01$ )、瘤胃球菌属\_NK4A214\_group( $P<0.01$ )、瘤胃球菌属\_UCG-002( $P<0.01$ )、解琥珀酸弧菌属( $P<0.05$ )、真杆菌属( $P<0.01$ );丰度降低的菌属有普雷沃氏菌属\_1( $P<0.01$ )、普雷沃氏菌属\_7( $P<0.01$ )、乳杆菌属( $P<0.01$ )、乳球菌属( $P<0.01$ )和密螺旋体属\_2( $P<0.05$ )。从结果中可以看出,MOS可以提高高精料诱导的低乳脂奶牛瘤胃中部分纤维降解菌的丰度,降低部分淀粉降解菌的丰度,降低产酸菌属的丰度,抑制部分致病菌的增殖。

表7 MOS对奶牛瘤胃细菌菌群在属水平上丰度的影响

Table 7 Effects of MOS on abundance of rumen bacterial flora in dairy cows at genus level

项目 Items	对照组 Control group	诱导组 Induction group	调控组 Regulatory group
普雷沃氏菌属_1 <i>Prevotella_1</i>	36.49±2.95 <sup>Aa</sup>	32.60±2.30 <sup>Aa</sup>	20.76±2.94 <sup>Bb</sup>
普雷沃氏菌属_7 <i>Prevotella_7</i>	0.07±0.00 <sup>Cc</sup>	1.19±0.78 <sup>Aa</sup>	0.19±0.04 <sup>Bb</sup>
普雷沃氏菌属_UCG-001 <i>Prevotellaceae_UCG-001</i>	0.70±0.00 <sup>Bb</sup>	1.16±0.12 <sup>Aa</sup>	2.13±0.48 <sup>Aa</sup>
普雷沃氏菌属_UCG-003 <i>Prevotellaceae_UCG-003</i>	0.66±0.00 <sup>Bb</sup>	0.54±0.05 <sup>Bb</sup>	1.10±0.12 <sup>Aa</sup>
理研菌属_RC9 肠道群 <i>Rikenellaceae_RC9_gut_group</i>	6.73±0.02 <sup>Bb</sup>	7.05±0.98 <sup>ABab</sup>	8.81±0.42 <sup>Aa</sup>
肠球菌属 <i>Enterococcus</i>	4.46±0.24 <sup>Aa</sup>	0.20±0.08 <sup>Bb</sup>	0.49±0.21 <sup>Bb</sup>
维斯氏菌属 <i>Weissella</i>	1.33±0.09	1.68±0.56	0.90±0.18
拟杆菌属_BS11_gut_group_NA <i>Bacteroidales_BS11_gut_group_NA</i>	3.65±0.01 <sup>Bb</sup>	4.05±0.37 <sup>ABab</sup>	4.94±0.18 <sup>Aa</sup>
拟杆菌属_S24-7_group_NA <i>Bacteroidales_S24-7_group_NA</i>	2.74±0.01 <sup>Bb</sup>	4.13±0.88 <sup>ABab</sup>	4.95±0.45 <sup>Aa</sup>
拟杆菌属_RF16_group_NA <i>Bacteroidales_RF16_group_NA</i>	0.32±0.00	0.38±0.00	0.45±0.05
拟杆菌属_UCG-001_NA <i>Bacteroidales_UCG-001_NA</i>	0.17±0.00	0.18±0.03	0.23±0.03
瘤胃球菌属_2 <i>Ruminococcus_2</i>	3.37±0.04 <sup>Bb</sup>	4.41±1.03 <sup>Bb</sup>	9.20±1.18 <sup>Aa</sup>
瘤胃球菌属_1 <i>Ruminococcus_1</i>	0.12±0.00 <sup>Bb</sup>	0.19±0.00 <sup>Aa</sup>	0.23±0.00 <sup>Aa</sup>
瘤胃球菌属_NK4A214_grou <i>Ruminococcaceae_NK4A214_group</i>	3.65±0.03 <sup>Bb</sup>	2.72±0.35 <sup>Bb</sup>	6.81±0.50 <sup>Aa</sup>
瘤胃球菌属_UCG-014 <i>Ruminococcaceae_UCG-014</i>	1.09±0.00 <sup>b</sup>	1.50±0.30 <sup>ab</sup>	2.15±0.41 <sup>a</sup>
瘤胃球菌属_UCG-010 <i>Ruminococcaceae_UCG-010</i>	0.63±0.00 <sup>Aa</sup>	0.36±0.00 <sup>Bb</sup>	0.64±0.00 <sup>Aa</sup>
瘤胃球菌属_UCG-005 <i>Ruminococcaceae_UCG-005</i>	0.33±0.00 <sup>b</sup>	0.48±0.00 <sup>ab</sup>	0.57±0.00 <sup>a</sup>
瘤胃球菌属_UCG-001 <i>Ruminococcaceae_UCG-001</i>	0.19±0.00 <sup>b</sup>	0.27±0.05 <sup>ab</sup>	0.46±0.09 <sup>a</sup>
瘤胃球菌属_UCG-002 <i>Ruminococcaceae_UCG-002</i>	0.20±0.00 <sup>Bc</sup>	0.13±0.00 <sup>Bb</sup>	0.41±0.00 <sup>Aa</sup>

