

不同氮利用率山羊瘤胃细菌结构与组成的差异

李琼 王立志* 王之盛 薛白 彭全辉

(四川农业大学动物营养研究所,动物抗病营养教育部重点实验室,成都 611130)

摘要: 本试验旨在研究不同氮利用率山羊瘤胃细菌结构与组成的差异。以 30 只山羊作为试验动物,通过代谢试验,筛选出高氮利用率组(HNU组)和低氮利用率组(LNU组)的山羊个体。屠宰采集 HNU 组、LNU 组每只山羊瘤胃内容物,用高通量测序技术分析比较组间瘤胃细菌结构与组成的差异性,并用实时荧光定量 PCR 技术对 7 种蛋白质分解菌进行定量分析和比较。结果表明:1)30 只山羊对饲料氮利用率存在明显的个体差异,HNU 组和 LNU 组的平均氮利用率分别为 $(56.68 \pm 5.54)\%$ 和 $(34.25 \pm 4.21)\%$,组间差异极显著($P < 0.01$)。2)HNU 组和 LNU 组瘤胃微生物的结构在属水平上有明显差异,HNU 组普雷沃氏菌属 1(*Prevotella* 1)、解琥珀酸菌属(*Succiniclasticum*)、p-1088-a5_gut_group 的相对丰度显著低于 LNU 组($P < 0.05$),毛螺菌科 XPB_1014 肠道群(*Lachnospiraceae* XPB_1014_group)、瘤胃球菌属 1(*Ruminococcus* 1)、瘤胃球菌科 UCG_004(*Ruminococcaceae* UCG_004)、瘤胃杆菌属(*Ruminobacter*)、Family_X III_UCG_002、厌氧支原体属(*Anaeroplasma*)的相对丰度显著高于 LNU 组($P < 0.05$)。3)相关分析显示宿主氮利用率与 *Ruminococcus* 1、*Ruminobacter*、*Anaeroplasma* 的相对丰度呈显著正相关($P < 0.05$)。4)HNU 组中溶纤维丁酸弧菌(*Butyrivibrio fibrisolvens*)、产琥珀酸丝状杆菌属(*Fibrobacter succinogens*)和瘤胃球菌属_sp._HUN007(*Ruminococcus*_sp._HUN007)数量显著高于 LNU 组($P < 0.05$),而栖息瘤胃普雷沃氏菌(*Prevotella ruminicola*)、牛链球菌(*Streptococcus bovis*)、溶糊精琥珀酸弧菌(*Succinivibrio dextrinsolvens*)和黄色瘤胃球菌(*Ruminococcus flavefaciens*)数量在 2 组间没有显著差异($P > 0.05$)。综上所述,不同氮利用率山羊瘤胃细菌的结构与组成存在显著差异。

关键词: 山羊;氮利用率;瘤胃细菌;高通量测序

中图分类号:S826

文献标识码:A

文章编号:1006-267X(2019)08-3651-13

畜牧业的发展在提高人们生活质量的同时也带来了严重的环境污染。由于畜禽对饲料氮的利用率较低,动物生产中粪氮、尿氮的大量排放造成的环境污染尤其严重。相对于单胃动物,反刍动物对饲料中氮的利用率更低^[1]。要治理动物生产造成的氮污染,最理想的途径就是提高动物对饲料氮的利用率,从源头上减少粪氮、尿氮的排放量。Harrison 等^[2]和 Calsamiglia 等^[3]研究表明,在

不同的试验条件下,反刍动物的饲料氮利用率变异范围很大,这说明其还有很大的提高空间。虽然前人做了很多努力,但截至目前,反刍动物对饲料氮的利用率整体并没有显著提高^[4-5],这说明人们并没有全面认识和掌握影响反刍动物氮代谢的关键因素。因此,本试验通过对对比氮利用率不同的山羊瘤胃细菌结构与组成的差异性,研究了瘤胃细菌与反刍动物氮利用率的关系,以期促进人

收稿日期:2019-02-18

基金项目:四川省学术带头人培养项目(03120244)

作者简介:李琼(1993—),女,湖北孝感人,硕士研究生,从事反刍动物胃肠道微生物研究。E-mail: 1471402850@qq.com

*通信作者:王立志,副教授,硕士生导师,E-mail: wanglizhi08@aliyun.com

们对影响反刍动物氮利用率因素的进一步认识,为以后通过调控瘤胃微生物来提高动物氮利用率奠定理论基础。

1 材料与方 法

1.1 试验动物与饲料

试验动物为 30 只 10 月龄左右、平均体重为 (24.47±0.38) kg 的雌性努比亚黑山羊。试验期间所有羊只单笼饲养,自由饮水,饲料参照我国《肉羊饲养标准》(NY/T 816—2004)(体重 25 kg,日增重 0.10 kg)进行配制,饲料组成及营养水平见表 1。每日饲喂前将精料和粗料按比例称量,并混合均匀。每日 07:30、13:30 和 18:30 分别饲喂 1 次,每日饲喂量以山羊活体重的 4% 供给^[6]。每天对每只羊的饲喂量、食入量和剩料量进行详细记录。

表 1 饲料组成及营养水平(干物质基础)

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

项目 Items	含量 Content
原料 Ingredients	
玉米 Corn	38.47
豆粕 Soybean meal	4.50
小苏打 NaHCO ₃	0.45
食盐 NaCl	0.45
碳酸钙 CaCO ₃	0.08
磷酸氢钙 CaHPO ₄	0.60
预混料 Premix ¹⁾	0.45
苜蓿草粉 Alfalfa meal	20.00
羊草 <i>Leymus chinensis</i>	35.00
合计 Total	100.00
营养水平 Nutrient levels ²⁾	
代谢能 ME/(MJ/kg)	9.34
粗蛋白质 CP	9.71
钙 Ca	0.52
磷 P	0.33
酸性洗涤纤维 ADF	24.07
中性洗涤纤维 NDF	36.11

¹⁾ 预混料为每千克饲料提供 Premix provided the following per kg of the diet: Fe (as ferrous sulfate) 40 mg, Cu (as copper sulfate) 10 mg, Zn (as zinc sulfate) 70 mg, Mn (as manganese sulfate) 40 mg, VA 2 937 IU, VD 343 IU, VE 30 IU。

²⁾ 代谢能为计算值,其余为实测值。ME was a calculated value, while the others were measured values.

