

饲料精粗比和添加硫胺素对奶牛体外瘤胃 发酵参数及菌群结构的影响

潘晓花 王梦芝 付 聪 王洪荣*

(扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225009)

摘 要: 本试验采用体内逐渐提高奶牛饲料精料水平与体外批次培养相结合的方法建立亚急性瘤胃酸中毒模型, 旨在研究不同精粗比饲料对硫胺素微生物净合成量的影响, 以及添加硫胺素对亚急性瘤胃酸中毒状态下奶牛体外瘤胃发酵参数和菌群结构的影响。试验采用 2×4 因子完全随机试验设计, 因素 1 为硫胺素添加水平, 设 0 和 180 mg/kg 2 个水平, 因素 2 为饲料的精粗比, 设 4 个水平, 分别为 40:60、50:50、60:40、70:30。试验共设 8 个处理, 每个处理 3 个重复, 于体外培养 0、3、6、9、12 h 后采集样品。结果表明: 随着精料水平的提高, 培养液中硫胺素的微生物净合成量呈先升高后降低的趋势, 其中精粗比为 40:60、70:30 的饲料组培养液中硫胺素的微生物净合成量在 3、9、12 h 时均显著或极显著低于精粗比为 50:50 和 60:40 的饲料组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。在 12 h 时, 随着精料水平的提高, 培养液 pH 极显著降低 ($P < 0.01$), 精粗比为 70:30 的饲料组发生亚急性瘤胃酸中毒; 与未添加组相比, 添加硫胺素组培养液 pH 极显著提高 ($P < 0.01$)。在 6、9、12 h 时, 精粗比为 60:40 和 70:30 的饲料组培养液中乳酸浓度极显著高于精粗比为 40:60 的饲料组 ($P < 0.01$); 在 3、9 h 时, 添加硫胺素可极显著降低培养液中乳酸浓度 ($P < 0.01$)。饲料精粗比对培养液中溶纤维丁酸弧菌和反刍兽新月形单胞菌的数量无显著影响 ($P > 0.05$), 但可显著或极显著影响培养液中牛链球菌、乳酸杆菌和埃氏巨型球菌的数量 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与未添加组相比, 添加硫胺素组培养液中牛链球菌的数量降低了 3.84% ($P < 0.01$), 埃氏巨型球菌的数量提高了 4.02% ($P < 0.01$), 但乳酸杆菌、溶纤维丁酸弧菌和反刍兽新月单胞菌的数量未发生显著变化 ($P > 0.05$)。由此得出, 在高精料饲料条件下, 瘤胃中硫胺素的微生物净合成量降低, 发生亚急性瘤胃酸中毒; 添加硫胺素可通过提高瘤胃 pH, 降低乳酸浓度, 以及调节瘤胃菌群结构来缓解亚急性瘤胃酸中毒。

关键词: 精粗比; 硫胺素; 瘤胃; 发酵参数; 菌群结构

中图分类号: S816

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2013)01-0088-12

在当前集约化饲养模式下, 为了提高动物的生产效率而大量饲喂以淀粉为主要能源的高精料饲料, 使得亚急性瘤胃酸中毒 (subacute ruminal acidosis, SARA) 等代谢性疾病的发病率升高, 而防治瘤胃酸中毒的传统措施主要是控制饲料中淀粉等精料的比例或添加碳酸氢钠等碱类物质^[1], 以及添加莫能菌素等抗生素以抑制瘤胃微生物产乳

酸^[2], 但碳酸氢钠只能暂时缓解酸中毒, 而很多抗生素会抑制纤维降解菌对粗饲料的降解并存在安全问题, 这使得抗生素逐渐被禁用, 因此寻求一种安全高效的缓解瘤胃酸中毒的途径具有重要意义。最新的一些研究表明: 瘤胃微生物硫胺素代谢与瘤胃酸中毒有密切关系, 向高精料饲料中添加硫胺素能提高瘤胃液 pH, 降低乳酸、组胺及内

收稿日期: 2012-07-23

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31072051)

作者简介: 潘晓花 (1988—), 女, 河南商丘人, 硕士研究生, 研究方向为动物营养与饲料科学。E-mail: pan200619880926@163.com

* 通讯作者: 王洪荣, 教授, 博士生导师, E-mail: hrwang@yzu.edu.cn

毒素浓度,以缓解瘤胃酸中毒^[3-5]。而瘤胃酸中毒得以缓解的根本原因是瘤胃微生物中乳酸利用菌和乳酸产生菌的比例逐渐恢复平衡,但有关硫酸脲素调控瘤胃菌群结构的研究鲜见报道。因此,本试验旨在采用人工瘤胃法研究不同精粗比饲粮对硫酸脲素微生物净合成量的影响,以及添加硫酸脲素对体外瘤胃发酵参数和菌群结构的影响,以期揭示硫酸脲素缓解亚急性瘤胃酸中毒的根本原因,为硫酸脲素在反刍动物中的实际应用提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验动物与饲粮

为了减少体外直接诱导亚急性瘤胃酸中毒及体内饲粮因素造成的影响,本试验采用体内初步诱导奶牛发生亚急性瘤胃酸中毒与体外培养相结合的研究方法。试验选用3头安装永久性瘤胃瘘

管、体重为(650 ± 20) kg、平均日产奶量为(16.5 ± 0.5) kg、身体健康状况良好的4岁龄荷斯坦奶牛。每天于06:00和18:00按奶牛体重2%的干物质质量等量饲喂,自由饮水。试验分为4期,每期饲喂10 d,依次饲喂精粗比为40:60、50:50、60:40、70:30的试验饲粮,经测定发现第4期饲喂结束后亚急性瘤胃酸中毒诱导成功。试验饲粮组成及营养水平见表1。

1.2 体外培养试验方法

1.2.1 体外发酵装置

参照 Menke 等^[6]的方法安装人工瘤胃装置,由恒温振荡水浴锅和具3孔(进气口、出气口及采样通道)橡皮塞的250 mL三角烧瓶组成。三角烧瓶用橡皮塞塞好后,调节气体流量,使其在39 °C条件下培养。

表1 试验饲粮组成及营养水平(干物质基础)