续表 7

项目 Items	对照组 Control group	诱导组 Induction group	调控组 Regulatory group
克里斯滕森菌属 <i>Christensenellaceae_R-7_group</i>	4.18±0.04 <sup>Bb</sup>	3.04±0.23 <sup>Bc</sup>	5.21±0.33 <sup>Aa</sup>
乳杆菌属 <i>Lactobacillus</i>	0.34±0.00 <sup>Cc</sup>	4.43±0.23 <sup>Aa</sup>	1.50±0.33 <sup>Bb</sup>
梭菌属 <i>Clostridium_sensu_stricto_1</i>	1.75±0.00	1.64±0.24	1.22±0.11
解琥珀酸弧菌属 <i>Succiniclaticum</i>	1.32±0.00 <sup>b</sup>	1.44±0.23 <sup>b</sup>	3.18±0.47 <sup>a</sup>
链球菌属 <i>Streptococcus</i>	1.85±0.00	2.13±0.53	2.15±0.28
毛螺菌属 <i>Lachnospira</i>	0.42±0.00 <sup>Bb</sup>	0.92±0.03 <sup>ABab</sup>	1.26±0.02 <sup>Aa</sup>
乳球菌属 <i>Lactococcus</i>	0.07±0.00	0.12±0.00	0.09±0.00
真杆菌属 <i>Coprostanoligenes_group</i>	0.17±0.00 <sup>Bb</sup>	1.82±0.58 <sup>Aa</sup>	0.37±0.00 <sup>Bb</sup>
密螺旋体属_2 <i>Treponema_2</i>	0.36±0.00 <sup>Bc</sup>	0.56±0.00 <sup>Bb</sup>	0.84±0.00 <sup>Aa</sup>
密螺旋体属_2 <i>Treponema_2</i>	0.67±0.00 <sup>b</sup>	0.97±0.06 <sup>a</sup>	0.79±0.07 <sup>b</sup>
丁酸弧菌属_2 <i>Butyrivibrio_2</i>	0.70±0.00 <sup>a</sup>	0.44±0.00 <sup>b</sup>	0.42±0.00 <sup>b</sup>

