

荞麦秸秆饲粮条件下甘露寡糖对滩羊瘤胃菌群结构的影响

马秀花 桂瑞麒* 焦娜 杨万宗 李庆敏 周玉香**

(宁夏大学农学院,银川 750021)

摘要: 本试验旨在利用 16S rDNA 高通量测序技术探究荞麦秸秆饲粮条件下添加不同水平甘露寡糖(MOS)对滩羊瘤胃菌群结构的影响。选取健康、体重在 30.5 kg 左右的宁夏断奶滩羊羯羊 20 只,随机分为 4 组,每组 5 只。其中,CK-3 组为对照组,饲喂基础饲粮;Y1-3 组、Y2-3 组、Y3-3 组为试验组,分别饲喂在基础饲粮基础上添加 1%、2%、3% MOS 的试验饲粮。试验期为 75 d,其中预试期 15 d,正试期 60 d。结果显示:1)除 Y1-3 组、Y2-3 组瘤胃液乙酸含量显著高于 Y3-3 组($P<0.05$)外,各瘤胃发酵参数在各组间无显著差异($P>0.05$)。2) Alpha 多样性分析显示,Y1-3 组、Y2-3 组、Y3-3 组较 CK-3 组瘤胃菌群多样性增加。聚类分析显示,与 CK-3 组瘤胃菌群构成相比差异由大到小的试验组依次为 Y2-3 组、Y1-3 组、Y3-3 组。3)在门水平上,Y2-3 组较其他组极显著提高了厚壁菌门、拟杆菌门的相对丰度($P<0.01$),而极显著降低了变形菌门的相对丰度($P<0.01$),且浮霉菌门、Kiritimatiellaota 和黏胶球形菌门相对丰度较其他组高。4)在属水平上,相比其他组,添加 2% MOS 对滩羊瘤胃菌群结构的影响最大,包括赖氨酸芽孢杆菌属、普雷沃氏菌属 1、醋杆菌属 3 种优势菌属在内的 9 种菌属的相对丰度极显著大于其他组($P<0.01$)。总体而言,荞麦秸秆饲粮中添加 MOS 可以增加滩羊瘤胃菌群多样性,其中 2% MOS 对滩羊瘤胃菌群结构的影响最大,其有利于增强滩羊对饲粮纤维物质的降解能力。

关键词: 甘露寡糖;16S rDNA;滩羊;瘤胃细菌

中图分类号:S816

文献标识码:A

文章编号:1006-267X(2021)04-2365-13

反刍动物瘤胃的微生物生态系统极其复杂^[1-2],包括细菌、真菌和原生动物,而细菌是这些微生物中的优势种群^[3]。甘露寡糖(MOS)是一种常见的功能性低聚糖^[4],被称为“化学益生菌”,可以促进动物胃肠道内有益菌群的增殖^[5-6],改善动物胃肠道微生态环境,提高免疫力和生产性能^[7],在动物饲粮中得到广泛使用^[8],并已成为多种单胃动物研究的主题,包括猪^[9-10]、蛋鸡^[11]、肉鸡^[12]、家兔^[13],而其在反刍动物瘤胃微生物方面的研究较少^[14]。普遍认为是低聚糖会被瘤胃微生物降解而不会对反刍动物饲粮带来益处。然而,有研究发

现,添加不同水平的 MOS 在不影响绵羊对绝大多数营养物质表观消化率、存留率以及瘤胃发酵、免疫力、血清一氧化氮(NO)浓度和一氧化氮合酶活性的情况下提高了纤维物质的表观消化率^[15],而关于 MOS 可提高绵羊纤维物质表观消化率的生理机理还需要全面去揭示。因此,本研究基于 16S rDNA 高通量测序技术分析荞麦秸秆饲粮条件下添加不同水平 MOS 对滩羊瘤胃细菌菌群结构与多样性的影响,为进一步研究 MOS 对纤维物质的影响提供一定的理论基础。

收稿日期:2020-09-14

基金项目:农业部公益性行业(农业)项目(201503134)

作者简介:马秀花(1995—),女,回族,宁夏吴忠人,硕士研究生,研究方向为反刍动物营养。E-mail:2095602677@qq.com

* 同等贡献作者

** 通信作者:周玉香,教授,博士生导师,E-mail:zhzyzhww@163.com

1 材料与方法

1.1 试验动物与饲料组成

本试验于 2019 年 5—9 月在宁夏农垦贺兰山牛羊产业(集团)有限公司开展,试验前 1 个月对羊舍做好清洁、防疫工作。

选取健康、体重在 30.5 kg 左右的宁夏断奶滩羊羯羊 20 只,随机分为 4 组,每组 5 只,独笼饲养。基础饲料参照《肉羊饲养标准》(NY/T 816—2004)并结合宁夏滩羊的饲养实践进行配制,其组成及营养水平见表 1。饲料精粗比为 30:70,全株玉米青贮与荞麦秸秆以 60:40 混合作为粗饲料,其中荞麦秸秆粉碎后与 0.1% 纤维素酶、1.0% 麸皮混合均匀并密闭发酵 30 d。对照组(CK-3 组)滩羊饲喂基础饲料;试验组滩羊饲喂在基础饲料基础上分别添加 1%(Y1-3 组)、2%(Y2-3 组)和 3%(Y3-3 组)MOS(纯度>99%)的试验饲料,MOS 与精料混合均匀,以保证全部 MOS 被羊只采食。试验期为 75 d,其中预试期 15 d,正试期 60 d。每天饲喂 2 次(07:30 和 17:30),先喂粗料后喂精料,自由采食和饮水。

1.2 样品采集

瘤胃液采集:在正试期第 60 天每组随机选择 3 只羊用瘤胃导管各采集瘤胃液 50 mL,于 -80 °C 超低温保存,待测瘤胃发酵参数和菌群结构。

1.3 指标测定

1.3.1 瘤胃发酵参数

使用 pH S-2 型酸度计测定瘤胃液的 pH,参照冯宗慈等^[16]的方法测定氨态氮(NH₃-N)含量;采用气相色谱法测定挥发性脂肪酸含量。

1.3.2 16S rDNA 测序

从样本中提取基因组 DNA 后,用带有 barcode 的特异引物扩增 16S rDNA 的 V3+V4 区,所用引物及引物序列为:341F, 5'-CCTACGGGNGGC-WGCAG-3'; 806R, 5'-GGACTACHVGGG-TATCTAAT-3'。然后 PCR 扩增产物切胶回收,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,构建测序文库,以 HiSeq 2500 的 PE250 模式上机测序。测序得到 raw reads 之后,对低质量 reads 进行过滤,然后进行组装和过滤,以保证利用最有效数据聚类成操作分类单元(OTUs)。

表 1 基础饲料组成及营养水平(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	
荞麦秸秆 Buck wheat straw	28.00
全株玉米青贮 Whole corn silage	42.00
玉米 Corn	10.20
豆粕 Soybean meal	9.50
麸皮 Bran	4.00
胡麻饼 Flax cake	4.00
磷酸氢钙 CaHPO ₄	0.50
食盐 NaCl	0.80
预混料 Premix ¹⁾	1.00
合计 Total	100.00
营养水平 Nutrient levels ²⁾	
代谢能 ME/(MJ/kg)	12.47
粗蛋白质 CP	14.08
钙 Ca	0.62
磷 P	0.29

1) 每千克预混料含有 Contained the following per kg of premix: VA 1 600 000 IU, VE 1 200 IU, VD₃ 100 000 IU, 烟酸 niacin 200 mg, 生物素 biotin 20 mg, Fe (as iron sulfate) 600 mg, Cu (as copper sulfate) 160 mg, Zn (as zinc sulfate) 900 mg, Mn (as manganese sulfate) 800 mg, Se (as selenium sulfate) 0.6 mg, I (as iodine sulfate) 16 mg。

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.