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

%

项目 Items	精粗比 Concentrate to forage ratio			
	40:60	50:50	60:40	70:30
原料 Ingredients				
羊草 Chinese hay	14.66	13.23	10.48	6.08
苜蓿 Alfalfa	14.66	13.23	10.48	6.08
玉米青贮 Corn silage	30.34	24.01	19.65	17.96
混合精料 Mixed concentrate ¹⁾	40.34	49.53	59.39	69.88
合计 Total	100.00	100.00	100.00	100.00
营养水平 Nutrient levels ²⁾				
泌乳净能 NE _L /(MJ/kg)	6.83	6.99	7.14	7.28
粗蛋白质 CP	14.31	15.20	15.98	16.63
非纤维性碳水化合物 NFC	46.79	47.98	52.77	58.39
中性洗涤纤维 NDF	39.32	34.27	29.15	25.39
非纤维性碳水化合物/中性洗涤纤维 NFC/NDF	1.19	1.40	1.81	2.30
钙 Ca	0.49	0.55	0.53	0.47
磷 P	0.29	0.32	0.35	0.31

¹⁾混合精料组成 Composition of the mixed concentrate:玉米 corn 29.0%,玉米压片 corn compressor 28%,豆粕 soybean meal 12.0%,玉米干酒糟及其可溶物 corn DDGS 12.0%,棉籽粕 cottonseed meal 12.0%,磷酸氢钙 CaHPO₄ 2.0%,碳酸钙 CaCO₃ 0.7%,食盐 NaCl 1.0%,碳酸氢钠 NaHCO₃ 1.5%,瘤胃专用酵母活性饲料 ruminant-specified active yeast feed (XP) 0.5%,氧化镁 MgO 0.5%,预混料 premix 0.8%。每千克预混料中含有 One kilogram of premix contains the following:CuSO₄ · 5H₂O 3 125 mg,FeSO₄ · H₂O 9 375 mg,MnSO₄ · H₂O 14 375 mg,ZnSO₄ · 7 H₂O 13 125 mg,Co 0.3 mg,Se 0.2 mg,I (as potassium iodide) 6.25 mg,VA 1 500 000 IU,VD₃ 1 250 000 IU,VE 3 125 mg,尼克酸 niacin 4 500 mg,胆碱 choline 125 000 mg。

²⁾产奶净能、非纤维性碳水化合物和非纤维性碳水化合物/中性洗涤纤维为计算值,其余营养水平为实测值。NE_L, NFC and NFC/NDF are calculated values, while other nutrient levels are measured values.

1.2.2 体外发酵液

于第4期结束后次日晨饲前采集瘤胃液用于体外培养。在晨饲前,利用自制真空负压装置,通过奶牛瘤胃瘘管从3头奶牛瘤胃内各采取250 mL的瘤胃液,经4层纱布过滤,将滤液装于事先通有CO₂的灭菌生理盐水瓶中,混合均匀,于39℃水浴保温。

人工唾液盐参照 Menke 等^[6]的方法于使用的

前1天配制,按照2:1的比例将人工唾液盐和瘤胃液混合制备体外发酵液。

1.2.3 体外发酵底物

将粉碎的滤纸纤维素、羧甲基纤维素、果胶、木聚糖、小麦淀粉和可溶性淀粉按表2所列比例配制成精粗比分别为40:60、50:50、60:40和70:30的4种半纯合饲料,作为4个时期体外培养的底物,底物添加量为2 g。

表2 体外培养底物的组成

Table 2 Composition of substrates used for culture *in vitro*

%

底物组成 Substrate composition	精粗比 Concentrate to forage ratio			
	40:60	50:50	60:40	70:30
酪蛋白 Casein	17.0	17.0	17.0	17.0
小麦淀粉 Wheat starch	25.6	31.9	38.4	44.7
可溶性淀粉 Soluble starch	3.8	4.8	5.7	6.7
果胶 Pectin	3.8	4.8	5.7	6.7
木聚糖 Xylan	10.4	8.7	7.0	5.3
羧甲基纤维素 Carboxymethylcellulose	19.7	16.4	13.1	9.8
滤纸纤维素 Filter paper cellulose	19.7	16.4	13.1	9.8
合计 Total	100.0	100.0	100.0	100.0

1.2.4 试验设计

根据本课题组前期硫酸素添加水平和体外培养的试验结果^[5],确定硫酸素的最佳添加量为180 mg/kg。试验采用2×4因子完全随机试验设计,因素1为硫酸素添加水平,设0和180 mg/kg 2个水平;因素2为底物精粗比,设4个水平,分别为40:60、50:50、60:40、70:30。试验共设8个处理,每个处理3个重复,于体外培养0、3、6、9和12 h后采集培养液用于各指标的测定。

1.3 指标测定与方法

1.3.1 培养液中硫酸素微生物净合成量的测定

参照董淑红^[7]的方法,采用荧光分光光度法测定未添加硫酸素时不同精粗比饲料条件下各采样时间点(0、3、6、9、12 h)培养液中硫酸素的含量,3、6、9、12 h时培养液中硫酸素的微生物净合成量表示为相对于0 h的增加量。

1.3.2 瘤胃发酵参数的测定

培养液pH的测定采用雷磁pHS-3C型pH计于采样后立即测定,培养液中乳酸浓度的测定参照文献^[8]的方法。

1.3.3 瘤胃菌群结构的测定

对体外培养9 h的培养液中的细菌进行定量。

瘤胃细菌基因组DNA的提取采用反复冻融法,参照Zhou等^[9]的方法进行;瘤胃细菌定量采用PCR标准曲线法,引物序列见表3。PCR反应体系(20 μL)如下:10 μmol/L的上、下游引物各0.8 μL,2×SYBR Green II 10 μL,ROX II 0.4 μL,模板(50 ng/μL)2 μL,加无菌水至20 μL。PCR反应参数参照TaKaRa试剂盒(DR081A, TaKaRa)说明书进行。参照吕莉华等^[10]的方法构建质粒,用以验证扩增片段的准确性并建立标准曲线。

1.4 数据处理

试验数据用Excel 2003建立数据库,通过SAS 9.1.3软件中的ANOVA模块进行单因素及两因素方差分析,运用Duncan氏法进行多重比较, $P < 0.05$ 为差异显著,结果以平均值±标准差或平均值与平均标准误表示。

2 结果

2.1 饲料精粗比对培养液中硫酸素微生物净合成量的影响

由表4可知,随着培养时间的延长,硫酸素的微生物净合成量呈先降低后升高的趋势,精粗比

为 40:60 和 50:50 的饲粮组在培养至 6 h 时其硫胺素微生物净合成量降至最低, 精粗比为 60:40 和 70:30 的饲粮组在培养至 9 h 时其硫胺素微生物净合成量降至最低。随着饲粮精料水平的增加, 硫胺素的微生物净合成量呈现先升高后降低的趋势, 在 3、6、12 h 时常规饲粮(精粗比为 40:60)组和高精料饲粮(精粗比为 70:30)组差异不显著