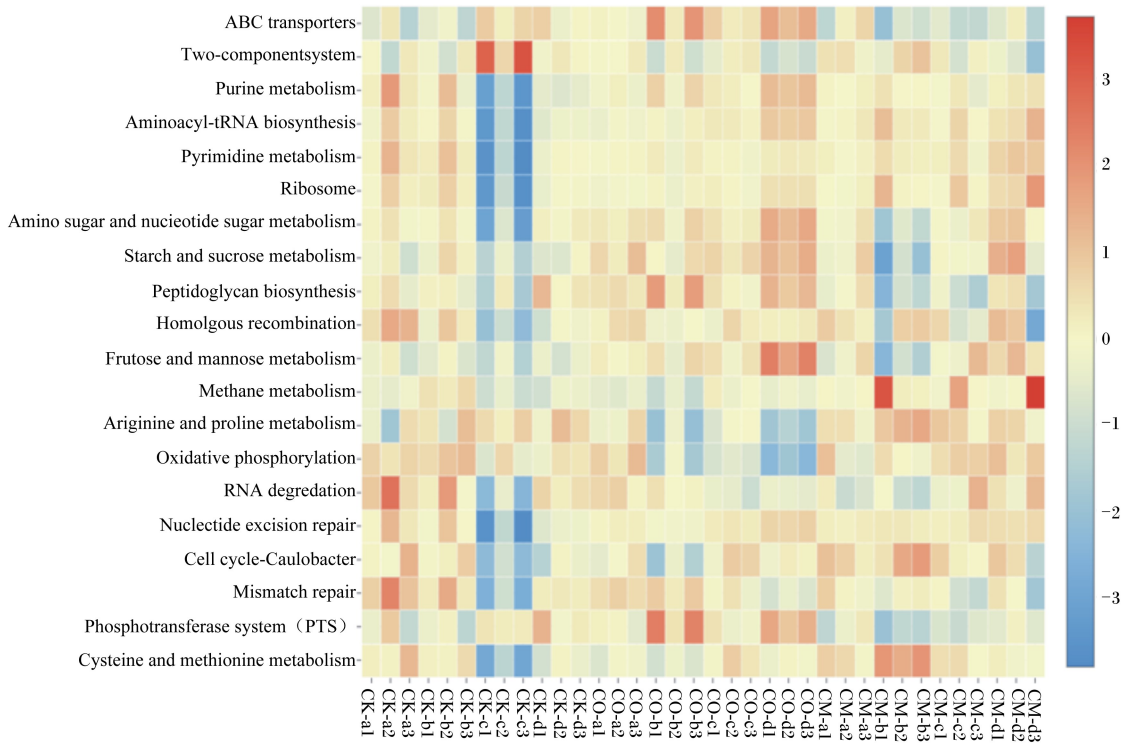
## 2.4 菌群功能预测

首先将 KEGG 数据库中已有基因组的原核生物 16S rRNA 序列与 SILVA 数据库中 16S rRNA 序列进行关联,然后将 KEGG 数据库已有的原核物种基因组进行序列打断,利用 UProC 对所有基因组的 KO 序列进行统计;最后利用 16S 的拷贝数对物种数目进行校正,最终实行 KEGG 预测以及 KO 丰度统计。由图 2 可知,诱导组奶牛瘤胃中参与淀粉和蔗糖代谢的细菌菌群丰度要高于对照组,调控组奶牛瘤胃中参与淀粉和蔗糖代谢的细菌菌群丰度明显降低,说明饲粮添加 MOS 可以降低奶牛瘤胃对淀粉的降解速率。

## 3 讨论

在瘤胃细菌菌群门水平上,低乳脂奶牛瘤胃中拟杆菌门的丰度增加,拟杆菌可以分解多糖<sup>[7]</sup>,李亚丹等<sup>[8]</sup>论述了拟杆菌 VPI-5482 具有 ECF-typeσ 因子,该因子可以使拟杆菌的基因表达受到环境因素的调节,拟杆菌基因组编码的外周蛋白 SusC 和 SusD 可以调节淀粉与细菌表面连接,达到降解淀粉的效果。添加 MOS 奶牛瘤胃中拟杆菌门的丰度较低乳脂奶牛显著降低,拟杆菌门丰度的降低,在一定程度上降低了瘤胃对淀粉的降解速率,对稳定奶牛瘤胃 pH 有一定的作用。厚壁菌门具有降解纤维素的功能。有研究表明,饲喂高谷物饲粮会导致厚壁菌门的丰度显著增加<sup>[9]</sup>,但