1.2 试验设计与样品采集

试验由 30 d 预试期和 6 d 代谢试验期组成。代谢试验的第 1 天晨饲前,对所有试验羊进行称重,代谢试验期间收集每只羊排泄的全部粪尿,试验结束后将 6 d 粪尿样品均匀混合。代谢试验结束后的次日晨饲前对羊只进行颈静脉采血,抗凝处理后制备血浆,-20 ℃ 保存备用。随后将山羊迅速屠宰,分离出瘤胃,测定瘤胃内容物 pH 后,迅速用无菌容器采集每只山羊适量的瘤胃内容物,一部分于-80 ℃ 保存,用于测定细菌结构与组成;另一部分经 4 层纱布过滤,将滤液置于无菌的离心管中,放入液氮中暂时保存,取样结束后将其转移到-80 ℃ 冰箱中保存,用于瘤胃发酵指标的测定。根据采食量,饲料、粪便和尿液样品中的氮含量计算每只山羊对饲料的氮利用率^[7],计算公式如下:

$$\text{氮利用率}(\%) = 100 \times (\text{食入的饲料氮} - \text{粪氮} - \text{尿氮}) / \text{食入的饲料氮}$$

然后统计 30 只山羊对饲料氮利用率的平均值和标准差,参照 Ramos 等^[8]的方法,将氮利用率大于平均值+0.5 倍标准差的山羊个体作为高氮利用率组(HNU 组),氮利用率小于平均值-0.5 倍标准差的个体作为低氮利用率组(LNU 组),并对 HNU 组和 LNU 组的样品进行分析检测。

1.3 样品分析

采用 Roche Cobas-8000c702 型自动生化分析仪测定血浆样品总蛋白(PT)、白蛋白(ALB)、尿素(UR)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)含量及谷丙转氨酶(GPT)、谷草转氨酶(GOT)活性。

粪便样品中干物质(DM)、粗灰分(Ash)、粗蛋白质(CP)、中性洗涤纤维(NDF)、酸性洗涤纤维(ADF)、钙(Ca)、磷(P)和粗脂肪(EE)含量的测定参照张丽英^[9]的方法进行。尿液中 CP 含量的测定参照粪便样品的测定方法。

瘤胃液中氨态氮(NH₃-N)、微生物蛋白质(MCP)和挥发性脂肪酸(VFAs)含量的测定:从-80 ℃ 冰箱中取出 50 mL 瘤胃液滤液样品,在冰上进行解冻,然后 4 ℃ 离心(12 000×g) 10 min,取上清液。采用碱性次氯酸钠-苯酚比色法测定 NH₃-N 含量^[10],采用考马斯亮蓝法测定 MCP 含量^[11],采用气相色谱仪(Varian CP-3 800,美国)

测定 VFAs(乙酸、丙酸和丁酸)含量^[12]。

1.4 细菌 16S rDNA 高通量测序

瘤胃内容物样品放置于冰上解冻后,用无菌的磷酸缓冲盐溶液(PBS)反复冲洗内容物于纱布上,通过漏斗将冲洗液引入新的无菌离心管中,将得到的冲洗液 4 ℃离心(10 000×g)10 min,收集沉淀,用 TIANamp Bacteria DNA Ki[天根生化科技(北京)有限公司]提取瘤胃微生物总 DNA,具体步骤参照试剂盒说明书进行。用带有 barcode 的细菌通用引物 515F 和 806R^[13],以获得的 DNA 为模板,对细菌 16S rRNA 的 V4 高变区进行 PCR 扩增,扩增得到的产物用 Illumina's HiSeq 300PE 平台进行高通量测序。

针对高通量测序所获得的片段,经纯化、质控,筛选掉那些低质量的序列,比如平均碱基质量值小于 Q25、未知碱基数大于 6、长度小于 200 bp 和大于 500 bp 的序列,然后调用 Usearch V7.0 去除嵌合体^[14];得到高质量的片段后,在序列相似度大于 97%的基础上,用 Uclust 方法和 Furthest 聚类算法聚类为操作分类单元(operational taxonomic units, OTU),然后在每个 OTU 的序列中选取相对丰度最高的序列作为该 OTU 的代表序列;将代表序列与 SILVA (<http://www.arb-silva.de/>) 的 SSUrRNA 数据库中的参考序列进行比对^[15-16],最终生成 OTU 物种注释表和各分类水平的物种相对丰度表。在上述数据分析的同时,使用 QIIME V1.8.0 软件计算 alpha 多样性指数;用 QIIME V1.8.0 软件计算样品间的 Unifrac 距离,并利用 R 软件绘制样品间的主坐标分析(PCoA)图。

1.5 瘤胃中蛋白质分解菌的实时荧光定量(real-time)PCR 分析

用 real-time PCR (Bio-Rad CFX96) 对瘤胃内容物样品中产琥珀酸丝状杆菌(*Fibrobacter succinogenes*)、溶纤维丁酸弧菌(*Butyrivibrio fibrisolvens*)、栖瘤胃普雷沃氏菌(*Prevotella ruminicola*)、溶糊精琥珀酸弧菌(*Succinivibrio dextrinosolvens*)、黄色瘤胃球菌(*Ruminococcus flavefaciens*)、牛链球菌(*Streptococcus bovis*)和瘤胃球菌属_sp._HUN007(*Ruminococcus_sp._HUN007*) 7 个与蛋白质降解相关的细菌进行定量分析。PCR 的反应体系为 25.0 μL(表 2)。参照 Stubner^[17]的方法,用含有目的片段的质粒作为标准质粒,绘制标准曲线。Real-time PCR 引物见表 3。

表 2 Real-time PCR 反应体系
Table 2 Real-time PCR reaction system μL

试剂 Reagents	加样体积 Sample volume
SsoFast™ Eva Green® Supermix	12.5
上游引物 Forward primer	1.0
下游引物 Reverse primer	1.0
DNA 模板 DNA template	5.0
双蒸水 ddH ₂ O	5.5
合计 Total	25.0

PCR 扩增程序:98 ℃预变性 30 s,1 个循环;95 ℃变性 5 s,58 ℃退火 5 s,72 ℃延伸 5 s,40 个循环;1 step 熔解曲线信号采集。荧光数据采集在延伸结束时进行。

表 3 Real-time PCR 引物
Table 3 Primers of real-time PCR

项目 Items	引物序列 Primer sequences (5'—3')	参考文献 References
瘤胃球菌属_sp._HUN007 <i>Ruminococcus_sp._HUN007</i>	上游:AGCGGGACTGTAAGTCAGA 下游:ACGCATTTACCCGCTACACT	*
产琥珀酸丝状杆菌 <i>Fibrobacter succinogenes</i>	上游:GGCGGGATTGAATGTACCTTGAGA 下游:TCCGCCTGCCCTGAACTATC	*
溶纤维丁酸弧菌 <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	上游:TAACATGAGAGTTTGATCCCTGGCTC 下游:CGTTACTACCCCCCGTCCGC	[18]
栖瘤胃普雷沃氏菌 <i>Prevotella ruminicola</i>	上游:GAAAGTCGATTATGCTCTATGTTG 下游:CATCCTATAGCGGTAAACCTTTGG	[19]
溶糊精琥珀酸弧菌 <i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>	上游:TAGGAGCTTGTCGATAGTATGG 下游:CTCACTATGTCAAGGTCAGGTAAGG	[19]

续表 3

项目 Items	引物序列 Primer sequences (5'—3')	参考文献 References
黄色瘤胃球菌 <i>Ruminococcus flavefaciens</i>	上游:CGAACGGAGATAATTTGAGTTTACTTAGG 下游:CGGTCTCTGTATGTTATGAGGTATTACC	[19]
牛链球菌 <i>Streptococcus bovis</i>	上游:TTCCTAGAGATAGGAAGTTTCTTCGG 下游:ATGATGGCAACTAACAATAGGGGT	[20]

* :参考本试验高通量测序所获得的相应序列自行设计 Refer to the corresponding sequences obtained by high-throughput sequencing of this experiment.