($P > 0.05$), 但上述 2 组在 3、9、12 h 时均显著或极显著低于精粗比为 50:50 和 60:40 的饲粮组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。此外, 高精料饲粮(精粗比为 70:30)组硫胺素的微生物净合成量在 9 h 时达到最低, 极显著低于其他各组($P < 0.01$), 并且相对于其 0 h 时的增加量为 $-0.037 \mu\text{g/mL}$ 。

表 3 瘤胃细菌 PCR 的引物序列

Table 3 Primer sequences for PCR of rumen bacteria

瘤胃细菌 Rumen bacteria	引物序列 Primer sequence(5'—3')	扩增片段 Amplification size/bp	登录号 Accession No.
牛链球菌 <i>Streptococcus bovis</i>	上游: CGATACATAGCCGACCTGAG 下游: TAGTTAGCCGTCCTTTCTG	235	AF135453.1
溶纤维丁酸弧菌 <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	上游: GGAGCAAACAGGATTAGATACCC 下游: TGACGACAACCATGCACCAC	293	EU684229.1
乳酸杆菌 <i>Lactobacillus</i>	上游: AGCGAACAGGATTAGATACCC 下游: GATGGCACTAGATGTCAAGACC	233	AY763429.1
反刍兽新月形单胞菌 <i>Selenomonas ruminantium</i>	上游: GAGCGAACAGGATTAGATACCC 下游: TGCCTCGAATTAACACATAC	194	AB198424.1
埃氏巨型球菌 <i>Megasphaera elsdenii</i>	上游: GACCGAAACTGCGATGCTAGA 下游: CGCCTCAGCGTCAGTTGTC	129	AF283705

埃氏巨型球菌引物序列参考 Ouwerkerk 等^[11], 其他引物序列自行设计。

Megasphaera elsdenii primer sequence was cited from Ouwerkerk, et al^[11], and others were designed by self.

表 4 饲粮精粗比对培养液中硫胺素微生物净合成量的影响

Table 4 Effects of dietary concentrate to roughage ratio on microbial net synthetic quantity of thiamine in culture solution

精粗比 Concentrate to roughage ratio	采样时间点 Sampling time point/h			
	3	6	9	12
40:60	0.015 ± 0.001 ^b	0.003 ± 0.001 ^{Bb}	0.003 ± 0.001 ^{Bb}	0.012 ± 0.002 ^{Bb}
50:50	0.041 ± 0.005 ^a	0.009 ± 0.003 ^{Bb}	0.017 ± 0.005 ^{Aa}	0.040 ± 0.004 ^{Aa}
60:40	0.044 ± 0.002 ^a	0.022 ± 0.001 ^{Aa}	0.015 ± 0.003 ^{Aa}	0.034 ± 0.006 ^{Aa}
70:30	0.010 ± 0.002 ^b	0.009 ± 0.001 ^{Bb}	-0.037 ± 0.001 ^{Cc}	0.012 ± 0.004 ^{Bb}
P 值 P-value	0.042	<0.010	<0.010	<0.010

同列数据肩标无字母或相同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 column, values with no letter or the same 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 饲粮精粗比和添加硫胺素对奶牛体外瘤胃发酵参数的影响

2.2.1 饲粮精粗比和添加硫胺素对培养液 pH 的影响

由表 5 可知, 培养液 pH 与底物的精粗比有着

密切的关系, 除精粗比为 50:50 的饲粮组与精粗比为 40:60 的饲粮组在 3、6、9 h 时未达显著差异($P > 0.05$)外, 各时间点培养液 pH 均随饲粮精料水平的增加而极显著降低($P < 0.01$), 其中精粗比为 70:30 的饲粮组在 6、9、12 h 时的培养液 pH 均

低于 5.70, 达到轻度亚急性瘤胃酸中毒状态^[12]。在体外培养 3~12 h 的时间段内, 饲料中添加硫胺

素可极显著提高培养液 pH ($P < 0.01$)。此外, 各组培养液 pH 均随着培养时间的延长而降低。

表 5 饲料精粗比和添加硫胺素对培养液 pH 的影响

Table 5 Effects of dietary concentrate to forage ratio and thiamine supplementation on pH in culture solution

硫胺素添加量 Thiamine supplemental level/(mg/kg)	精粗比 Concentrate to forage ratio	采样时间点 Sampling time point/h				
		0	3	6	9	12
0	40:60	6.46 ± 0.02	6.48 ± 0.01	6.34 ± 0.02	6.23 ± 0.10	6.05 ± 0.02
	50:50	6.44 ± 0.04	6.43 ± 0.04	6.23 ± 0.08	6.23 ± 0.05	6.09 ± 0.07
	60:40	6.45 ± 0.02	6.35 ± 0.04	6.06 ± 0.04	5.90 ± 0.15	5.85 ± 0.13
	70:30	6.43 ± 0.06	5.99 ± 0.04	5.70 ± 0.12	5.65 ± 0.08	5.60 ± 0.08
180	40:60	6.48 ± 0.02	6.61 ± 0.03	6.45 ± 0.03	6.40 ± 0.08	6.19 ± 0.06
	50:50	6.45 ± 0.01	6.53 ± 0.01	6.42 ± 0.03	6.36 ± 0.02	5.97 ± 0.04
	60:40	6.46 ± 0.01	6.32 ± 0.04	6.12 ± 0.02	6.01 ± 0.02	5.92 ± 0.03
	70:30	6.45 ± 0.05	6.14 ± 0.03	6.00 ± 0.04	5.94 ± 0.01	5.92 ± 0.06
硫胺素添加量 Thiamine supplemental level/(mg/kg)	0	6.45	6.34 ^{Bb}	6.08 ^{Bb}	6.00 ^{Bb}	5.90 ^{Bb}
	180	6.46	6.42 ^{Aa}	6.25 ^{Aa}	6.17 ^{Aa}	6.00 ^{Aa}
精粗比 Concentrate to forage ratio	40:60	6.47	6.52 ^{Aa}	6.38 ^{Aa}	6.31 ^{Aa}	6.14 ^{Aa}
	50:50	6.45	6.50 ^{Aa}	6.34 ^{Aa}	6.29 ^{Aa}	6.01 ^{Bb}
	60:40	6.46	6.33 ^{Bb}	6.09 ^{Bb}	5.95 ^{Bb}	5.89 ^{Cc}
	70:30	6.44	6.07 ^{Cc}	5.85 ^{Cc}	5.80 ^{Cc}	5.76 ^{Dd}
平均标准误 SEM		0.02	0.03	0.02	0.04	0.04
<i>P</i> 值 <i>P</i> -value						
硫胺素添加量 Thiamine supplemental level		0.363 0	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	0.002 7
精粗比 Concentrate to forage ratio		0.524 2	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1
硫胺素添加量 × 精粗比 Thiamine supplemental level × concentrate to forage ratio		0.986 6	0.007 7	0.000 4	0.203 9	0.002 0