1.4 数据统计与分析

用 Excel 2010 对试验数据进行简单处理,并在 SAS 8.2 软件上进行分析,数据用“平均值±标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 瘤胃发酵参数

由表 2 可知,在本试验条件下,饲料中添加不同水平的 MOS 对试验羊的瘤胃液 pH 及 NH₃-N 含量无显著影响($P>0.05$),以 Y2-3 组数值最高。饲料中添加不同水平的 MOS 显著影响瘤胃液乙酸含量($P<0.05$),表现为 Y1-3 组、Y2-3 组显著高于 Y3-3 组($P<0.05$),其中以 Y2-3 组数值最高。各组间瘤胃液丙酸含量无显著差异($P>0.05$)。Y2-3 组瘤胃液丁酸、异丁酸、戊酸、异戊酸含量以及乙酸/丙酸均高于其他组,但差异未达显著水平($P>0.05$)。

表 2 瘤胃发酵参数

Table 2 Rumen fermentation parameters

项目 Items	组别 Groups				P 值 P-value
	CK-3	Y1-3	Y2-3	Y3-3	
pH	6.45±0.30	6.58±0.38	6.86±0.66	6.68±0.25	0.602
氨态氮 NH ₃ -N/(mg/dL)	14.67±5.12	13.33±4.08	14.85±5.42	13.72±5.25	0.967
挥发性脂肪酸 VFA/(mmol/L)					
乙酸 Acetate	51.19±2.26 ^{ab}	56.83±7.87 ^a	58.45±8.67 ^a	43.37±3.80 ^b	0.021
丙酸 Propionate	10.98±1.94	10.99±2.22	10.21±0.65	9.28±1.61	0.469
乙酸/丙酸 Acetate/propionate	4.76±0.76	5.25±0.83	5.70±0.49	4.84±1.29	0.447
丁酸 Butyrate	4.92±1.20	5.41±0.86	6.64±2.10	5.12±1.27	0.362
异丁酸 Isobutyrate	0.47±0.13	0.55±0.19	0.62±0.16	0.53±0.15	0.580
戊酸 Valerate	0.43±0.06	0.51±0.14	0.53±0.12	0.47±0.15	0.700
异戊酸 Isovalerate	0.57±0.07	0.74±0.29	0.67±0.11	0.59±0.08	0.448

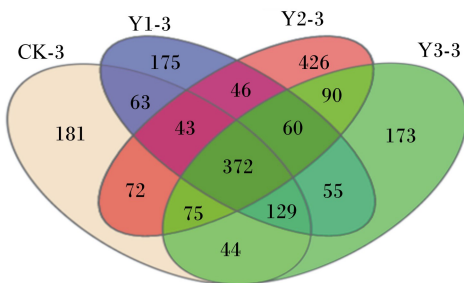
同行数据肩标无字母或相同小写字母表示差异不显著 ($P>0.05$), 不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$), 不同大写字母表示差异极显著 ($P<0.01$)。下表同。

Values in the same row with no letter or the same small letter superscripts 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 测序结果及其合理性

2.2.1 瘤胃菌群 OTUs 数量

测序共得 888 992 个有效序列, 用 Uparse 软件对所有样本的全部有效序列聚类, 以 97% 的一致性将序列聚类成为 OTUs, 结果显示 12 个样本共产生 4 104 个 OTUs。由图 1 可知, CK-3 组有 979 个 OTUs, Y1-3 组有 943 个 OTUs, Y2-3 组有 1 184 个 OTUs, Y3-3 组有 998 个 OTUs。4 组共享 372 个 OTUs。Y1-3 组 OTUs 相对 CK-3 组有所减少, 而 Y2-3 组、Y3-3 组 OTUs 相对 CK-3 组有所增加, 说明不同添加水平的 MOS 对滩羊瘤胃菌群丰度的影响不同。



CK-3: CK-3 组 CK-3 group; Y1-3: Y1-3 组 Y1-3 group; Y2-3: Y2-3 组 Y2-3 group; Y3-3: Y3-3 组 Y3-3 group。下图同 the same as below。

图 1 瘤胃菌群 OTUs 数量

Fig.1 Number of rumen bacterial OTUs

2.2.2 稀释曲线

样本稀释曲线如图 2 所示, 随着试验测序深度的增加, 各条曲线趋于平缓, 表明测序深度覆盖了样本中的大部分微生物。样本覆盖度曲线如图 3 所示, 当测序深度达 50 000 reads 时, 覆盖度 > 0.99, 已至饱和状态, 表明本试验中测序饱和, 测序量及测序深度合理, 当前的测序量足够进行菌群多样性分析。

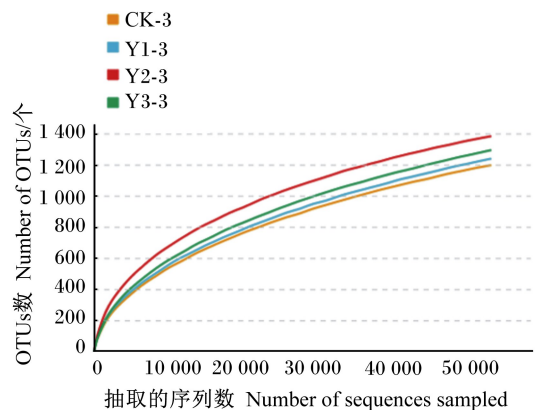


图 2 样本稀释曲线

Fig.2 Sample dilution curve

2.3 Alpha 多样性分析

如表 3 可知, Y1-3 组、Y2-3 组、Y3-3 组的各 Alpha 多样性指数与对照组均无显著差异 ($P>$

0.05),但是总体分析可知 Y1-3 组、Y2-3 组、Y3-3 组的菌群丰度较 CK-3 组提高,且多样性增加,说明添加 MOS 可在一定程度上提高滩羊瘤胃菌群的多样性。

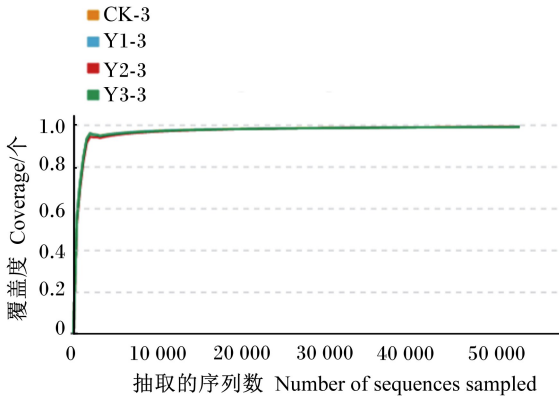


图 3 样本覆盖度曲线

Fig.3 Sample coverage curve

2.4 Beta 多样性分析

2.4.1 样本间物种组成聚类分析

根据各样本丰度差异的统计结果,基于遗传

距离矩阵,采用非加权组平均法(unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA)对样本进行聚类分析。样本越靠近,枝长越短,说明 2 个样本的物种组成越相似。由图 4 可知,与 CK-3 组样本的瘤胃菌群构成相比差异由大到小依次为 Y2-3 组、Y1-3 组、Y3-3 组,说明饲料中添加不同水平的 MOS 对滩羊瘤胃菌群组成有不同的影响,饲料中添加 2% MOS 时滩羊瘤胃菌群组成与饲料不添加 MOS 时差异最大。