1.6 数据统计与分析

数据用 SPSS 19.0 中两样本非参数检验进行组间差异显著性检验。 $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。用 SPSS 19.0 中的 Spearman 等级相关 (Spearman rank correlation) 对山羊的氮利用率与组间有显著差异微生物的相对丰度进行相关性分析, $P < 0.05$ 表示两者存在显著相关关系。

2 结果与分析

2.1 氮利用率

30 只试验羊对饲料的氮利用率平均值为

(45.62±9.89)%, 变异范围为 20.71%~67.47%, 变异系数 (CV) 为 26.81%。用“试验设计”中所描述的分组方法, 从群体中共挑选出 HNU 组山羊 8 只, LNU 组山羊 7 只, 由表 4 可知, 2 组饲料氮利用率分别为 (56.68±5.54)% 和 (34.25±4.21)%, 经显著性检验, 组间差异极显著 ($P < 0.01$)。

2.2 饲料营养物质表观消化率差异

由表 5 可知, HNU 组和 LNU 组之间饲料 DM、Ash、OM、EE、ADF 和 NDF 的表观消化率差异均不显著 ($P > 0.05$)。HNU 组饲料 CP 的表观消化率显著高于 LNU 组 ($P < 0.05$)。

表 4 HNU 组和 LNU 组山羊的氮利用率

Table 4 Nitrogen utilization of goats in HNU group and LNU group

项目 Items	编号 Number	摄入氮 Nitrogen intake/ (kg/d)	粪氮 Fecal nitrogen/ (kg/d)	尿氮 Urinary nitrogen/ (kg/d)	氮利用率 Nitrogen utilization/%
高氮利用率组 HNU group	R1	0.321 6	0.097 6	0.058 6	51.42
	R2	0.476 4	0.149 5	0.077 0	52.46
	R3	0.584 2	0.215 2	0.062 0	52.56
	R4	0.318 6	0.084 8	0.064 0	53.29
	R5	0.430 9	0.118 4	0.081 9	53.53
	R6	0.423 4	0.134 6	0.032 5	60.55
	R7	0.386 0	0.114 4	0.027 8	62.18
	R8	0.360 5	0.079 4	0.037 8	67.47
平均值 Average value					56.68±5.54
低氮利用率组 LNU group	R1	0.530 8	0.162 9	0.224 7	39.63
	R2	0.485 3	0.189 6	0.153 9	39.15
	R3	0.428 9	0.174 1	0.108 7	37.72
	R4	0.420 9	0.144 6	0.127 2	37.17
	R5	0.425 4	0.160 1	0.107 2	29.24
	R6	0.525 8	0.162 6	0.164 8	26.97
	R7	0.525 8	0.168 2	0.151 8	20.71
平均值 Average value					34.25±4.21

摄入氮、粪氮和尿氮是 6 d 代谢试验数据的平均值。

Nitrogen intake, fecal nitrogen and urinary nitrogen are the average values of six days of metabolic test data.

表 5 饲料营养物质表观消化率差异

Table 5 Difference of nutrient apparent digestibility in diets

%

项目 Items	组别 Groups		P 值 P-value
	LNU (<i>n</i> = 7)	HNU (<i>n</i> = 8)	
干物质 DM	71.59±4.00	71.22±3.42	0.852
粗灰分 Ash	55.54±7.12	55.98±5.31	0.895
粗蛋白质 CP	63.38±5.61	70.39±4.35	0.017
粗脂肪 EE	68.49±6.84	67.58±3.89	0.763
中性洗涤纤维 NDF	63.12±6.17	63.31±4.52	0.949
酸性洗涤纤维 ADF	51.42±8.80	48.09±9.69	0.497

2.3 血浆生化指标差异

由表 6 可知, HNU 组的血浆 HDL-C 含量显著高于 LNU 组 ($P < 0.05$); HNU 组和 LNU 组之间血

浆 TP、ALB、UR、TC、TG、LDL-C 含量及 GPT、GOT 活性差异均不显著 ($P > 0.05$)。

表 6 血浆生化指标差异

Table 6 Differences of plasma biochemical indexes

项目 Items	组别 Groups		P 值 P-value
	LNU (<i>n</i> = 7)	HNU (<i>n</i> = 8)	
总蛋白 TP/(g/L)	71.30±5.51	74.48±2.52	0.165
白蛋白 ALB/(g/L)	30.86±3.42	30.43±1.48	0.750
谷丙转氨酶 GPT/(U/L)	22.80±3.53	18.74±5.16	0.103
谷草转氨酶 GOT/(U/L)	68.77±8.10	65.06±14.12	0.552
尿素 UR/(mmol/L)	5.54±1.04	5.07±0.78	0.338
总胆固醇 TC/(mmol/L)	1.78±0.38	2.11±0.37	0.112
甘油三酯 TG/(mmol/L)	0.35±0.19	0.25±0.14	0.225
高密度脂蛋白胆固醇 HDL-C/(mmol/L)	1.21±0.12	1.43±0.22	0.034
低密度脂蛋白胆固醇 LDL-C/(mmol/L)	0.59±0.27	0.72±0.18	0.292

2.4 瘤胃发酵指标差异

由表 7 可知, HNU 组的瘤胃液 pH 显著高于 LNU 组 ($P < 0.05$), HNU 组的瘤胃液 MCP 含量极显著高于 LNU 组 ($P < 0.01$), HNU 组的瘤胃液

$\text{NH}_3\text{-N}$ 含量极显著低于 LNU 组 ($P < 0.01$), HNU 组的瘤胃液丙酸含量显著低于 LNU 组 ($P < 0.05$); HNU 组的瘤胃液乙酸、丁酸含量和乙酸/丙酸均低于 LNU 组, 但差异不显著 ($P > 0.05$)。

表 7 瘤胃发酵指标差异

Table 7 Differences of rumen fermentation indexes

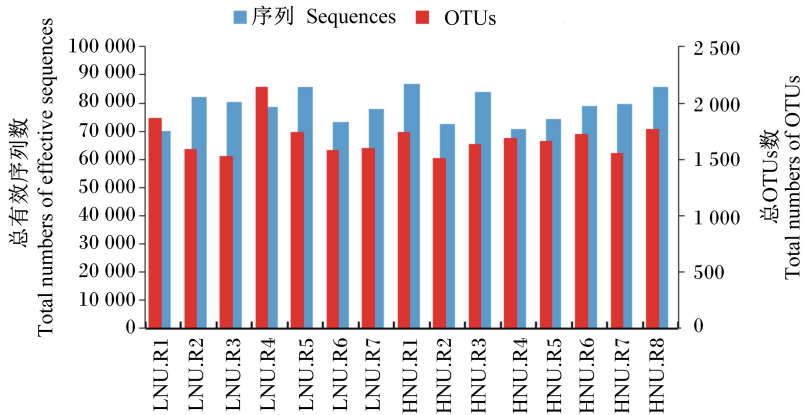
项目 Items	组别 Groups		P 值 P-value
	LNU (<i>n</i> = 7)	HNU (<i>n</i> = 8)	
pH	6.13±0.22	6.41±0.24	0.034
氨态氮 $\text{NH}_3\text{-N}$ /(mg/dL)	20.89±4.10	4.10±1.81	<0.001
微生物蛋白质 MCP/(mg/dL)	17.89±1.21	20.11±0.73	<0.001
乙酸 Acetate/(mmol/L)	30.40±3.66	26.59±8.80	0.275
丙酸 Propionic/(mmol/L)	10.87±1.02	9.05±3.19	0.016
丁酸 Butyrate/(mmol/L)	8.16±1.68	7.80±2.24	0.960
乙酸/丙酸 Acetate/propionic	2.82±0.44	2.74±0.86	0.203

2.5 微生物结构与组成的差异分析

2.5.1 有效序列和 OTUs 分布

本次测序,从 15 个瘤胃样品中共检测到 1 180 198 条高质量的序列,平均每个样品

(78 679.87±5 548.27) 条;经>97%相似性聚类后,共得到 25 356 个 OTU,所有样本共享的 OTU 有 700 个(图 1)。



LNU:低氮利用率组 low nitrogen utilization group;HNU:高氮利用率组 high nitrogen utilization group;R1~R8:样品编号 sample number。下图同。The same as below.