2.2.2 饲料精粗比和添加硫胺素对培养液中乳酸浓度的影响

由表 6 可知, 随着培养时间的增加, 各组培养液中乳酸浓度均呈先上升后降低, 至 12 h 时又有所升高的趋势。在 3 h 时, 精粗比为 70:30 的饲料组培养液中乳酸浓度极显著高于其他 3 组 ($P < 0.01$); 在 6~12 h 时, 精粗比为 60:40 和 70:30 的饲料组培养液中乳酸浓度均极显著高于精粗比为 40:60 的饲料组 ($P < 0.01$)。在 3、9 h 时, 饲料添加硫胺素可极显著降低培养液中乳酸浓度 ($P < 0.01$), 但在其他时间点饲料添加硫胺素对培养液中乳酸浓度的影响差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.3 饲料精粗比和添加硫胺素对奶牛体外瘤胃菌群结构的影响

2.3.1 瘤胃菌群的常规 PCR 扩增

以提取的细菌基因组 DNA 为模板扩增各目标片段, 用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 牛链球菌、溶纤维丁酸弧菌、埃氏巨型球菌、反刍兽新月单胞菌、乳酸杆菌目标片段常规 PCR 扩增结果见图 1。由图知, 每种引物实际扩增片段大小与预期的目的片段大小相符。将这 5 种 PCR 产物回收、克隆、构建重组质粒测定, 并对阳性克隆测定, 测序结果与 GenBank Blast 进行序列同源性分析, 与标准菌株相似性均在 95% 以上, 克隆的片段含有完整的引物对序列, 说明质粒构建成功, 可以用于制作标准曲线。

表 6 饲粮精粗比和添加硫胺素对培养液中乳酸浓度的影响

Table 6 Effects of dietary concentrate to forage ratio and thiamine supplementation on lactate concentration in culture solution

硫胺素添加量 Thiamine supplemental level/(mg/kg)	精粗比 Concentrate to forage ratio	采样时间点 Sampling time point/h					
		0	3	6	9	12	
0	40:60	3.15 ± 0.36	4.50 ± 0.54	2.97 ± 0.09	2.88 ± 0.27	3.87 ± 0.09	
	50:50	2.97 ± 0.09	3.69 ± 0.45	3.42 ± 1.35	3.87 ± 0.18	5.13 ± 0.18	
	60:40	3.69 ± 1.26	5.40 ± 0.54	5.45 ± 0.09	5.04 ± 0.36	5.76 ± 0.09	
	70:30	3.96 ± 0.36	5.04 ± 0.09	4.86 ± 0.27	5.94 ± 1.26	6.39 ± 0.27	
180	40:60	3.51 ± 0.54	3.78 ± 0.27	3.15 ± 0.18	2.52 ± 0.36	2.88 ± 0.27	
	50:50	3.15 ± 0.09	3.06 ± 0.18	3.33 ± 0.36	2.61 ± 0.18	5.04 ± 1.17	
	60:40	4.32 ± 0.63	3.60 ± 0.45	3.78 ± 0.54	4.59 ± 0.09	5.67 ± 0.36	
硫胺素添加量 Thiamine supplemental level/(mg/kg)	0	3.42 ^{Aa}	4.68 ^{Aa}	3.96 ^{Aa}	5.31 ^{Aa}	4.50 ^{Aa}	
	180	3.69 ^{Aa}	3.87 ^{Bb}	3.78 ^{Aa}	4.95 ^{Bb}	3.69 ^{Aa}	
	精粗比 Concentrate to forage ratio	40:60	3.33 ^{ab}	4.14 ^{Bb}	3.06 ^{Bb}	2.79 ^{Bb}	3.33 ^{Bb}
		50:50	3.06 ^b	3.42 ^{Cc}	3.42 ^{Bb}	3.33 ^{Bb}	5.13 ^{Aa}
		60:40	3.96 ^a	4.32 ^{Bb}	4.59 ^{Aa}	4.86 ^{Aa}	5.76 ^{Aa}
70:30		3.87 ^a	5.22 ^{Aa}	4.50 ^{Aa}	5.40 ^{Aa}	6.39 ^{Aa}	
平均标准误 SEM		0.36	0.27	0.27	0.27	0.45	
<i>P</i> 值 <i>P</i> -value							
硫胺素添加量 Thiamine supplemental level		0.269 4	0.000 3	0.259 8	0.002 5	0.258 1	
精粗比 Concentrate to forage ratio		0.035 7	0.005 8	0.002 3	<0.000 1	0.005 0	
硫胺素添加量 × 精粗比 Thiamine supplemental level × concentrate to forage ratio		0.746 5	0.004 6	0.446 0	0.367 8	0.629 3	

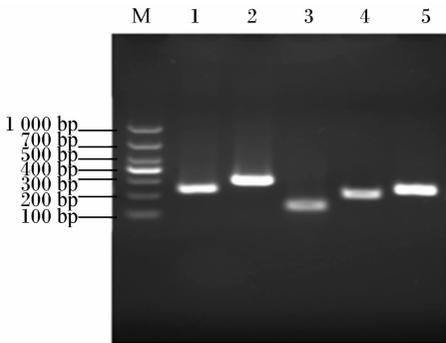
2.3.2 质粒标准曲线

由 ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪的软件自动生成质粒标准品扩增反应曲线。绘制出的荧光定量 PCR 标准曲线方程分别为: 牛链球菌, $Y = -3.05X + 36.25$, $R^2 = 0.996$; 溶纤维丁酸弧菌, $Y = -3.35X + 36.77$, $R^2 = 0.985$; 埃氏巨型球菌, $Y = -2.99X + 42.51$, $R^2 = 0.930$; 反刍兽新月单胞菌, $Y = -2.93X + 36.25$, $R^2 = 0.993$; 乳酸杆菌, $Y = -3.18X + 37.45$, $R^2 = 0.987$ 。其中 X 表示拷贝数的对数, Y 表示 Ct 值。5 对引物的扩增效率均在 0.9 ~ 1.2 的范围内, 所建立的标准曲线符合 PCR 定量的要求。