2.4.2 主坐标分析(PCoA)

通过 PCoA,可以观察到个体或者群体之间的差异。PCo1 为第 1 主成分,表示分离样品 66.39% 的方差;PCo2 为第 2 主成分,表示分离样品 17.92% 的方差。从图 5 可知,与 CK-3 组相比, Y2-3 组、Y3-3 组的个体聚集度较高,而 Y1-3 组的个体聚集度降低,说明饲料中添加 2% 或 3% MOS 均能使组内菌群组成相似性变得更高。Y2-3 组的组内菌群组成相似性最高且与其他组间差异最大,说明饲料中添加 2% MOS 对滩羊瘤胃菌群结构影响最大。

表 3 Alpha 多样性指数

Table 3 Alpha diversity indexes

项目 Items	组别 Groups				P 值 P-value
	CK-3	Y1-3	Y2-3	Y3-3	
Shannon 指数 Shannon index	4.83±0.15	5.00±0.39	5.36±0.57	4.81±0.17	0.289
Simpson 指数 Simpson index	0.88±0.02	0.88±0.04	0.85±0.06	0.90±0.00	0.696
Chao1 指数 Chao1 index	1 926.95±54.34	1 986.29±121.05	1 911.82±61.54	1 990.30±47.45	0.845
Ace 指数 Ace index	2 017.87±38.89	2 068.53±130.52	2 024.95±50.98	2 075.64±38.14	0.924

2.5 系统分类学分析

2.5.1 MOS 对滩羊瘤胃菌群在门水平上相对丰度的影响

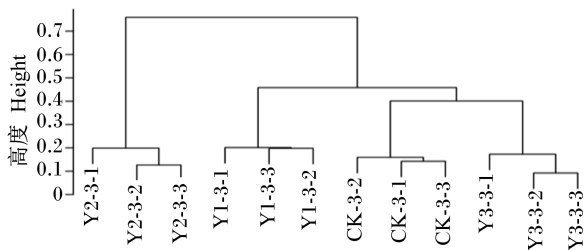
将试验得到的有效序列在不同分类水平上进行物种注释及组间统计分析。如图 6 所示,在门水平上共注释得到 12 个菌门,相对丰度都在 0.1% 以上。变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)和拟杆菌门(Bacteroidetes)为 4 组滩羊瘤胃菌群中的优势菌门。其中,变形菌门是 CK-3 组、Y1-3 组和 Y3-3 组这 3 组中共享的优势菌门,而厚壁菌门、拟杆菌门是 Y2-3 组中的优势菌门。Y2-3 组较其他组极显著提高了厚壁菌门、拟杆菌门的相对丰度($P<0.01$),极显著降低了变形菌门的相

对丰度($P<0.01$),且此组中浮霉菌门(Planctomycetes)、Kiritimatiellaota、黏胶球形菌门(Lentisphaerae)的相对丰度也较其他组高(表 4)。上述结果说明饲料中添加不同水平 MOS 对滩羊瘤胃菌群中的优势菌门存在不同的影响,添加 2% MOS 提高了厚壁菌门、拟杆菌门的相对丰度,而降低了变形菌门的相对丰度。

2.5.2 MOS 对滩羊瘤胃菌群在属水平上相对丰度的影响

为了进一步探索不同添加水平的 MOS 对滩羊瘤胃菌群结构影响的差异,对各组菌群进行了属水平上的差异分析,总共得到 56 个菌属,但是由于种类太多且相对丰度太小,仅对排名前 20 的

菌属进行分析,图 7 为聚类热图,绿色越深代表细菌丰度越小,红色越深代表细菌丰度越大。结合图 7 和表 5 可知,CK-3 组 *Rummeliibacillus*、肠球菌属 (*Enterococcus*)、链球菌属 (*Streptococcus*) 的相对丰度极显著大于其他组 ($P < 0.01$),不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 的相对丰度极显著大于 Y1-3 组和 Y2-3 组 ($P < 0.01$)。Y1-3 组丛毛单胞菌属 (*Comamonas*)、埃希氏菌属-志贺菌属 (*Escherichia-Shigella*)、寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas*)、鞘氨醇杆菌属 (*Sphingobacterium*) 的相对丰度极显著大于其他组 ($P < 0.01$)。Y2-3 组赖氨酸芽孢杆菌属 (*Lysinibacillus*)、普雷沃氏菌属 1 (*Prevotella_1*)、醋杆菌属 (*Acetobacter*)、理岩菌科 RC9 肠道群 (*Rikenellaceae_RC9_gut_group*)、克里斯滕森菌科 R-7 群 (*Christensenellaceae_R-7_group*)、乳球菌属 (*Lactococcus*)、解琥珀酸菌属 (*Succiniclasticum*)、瘤胃球菌科 NK4A214 群 (*Ruminococcaceae_NK4A214_group*)、瘤胃球菌属 (*Ruminococcus*)、小梨形菌属 (*Pirellula*) 的相对丰度极显著大于 CK-3 组 ($P < 0.01$)。Y3-3 组狭义梭菌属 1 (*Clostridium_sensu_stricto_1*) 的相对丰度极显著大于其他组 ($P < 0.01$)。p-1088-a5_gut_group、甲烷短杆菌属 (*Methanobrevibacter*) 的相对丰度在 4 组之间差异不显著 ($P > 0.05$)。



CK-3-1、CK-3-2、CK-3-3 为 CK-3 组的 3 个样本, Y1-3-1、Y1-3-2、Y1-3-3 为 Y1-3 组的 3 个样本, Y2-3-1、Y2-3-2、Y2-3-3 为 Y2-3 组的 3 个样本, Y3-3-1、Y3-3-2、Y3-3-3 为 Y3-3 组的 3 个样本。

Three samples in CK-3 group were CK-3-1, CK-3-2, CK-3-3, in Y1-3 group were Y1-3-1, Y1-3-2, Y1-3-3, in Y2-3 group were Y2-3-1, Y2-3-2, Y2-3-3, and in Y3-3 group were Y3-3-1, Y3-3-2, Y3-3-3.

图 4 样本间物种组成聚类分析

Fig.4 Cluster analysis of species composition among samples

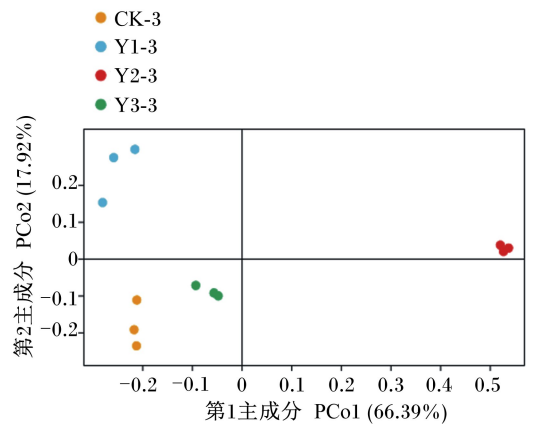


图 5 PCoA 图

Fig.5 PCoA map

3 讨论

有研究表明瘤胃微生物可以利用饲料中的寡糖,添加到饲料中的寡糖在瘤胃中会被降解转化为挥发性脂肪酸^[17]。在 MOS 降解的过程中,对瘤胃发酵模式会产生影响而增加丙酸的产量。有研究者比较了基础饲料、基础饲料+乳寡糖、基础饲料+丝兰植物提取液、基础饲料+乳酸链球菌肽 4 种饲料对绵羊的影响,结果表明,各组干物质、有机物、粗蛋白质、中性洗涤纤维和酸性洗涤纤维的消化率相似,寡糖组微生物氮的供给量最高,乙酸含量最低,丙酸含量最高^[18],说明瘤胃微生物可有效降解寡糖,但是由于瘤胃内环境的复杂性,目前尚不清楚这一系列变化的产生机理。