在本试验中,高精料诱导的低乳脂奶牛瘤胃中厚壁菌门的丰度较对照组并未发生显著的改变,厚壁菌门的丰度在添加 MOS 后显著增加,较低乳脂奶牛组提高了 22.25%,而且奶牛瘤胃中厚壁菌门的丰度超过了拟杆菌门,厚壁菌门丰度的增加提高了纤维素的降解率,有研究证明,外源添加功能性 MOS 可以提高奶牛瘤胃中纤维素降解菌的活性和数量,改善瘤胃微生物区系<sup>[10-11]</sup>,本研究中发现,添加 MOS 可以极显著增加纤维杆菌门的丰度,通过本研究可以总结出 MOS 可以提高瘤胃中厚壁菌门和纤维杆菌门的丰度,提高瘤胃中纤维素降解率,进而提高了牛奶的乳脂率。浮霉菌门是严格厌氧的革兰氏阴性细菌,刘冬英等<sup>[12]</sup>从制糖废水厌氧处理反应器的颗粒污泥中分离得到一株属于浮霉菌门的菌株,并发现该菌株可利用葡萄糖、麦芽糖、核糖等多种糖类作为唯一碳源,葡萄糖发酵的最终产物为乙酸和氢气,而且浮霉菌门与机体的健康有关系。刘志刚等<sup>[13]</sup>通过研究尼罗罗非鱼肠道菌群结构与链球菌病的相关性发现,健康尼罗罗非鱼的浮霉菌门的丰度显著低于发病组。本研究中高精料诱导的低乳脂奶牛瘤胃中浮霉菌门丰度的极显著增加,主要是由于在构建低乳脂奶牛模型过程中在奶牛的饲粮中添加玉米面,随着饲粮中淀粉含量占比增加,饲粮中碳水化合物含量增加,致使浮霉菌门的丰度增加。在低乳脂奶牛的饲粮中添加 MOS 之后浮霉菌门的丰度下降。



ABC transporters: ABC 转运蛋白; Two-componentsystem: 二组分系统; Purine metabolism: 嘌呤代谢; Aminoacyl-tRNA biosynthesis: 氨酰 tRNA 生物合成; Pyrimidine metabolism: 嘧啶代谢; Ribosome: 核糖体; Amino sugar and nucleotide sugar metabolism: 氨基糖和核苷酸糖代谢; Starch and sucrose metabolism: 淀粉和蔗糖代谢; Peptidoglycan biosynthesis: 肽聚糖生物合成; Homologous recombination: 同源重组; Fructose and mannose metabolism: 果糖和甘露糖代谢; Methane metabolism: 甲烷代谢; Arginine and proline metabolism: 精氨酸和脯氨酸代谢; Oxidative phosphorylation: 氧化磷酸化; RNA degradation: RNA 降解; Nucleotide excision repair: 核苷酸切除修复; Cell cycle-Caulobacter: 细胞周期-茎杆菌; Mismatch repair: 错配修复; Phosphotransferase system (PTS): 磷酸转移酶系统 (PTS); Cysteine and methionine metabolism: 半胱氨酸和蛋氨酸代谢。

CK-a1、CK-a2、CK-a3、CK-b1、CK-b2、CK-b3、CK-c1、CK-c2、CK-c3、CK-d1、CK-d2、CK-d3 为对照组样品; CO-a1、CO-a2、CO-a3、CO-b1、CO-b2、CO-b3、CO-c1、CO-c2、CO-c3、CO-d1、CO-d2、CO-d3 为诱导组样品; CM-a1、CM-a2、CM-a3、CM-b1、CM-b2、CM-b3、CM-c1、CM-c2、CM-c3、CM-d1、CM-d2、CM-d3 为调控组样品。CK-a1, CK-a2, CK-a3, CK-b1, CK-b2, CK-b3, CK-c1, CK-c2, CK-c3, CK-d1, CK-d2, CK-d3 were the samples in the control group. CO-a1, CO-a2, CO-a3, CO-b1, CO-b2, CO-b3, CO-c1, CO-c2, CO-c3, CO-d1, CO-d2, CO-d3 were the samples in induction group; CM-a1, CM-a2, CM-a3, CM-b1, CM-b2, CM-b3, CM-c1, CM-c2, CM-c3, CM-d1, CM-d2, CM-d3 were the samples in control group.