2.3.3 PCR 定量分析饲粮精粗比和添加硫胺素对瘤胃菌群结构的影响

由表 7 可知, 随着底物精料水平的增加, 培养

液中牛链球菌和乳酸杆菌的数量呈增加趋势, 而培养液中埃氏巨型球菌的数量则呈先升高后降低的变化趋势。其中, 精粗比为 60:40 和 70:30 的饲粮组培养液中牛链球菌和乳酸杆菌的数量极显著高于精粗比为 40:60 和 50:50 的饲粮组 ($P < 0.01$); 精粗比为 50:50 和 60:40 的饲粮组培养液中埃氏巨型球菌的数量极显著高于精粗比为 40:60 和 70:30 的饲粮组 ($P < 0.01$)。饲粮精粗比对培养液中溶纤维丁酸弧菌和反刍兽新月形单胞菌的数量未产生显著影响 ($P > 0.05$)。添加硫胺素可极显著地降低培养液中牛链球菌的数量 ($P < 0.01$), 并极显著地提高埃氏巨型球菌的数量 ($P < 0.01$), 但对乳酸杆菌、溶纤维丁酸弧菌和反刍兽新月单胞菌的数量未产生显著影响 ($P > 0.05$)。



M: DNA 相对分子质量标准 1000; 1: 牛链球菌; 2: 溶纤维丁酸弧菌; 3: 埃氏巨型球菌; 4: 反刍兽新月单胞菌; 5: 乳酸杆菌。

M: DNA marker 1000; 1: *Streptococcus bovis*; 2: *Butyrivibrio fibrisolvens*; 3: *Megasphaera elsdenii*; 4: *Selenomonas ruminantium*; 5: *Lactobacillus*.

图 1 瘤胃细菌 16S rDNA 目标片段扩增结果

Fig. 1 Amplification results of target segment of rumen bacteria 16S rDNA

3 讨论

3.1 饲料精粗比对培养液中硫胺素微生物净合成量的影响

硫胺素主要通过其活性物质焦磷酸硫胺素 (TPP) 的形式发挥其生理功能。TPP 是丙酮酸脱氢酶、 α -酮戊二酸脱氢酶复合体和转酮醇酶的辅酶, 参与糖酵解、柠檬酸循环和磷酸戊糖途径的非氧化分支^[13]。在正常饲喂条件下, 反刍动物瘤胃内微生物合成的硫胺素能够满足动物的需要^[14-15], 但在高精料饲喂条件下或特殊的生理状态下, 反刍动物有可能缺乏硫胺素^[16]。Abbas 等^[17]研究了骆驼不同生理时期血液中硫胺素含量的变化, 发现非泌乳期、非妊娠期的骆驼血液内硫胺素含量显著高于其他生理阶段, 泌乳期血液硫胺素含量显著降低。硫胺素的缺乏会降低转酮醇酶活性, 增加红细胞中 TPP 水平, 当 TPP 水平增量超过 45% 时就可能与硫胺素缺乏有关^[18]。Karapinar 等^[19]通过测定奶牛血液中 TPP 水平以研究在高精料饲喂条件下奶牛是否缺乏硫胺素, 结果发现高精料饲喂组血液中 TPP 水平显著高于对照组 (47.2% vs. 19.53%), 这说明在高精料饲喂条件下奶牛缺乏硫胺素。本试验研究发现, 在精粗比为 70:30 的高精料饲喂条件下硫胺素的微生物净合成量显著降低, 但与精粗比为 40:60 的常规饲料

相比, 精粗比在 50:50 和 60:40 条件下硫胺素的微生物净合成量又显著升高, 其原因可能是精粗比为 40:60 的常规饲料的能量水平相对较低, 适当的提高精料水平可促进瘤胃微生物合成硫胺素^[20-21]; 但在精粗比为 70:30 的高精料饲喂条件下, 碳水化合物代谢所需的硫胺素增加, 同时由于 pH 的降低导致瘤胃菌群结构失衡, 致使分解硫胺素的硫胺素酶合成量增加^[22-24], 使得硫胺素降解量增加。此外, 硫胺素的合成量与短链脂肪酸和丙酸的含量呈正相关^[25], 而主要的丙酸产生菌是反刍兽新月单胞菌和埃氏巨型球菌, 结合本研究中饲料精粗比对埃氏巨型球菌数量的影响结果可知, 精粗比为 50:50、60:40 的饲料组其埃氏巨型球菌的数量显著高于其他 2 组, 由此推测埃氏巨型球菌数量的增加促进了硫胺素的合成, 而在精粗比为 70:30 的高精料组由于培养液 pH 的改变降低了埃氏巨型球菌数量, 致使硫胺素的微生物合成量下降。因此, 高精料饲喂条件下, 反刍动物体内会缺乏硫胺素, 而当硫胺素缺乏时, 碳水化合物代谢受阻, 导致瘤胃乳酸积累, pH 下降, 最终发生亚急性瘤胃酸中毒或急性瘤胃酸中毒。

3.2 饲料精粗比和添加硫胺素对奶牛体外瘤胃发酵参数的影响

3.2.1 饲料精粗比和添加硫胺素对培养液 pH 的影响

瘤胃液 pH 是反映瘤胃发酵状况的指标之一, 主要受瘤胃上皮对挥发性脂肪酸吸收、食糜外流以及唾液分泌量的影响。由于本试验采用的是体外批次培养法, 没有瘤胃对挥发性脂肪酸的吸收和底物的外流, 人工唾液盐的缓冲能力也会随着时间的延长而降低, 导致饲料中碳水化合物发酵产物大量积累, 使得各组培养液 pH 整体上呈不断下降趋势, 但在 3 h 时, 精粗比为 40:60 和 50:50 饲料组的 pH 有所升高, 原因可能是体外精料水平的降低使得瘤胃发酵速度减慢。在本试验中, 高精料饲料 (精粗比为 70:30) 组在 3 ~ 12 h 时间内培养液的 pH 均显著低于常规饲料 (精粗比为 40:60) 组, 究其原因可能是由于高精料饲料组培养底物中有较高的可溶性碳水化合物, 其在瘤胃中发酵速度较快, 从而使微生物产生挥发性脂肪酸和其他有机酸的速度加快, 而 pH 的降低又进一步促使酸利用菌与酸产生菌间的数量失衡, 致使 pH 进一步降低。

表 7 饲粮精粗比和添加硫胺素对瘤胃菌群结构的影响

Table 7 Effects of dietary concentrate to forage ratio and thiamine supplementation on structure of rumen microbial community

lg(拷贝数/ μL)