3.1 MOS 对滩羊瘤胃发酵参数的影响

瘤胃液 pH 可直观反映瘤胃内环境是否正常,其过高或过低均不利于瘤胃微生物的生长、增殖^[19]。本试验中,4 组滩羊瘤胃液 pH 变动范围为 6.45~6.86,在瘤胃液 pH 的正常范围 (5.5~7.5) 内^[20]。此外,本试验条件下,不同添加水平的 MOS 对滩羊瘤胃液 pH 无显著影响,这与张然等^[21]的结果一致,即 MOS 添加水平在各时间点对体外瘤胃培养液 pH 没有产生显著影响,其分析原因可能是 MOS 添加水平 (其最高添加水平为 2%) 太低。瘤胃液 $\text{NH}_3\text{-N}$ 含量可在一定程度上反映出瘤胃微生物分解含氮物质产生 $\text{NH}_3\text{-N}$ 及其利用的情况。 $\text{NH}_3\text{-N}$ 含量过高,会增加瘤胃氮循环中氮素的损失,而 $\text{NH}_3\text{-N}$ 含量过低,则会限制纤维素分解菌分解纤维物质的效率^[22]。本试验中,4 组

滩羊瘤胃液 $\text{NH}_3\text{-N}$ 含量在 13.33~14.85 mg/dL, 在大多研究者认可范围(10~50 mg/dL)之内^[23]。本试验中,不同添加水平的 MOS 对滩羊瘤胃液 $\text{NH}_3\text{-N}$ 含量无显著影响,其中 Y2-3 组 $\text{NH}_3\text{-N}$ 含量最高。这可能是由于,添加 2% MOS 对纤维素分解菌分解纤维物质的效率的影响比其他组小,从而能保证纤维菌的正常生长增殖,也可能是 2% MOS 促进了分解含氮微生物的生长、增殖。瘤胃发酵类型及挥发性脂肪酸产量主要与饲料的类型

密切相关^[24],一般而言,粗饲料中纤维素、半纤维素、木质素的含量较高,瘤胃中发酵产生的乙酸比例较高。本试验中,Y2-3 组瘤胃液乙酸含量显著高于 Y3-3 组、CK-3 组且高于 Y1-3 组,在同等饲料条件下,可能的原因是添加 2% MOS 促进了纤维分解菌的增殖,从而促进了纤维物质的降解。总体而言,添加不同水平 MOS 均可保证滩羊瘤胃内环境正常。

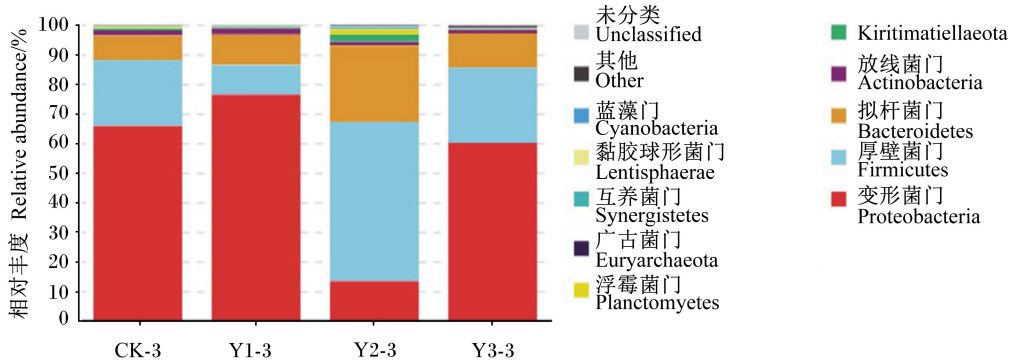


图 6 门水平物种注释

Fig.6 Phylogeny level species annotation

表 4 门水平相对丰度

Table 4 Relative abundance at phylum level

项目 Items	组别 Groups				P 值 P-value
	CK-3	Y1-3	Y2-3	Y3-3	
变形菌门 Proteobacteria	65.83±2.03 ^{Bb}	76.45±2.56 ^{Aa}	13.40±2.93 ^{Dd}	60.12±2.46 ^{Cc}	<0.001
厚壁菌门 Firmicutes	22.24±2.27 ^{Bb}	9.90±0.86 ^{Cc}	53.74±7.44 ^{Aa}	25.41±1.02 ^{Bb}	<0.001
拟杆菌门 Bacteroidetes	8.26±0.41 ^{Bb}	10.35±1.76 ^{Bb}	25.86±4.92 ^{Aa}	11.60±0.96 ^{Bb}	<0.001
放线菌门 Actinobacteria	1.79±0.22 ^{ABa}	2.09±0.35 ^{Aa}	1.27±0.17 ^{Bb}	1.21±0.11 ^{Bb}	0.004
Kiritimatiellaota	0.60±0.20 ^{Bb}	0.51±0.06 ^{Bb}	2.38±0.62 ^{Aa}	0.43±0.06 ^{Bb}	<0.001
浮霉菌门 Planctomycetes	0.64±0.18	0.21±0.04	1.79±1.34	0.27±0.17	0.071
广古菌门 Euryarchaeota	1.14±0.05	1.12±0.06	0.16±0.03	0.52±0.73	0.540
互养菌门 Synergistetes	0.05±0.01 ^{Bb}	0.11±0.03 ^{Bb}	0.39±0.08 ^{Aa}	0.09±0.01 ^{Bb}	<0.001
黏胶球形菌门 Lentisphaerae	0.13±0.06 ^{Bb}	0.07±0.01 ^{Bb}	0.24±0.05 ^{Aa}	0.09±0.01 ^{Bb}	0.004
蓝藻门 Cyanobacteria	0.09±0.01 ^{Bb}	0.08±0.02 ^{Bbc}	0.27±0.02 ^{Aa}	0.06±0.02 ^{Bc}	<0.001
其他 Other	0.15±0.02 ^{Bb}	0.06±0.02 ^{Bb}	0.38±0.11 ^{Aa}	0.12±0.01 ^{Bb}	<0.001
未分类 Unclassified	0.09±0.01 ^{ABa}	0.05±0.02 ^{Bb}	0.10±0.01 ^{Aa}	0.08±0.02 ^{ABab}	0.036

3.2 MOS 对滩羊瘤胃菌群多样性的影响

瘤胃微生物群落结构和多样性长期以来一直是研究的热点话题^[25]。近几年,16S rDNA 高通量测序技术被用来研究反刍动物瘤胃微生物群落结构,更利于学者对瘤胃细菌遗传多样性的探

究^[26-27]。本研究基于 16S rDNA 高通量测序技术,探究添加不同水平 MOS 对滩羊瘤胃菌群多样性的影响。通过质控测序共得 888 992 个有效序列用于后续多样性组成分析。各组样本稀释曲线趋于平缓,表明测序深度覆盖了样本中的大部分