图 1 15 只山羊瘤胃获得的总有效序列数和总 OTUs 数

Fig.1 Total numbers of effective sequences and total numbers of OTUs obtained from rumen of 15 goats

2.5.2 Alpha 多样性分析

随机抽取一定测序量的数据,并对这些序列聚类得到的 OTUs 数目进行统计,然后以 2 组山羊抽取的序列数与对应的物种数构建稀释曲线。从图 2 的稀释曲线可以看出,每条稀释曲线均趋于平缓,最终达到了平台期,说明本研究所采集的瘤胃内容物样本均能够覆盖绝大多数的菌群种类。

观察到的物种指数 (observed species index)、Shannon 指数、Simpson 指数、Chao1 指数、ACE 指数、覆盖率、PD whole tree 指数等 alpha 多样性指数的计算结果见表 8。虽然 HNU 组的观察到的物种指数、Chao1 指数、ACE 指数、PD whole tree 指数有低于 LNU 组的趋势,但 2 组之间各 α 多样性指数差异均不显著 ($P>0.05$)。

2.5.3 β 多样性分析

根据样品间的非加权遗传距离 (Unweighted unfrac-distance),用主坐标分析对样品的相似性进行分析,结果如图 3 所示。图中 2 点间距离值越小代表样品间微生物群落的相似度就越高,距离值越大则代表相似度就越低。从图中可以看出,HNU 组样品聚集度高,而 LNU 组样品则较为分散。

从图 4 各组的 ANOSIM 统计分析图可以看出, $R = 0.147 > 0$,说明组间差异大于组内; $P = 0.015 < 0.05$,说明组间有显著差异。

2.5.4 菌群的结构与组成

本次测序,从 15 个瘤胃样品中共检测到了 23 个菌门。拟杆菌门和厚壁菌门占整个瘤胃微生物的 90% 左右,其中拟杆菌门 (HNU 组平均值为

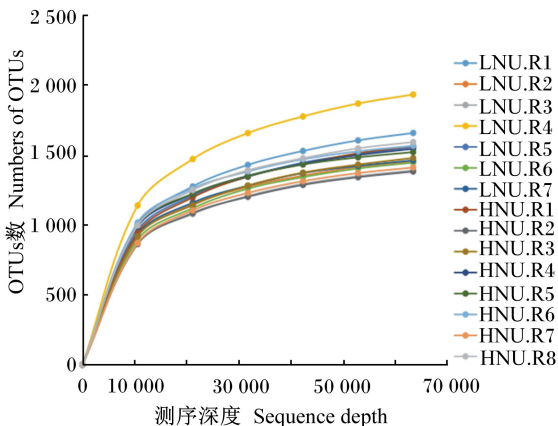


图 2 各样品的稀释曲线

Fig.2 Rarefaction curves of each sample

61.37%, LNU 组平均值为 59.91%) 的相对丰度最高, 厚壁菌门位居第二 (HNU 组平均值为 32.11%, LNU 组平均值为 30.75%) (图 5)。在属水平上共注释到了 239 个菌属, 相对丰度最高的属为普雷沃菌属 1 (*Prevotella* 1) (HNU 组 12.02%, LNU 组 17.63%), 其次为理研菌科 RC9 肠道群 (*Rikenellaceae* RC9_gut_group) (HNU 组 11.71%, LNU 组 10.16%), 约 38% 的序列为未知序列, 未能得到注释。LNU 组中 *Prevotella* 1 和解琥珀酸菌属 (*Succiniclasicum*) 的相对丰度显著高于 HNU 组 ($P < 0.05$), 而瘤胃球菌属 1 (*Ruminococcus* 1)、毛螺菌科 XPB_1014 肠道群 (*Lachnospiraceae* XPB_1014_group)、瘤胃球菌科 UCG_004 (*Ruminococcaceae* UCG_004) 和瘤胃杆菌属 (*Ruminobacter*) 的相对丰度则显著低于 HNU 组 ($P < 0.05$); 另外, 还有一

些相对丰度比较低的微生物在组间也存在显著差异 ($P < 0.05$), 具体见表 9。对这些组间有显著差异的微生物, 用其相对丰度与山羊的氮利用率做相关性分析, 结果发现, 有 3 个纲: 梭菌纲 (*Clostridia*)、甲烷微菌纲 (*Methanomicrobia*)、未鉴定拟杆菌门 (*unidentified Firmicutes*); 2 个目: 梭菌目 (*Clostridiales*)、甲烷八叠球菌目 (*Methanosarcinales*); 3 个科: 拟杆菌科 S24-7 (*Bacteroidales* S24-7_group)、瘤胃球菌科 (*Ruminococcaceae*)、酸杆菌科 (*Acidaminococcaceae*); 7 个属: *Ruminococcus* 1、*Ruminobacter*、*Ruminococcaceae* UCG_004、厌氧支原体属 (*Anaeroplasmata*)、*Succiniclasicum*、Possible genus_Sk018、*Lachnospiraceae* XPB_1014_group 与宿主氮利用率存在显著相关关系 ($P < 0.05$)。

表 8 各组的 alpha 多样性指数
Table 8 Alpha diversity indexes of each group

alpha 多样性指数 Alpha diversity index	组别 Groups		P 值 P-value
	LNU ($n=7$)	HNU ($n=8$)	
观察到的物种指数 Observed species index	1 557.42±187.62	1 507.75±77.00	0.503
Shannon 指数 Shannon index	7.60±0.38	7.69±0.37	0.646
Simpson 指数 Simpson index	0.98±0.02	0.98±0.01	0.813
Chao1 指数 Chao1 index	1 708.94±214.86	1 641.50±93.26	0.434
ACE 指数 ACE index	1 712.56±217.18	1 648.18±87.19	0.453
覆盖率 Good's coverage/%	0.996 28±0.000 75	0.996 50±0.000 53	0.533
PD whole tree 指数 PD whole tree index	96.48±7.84	94.87±4.10	0.621

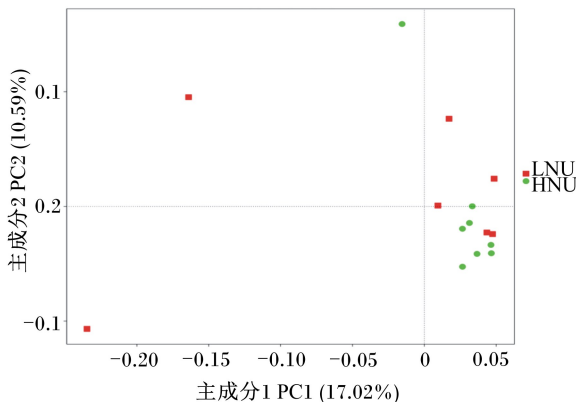


图 3 主坐标分析图

Fig.3 Principal coordinate analysis plot

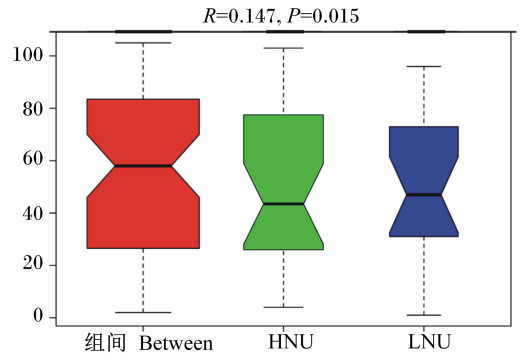


图 4 各组的 ANOSIM 统计分析图

Fig.4 ANOSIM statistical analysis chart of each group

表 9 相对丰度在组间有显著差异的菌群分布及其与宿主氮利用率的相关性

Table 9 Distribution of bacteria with significant differences in relative abundance among groups and their correlation with nitrogen utilization efficiency of host