硫胺素添加量 Thiamine supplemental level/(mg/kg)	精粗比 Concentrate to forage ratio	瘤胃细菌 Rumen bacteria				
		牛链球菌 <i>Streptococcus bovis</i>	溶纤维丁酸弧菌 <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	乳酸杆菌 <i>Lactobacillus</i>	反刍兽新月 单胞菌 <i>Selenomonas ruminantium</i>	埃氏巨型球菌 <i>Megasphaera elsdenii</i>
0	40:60	5.76 ± 0.20	6.97 ± 0.02	6.23 ± 0.34	7.44 ± 0.11	5.94 ± 0.11
	50:50	5.83 ± 0.13	6.99 ± 0.04	6.21 ± 0.13	7.48 ± 0.05	7.05 ± 0.13
	60:40	6.03 ± 0.22	6.95 ± 0.01	6.52 ± 0.21	7.47 ± 0.03	7.01 ± 0.14
	70:30	6.34 ± 0.05	6.97 ± 0.02	6.56 ± 0.02	7.50 ± 0.08	5.90 ± 0.13
	40:60	5.63 ± 0.02	6.99 ± 0.01	6.30 ± 0.09	7.48 ± 0.07	6.28 ± 0.20
180	50:50	5.73 ± 0.12	6.99 ± 0.01	6.35 ± 0.09	7.46 ± 0.02	7.18 ± 0.08
	60:40	5.87 ± 0.15	7.01 ± 0.03	6.59 ± 0.11	7.51 ± 0.01	7.20 ± 0.48
	70:30	5.79 ± 0.09	6.98 ± 0.03	6.76 ± 0.01	7.48 ± 0.06	6.21 ± 0.32
硫胺素添加量 Thiamine supplemental level/(mg/kg)	0	5.99 ^{Aa}	7.00 ^{Aa}	6.38 ^{Aa}	7.47 ^{Aa}	6.46 ^{Bb}
	180	5.76 ^{Bb}	6.97 ^{Aa}	6.50 ^{Aa}	7.49 ^{Aa}	6.72 ^{Aa}
精粗比 Concentrate to forage ratio	40:60	5.70 ^{Bc}	6.99 ^{Aa}	6.27 ^{Bb}	7.46 ^{Aa}	6.11 ^{Bb}
	50:50	5.78 ^{Bc}	6.98 ^{Aa}	6.28 ^{Bb}	7.47 ^{Aa}	7.12 ^{Aa}
	60:40	5.95 ^{Ab}	6.99 ^{Aa}	6.56 ^{Aa}	7.49 ^{Aa}	7.10 ^{Aa}
	70:30	6.06 ^{Aa}	6.98 ^{Aa}	6.66 ^{Aa}	7.49 ^{Aa}	6.06 ^{Bb}
平均标准误 SEM		0.08	0.03	0.03	0.03	0.14
<i>P</i> 值 <i>P</i> -value						
硫胺素添加量 Thiamine supplemental level/(mg/kg)		0.000 8	0.230 0	0.080 3	0.632 6	<0.000 1
精粗比 Concentrate to forage ratio		0.001 2	0.938 9	0.000 9	0.768 9	0.002 4
硫胺素添加量 × 精粗比 Thiamine supplemental level × concentrate to forage ratio		0.038 4	0.641 6	0.864 9	0.632 5	0.848 8

本试验结果表明,向各饲粮中添加硫胺素均能有效地提高培养液的 pH,这与大多数的研究结果一致^[3,26]。结合本试验其他指标测定结果分析,pH 的升高可能是由于硫胺素促进了埃氏巨型球菌和反刍兽新月单胞菌的生长,从而促进乳酸的分解,同时硫胺素抑制了牛链球菌的增殖而减少了乳酸的生成量,致使乳酸浓度降低。

3.2.2 饲粮精粗比和添加硫胺素对培养液乳酸浓度的影响

乳酸是碳水化合物代谢的中间产物,由丙酮酸还原而成,瘤胃内产生的乳酸被乳酸利用菌转化为挥发性脂肪酸,为反刍动物提供能量。但长时间饲喂反刍动物高精料饲粮时,瘤胃的消化功能会发生紊乱,乳酸产生菌与乳酸利用菌的平衡

被打破,瘤胃内积蓄的乳酸就会异常升高,将会导致瘤胃酸中毒^[27]。因此,降低乳酸的浓度对于维持瘤胃内环境的稳定和防止瘤胃酸中毒非常重要。张红伟等^[3]以高精料为发酵底物,体外培养 12 h 后发现添加硫胺素 60、90 mg/kg 的试验组的乳酸浓度较对照组分别下降 42.2%、33.7%。本试验研究也发现,随着精料水平的提高,培养液中乳酸浓度上升,添加硫胺素可显著降低培养液乳酸浓度,其可能原因是精料中易发酵碳水化合物含量较高,瘤胃中硫胺素的微生物合成量难以满足碳水化合物代谢的需要,导致碳水化合物代谢受阻,乳酸浓度升高;另外,因饲粮中添加硫胺素可提高瘤胃 pH 以缓解瘤胃的酸性环境,并逐渐恢复乳酸产生菌与乳酸利用菌的平衡,使得硫胺素

的增加量要大于硫胺素的减少量,从而满足了能量代谢的需要,使碳水化合物的降解顺利进行,减少乳酸的积累^[4]。

3.3 饲料精粗比和添加硫胺素对奶牛体外瘤胃菌群结构的影响

瘤胃内产生的乳酸菌主要包括牛链球菌、淀粉分解菌(溶纤维丁酸弧菌)和乳酸杆菌。牛链球菌具有很强的利用淀粉产生乳酸的能力^[28]。通常,当突然饲喂动物含高淀粉的精料饲料时易发生亚急性瘤胃酸中毒和 pH 的降低,致使牛链球菌大量快速增殖^[29],当 pH 低于 5.75 时,该菌体内 1,6-二磷酸激酶(FDP)、磷酸丙糖和丙酮酸浓度增加,乳酸脱氢酶(LDH)被激活,促使代谢终产物乳酸大量积累^[30]。本研究结果表明,随着精料水平的提高,牛链球菌和乳酸杆菌的数量逐渐提高,在不添加硫胺素的情况下,70%精料水平组与40%精料水平组相比分别提高了6.31%和5.29%,这与其他研究结果相似^[31-33],但对溶纤维丁酸弧菌的数量无显著性影响,这与赵培厅等^[34]的结果相反,原因可能是溶纤维丁酸弧菌是一种严格厌氧型革兰氏阳性菌,而本试验采用体外批次培养法,其生长活性受到抑制。同时,添加硫胺素可极显著降低牛链球菌的数量,但对乳酸杆菌和溶纤维丁酸弧菌的数量无显著影响,该结果与王洪荣等^[4]的研究结果一致,说明硫胺素在一定程度上能够抑制牛链球菌的增殖。结合本试验中硫胺素对乳酸浓度和 pH 影响的试验结果,出现上述结果的原因可能是硫胺素的添加促进了碳水化合物的代谢,减少了丙酮酸的积累,使得乳酸脱氢酶活性降低,从而降低了乳酸的浓度,进而使 pH 有所升高,从而导致牛链球菌的数量降低;牛链球菌生长被抑制将进一步降低乳酸的产生量,从而改善瘤胃发酵,使瘤胃菌群结构逐渐趋于平衡。