微生物,且覆盖度>0.99,说明测序量和测序深度合理。Alpha 多样性是对样本中物种丰富度和多样性进行分析,主要包括 Chao1 指数、Ace 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数,前 2 个指数可以反映样品中群落的丰富数值,该值越大说明物种数量越多,即丰富度越高;后 2 个指数表示群落的多样性,Shannon 指数越大,Simpson 指数越接近 1,表明多样性越高^[28]。本试验中 4 组滩羊瘤胃菌群 Alpha 多样性指数无显著差异,但是总体来看,添加 MOS 组的瘤胃菌群多样性较对照组有所增加,其中添加 2% MOS 组对瘤胃菌群多样性影响最大,由 Beta 多样性分析可知添加 2% MOS 组的瘤胃菌群构成与对照组相比差异最大。有研究者在锦江黄牛饲粮中添加功能性寡糖组合,结果表明可提升瘤胃液微生物种类^[29],与本试验研究结果

一致。有研究报道,MOS 添加方式对哺乳期犍牛瘤胃菌群多样性未产生显著影响^[30]。有研究表明,低聚糖可通过改变羔羊断奶引起的肠道菌群变化及改变微生物的代谢等来影响动物的生产性能^[31]。Newman 等^[32]在犍牛饲粮每天添加 2 g MOS,5 周后粪便中大肠杆菌数量明显降低且呼吸道疾病减少,从而提高生产性能。赵晓静等^[33]在犍牛饲粮中分别添加 0.1% 和 0.2% (干物质基础)的 MOS,结果显示添加 0.1% 组在降低大肠杆菌和增加乳酸杆菌数量方面均较不添加组和添加 0.2% 组优势明显。任海军^[34]研究发现,饲粮中添加 0.1% 壳聚糖显著增加了奶牛肠道乳酸杆菌数量且降低了大肠杆菌数量。以上结果均说明,添加一定水平的 MOS 可在一定程度上提高滩羊瘤胃菌群的多样性。

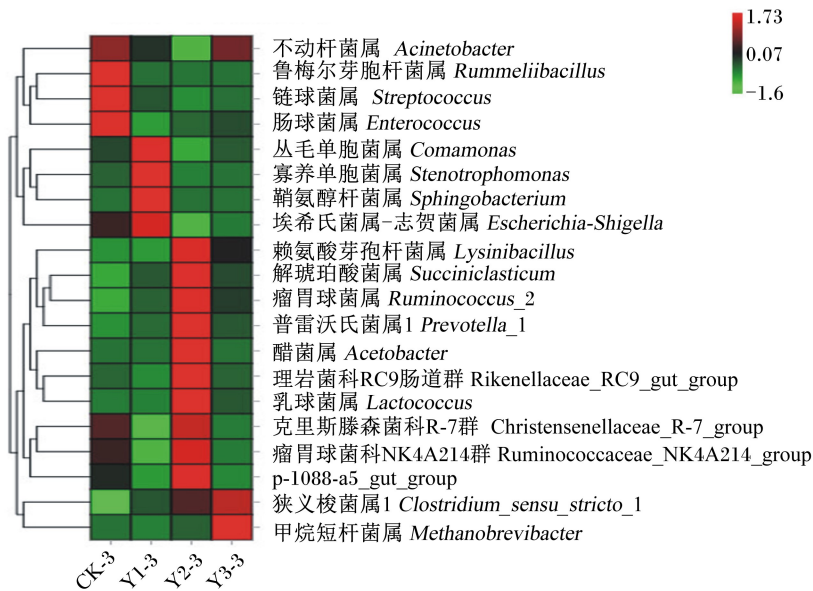


图 7 属水平物种注释

Fig.7 Species annotation at genus level

表 5 属水平相对丰度

Table 5 Relative abundance at genus level

项目 Items	组别 Groups				P 值 P-value
	CK-3	Y1-3	Y2-3	Y3-3	
不动杆菌属 <i>Acinetobacter</i>	52.15±6.77 ^{Aa}	31.04±7.93 ^{Bb}	0.18±0.02 ^{Cc}	48.18±1.39 ^{Aa}	0.001
赖氨酸芽孢杆菌属 <i>Lysinibacillus</i>	5.24±1.09 ^{BCc}	4.51±0.40 ^{Cc}	37.90±9.36 ^{Aa}	17.87±0.99 ^{Bb}	0.001
丛毛单胞菌属 <i>Comamonas</i>	10.97±4.88 ^{Bb}	38.18±7.27 ^{Aa}	0.18±0.02 ^{Bc}	8.88±3.61 ^{Bbc}	0.001
普雷沃氏菌属 1 <i>Prevotella_1</i>	5.03±0.28 ^{Bb}	6.48±1.37 ^{Bb}	17.5±3.50 ^{Aa}	7.16±0.64 ^{Bb}	<0.001
醋杆菌属 <i>Acetobacter</i>	0.03±0.01 ^{Bb}	0.10±0.02 ^{Bb}	11.1±3.31 ^{Aa}	0.10±0.01 ^{Bb}	0.001
<i>Rummeliibacillus</i>	9.07±1.83 ^{Aa}	0.28±0.01 ^{Bb}	0.12±0.04 ^{Bb}	0.17±0.10 ^{Bb}	0.001

续表 5

项目 Items	组别 Groups				P 值 P-value
	CK-3	Y1-3	Y2-3	Y3-3	
理岩菌科 RC9 肠道群 Rikenellaceae_RC9_gut_group	1.62±0.06 ^{Bb}	1.38±0.26 ^{Bb}	3.52±0.56 ^{Aa}	1.63±0.15 ^{Bb}	<0.001
克里斯滕森菌科 R-7 群 Christensenellaceae_R-7_group	2.14±0.18 ^{Bb}	0.80±0.11 ^{Cd}	2.77±0.36 ^{Aa}	1.23±0.08 ^{Cc}	0.001
乳球菌属 <i>Lactococcus</i>	0.08±0.02 ^{Bc}	0.02±0.00 ^{Bc}	4.35±0.46 ^{Aa}	0.60±0.04 ^{Bb}	0.001
肠球菌属 <i>Enterococcus</i>	1.63±0.36 ^{Aa}	0.64±0.05 ^{Bb}	0.80±0.12 ^{Bb}	0.88±0.04 ^{Bb}	<0.001
解琥珀酸菌属 <i>Succiniclasticum</i>	0.43±0.07 ^{Bc}	0.73±0.11 ^{Bbc}	1.67±0.32 ^{Aa}	0.77±0.09 ^{Bb}	<0.001
瘤胃球菌科 NK4A214 群 Ruminococcaceae_NK4A214_group	0.77±0.12 ^{ABb}	0.35±0.03 ^{Cc}	1.08±0.24 ^{Aa}	0.49±0.04 ^{BCc}	<0.001
埃希氏菌属-志贺菌属 <i>Escherichia-Shigella</i>	0.85±0.16 ^{Bb}	1.46±0.23 ^{Aa}	0.05±0.03 ^{Cd}	0.33±0.01 ^{Cc}	0.001
瘤胃球菌属 <i>Ruminococcus</i>	0.20±0.01 ^{Bc}	0.36±0.02 ^{Bbc}	0.97±0.22 ^{Aa}	0.45±0.02 ^{Bb}	<0.001
链球菌属 <i>Streptococcus</i>	0.88±0.20 ^{Aa}	0.35±0.04 ^{Bb}	0.24±0.04 ^{Bb}	0.30±0.04 ^{Bb}	<0.001
寡养单胞菌属 <i>Stenotrophomonas</i>	0.16±0.01 ^{Bb}	1.28±0.21 ^{Aa}	0.04±0.01 ^{Bb}	0.09±0.00 ^{Bb}	0.001
p-1088-a5_gut_group	0.37±0.12	0.11±0.03	0.85±0.85	0.16±0.13	0.218
狭义梭菌属 1 <i>Clostridium_sensu_stricto_1</i>	0.12±0.04 ^{Bc}	0.24±0.03 ^{ABbc}	0.34±0.13 ^{ABb}	0.43±0.06 ^{Aa}	0.005
鞘氨醇杆菌属 <i>Sphingobacterium</i>	0.00±0.00 ^{Bb}	0.98±0.55 ^{Aa}	0.00±0.00 ^{Bb}	0.00±0.00 ^{Bb}	0.006
甲烷短杆菌属 <i>Methanobrevibacter</i>	0.14±0.05	0.12±0.06	0.16±0.03	0.51±0.73	0.543
小梨形菌属 <i>Pirellula</i>	0.11±0.04 ^{Bb}	0.05±0.02 ^{Bb}	0.68±0.39 ^{Aa}	0.08±0.04 ^{Bb}	0.013