图 2 菌群功能注释热图

Fig.2 Heat map of flora function annotation

放线菌被认为是天然药物的重要来源之一,是由于放线菌能够产生丰富的活性物质,而且其代谢物质具有抗病毒、抗菌和抗肿瘤等活性,而且现如今发现的天然抗生素有 2/3 来源于放线菌,其被认为是新天然抗生素的重要来源<sup>[14-15]</sup>。本研究中在诱导乳脂下调的奶牛瘤胃中发现放线菌门的丰度显著增加,随着 MOS 的添加放线菌门的丰度略有降低。螺旋体门是一类很有特点的细菌,具有长的螺旋形盘绕的细胞。螺旋体门的密螺旋体属能与纤维素菌相互作用,可以参与纤维素的

降解<sup>[16-17]</sup>。但同时螺旋体门的密螺旋体属可以引起猪痢疾<sup>[18]</sup>。倪莹等<sup>[19]</sup>通过 16S rRNA 高通量测序技术研究发现,重度牙周炎患者的唾液中含有较高的螺旋体门。在本研究中发现,高精料诱导的低乳脂奶牛瘤胃中螺旋体门的丰度较对照组显著增加,添加 MOS 后螺旋体门的丰度较低乳脂奶牛降低,这种现象极有可能是因为 MOS 可以调节奶牛瘤胃细菌菌群结构,既提高了奶牛瘤胃对纤维素的降解率,又调控了瘤胃细菌菌群结构的合理性。据报道,黏胶球形菌门与纤维二糖的降解



有关<sup>[20-21]</sup>,郭威等<sup>[22]</sup>研究发酵玉米秸秆对绵羊瘤胃菌群结构的影响发现,黏胶球形菌门和纤维杆菌门均为绵羊的优势菌群。本研究高精料诱导的低乳脂奶牛瘤胃中黏胶球形菌门的丰度较对照组显著降低,添加 MOS 可以增加黏胶球形菌门的丰度,说明饲料中添加 MOS 可以缓解奶牛因饲料淀粉含量过高而引起的瘤胃纤维降解菌下降的现象,可以提高瘤胃对纤维素的降解率。

在瘤胃细菌菌群属水平上,普雷沃氏菌属是奶牛瘤胃的优势菌属,普雷沃氏菌属具有多种功能和多种基因型,普雷沃氏菌属包含不同的菌种,不同的菌种在瘤胃中的功能也不尽相同,Purushe 等<sup>[23]</sup>论述了布氏普雷沃氏菌和栖瘤胃普雷沃氏菌具有降解蛋白质、淀粉和寡糖的功能,同时也有研究发现了普雷沃氏菌属具有降解半纤维素的作用<sup>[24]</sup>。本试验中高精料诱导的低乳脂奶牛瘤胃中普雷沃氏菌属<sub>7</sub>和普雷沃氏菌属\_UCG-001 的丰度较对照组均增加,普雷沃氏菌属是瘤胃中主要的耗氢菌属,可以通过丙烯酸和琥珀酸途径发酵糖类物质产生丙酸<sup>[25-26]</sup>,奶牛在饲喂高精饲料导致亚急性瘤胃酸中毒(SARA)时,奶牛瘤胃中普雷沃氏菌属的丰度是正常奶牛的 1.5 倍<sup>[27]</sup>,本试验诱导期奶牛瘤胃中丙酸的含量极显著增加也进一步验证了普雷沃氏菌属具有降解淀粉的能力。本试验研究发现,在低乳脂奶牛饲料中添加 MOS 可以极显著降低普雷沃氏菌属<sub>1</sub>和普雷沃氏菌属<sub>7</sub>的丰度,同时通过对瘤胃细菌菌群功能预测发现,添加 MOS 可以明显降低参与淀粉代谢的菌群丰度。De Nardi 等<sup>[28]</sup>研究发现,在高精饲料中补充一定的有机酸和多酚可以降低短普雷沃氏菌(*Prevotella brevis*)的丰度,该研究表明适宜的饲料添加剂可以降低瘤胃对淀粉的降解率。普雷沃氏菌属<sub>1</sub>是瘤胃中普雷沃氏菌占比最多的菌属,普雷沃氏菌属<sub>1</sub>丰度的极显著降低导致瘤胃对淀粉的降解作用降低,对维持瘤胃 pH 具有一定的作用,同时也降低了瘤胃中丙酸的含量。低乳脂奶牛饲料添加 MOS 瘤胃中普雷沃氏菌属\_UCG-001 和普雷沃氏菌属\_UCG-003 的丰度均增加,其主要原因可能是普雷沃氏菌属\_UCG-001 和普雷沃氏菌属\_UCG-003 可以利用寡糖,MOS 的添加为这 2 种菌属提供了更多的发酵底物,具体的原因还需要进一步的研究。本试验在饲料中添加 MOS 可以提高低乳脂奶牛瘤胃中瘤胃球菌属的丰度,其中瘤