项目 Items		相对丰度 Relative abundance/%			相关系数 Correlation coefficient (R^2)
		LNU ($n=7$)	HNU ($n=8$)	P 值 P -value	
纲	梭菌 Clostridia	20.36±2.27	26.50±4.87	0.009	0.614 *
Class	Negativicutes	7.60±4.38	3.31±1.97	0.026	-0.457
目	梭菌目 Clostridiales	20.31±2.27	26.42±4.84	0.009	0.600 *
Order	月形单胞菌目 Selenomonadales	7.60±4.38	3.31±1.97	0.026	-0.457
	厌氧支原体目 Anaeroplasmatales	0.05±0.01	0.07±0.02	0.020	0.517
科	拟杆菌科 S24-7 Bacteroidales S24-7_group	7.89±2.65	16.90±5.68	0.002	0.650
Family	瘤胃球菌科 Ruminococcaceae	7.82±0.57	9.29±1.00	0.004	0.536
	酸杆菌科 Acidaminococcaceae	5.61±3.77	1.70±1.01	0.014	-0.550
	厌氧支原体科 Anaeroplasmataceae	0.05±0.01	0.07±0.02	0.020	0.517
	普雷沃氏菌属 1 <i>Prevotella</i> 1	17.63±5.04	12.02±4.75	0.045	-0.279
	解琥珀酸菌属 <i>Succiniclasticum</i>	5.57±3.67	1.70±1.01	0.013	-0.550
	瘤胃球菌属 1 <i>Ruminococcus</i> 1	0.86±0.25	1.26±0.31	0.018	0.621 *
	p-1088-a5_gut_group	0.61±0.43	0.24±0.18	0.044	-0.289
	毛螺菌科 XPB_1014 肠道群	0.24±0.07	0.41±0.14	0.014	0.496
	Lachnospiraceae XPB_1014_group				
	属	瘤胃球菌科 UCG_004	0.14±0.05	0.22±0.05	0.005
Genus	Ruminococcaceae UCG_004				
	瘤胃杆菌属 <i>Ruminobacter</i>	0.07±0.08	0.22±0.13	0.024	0.536 *
	Family_X III_UCG_002	0.06±0.03	0.11±0.04	0.029	-0.140
	厌氧支原体属 <i>Anaeroplasma</i>	0.05±0.01	0.07±0.02	0.020	0.517 *
	Possible_genus_Sk018	0.02±0.01	0.03±0.01	0.045	0.476

* 代表 R 值显著相关 ($P<0.05$)。

* represent R value is significantly correlated ($P<0.05$) .

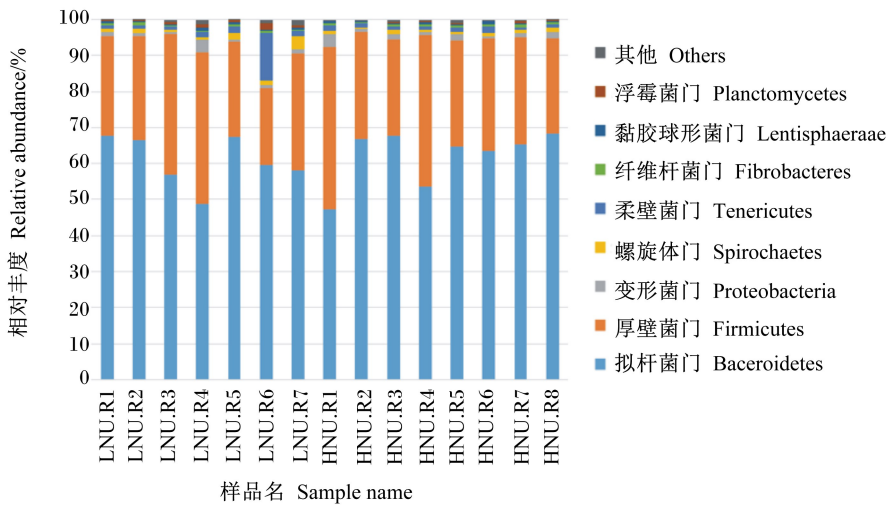


图 5 各样品在门水平上的微生物组成

Fig.5 Composition of bacteria at genus level of each sample

2.5.5 核心菌属分析

对 15 个样品间的核心共享菌属进行分析,并将相对丰度位于前 35 位的共享属用热图进行展示(图 6)。图中,*Prevotella* 1、*Rikenellaceae* RC9_gut_group 属于拟杆菌门,琥珀酸弧菌科 UCG_002

(*Succinivibrionaceae* UCG_002)属于变形菌门,其他的共享属均来源于厚壁菌门。由热图上的颜色可以看出,*Prevotella* 1 是瘤胃中相对丰度最高的共享菌。