3.3 MOS 对滩羊瘤胃菌群结构的影响

有研究发现,拟杆菌门、厚壁菌门是反刍动物纤维物质降解的主要菌群,因此瘤胃中拟杆菌门、厚壁菌门丰度的高低与纤维物质降解紧密相关^[35-36]。本试验中,变形菌门、厚壁菌门和拟杆菌门为 4 组中的优势菌门,与不添加 MOS 组菌群结构组成相比差异由大到小的添加水平依次为 2%、1%、3%,其中添加 2% MOS 组厚壁菌门、拟杆菌门的相对丰度最高,说明添加 2% MOS 组滩羊的瘤胃内环境更利于瘤胃细菌对荞麦秸秆等纤维物质的降解,在奶牛饲粮中添加 MOS 同样发现能够改善瘤胃中纤维素降解菌的丰度和活性^[37-38]。另有研究表明变形菌门丰度的大量增加是胃肠道菌群失调的微生物标志^[39]。本试验中添加 2% MOS 组使变形菌门的相对丰度降低,说明在荞麦秸秆饲粮条件下添加 2% MOS 可能有利于维持滩羊瘤胃菌群微生态平衡,具体机制还有待研究。浮霉菌门是严格厌氧的革兰氏阴性细菌,有研究者为了研究浮霉菌门沿化学梯度的分布,对整个 Sælenvannet 湖的水柱进行了采样,并使用 16S rDNA 扩增子测序和 454 焦磷酸测序对微生物群落

进行了描述,结果表明与浮霉菌门相关的 16S rDNA 基因序列在湖泊的缺氧和氧化部分都存在,并且在整个水柱中分布不均,在 15 m 深的盐碱地缺氧层中其相对丰度最高,为 10%^[40]。另外,有研究者在研究黄粉虫降解肠道塑料废物的能力时发现,其肠道浮霉菌门可以降解燕麦等纤维类饲料,但是在饲喂聚苯乙烯后浮霉菌门的摄食频率增加^[41]。黏胶球形菌门与纤维二糖的降解有关,郭威等^[42]研究发酵玉米秸秆对绵羊瘤胃菌群结构的影响时发现,黏胶球形菌门和纤维杆菌门均为绵羊瘤胃中的优势菌群。本试验中,添加 2% MOS 组滩羊瘤胃菌群中浮霉菌门、Kiritimatiellaeota 和黏胶球形菌门的相对丰度较其他组高,说明添加 2% MOS 有利于增加与纤维分解有关的菌,从而促进荞麦秸秆等纤维物质的降解。

在属水平上,本试验中的 4 组滩羊瘤胃中不同菌群的相对丰度差异明显。相比其他组,添加 2% MOS 对滩羊瘤胃菌群结构及其相对丰度影响最大,其中赖氨酸芽孢杆菌属、普雷沃氏菌属 1、醋杆菌属为优势菌属且其相对丰度极显著大于其他组。普雷沃氏菌属具有多种功能,它不仅能促进

最初的蛋白质分解并协同其他分解纤维素菌发挥作用,提高机体对纤维素的分解能力^[43],且对植物中非纤维性多糖和蛋白质的降解也有一定的作用^[44]。本试验结果说明添加 2% MOS 可促进滩羊瘤胃中普雷沃氏菌的增殖,从而增强对荞麦秸秆等相关纤维物质的降解能力。另外,添加 2% MOS 组滩羊瘤胃菌群中理岩菌科 RC9 肠道群、解琥珀酸菌属、瘤胃球菌属的相对丰度也极显著大于其他组。普雷沃氏菌属 1 和理岩菌科 RC9 肠道群都属于拟杆菌门^[45],所以可推测理岩菌科 RC9 肠道群可能是与非纤维植物成分降解有关的细菌。瘤胃球菌属和琥珀酸菌属均有降解纤维物质的能力^[46-47]。瘤胃球菌科 NK4A214 群属于瘤胃球菌科,有研究表明瘤胃球菌科是一类典型的纤维降解菌^[48],饲料中性洗涤纤维的消化率随着瘤胃球菌科丰度的增加而增加^[49-50]。也有研究表明瘤胃球菌科可促进宿主对饲料中氮的消化和利用^[51-52]。另外,本试验结果显示,添加 2% MOS 组滩羊瘤胃菌群中克里斯滕森菌科 R-7 群、乳球菌属、小梨形菌属的相对丰度也极显著大于其他组,这些微生物可能在滩羊瘤胃体内扮演着重要的生理及生态角色。

4 结 论

① 本试验条件下,饲料中添加不同水平 MOS 均可保证滩羊瘤胃内环境正常。

② 本试验条件下,饲料中添加 MOS 可增加滩羊瘤胃菌群的多样性,其中 2% MOS 对其影响最大。

③ 本试验条件下,饲料中添加 2% MOS 对滩羊瘤胃菌群结构影响最大,可提高纤维素降解菌的相对丰度,有利于增强滩羊对饲料纤维物质的降解能力。

参考文献:

- [1] AGARWAL N, KAMRA D N, CHAUDHARY L C. Rumen microbial ecosystem of domesticated ruminants [M] // PUNIYA A, SINGH R, KAMRA D. Rumen microbiology: from evolution to revolution. New Delhi: Springer, 2015: 17-30.
- [2] KNOELL A L, ANDERSON C L, PESTA A C, et al. Alterations of the rumen bacterial and archaeal communities in growing and finishing beef cattle and its effects on methane emissions [J]. Journal of Animal Science, 2016, 94 (Suppl. 2) : 53-54.
- [3] PITTA D W, INDUGU N, KUMAR S, et al. Metagenomic assessment of the functional potential of the rumen microbiome in Holstein dairy cows [J]. Anaerobe, 2015, 38: 50-60.
- [4] PATEL S, GOYAL A. Functional oligosaccharides: production, properties and applications [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 27 (5) : 1119-1128.
- [5] 刘卫东, 宋素芳, 程璞. 甘露寡糖和益生菌对肉仔鸡生产性能和肠道菌群的影响 [J]. 家畜生态学报, 2011, 32 (1) : 32-35.
- LIU W D, SONG S F, CHENG P. Effects of mannan oligosaccharides and probiotics on production performance and intestinal flora of broilers [J]. Journal of Domestic Animal Ecology, 2011, 32 (1) : 32-35. (in Chinese)
- [6] 万嘉佳, 蒋敏, 李恒, 等. 低聚合度魔芋甘露寡糖对正常小鼠肠道及微生物菌群的影响 [J]. 食品与发酵工业, 2015, 41 (9) : 13-18.
- WAN J J, JIANG M, LI H, et al. Effects of low degree of polymerization konjac mannan oligosaccharide on intestinal tract and microflora of normal mice [J]. Food and Fermentation Industry, 2015, 41 (9) : 13-18. (in Chinese)
- [7] 张学峰. 外源寡糖在绵羊消化道内的降解、转化、利用和流通规律及其对瘤胃微生物区系、免疫和营养物质消化影响的研究 [D]. 博士学位论文. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2007.
- ZHANG X F. Studies on the degradation, transformation, utilization and circulation of exogenous oligosaccharides in the digestive tract of sheep and their effects on rumen microflora, immunity and nutrient digestion [D]. Ph.D. Thesis. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2007. (in Chinese)
- [8] DUAN X D, CHEN D W, ZHENG P, et al. Effects of dietary mannan oligosaccharide supplementation on performance and immune response of sows and their offspring [J]. Animal Feed Science and Technology, 2016, 218: 17-25.
- [9] GIANNENAS I, DOUKAS D, KARAMOUTSIOS A, et al. Effects of *Enterococcus faecium*, mannan oligosaccharide, benzoic acid and their mixture on growth performance, intestinal microbiota, intestinal morphology and blood lymphocyte subpopulations of fattening pigs [J]. Animal Feed Science and Technology, 2016, 220: 159-167.