胃球菌属<sub>2</sub>、瘤胃球菌属\_NK4A214\_group 和瘤胃球菌属\_UCG-002 的丰度均极显著的增加,瘤胃球菌属是瘤胃中主要的纤维降解菌,本研究还发现添加 MOS 可以极显著提高瘤胃中真杆菌属的丰度,显著提高解琥珀酸菌属的丰度。有研究发现,与半纤维素降解有关的丁酸弧菌属的丰度因瘤胃总淀粉的含量增加而降低<sup>[29]</sup>,这与 Petri 等<sup>[30]</sup>的研究结果相一致,在本研究中,添加 MOS 对丁酸弧菌属<sub>2</sub>丰度的降低并无缓解作用。乳球菌属和乳杆菌属是瘤胃中降解淀粉的主要菌属,本试验低乳脂奶牛瘤胃中这 2 类菌属丰度均出现大幅度的增加,乳杆菌属和乳球菌属丰度的增加可分解淀粉产生大量的乳酸,大量乳酸的堆积导致瘤胃 pH 的下降,致使瘤胃中许多纤维降解菌的增殖受到了限制,乳酸的大量生成也会导致乙酸的含量下降,乳脂的合成也受到了一定程度的限制。在本研究中检测到较高丰度的理研菌属 RC9 肠道菌群,高精料饲料条件下,理研菌属的丰度增加。理研菌属 RC9 肠道菌群易受到饲料结构的影响,Pitta 等<sup>[31]</sup>研究发现,饲喂不同来源的干草显著影响理研菌属的丰度。以此推测 MOS 可以降低部分降解淀粉的普雷沃氏菌属的丰度,有利于瘤胃球菌属、真杆菌属和解琥珀酸菌属的增殖,提高瘤胃对纤维素的降解率,促进乙酸的合成,提高乳脂合成的前体物质。

## 4 结 论

低乳脂奶牛饲料添加 MOS 提高了瘤胃纤维降解菌的丰度,提高了瘤胃对纤维素的降解率;降低了瘤胃中产酸菌种的增殖,对提高瘤胃 pH 具有积极的作用;同时抑制了瘤胃中一些致病菌的繁殖;但对半纤维降解菌丁酸弧菌属<sub>2</sub>丰度的降低无缓解作用。对瘤胃菌群进行功能预测发现,低乳脂奶牛饲料添加 MOS 降低了参与淀粉和蔗糖代谢的菌群丰度。

## 参考文献:

- [1] 董国忠,周俊,张德广,等.瘤胃代谢异常产物对乳腺代谢的影响[M]//敖长金.奶牛乳腺对乳成分前体物的摄取与利用.北京:中国农业出版社,2015:241-288.
- [2] 柳君辉,董国忠,田可.高精料饲料对反刍动物胃肠道微生物区系的影响及调控[J].动物营养学报,