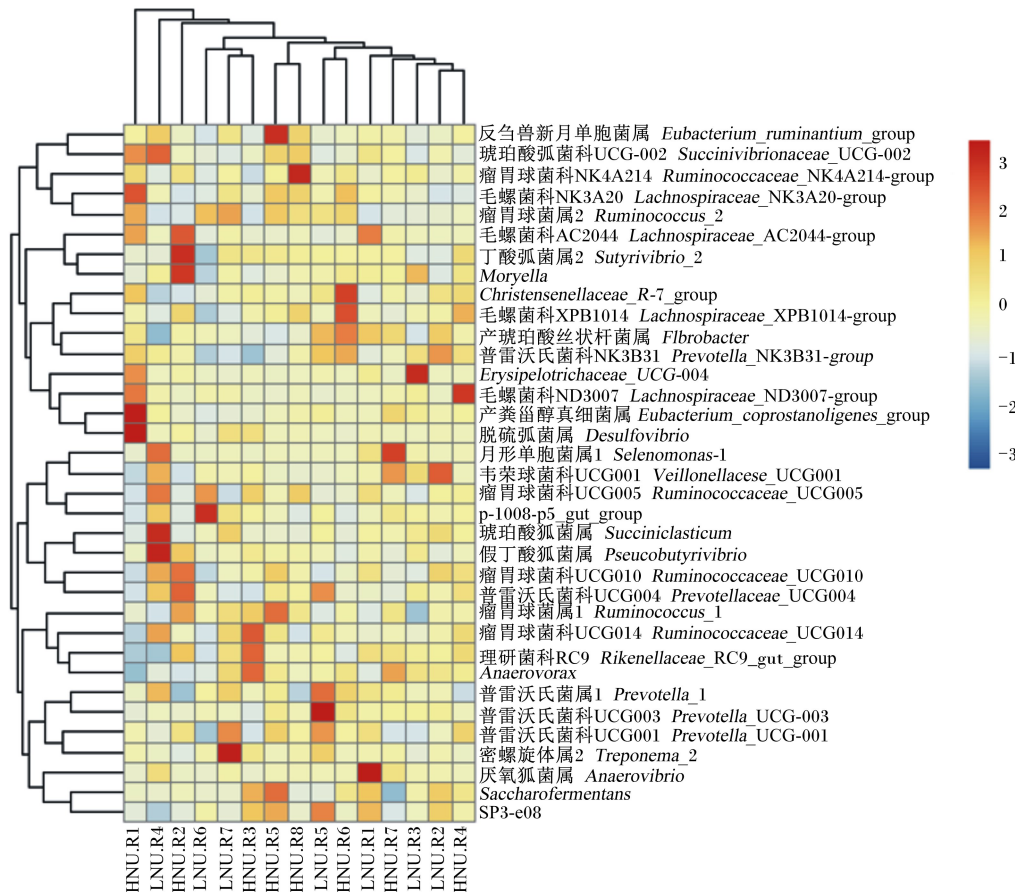


图 6 各样品中共享菌群在属水平上的聚类热图

Fig.6 Heatmap of shared-genus of each sample

2.5.6 蛋白质分解菌的组间差异分析

根据以往报道,本试验挑选了 7 种与蛋白质降解相关的瘤胃细菌进行 real-time PCR 分析。结果如表 10 所示,HNU 组中 *Butyrivibrio fibrisolvens* 数量极显著高于 LNU 组 ($P < 0.01$), *Fibrobacter succinogenes* 和 *Ruminococcus* _ sp. _ HUN007 数量显著高于 LNU 组 ($P < 0.05$); 而 *Prevotella ruminicola*、*Succinivibrio dextrinosolvens*、*Ruminococcus flavefaciens* 和 *Streptococcus bovis* 数量在 2 组间没有显著差异 ($P > 0.05$)。

3 讨论

对于反刍动物来说,瘤胃发酵指标是机体消化代谢正常与否的直接反映。高效的瘤胃发酵有利于 MCP 的合成,为宿主增加瘤胃后消化道可吸收蛋白质的比例,最终影响饲料中氮的利用率^[21]。瘤胃内 $\text{NH}_3\text{-N}$ 是饲料中蛋白质和非蛋白氮分解的终产物,同时又是瘤胃微生物合成 MCP 的原料。瘤胃 $\text{NH}_3\text{-N}$ 含量过高,超过了微生物对其的利用能力时,就会经瘤胃壁吸收进入肝脏合成尿素,并随尿液排出,由此而造成氮的浪费。瘤胃内 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的含量主要受饲料中含氮物降解产氨速度和瘤胃

微生物摄取氮合成 MCP 速度的影响。本试验中, HNU 组和 LNU 组的饲料氮含量和氮的降解特性完全一样, 但 HNU 组 $\text{NH}_3\text{-N}$ 含量却极显著低于 LNU 组, 这说明 HNU 组微生物降解饲料中氮产生氨的速度可能显著低于 LNU 组, 或者是微生物利用氨氮合成 MCP 的速度显著高于 LNU 组, 总之降低瘤胃 $\text{NH}_3\text{-N}$ 含量会降低饲料氮的浪费。这也许正是 HNU 组饲料氮利用率显著高于 LNU 组的一个重要原因。另外本试验在饲料一致且没有添加任何添加剂的情况下, 发现氮利用率不同的山羊其瘤胃 pH 及丙酸及 $\text{NH}_3\text{-N}$ 和 MCP 含量在组

间存在显著差异, 这可能与组间氮利用率存在差异有很大关系。瘤胃中 pH 相对比较稳定, 过高或过低都将影响瘤胃微生物的正常生长, 从而影响瘤胃的发酵。一般情况下, 瘤胃 pH 的正常范围为 6.0~7.0, 本试验中, LNU 组 pH 的平均值为 6.13 ± 0.22 , HNU 组 pH 的平均值为 6.41 ± 0.24 , 所有山羊的瘤胃 pH 均保持在正常范围之内。但是, HNU 组的 pH 却显著高于 LNU 组, 这很可能是由于 HNU 组中丙酸含量低于 LNU 组引起的, 原因很可能跟瘤胃中某种瘤胃微生物有关, 如 *Ruminococcus* sp. HUN007、*Fibrobacter succinogenes* 等。

表 10 与蛋白质降解相关的 7 种瘤胃细菌的丰度

Table 10 Abundances of 7 ruminal bacteria associated with protein degradation lg(拷贝数/mL)

项目 Items	组别 Groups		P 值 P-value
	LNU (n=7)	HNU (n=8)	
溶纤维丁酸弧菌 <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	$4.3 \times 10^7 \pm 2.1 \times 10^7$	$2.6 \times 10^8 \pm 1.3 \times 10^8$	0.002
产琥珀酸丝状杆菌 <i>Fibrobacter succinogenes</i>	$1.4 \times 10^5 \pm 1.2 \times 10^5$	$1.2 \times 10^6 \pm 1.1 \times 10^6$	0.027
栖瘤胃普雷沃氏菌 <i>Prevotella ruminicola</i>	$8.0 \times 10^6 \pm 1.2 \times 10^7$	$2.1 \times 10^7 \pm 1.4 \times 10^7$	0.063
黄色瘤胃球菌 sp.HUN007 <i>Ruminococcus</i> sp. HUN007	$2.2 \times 10^6 \pm 1.6 \times 10^6$	$1.8 \times 10^7 \pm 1.3 \times 10^7$	0.014
牛链球菌 <i>Streptococcus bovis</i>	$2.1 \times 10^4 \pm 3.4 \times 10^4$	$4.7 \times 10^4 \pm 4.0 \times 10^4$	0.187
溶糊精琥珀酸弧菌 <i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>	$3.5 \times 10^5 \pm 4.3 \times 10^5$	$1.9 \times 10^6 \pm 3.9 \times 10^6$	0.327
黄色瘤胃球菌 <i>Ruminococcus flavefaciens</i>	$1.2 \times 10^5 \pm 1.7 \times 10^5$	$2.6 \times 10^5 \pm 2.4 \times 10^5$	0.226

血液成分与各种营养素的营养状况密切相关, 且血液样本容易得到, 通过测定和分析血液中相关生理生化指标, 可以快速检验动物的营养状况并做出评价。血液尿素氮 (UN) 含量被用来估测反刍动物饲料蛋白质生物学价值, 它的含量反映着反刍动物消耗氮的程度, 即其含量可反映动物蛋白质代谢状况, 并可作为蛋白质沉积的一个指标。UN 是肝脏尿素生成量、内源 UN 周转量和尿中排出量相平衡的动态结果, 与蛋白质采食量、瘤胃 $\text{NH}_3\text{-N}$ 含量关系密切。如果瘤胃 $\text{NH}_3\text{-N}$ 含量低于其适宜的范围, 则血液 UR 库中的 UN 就被运到瘤胃转化为 $\text{NH}_3\text{-N}$, 以使瘤胃 $\text{NH}_3\text{-N}$ 含量保持相对稳定^[22]。本试验中, UR 含量在 HNU 组和 LNU 组之间无显著差异, 而瘤胃 $\text{NH}_3\text{-N}$ 和 MCP 的含量在 2 组间差异极显著, 出现这种差异的原因可能是瘤胃内蛋白质利用菌群的差异造成的。

本次试验所用的 30 只山羊年龄、性别、遗传背景和饲养管理都一致, 但它们对饲料中氮的利用效率却在 20.71%~67.47% 之间高度变异。以往在生产 and 科研活动中, 人们也许曾经注意到了