反刍兽新月单胞菌和埃氏巨型球菌是瘤胃内主要的乳酸利用菌。其中,反刍兽新月单胞菌可以利用累积的乳酸形成乙酸和丙酸,它还有脱羧基作用,能使琥珀酸脱羧基形成丙酸^[24],但反刍兽新月形单胞菌发酵乳酸的能力因可溶性糖的增加受到抑制^[35]。埃氏巨型球菌可通过乳酸-丙烯酸和琥珀酸 2 条途径将乳酸分解为丙酸^[36],但在高精料饲料情况下,乳酸-丙烯酸途径是其生成丙酸的主要途径。在高精料饲料条件下,埃氏巨型

球菌可以代谢掉 70% 的乳酸^[37],在饲喂高精料饲料的绵羊瘤胃中,埃氏巨型球菌占乳酸利用菌总数的 21%^[38]。本研究表明,在逐渐提高饲料精料水平的过程中,埃氏巨型球菌的数量急剧增加,但是当精料水平达到 70% 时,该菌的数量又急剧降低,而反刍兽新月单胞菌的数量在 4 种饲料条件下差异不显著,原因可能是饲料营养水平的适量提高促进了埃氏巨型球菌的增殖,但精料水平达到 70% 时,由于大量碳水化合物发酵产酸, pH 显著降低,超过了埃氏巨型球菌耐受酸度的阈值,造成其数量急剧下降。而反刍兽新月单胞菌的数量变化差异不显著,可能是因为本试验所用底物为半纯合饲料,含有大量的碳水化合物,抑制了该菌的繁殖。同时,本研究发现,添加硫胺素能极显著地提高埃氏巨型球菌的数量,说明硫胺素可通过促进乳酸利用菌的生长而改善瘤胃发酵,促进瘤胃菌群结构的平衡。

4 结论

- ① 在高精料饲料条件下,瘤胃内硫胺素微生物净合成量降低,发生亚急性瘤胃酸中毒。
- ② 添加的硫胺素可通过改善瘤胃发酵,调节瘤胃菌群结构来缓解亚急性瘤胃酸中毒。

参考文献:

- [1] 陈渊,朱家增,邓立新,等. 牛瘤胃酸中毒发病机制与防治的研究进展[J]. 中国畜牧兽医,2011,38(6):132-135.
- [2] YANG Y, LIU D C, LU D X, et al. Effects of adding both disodium fumarate and monensin on rumen fermentation and bacterial number amounts in dairy goats suffered from subacute rumen acidosis [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2009, 21(2): 258-262.
- [3] 张红伟,王洪荣,刘翔,等. 高精料日粮条件下维生素 B₁ 对山羊瘤胃体外发酵的影响[J]. 中国奶牛, 2010(3): 13-16.
- [4] 王洪荣,张红伟. 硫胺素和硫水平对山羊人工瘤胃代谢和微生物菌群的影响[J]. 中国农业科学, 2012, 45(8): 1595-1605.
- [5] 郝志敏,王洪荣,潘晓花,等. 高精料日粮下硫胺素对体外培养荷斯坦牛瘤胃微生物消化代谢的影响[J]. 中国奶牛, 2011(18): 8-12.
- [6] MENKE K H, STEINGASS H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and

- in vitro* gas production using rumen fluid[J]. Animal Research and Development, 1988, 28: 7-55.
- [7] 董淑红. 硫胺素对山羊瘤胃代谢的影响及其与亚急性瘤胃酸中毒关系的研究[D]. 硕士学位论文. 扬州: 扬州大学, 2011: 37-38.
- [8] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术[M]. 2版. 北京: 高等教育出版社, 1997: 422-428.
- [9] ZHOU J, BRUNS M A, TIEDJE J M. DNA recovery from soils of diverse composition[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(2): 316-322.
- [10] 吕莉华, 侯先志, 王海荣, 等. 定量检测瘤胃纤维降解细菌的 RT-PCR 法[J]. 中国农业科学, 2008, 41(6): 1795-1803.
- [11] OUWERKERK D, KLIEVE A V, FORSTER R J. Enumeration of *Megasphaera elsdenii* in rumen contents by real-time Taq nuclease assay[J]. Journal of Applied Microbiology, 2002, 92: 753-758.
- [12] PENNER G B, BEAUCHEMIN K A, MUTSVANGWA T. Severity of ruminal acidosis in primiparous Holstein cows during the periparturient period[J]. Journal of Dairy Science, 2007, 90: 365-375.
- [13] BRENT B E, BARTLEY E E. Thiamine and niacin in the rumen[J]. Journal of Animal Science, 1984, 59: 813-822.
- [14] ZINN R A, OWEN F N, STUART R L, et al. B-vitamin supplementation of diets for feedlot calves[J]. Journal of Animal Science, 1987, 65: 267-277.
- [15] SANTSCHI D E, BERTHIAUME R, MATTE J J, et al. Fate of supplementary B-vitamins in the gastrointestinal tract of dairy cows[J]. Journal of Dairy Science, 2005, 88: 2043-2054.
- [16] KARAPINAR T, DABAK M, KIZIL O, et al. Severe thiamine deficiency in sheep with acute ruminal lactic acidosis[J]. Journal of Veterinary Internal Medicine, 2008, 22: 662-665.
- [17] ABBAS T A, ALHAJALI M, ABU DAMIR H. Thiamine (vitamin B₁) status in the blood of young, pregnant, lactating and racing dromedary camels (*Camelus Dromedarius*) in UAE[J]. Revue de Médecine Vétérinaire, 2008, 159(11): 545-550.
- [18] REHM W F, ZEROBIN K, CHRISTELLER S, et al. Diagnosis of clinical vitamin B₁ deficiency in cattle[J]. Berl Münch Tierärz Wochenschr, 1971, 84: 64-67.
- [19] KARAPINAR T, DABAK M, KIZIL O. Thiamine status of feedlot cattle fed a high-concentrate diet[J]. The Canadian Veterinary Journal, 2010, 51(11): 1251-1253.
- [20] FRASER C M. Polioencephalomalacia[M]//FRASER M C. The merck veterinary manual. 7th ed. Rathway: Merck Sharp and Dohme Inc., 1991: 614-616.
- [21] GEORGE L W. Diseases of the nervous system: polioencephalomalacia[M]//SMITH B P. Large animal internal medicine. 2nd ed. St Louise MS: Mosby, 1996: 1055-1062.
- [22] BRENT B E. Relationship of acidosis to other feedlot ailments[J]. Journal of Animal Science, 1976, 43: 930-935.
- [23] NOCEK J E. Bovine acidosis: implications on laminitis[J]. Journal of Dairy Science, 1997, 80: 1005-1028.
- [24] PIERSON R E, JENSEN R. Polioencephalomalacia in feedlot lambs[J]. Journal of the American Veterinary Medical Association, 1975, 166: 257-259.
- [25] TAJAJ M, SCHOLLENBERGER M, FEOFLOWA J, et al. Relationship between thiamine concentration and fermentation patterns in the rumen fluid of dairy cows fed with graded concentrate levels[J]. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 2006, 90(7/8): 335-343.
- [26] 董淑红, 王洪荣, 王剑飞, 等. 高精日粮条件下硫胺素对山羊瘤胃代谢的影响[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2010(6): 6-7.
- [27] 胡红莲. 奶山羊亚急性瘤胃酸中毒营养生理机制的研究[D]. 博士学位论文. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2008: 2-4.
- [28] TAJIMA K, AMINOV R I, NAGAMINE T, et al. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67: 2766-2774.
- [29] KHAFIPOUR E, LI S C, PLAIZIER J C, et al. Rumen microbiome composition determined using two nutritional models of subacute ruminal acidosis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(20): 7115-7124.
- [30] RUSSELL J B, HINO T. Regulation of lactate production in *Streptococcus bovis*: a spiraling effect that contributes to rumen acidosis[J]. Journal of Dairy Science, 1985, 68(7): 1712-1721.