- 2018,30(12):4821-4827.
- [3] WEIMER P J.泌乳奶牛在低乳脂综合症下瘤胃微生物群落结构的变化[J].姜雅慧,译.中国畜牧兽医,2011,38(11):230.
- [4] PITTA D W, INDUGU N, VECCHIARELLI B, et al. Alterations in ruminal bacterial populations at induction and recovery from diet-induced milk fat depression in dairy cows [J]. Journal of Dairy Science, 2018, 101(1):295-309.
- [5] 赵臣,陈志龙,曾燕霞,等.不同精粗比日粮添加甘露寡糖对绵羊瘤胃纤维降解率的影响[J].中国畜牧兽医,2015,42(12):3210-3216.
- [6] HEINRICHS A J, JONES C M, HEINRICHS B S. Effects of mannan oligosaccharide or antibiotics in neonatal diets on health and growth of dairy calves [J]. Journal of Dairy Science, 2003, 86(12):4064-4069.
- [7] BENCHAAR C, HASSANAT F, GERVAIS R, et al. Methane production, digestion, ruminal fermentation, nitrogen balance, and milk production of cows fed corn silage-or barley silage-based diets [J]. Journal of Dairy Science, 2014, 97(2):961-974.
- [8] 李亚丹,任宏伟,吴彦彬,等.拟杆菌与肠道微生态[J].微生物学通报,2008,35(2):281-285.
- [9] YU Y, LEE C, KIM J, et al. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction [J]. Biotechnology and bioengineering, 2005, 89(6):670-679.
- [10] BÄACKHED F, DING H, WANG T, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(44):15718-15723.
- [11] FERNANDO S C, PURVIS II H T, 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.
- [12] 刘冬英,刘奕,门学慧,等.浮霉菌门严格厌氧产氢细菌(*Thermopirellula anaerolimosa*)的分离及其生理特性[J].微生物学报,2012,52(8):994-1001.
- [13] 刘志刚,卢迈新,可小丽,等.尼罗罗非鱼肠道及养殖环境中菌群结构与链球菌病的相关性[J].水产学报,2018,42(10):1635-1647.
- [14] 郑有坤,刘凯,熊子君,等.药用植物内生放线菌多样性及天然活性物质研究进展[J].中草药,2014,45(14):2089-2099.
- [15] 刘娟,刘晓飞,关统伟,等.中华蜂体内放线菌的分离、多样性及抗菌活性研究[J].微生物学通报,2014,41(12):2410-2422.
- [16] SHINKAI T, UEKI T, KOBAYASHI Y. Detection and identification of rumen bacteria constituting a fibrolytic consortium dominated by *Fibrobacter succinogenes* [J]. Animal Science Journal, 2010, 81(1):72-79.
- [17] KOIKE S, PAN J, SUZUKI T, et al. Ruminal distribution of the cellulolytic bacterium *Fibrobacter succinogenes* in relation to its phylogenetic grouping [J]. Animal Science Journal, 2004, 75(5):417-422.
- [18] 孙锡宝.猪密螺旋体属痢疾的流行、诊断和防治措施[J].兽医导刊,2016(20):111.
- [19] 倪莹,李宁,李蕙兰,等.高龋均和重度牙周炎患者口腔微生物多样性差异的研究[J].牙体牙髓牙周病学杂志,2018,28(12):695-699,740.
- [20] ZOETENDAL E G, PLUGGE C M, AKKERMANS A D L, et al. *Victivallis vadensis* gen. nov., sp. nov., a sugar-fermenting anaerobe from human faeces [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, 53(1):211-215.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] MATSUI H, OGATA K, TAJIMA K, et al. Phenotypic characterization of polysaccharidases produced by four *Prevotella* type strains [J]. Current Microbiology, 2000, 41(1):45-49.
- [25] FLINT H J, BAYER E A, RINCON M T, et al. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis [J]. Nature Reviews Microbiology, 2008, 6(2):121-131.
- [26] NEWBOLD C J, LÓPEZ S, NELSON N, et al. Propionate precursors and other metabolic intermediates as possible alternative electron acceptors to methanogenesis in ruminal fermentation *in vitro* [J]. British Journal of Nutrition, 2005, 94(1):27-35.