这种现象, 但本文是第 1 篇有关反刍动物饲料氮利用率个体差异的正式研究报道。在本文之前, 虽然还未见反刍动物氮利用效率个体差异的报道, 但以往的研究表明, 反刍动物饲料利用效率的个体差异性普遍存在的现象^[23-24]。氮利用率是饲料利用率的一个重要组成部分, 因此反刍动物氮利用率的个体差异性也许也是一种普遍存在的现象。以往的研究表明, 影响动物对氮利用率的主要因素包括品种、饲料、年龄等^[25-26], 本文首次研究了瘤胃微生物的结构与组成对宿主氮利用率的影响。

饲料中的含氮物被动物采食以后, 首先在瘤胃中被微生物分解并转化为 MCP, 然后 MCP 与饲料中的未降解蛋白质一起进入小肠再被宿主消化吸收^[27], 有研究表明, 进入宿主小肠的蛋白质 70% 左右为 MCP, 因此瘤胃微生物在反刍动物饲料蛋白质的消化过程中发挥着重要作用^[28]。本研究发现, 瘤胃内与宿主氮利用率显著相关的微生物不仅数量众多, 而且有些微生物的相对丰度也较高, 如 *Prevotella* 1 (LNU 组 17.63%, HNU 组

12.02%)。本研究中 *Prevotella 1* 是所有样品的瘤胃共享属,也是相对丰度最高的属,这与以往的研究结果一致^[29-30]。HNU 组 *Prevotella 1* 的相对丰度显著低于 LNU 组。*Prevotella 1* 下包含有许多细菌种,其中研究较为透彻的有布氏普雷沃氏菌、短普雷沃氏菌和 *Prevotella ruminicola*,他们作用的底物包括半纤维素、果胶、淀粉和蛋白质等^[31],但各自的侧重点不同。短普雷沃氏菌的发酵底物主要为葡萄糖、乳糖和纤维二糖等^[32];淀粉、木聚糖等营养物质均能够被布氏普雷沃氏菌和 *Prevotella ruminicola* 所利用^[33];只有 *Prevotella ruminicola* 被认为具有分解蛋白质的功能,但是本研究通过 real-time PCR 分析发现,*Prevotella ruminicola* 的相对丰度在组间未见显著差异。因此,本试验中造成 *Prevotella 1* 组间显著差异的原因尚不清楚,仍需进一步研究。

本研究结果表明,瘤胃中在属水平上,*Ruminococcus 1* 和 *Ruminococcaceae_UCG_004* 的相对丰度,在种水平上 *Ruminococcus_sp._HUN007* 的相对丰度,HNU 组都显著高于 LNU 组。*Ruminococcus flavefaciens*(也属于 *Ruminococcaceae*) 在组间的差异虽然不显著,但在数值上,HNU 组仍大于 LNU 组。以往许多研究表明,*Ruminococcaceae* 的很多微生物都是典型的纤维降解菌,而大部分的纤维降解菌都具有一定的蛋白质降解能力^[34]。因此,提高这些微生物在瘤胃中的丰度能促进宿主对氮的消化和利用。具有降解蛋白质功能的纤维分解菌还有 *Fibrobacter succinogenes*、*Butyrivibrio fibrisolvens* 等^[35]。本研究对它们也进行了定量分析,结果显示它们在 HNU 组的相对丰度也都高于 LNU 组。但并不是所有与纤维降解有关的微生物都能促进宿主对氮的利用。如 *Succinivibrio succinivibrio*,它能够将瘤胃内纤维分解产生的琥珀酸降解为丙酸从而促进 *Fibrobacter succinogenes* 对纤维的分解,然而本研究发现 LNU 组的 *Succinivibrio succinivibrio* 相对丰度显著高于 HNU 组。出现这种结果说明 LNU 组可能产生了更多的琥珀酸,也说明促进纤维降解并不一定能促进宿主对氮的利用。瘤胃中的 *Succinivibrio dextrinosolvens*、*Streptococcus bovis* 等也被认为与蛋白质的降解有关^[18-19],但本研究并未检测到它们在 HNU 组和 LNU 组间的差异,结合本课题组以往的研究结果,普雷沃氏菌科(*Prevotellaceae*)_UCG_001 和 *Prevotellaceae*_UCG_003

的相对丰度随饲料 NDF 水平增加而升高的变化规律,说明这 2 种菌具有纤维降解能力^[36],而以往体外培养的试验表明,它们具有消化蛋白质和氨基酸的活性,没有直接降解纤维的能力,但与纤维降解菌共培养时却能间接地促进纤维的降解^[37]。我们推测,细菌在体外分离培养的试验结果与实际瘤胃环境中发挥的作用可能不一致,这可能就是导致没有检测到它们在 HNU 组和 LNU 组间的差异的原因。

4 结 论

山羊对饲料中氮的利用效率存在明显的个体差异,这种差异与瘤胃微生物结构与组成的差异有关。瘤胃中存在多种与宿主氮利用率显著相关的微生物,宿主氮利用率越高,瘤胃中的 *Fibrobacter succinogenes*、*Butyrivibrio fibrisolvens*、*Ruminococcus_sp._HUN007* 等菌数量越多。

参考文献:

- [1] KOHN R A, DINNEEN M M, RUSSEK-COHEN E. Using blood urea nitrogen to predict nitrogen excretion and efficiency of nitrogen utilization in cattle, sheep, goats, horses, pigs, and rats[J]. *Journal of Animal Science*, 2005, 83(4): 879-889.
- [2] HARRISON R M, HESTER R E. Environmental impacts of modern agriculture[M]. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2012.
- [3] CALSAMIGLIA S, FERRET A, REYNOLDS C K, et al. Strategies for optimizing nitrogen use by ruminants[J]. *Animal*, 2010, 4(7): 1184-1196.
- [4] STONE J B, TRIMBERGER G W, HENDERSON C E, et al. Forage intake and efficiency of feed utilization in dairy cattle[J]. *Journal of Dairy Science*, 1960, 43(9): 1275-1281.
- [5] HUHTANEN P, HRISTOV A N. A meta-analysis of the effects of dietary protein concentration and degradability on milk protein yield and milk N efficiency in dairy cows[J]. *Journal of Dairy Science*, 2009, 92(7): 3222-3232.
- [6] WANG L Z, ZHOU M L, WANG J W, et al. The effect of dietary replacement of ordinary rice with red yeast rice on nutrient utilization, enteric methane emission and rumen archaeal diversity in goats[J]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0160198.
- [7] NIU Q, LI P H, HAO S S, et al. Dynamic distribution of the gut microbiota and the relationship with apparent crude fiber digestibility and growth stages in pigs[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 9938.