- [31] 魏德泳,朱伟云,毛胜勇.日粮不同 NFC/NDF 比对山羊瘤胃发酵与瘤胃微生物区系结构的影响[J]. 中国农业科学,2012,45(7):1392-1398.
- [32] 刘焯彤,刘大程,卢德勋,等.慢性瘤胃酸中毒状态下奶山羊瘤胃细菌内几种相关细菌数量变化的研究[J].中国畜牧兽医,2009,36(3):123-126.
- [33] 韩昊奇,刘大程,高民,等.不同 NFC/NDF 比对奶山羊瘤胃微生物及瘤胃 pH 变化的影响[J].动物营养学报,2011,23(4):597-603.
- [34] 赵培厅,刘大程,高民,等.饲粮不同 NFC/NDF 对奶山羊瘤胃溶纤维丁酸弧菌、牛链球菌及埃氏巨型球菌含量变化的影响[J].动物营养学报,2011,23(10):1716-1724.
- [35] 冯仰廉.反刍动物营养学[M].北京:科学出版社,2004:36.
- [36] COUOTTE G M, PRINS R A, JANSSEN R M, et al. Role of *Megasphaera elsdenii* in the fermentation of DL-lactate in the rumen of dairy cattle[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1981, 42: 649-655.
- [37] COUNOTTE G H M, LANKHORST A, PRINS R A. Role of DL-lactic acid as an intermediate in rumen metabolism of dairy cows[J]. Journal of Animal Science, 1983, 56: 1222-1235.
- [38] MACKIE R I, AMINOV R I, WHITE B A, et al. Molecular ecology and diversity in gut microbial ecosystems[M]//CRONJE P B. Ruminant physiology: digestion, metabolism, growth and reproduction. London: CAB International, 2000: 61-77.

Effects of Dietary Concentrate to Forage Ratio and Thiamine Supplementation on *in Vitro* Rumen Fermentation Parameters and Microbial Community Structure in Dairy Cows

PAN Xiaohua WANG Mengzhi FU Cong WANG Hongrong*

(College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009)

Abstract: A subacute ruminal acidosis (SARA) model was established by gradually increasing the dietary concentrate to forage ratio (C:F) of dairy cows *in vivo* combined with *in vitro* batch culture, aimed at determining the effects of dietary C:F on microbial net synthetic quantity of thiamine, and the effects of thiamine supplementation on *in vitro* rumen fermentation parameters and microbial community structure in dairy cows under the state of SARA. A 2 × 4 two factorial random experiment design was adopted: one factor was thiamine supplemental level (2 levels, 0 and 180 mg/kg, respectively), and the other was different dietary C:F (4 levels, 40:60, 50:50, 60:40 and 70:30, respectively). There were 8 treatments in the experiment and 3 replicates in each treatment, and samples were collected at 0, 3, 6, 9 and 12 h after culture *in vitro*. The results showed as follows: with the concentrate level increasing, microbial net synthetic quantity of thiamine in culture solution was firstly increased and then decreased, and it was significantly lower in the groups with the dietary C:F of 40:60 and 70:30 than the other two groups at 3, 9 and 12 h ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The pH in culture solution was significantly decreased with the increase of dietary concentrate level at 12 h ($P < 0.01$), and the SARA was occurred under the dietary C:F of 70:30. The pH in culture solution in the thiamine supplemental group was significantly increased compared with the non-thiamine supplemental group ($P < 0.01$). The lactate concentration in culture solution in the two groups with the C:F of 60:40 and 70:30 was significantly higher than that in the group with the dietary C:F of 40:60 ($P < 0.01$) at 6, 9 and 12 h, and thiamine supplementation could significantly reduce the lactate concentration in culture solution at 3 and 9 h ($P < 0.01$). Dietary C:F showed significant effects on the number of *Streptococcus bovis*, *Lactobacillus* and *Megasphaera elsdenii* in culture solution ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), but had no significant effects on the number of *Butyrivibrio fibrisolvens* and *Selenomonas ruminantium* in culture solution ($P > 0.05$). Meanwhile, the number of *Streptococcus bovis* was decreased by 3.84% ($P < 0.01$) and the number of *Megasphaera elsdenii* was increased by 4.02% ($P < 0.01$) in thiamine supplemental group compared with the non-thiamine supplemental group, while the number of *Lactobacillus*, *Butyrivibrio fibrisolvens* and *Selenomonas ruminantium* had no significant changes ($P > 0.05$). It is concluded that the microbial net synthetic quantity of thiamine is decreased and the SARA is occurred under the high concentrate diets. Thiamine supplementation can relieve SARA by increasing the rumen pH and declining the lactate concentration, and regulating rumen microbial community structure. [Chinese Journal of Animal Nutrition, 2013, 25(1):88-99]

Key words: concentrate to forage ratio; thiamine; rumen; fermentation parameters; microbial community structure