- [10] VALPOTIĆ H M, SAMARDŽIJA S, TERZIĆ S, et al. Effect of mannan oligosaccharide supplementation on blood and intestinal immune cells, bacteria numbers and performance in weaned pigs [J]. *Acta Veterinaria Brno*, 2016, 85 (3): 267-276.
- [11] BOZKURT M E, BINTAŞ S, KIRKAN H, et al. Comparative evaluation of dietary supplementation with mannan oligosaccharide and oregano essential oil in forced molted and fully fed laying hens between 82 and 106 weeks of age [J]. *Poultry Science*, 2016, 95 (11): 2576-2591.
- [12] ATTIA Y A, ABDAL-HAMID A E, IBRAHIM M S, et al. Productive performance, biochemical and hematological traits of broiler chickens supplemented with propolis, bee pollen, and mannan oligosaccharides continuously or intermittently [J]. *Livestock Science*, 2014, 164: 87-95.
- [13] ABDEL-HAMID T M, FARAHAT M H. Effect of dietary mannan-oligosaccharides on some blood biochemical, haematological parameters and carcass traits in purebred New Zealand White and crossbred rabbits [J]. *Animal Production Science*, 2016, 56 (12): 2133-2139.
- [14] 顾君华, 王欣. 安全饲料和绿色饲料的最终目标和途径 [J]. *饲料工业*, 2002, 23 (8): 1-4.
GU J H, WANG X. The ultimate goal and approach of safe feed and green feed [J]. *Feed Industry*, 2002, 23 (8): 1-4. (in Chinese)
- [15] ZHENG C, LI F D, HAO Z L, et al. Effects of adding mannan oligosaccharides on digestibility and metabolism of nutrients, ruminal fermentation parameters, immunity, and antioxidant capacity of sheep [J]. *Journal of Animal Science*, 2018, 96 (1): 284-292.
- [16] 冯宗慈, 高民. 通过比色测定瘤胃液氨氮含量方法的改进 [J]. *内蒙古畜牧科学*, 1993 (4): 40-41.
FENG Z C, GAO M. An improved method for determining the content of ammonia nitrogen in rumen fluid by colorimetry [J]. *Inner Mongolia Animal Husbandry Science*, 1993 (4): 40-41. (in Chinese)
- [17] 祁茹, 肖宇, 褚永康, 等. 外源寡糖对反刍动物胃肠道微生物区系的影响 [J]. *饲料博览*, 2011 (12): 32-34.
QI R, XIAO Y, CHU Y K, et al. effects of exogenous oligosaccharides on gastrointestinal microflora of ruminants [J]. *Feed Review*, 2011 (12): 32-34. (in Chinese)
- [18] SANTOSO B. Influence of galacto-oligosaccharides supplementation on nitrogen utilization, rumen fermentation, and microbial nitrogen supply in dairy cows fed silage [J]. *Animal Science*, 2003, 16 (8): 1137-1142.
- [19] HOOVER W H, KINCAID C R, VARGA G A, et al. Effects of solids and liquid flows on fermentation in continuous cultures. IV. pH and dilution rate [J]. *Journal of Animal Science*, 1984, 58 (3): 692-699.
- [20] 王加启, 冯仰廉. 不同粗饲料日粮发酵规律及合成瘤胃微生物蛋白质效率研究 [J]. *黄牛杂志*, 1994, 20 (增刊2): 82-85.
WANG J Q, FENG Y L. Study on fermentation regularity of different roughage diets and efficiency of rumen microbial protein synthesis [J]. *Scalper Magazine*, 1994, 20 (Suppl.2): 82-85. (in Chinese)
- [21] 张然, 郑琛, 韩海珠, 等. 应用 Rusitec-S 系统研究甘露寡糖对绵羊体外瘤胃发酵的影响 [J]. *草业科学*, 2018, 35 (9): 2262-2269.
ZHANG R, ZHENG C, HAN H Z, et al. The effect of mannan-oligosaccharide on rumen fermentation of sheep *in vitro* was studied by Rusitec-S system [J]. *Pratacultural Science*, 2018, 35 (9): 2262-2269. (in Chinese)
- [22] HRISTOV A N, ROPP J K, HUNT C W. Effect of barley and its amylopectin content on ruminal fermentation and bacterial utilization of ammonia-N *in vitro* [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2002, 99 (1/2/3/4): 25-36.
- [23] 韩正康, 陈杰. 反刍动物瘤胃的消化和代谢 [M]. 北京: 科学出版社, 1988.
HAN Z K, CHEN J. Rumen digestion and metabolism of ruminants [M]. Beijing: Science Press, 1988. (in Chinese)
- [24] 汪水平, 王文娟, 王加启, 等. 日粮精粗比对奶牛瘤胃发酵及泌乳性能的影响 [J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2007, 35 (6): 45-50.
WANG S P, WANG W J, WANG J Q, et al. Effect of dietary concentrate/roughage ratio on rumen fermentation and lactation performance of dairy cows [J]. *Journal of Northwestern University of Agriculture and Forestry (Natural Science Edition)*, 2007, 35 (6): 45-50. (in Chinese)
- [25] AZEVEDO A C, BENTO C B P, RUIZ J C, et al. Distribution and genetic diversity of bacteriocin gene clusters in rumen microbial genomes [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81 (20): 7290-7304.
- [26] HENDERSON G, COX F, GANESH S, et al. Rumen

- microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 14567.
- [27] 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.
- [28] 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.
- [29] 闵力. 功能性寡糖组合对锦江黄牛瘤胃微生物区系的影响 [D]. 硕士学位论文. 南昌: 江西农业大学, 2012.
- MIN L. Effect of functional oligosaccharide combination on rumen microflora of *Jinjiang* yellow cattle [D]. Master's Thesis. Nanchang: Jiangxi Agricultural University, 2012. (in Chinese)
- [30] 冶文兴, 张洁, 陈林, 等. 甘露寡糖添加方式对哺乳期犊牛瘤胃细菌菌群结构的影响 [J]. *草业科学*, 2020, 37 (5): 984–992.
- YE W X, ZHANG J, CHEN L, et al. Effect of mannose oligosaccharide addition on rumen bacterial flora structure of lactating calves [J]. *Pratacultural Science*, 2020, 37 (5): 984–992. (in Chinese)
- [31] WANG Y, HAN F, HU B, et al. *In vivo* prebiotic properties of alginate oligosaccharides prepared through enzymatic hydrolysis of alginate [J]. *Nutrition Research*, 2006, 26 (11): 597–603.
- [32] NEWMAN K, JACQUEA K, BUEDE R. Effect of mannan-oligosaccharide supplementation on performance and fecal bacteria of Holstein calves [J]. *Journal of Animal Sciences*. 1993, 71 (Suppl.1): 271.
- [33] 赵晓静, 李建国, 李秋凤, 等. 甘露寡糖对犊牛粪便菌群影响的研究 [J]. *中国畜牧杂志*, 2007, 43 (5): 31–34.
- ZHAO X J, LI J G, LI Q F, et al. Study on the effect of mannan oligosaccharides on fecal microflora of calves [J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2007, 43 (5): 31–34. (in Chinese)
- [34] 任海军. 壳聚糖对奶牛产奶性能和免疫功能影响的研究 [D]. 硕士学位论文. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2008.
- REN H J. Effects of chitosan on milk production performance and immune function of dairy cattle [D]. Master's Thesis. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2008. (in Chinese)
- [35] 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.
- [36] 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.
- [37] RAJENDHRAN J, GUNASEKARAN P. Microbial phylogeny and diversity: small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond [J]. *Microbiological Research*, 2011, 166 (2): 99–110.
- [38] 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.
- ZHAO G C. Cloning, Identification and expression of cellulase gene from uncultured bovine rumen [D]. Master's Thesis. Nanning: Guangxi University, 2005. (in Chinese)
- [39] 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.
- [40] STORESUND J E, LANZÈN A, NORDMANN E L, et al. Planctomycetes as a vital constituent of the microbial communities inhabiting different layers of the meromictic lake *Sælenvannet* (Norway) [J]. *Microorganisms*, 2020, 8 (8): 1150.
- [41] PRZEMIENIECKI S W, KOSEWSKA A, CIESIELSKI S, et al. Changes in the gut microbiome and enzymatic profile of *Tenebrio molitor* larvae biodegrading cellulose, polyethylene and polystyrene waste [J]. *Environment Pollution*, 2020, 256: 113265.
- [42] 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.
- GUO W, GUO X J, ZHOU X, et al. Effect of corn straw fermented with compound bacteria on the multiplicity of microflora in sheep rumen fluid [J]. *Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2018, 49 (4): 736–745. (in Chinese)
- [43] 杨琦玥, 黄勇, 陈亚冰, 等. 16S rRNA 高通量测序技

- 术筛选牦牛瘤胃细菌基因组 DNA 提取方法及菌群结构[J]. 中国农业科学, 2017, 50(5): 932-941.
- YANG Q Y, HUANG Y, CHEN Y B, et al. Screening of genomic DNA extraction and flora structure of rumen bacteria of yak by 16S rRNA high-throughput sequencing technique [J]. Chinese Agricultural Sciences, 2017, 50(5): 932-941. (in Chinese)
- [44] 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.
- [45] CUI X X, WANG Z F, YAN T H, et al. Rumen bacterial diversity of Tibetan sheep (*Ovis aries*) associated with different forage types on the Qinghai-Tibetan plateau [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2019, 65(12): 859-869.
- [46] GRILLI D J, CERÓN M E, PAEZ S, et al. Isolation of *Pseudobutyrvibrio ruminis* and *Pseudobutyrvibrio xylinivorans* from rumen of Creole goats fed native forage diet [J]. Folia Microbiologica, 2012, 58(5): 367-373.
- [47] KOIKE S, KOBAYASHI Y. Fibrolytic rumen bacteria; their ecology and functions [J]. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2009, 22(1): 131-138.
- [48] EZAKI T. Ruminococcus [M]. New York: John Wiley & Sons, Ltd., 2015.
- [49] PATRA A K, YU Z T. Essential oils affect populations of some rumen bacteria *in vitro* as revealed by microarray (RumenBactArray) analysis [J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 297.
- [50] ZHAO X H, CHEN Z D, ZHOU S, et al. Effects of daidzein on performance, serum metabolites, nutrient digestibility, and fecal bacterial community in bull calves [J]. Animal Feed Science and Technology, 2017, 225: 87-96.
- [51] 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.
- [52] WANG L Z, LIU K Z, WANG Z S, et al. Bacterial community diversity associated with different utilization efficiencies of nitrogen in the gastrointestinal tract of goats [J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 239.

Effect of Mannan Oligosaccharides on Rumen Bacterial Flora Structure of *Tan* Sheep under Buckwheat Straw Diet Condition

MA Xiuhua GUI Ruiqi* JIAO Na YANG Wanzong LI Qingmin ZHOU Yuxiang**

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

Abstract: The purpose of this experiment was to explore the effects of adding different levels of mannose oligosaccharides (MOS) on the rumen bacterial flora structure of *Tan* sheep under the condition of buckwheat straw diet using 16S rDNA sequencing technology. Twenty *Ningxia* weaned *Tan* wethers, healthy and weighing about 30.5 kg, were randomly divided into 4 groups and each group had 5 sheep. The sheep CK-3 group (control group) was fed a basal diet, and the sheep in test groups were fed the basal diet supplemented with was fed with 1% (Y1-3 group), 2% (Y2-3 group) and 3% (Y3-3 group) MOS, respectively. The test period was 75 days, of which the pre-feeding period was 15 days and the normal feeding period was 60 days. The results showed as follows: 1) only the acetate content in rumen fluid in Y1-3 group and Y2-3 group was significantly higher than that of Y3-3 group ($P < 0.05$), adding different levels of MOS had no significant effects on the other rumen fermentation parameters ($P > 0.05$). 2) Alpha diversity analysis showed that the diversity of rumen bacterial flora in Y1-3 group, Y2-3 group and Y3-3 group was increased compared with CK-3 group. Cluster analysis showed that, Compared with CK-3 group, the differences in the composition of the rumen bacterial flora in test groups from large to small were Y2-3 group, Y1-3 group, and Y3-3 group. 3) At the phylum level, the Y2-3 group significantly increased the relative abundances of Firmicutes and Bacteroides ($P < 0.01$) and significantly decreased the relative abundance of Proteobacteria compared with other groups ($P < 0.01$), and the relative abundances of Planctomycete, Spirophyta and Glucosphere were also higher than those in other groups. 4) At the genus level, compared with other groups, adding 2% MOS had the greatest impact on the structure of rumen bacterial flora of *Tan* sheep, the relative abundances of 9 bacteria genera including three dominant bacteria genera of *Lysinibacillus*, *Prevotella_1* and *Acetobacter* were significantly higher than those in other groups ($P < 0.01$). In general, adding MOS to the buckwheat straw diet can increase the diversity of rumen bacterial flora of *Tan* sheep. Among them, addition of 2% MOS has the greatest impact on the structure of the rumen bacterial flora of *Tan* sheep, and it is beneficial to improve the ability of *Tan* sheep to degrade dietary fiber substances. [Chinese Journal of Animal Nutrition, 2021, 33(4):2365-2377]

Key words: mannose-oligosaccharide; 16S rDNA; *Tan* sheep; rumen bacteria

* Contributed equally

** Corresponding author, professor, E-mail: zhyxzhww@163.com