- [8] RAMOS M H, KERLEY M S. Mitochondrial complex I protein differs among residual feed intake phenotype in beef cattle [J]. *Journal of Animal Science*, 2013, 91 (7) : 3299-3304.
- [9] 张丽英. 饲料分析及饲料质量检测技术 [M]. 3 版. 北京: 中国农业大学出版社, 2003: 48-150.
- [10] 屯妮萨·麦提赛伊迪, 阿里娅古丽·依布热依木, 阿依沙依拉, 等. 碱性次氯酸钠-苯酚分光光度法测定甲醇处理的瘤胃液中氨态氮浓度 [J]. *新疆农业科学*, 2012, 49 (3) : 565-570.
- [11] 张翔飞. 活性干酵母对肉牛瘤胃发酵、纤维降解及微生物菌群的影响 [D]. 硕士学位论文. 成都: 四川农业大学, 2014.
- [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] MEALE S J, LI S C, AZEVEDO P, et al. Weaning age influences the severity of gastrointestinal microbiome shifts in dairy calves [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 179.
- [14] EDGAR R C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST [J]. *Bioinformatics*, 2010, 26 (19) : 2460-2461.
- [15] WANG Q, GARRITY G M, TIEDJE J M, et al. Naive bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73 (16) : 5261-5267.
- [16] QUAST C, PRUESSE E, YILMAZ P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools [J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41 (Database issue) : D590-D596.
- [17] STUBNER S. Enumeration of 16S rDNA of *Desulfotomaculum* lineage I in rice field soil by real-time PCR with SybrGreen™ detection [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2002, 50 (2) : 155-164.
- [18] 李旦, 王加启, 卜登攀, 等. 运用 Real-time PCR 方法研究日粮添加豆油与胡麻油对肉牛瘤胃纤维分解菌数量的影响 [J]. *动物营养学报*, 2008, 20 (3) : 256-260.
- [19] 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.
- [20] LI F, YANG X J, CAO Y C, et al. Effects of dietary effective fiber to rumen degradable starch ratios on the risk of sub-acute ruminal acidosis and rumen content fatty acids composition in dairy goat [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2014, 189: 54-62.
- [21] 赖松家, 马恒东, 夏佑全, 等. 瘤胃内环境控制对饲料消化率影响的研究 [J]. *四川畜牧兽医*, 2000, 27 (S1) : 26-27.
- [22] 樊艳华, 孙海洲, 桑丹, 等. 不同日粮氮水平对山羊氮代谢和微生物蛋白质合成的影响 [J]. *中国畜牧杂志*, 2015, 51 (1) : 28-32.
- [23] HESTER R E, HARRISON R M. *Environmental Impacts of Modern Agriculture* [M]. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2012.
- [24] CALSAMIGLIA S, FERRET A, REYNOLDS C K, et al. Strategies for optimizing nitrogen use by ruminants [J]. *Animal*, 2010, 4 (7) : 1184-1196.
- [25] LIU K Z, XU Q, WANG L Z, et al. The impact of diet on the composition and relative abundance of rumen microbes in goat [J]. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2017, 30 (4) : 531-537.
- [26] JIN D X, KANG K, WANG H Z, et al. Effects of dietary supplementation of active dried yeast on fecal methanogenic archaea diversity in dairy cows [J]. *Anaerobe*, 2017, 44: 78-86.
- [27] MCDONALD I W. The extent of conversion of food protein to microbial protein in the rumen of the sheep [J]. *Biochemical Journal*, 1954, 56 (1) : 120-125.
- [28] LENG R A, NOLAN J V. Nitrogen metabolism in the rumen [J]. *Journal of Dairy Science*, 1984, 67 (5) : 1072-1089.
- [29] BEKELE A Z, KOIKE S, KOBAYASHI Y. Genetic diversity and diet specificity of ruminal *Prevotella* revealed by 16S rRNA gene-based analysis [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2010, 305 (1) : 49-57.
- [30] MOHAMMADZADEH H, YÁÑEZ-RUIZ D R, MARTÍNEZ-FERNANDEZ G, et al. Molecular comparative assessment of the microbial ecosystem in rumen and faeces of goats fed alfalfa hay alone or combined with oats [J]. *Anaerobe*, 2014, 29: 52-58.
- [31] KOIKE S, YOSHITANI S, KOBAYASHI Y, et al. Phylogenetic analysis of fiber-associated rumen bacterial community and PCR detection of uncultured bacteria [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 229 (1) : 23-30.
- [32] AVGUŠTIN G, WALLACE R J, FLINT H J. Phenotypic diversity among ruminal isolates of *Prevotella ruminicola*; proposal of *Prevotella brevis* sp. nov., *Prevotella bryantii* sp. nov., and *Prevotella albensis* sp. nov. and redefinition of *Prevotella ruminicola* [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1997, 47 (2) : 284-288.
- [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] DE SMET A M, DE BOEVER J L, DE BRABAND-

- ER D L, et al. Investigation of dry matter degradation and acidotic effect of some feedstuffs by means of in sacco and in vitro incubations [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 1995, 51 (3/4): 297-315.
- [35] KANG J H, ZENG B, TANG S X, et al. Effects of *Momordica charantia* polysaccharide on *in vitro* ruminal fermentation and cellulolytic bacteria [J]. *Italian Journal of Animal Science*, 2017, 16 (2): 226-233.
- [36] 张雪娇, 王立志. 饲料中性洗涤纤维水平对山羊瘤胃细菌结构及组成的影响 [J]. *动物营养学报*, 2018, 30 (4): 1377-1386.
- [37] ROSENBERG E. The family Prevotellaceae [M] // ROSENBERG E, DELONG E F, LORY S, et al. *The prokaryotes*. Berlin: Springer, 2014: 825-827.

Differences of Bacterial Structure and Composition in Rumen of Goats with Different Nitrogen Utilization

LI Qiong WANG Lizhi* WANG Zhisheng XUE Bai PENG Quanhui

(Key Laboratory for Animal Disease-Resistance Nutrition of China Ministry of Education, Animal Nutrition Institute, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract: The objective of this study was to compare the differences in the bacterial structure and composition in rumen of goats with different nitrogen utilization. Thirty goats were chosen as the experimental animals, according to the data of metabolic test, goats were chosen as the high nitrogen utilization (HNU) group and low nitrogen utilization (LNU) group. Rumen contents of each goat in 2 groups were collected after slaughter and the differences of their bacterial structure and composition were analyzed and compared by high-throughput sequencing technique, and 7 proteolytic bacteria were quantitatively analyzed and compared by real-time PCR. The results showed as follows: 1) there were obvious individual differences in the nitrogen utilization in 30 goats, the average nitrogen utilization of HNU group and LNU group was $(56.68 \pm 5.54)\%$ and $(34.25 \pm 4.21)\%$, and there was significant difference between groups ($P < 0.01$). 2) The differences of rumen microorganisms structure in HNU group and LNU group were different at the genus level. The relative abundances of *Prevotella* 1, *Succiniclasticum*, p-1088-a5_gut_group in HNU group were significantly lower than those in LNU group ($P < 0.05$), and the relative abundances of Lachnospiraceae_XPB_1014_group, *Ruminococcus* 1, Ruminococcaceae_UCG_004, *Ruminobacter*, Family_X III_UCG_002 and *Anaeroplasma* groups were significantly higher than those in LNU group ($P < 0.05$). 3) The further analysis showed that the relative abundance of *Ruminococcus* 1, *Ruminobacter* and *Anaeroplasma* had a positive relationship with the host nitrogen utilization ($P < 0.05$). 4) The numbers of *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Fibrobacter succinogenes* and *Ruminococcus*_sp._HUN007 in HNU group were significantly higher than those in LNU group ($P < 0.05$), and the numbers of *Prevotella ruminicola*, *Streptococcus bovis*, *Succinivibrio dextrinisolvens* and *Ruminococcus flavefaciens* had no differences between two groups ($P > 0.05$). In summary, there are significant differences on the bacterial structure and composition in rumen of goats with different nitrogen utilization. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2019, 31 (8): 3651-3663]

Key words: goats; nitrogen utilization; rumen bacterial; high-throughput sequencing