- [27] MICKDAM E, KHIAOSA-ARD R, METZLER-ZEBELI B U, et al. Rumen microbial abundance and fermentation profile during severe subacute ruminal acidosis and its modulation by plant derived alkaloids *in vitro* [J]. *Anaerobe*, 2016, 39: 4–13.
- [28] DE NARDI R, MARCHESINI G, LI S C, et al. Metagenomic analysis of rumen microbial population in dairy heifers fed a high grain diet supplemented with dicarboxylic acids or polyphenols [J]. *BMC Veterinary Research*, 2016, 12: 29.
- [29] GRILLI D J, CERÓN M E, PAEZ S, et al. Isolation of *Pseudobutyrvibrio ruminis* and *Pseudobutyrvibrio xy-*  
*lanivorans* from rumen of Creole goats fed native forage diet [J]. *Folia Microbiologica*, 2012, 58(5): 367–373.
- [30] PETRI R M, SCHWAIGER T, PENNER G B, et al. Changes in the rumen epimural bacterial diversity of beef cattle as affected by diet and induced ruminal acidosis [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(12): 3744–3755.
- [31] PITTA D W, PINCHAK W E, DOWD S E, et al. Rumen bacterial diversity dynamics associated with changing from bermudagrass hay to grazed winter wheat diets [J]. *Microbial Ecology*, 2010, 59(3): 511–522.

## Regulation of Mannan Oligosaccharides on Rumen Bacterial Flora Induced by High Concentrate in Low Milk Fat Dairy Cows

XU Xiaofeng GUO Tingting GUO Cheng JI Wulong ZHANG Lili

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

**Abstract:** This experiment was aimed to reveal the regulation of mannan oligosaccharides (MOS) on the rumen microbial flora structure of concentrate-induced low-fat dairy cows. Four Chinese Holstein dairy cows with similar lactation stages and the same parity were selected. A self-controlled trials were used, dairy cows fed a basal diet (control group), used starch to induce low milk fat (induction group), and then added MOS to regulate rumen fermentation and milk fat (regulatory group). The results showed that MOS affected the rumen microbial flora structure of concentrate-induced low-fat dairy cows. At phylum level, compared with induction group, the abundance of Bacteroidetes ( $P < 0.05$ ), Spirochaetae ( $P > 0.05$ ) and Actinobacteria ( $P > 0.05$ ) were reduced in the rumen of low-fat dairy cows; the abundance of Firmicutes was significantly increased ( $P < 0.05$ ), and significantly higher than that in control group ( $P < 0.05$ ); the abundance of Fibrobacteres was significantly increased compared with the induction group and control group ( $P < 0.01$ ). At genus level, compared with induction group, the abundance of *Prevotella\_1*, *Prevotella\_7*, *Lactobacillus* and *Lactococcus* in regulatory group were significantly reduced ( $P < 0.01$ ); the abundances of *Prevotella\_UCG-001* and *Prevotella\_UCG-003* were increased, and the abundance of *Prevotella\_UCG-001* was significantly higher than that in the control group ( $P < 0.01$ ), the abundance of *Prevotella\_UCG-003* was significantly higher than that in the control group and induction group ( $P < 0.01$ ); the abundance of *Succinlasticum* was significantly increased ( $P < 0.05$ ). Functional prediction of the rumen flora revealed that low-fat dairy cows supplemented with MOS reduced the abundance of the flora involved in starch and sucrose metabolism. It can be seen that the addition of MOS can regulate the structure of the bacterial flora in the rumen, alleviate the decrease in the abundance of the fiber-degrading bacteria caused by feeding a large amount of starch, and has a certain effect on improving the degradation rate of cellulose in the rumen. Reducing the abundance of acid-producing bacteria has a positive effect on stabilizing the rumen pH. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2019, 31(11): 5245-5255]

**Key words:** dairy cows; low milk fat; mannan oligosaccharide; rumen flora; regulation