动物营养学报 2019,31(1):324-333
Chinese Journal of Animal Nutrition

doi:10.3969/j.issn.1006-267x.2019.01.039

饲粮中添加沙葱粉或复合益生菌制剂对杜寒杂交羊瘤胃发酵参数和瘤胃液菌群多样性的影响

丁　赫　刘旺景　敖长金*　哈斯额尔敦　李书仪　李　英　张佐忠

(内蒙古农业大学动物科学学院,呼和浩特 010018)

摘　要: 本试验旨在研究饲粮中添加沙葱粉或复合益生菌制剂对杜寒杂交羊瘤胃发酵参数和瘤胃液菌群多样性的影响。选取体重相近的杜寒杂交羊30只,随机分为3组,每组10只,各组饲喂饲粮如下:对照组,基础饲粮;沙葱组,基础饲粮+沙葱粉(沙葱粉添加量为饲粮干物质的0.46%);复合益生菌组,基础饲粮+复合益生菌制剂(复合益生菌制剂添加量为饲粮干物质的4.35%)。饲喂90 d后,随机从每组羊群中选取体重相近的试验羊4只,屠宰后采集瘤胃液,检测瘤胃发酵参数,并运用高通量测序方法检测瘤胃菌群多样性。结果表明:1)与对照组相比,复合益生菌组瘤胃液乙酸浓度显著提高($P<0.05$),沙葱组瘤胃液乙丙比下降($P>0.05$),复合益生菌组瘤胃液乙丙比则升高($P>0.05$)。2)复合益生菌组瘤胃液香农指数显著高于对照组($P<0.05$),而沙葱组瘤胃液香农指数虽高于对照组,但差异不显著($P>0.05$)。3)在前10种菌门中,沙葱组各菌门相对丰度与对照组存在差异,但差异均不显著($P>0.05$);复合益生菌组拟杆菌门、疣微菌门和互养菌门的相对丰度显著高于对照组($P<0.05$),而变形菌门的相对丰度显著低于对照组($P<0.05$);在科水平上,沙葱组和复合益生菌组氨基酸球菌科的相对丰度均显著低于对照组($P<0.05$)。由此得出,饲粮中添加沙葱粉或复合益生菌制剂均可以改变瘤胃发酵类型,并可不同程度地丰富瘤胃液菌群多样性。

关键词: 沙葱粉;复合益生菌制剂;杜寒杂交羊;瘤胃发酵;菌群多样性

中图分类号:S816　　**文献标识码:**A　　**文章编号:**1006-267X(2019)01-0324-10

瘤胃中定植着大量的微生物,在这些微生物的作用下,饲粮中70%~80%的可消化干物质和50%的粗纤维可在瘤胃内被消化,产生挥发性脂肪酸、甲烷、氨和二氧化碳,并能合成B族维生素和菌体蛋白[1-2]。因此,瘤胃中微生物的活性在反刍动物消化代谢中起着重要的作用。饲粮中的营养因素是调节反刍动物瘤胃发酵的有效措施[3],而越来越多的研究开始关注饲粮中添加植物提取物和益生菌制剂对反刍动物瘤胃发酵的调节作用[4-5]。董晓丽[6]研究指出,在断奶犊牛饲粮中添加复合益生菌(probiotic complex,PC)可以显著提高犊牛饲料转化率,影响瘤胃菌群结构。潘龙等[5]研究表明荷斯坦奶牛饲粮中添加1.0 g/kg的柴胡可显著降低瘤胃液香农指数,提高菌群优势度指数。占今舜等[7]研究发现,当给奶牛饲喂含不同添加量苜蓿黄酮的全混合日粮时,瘤胃液香农指数随着苜蓿黄酮添加量的升高呈先上升后下降的趋势,且在门水平上,随着苜蓿黄酮添加量的

收稿日期:2018-06-06

基金项目:内蒙古自治区重大专项"中国-加拿大肉羊养殖及饲草料品种开发与利用"

作者简介:丁　赫(1991—),男,内蒙古鄂尔多斯人,博士研究生,研究方向为动物营养与饲料科学。E-mail: HeDing@emails.imau.edu.cn

* **通信作者:**敖长金,教授,博士生导师,E-mail: changjinao@aliyun.com

增加,互养菌门相对丰度呈先下降后升高的趋势。天然葱属植物因含有甾体皂苷、含硫化合物、多糖、黄酮类化合物等活性物质而具有增强免疫[8]、抑菌消炎[9]、抗氧化[10-11]、抗肿瘤[12]和调节瘤胃发酵[13]等生理功能,被用作绿色营养功能性添加剂,其中国内外研究较常见的是大蒜和沙葱(*Allium mongolicum* Regel, AMR)[4,13]。张霞[14]研究发现,在蒙古羯羊饲粮中添加鲜沙葱及其提取物均可提高瘤胃纤维分解菌、白色瘤胃球菌、产琥珀酸丝状杆菌的相对数量。另外,瘤胃发酵参数是评价瘤胃健康的重要指标。有研究表明复合益生菌制剂和植物提取物可以稳定瘤胃内环境和促进氮的代谢[15-16]。但是有关沙葱粉和复合益生菌制剂对杜寒杂交羊发酵参数和菌群多样性影响的报道甚少。因此,本试验拟研究饲粮中添加沙葱粉或复合益生菌制剂对杜寒杂交羊瘤胃发酵参数和菌群多样性的影响,以期为沙葱粉和复合益生菌制剂在舍饲肉羊生产实践中的应用提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　试验设计与饲粮

随机选取体重相近的杜寒杂交羊(杜泊羊×小尾寒羊 F1 代)30 只,分为 3 组,每组 10 只,各组饲喂饲粮如下:对照组,基础饲粮(将饲料原料粉碎后均匀混合并制粒后饲喂);沙葱组,基础饲粮+沙葱粉(沙葱粉添加量为饲粮干物质的 0.46%;将沙葱粉与其他饲料原料粉料均匀混合并制粒后饲喂);复合益生菌组,基础饲粮+复合益生菌制剂(复合益生菌制剂添加量为饲粮干物质的 4.35%;考虑到高温对益生菌活性的破坏,故该组饲粮未制粒,将复合益生菌制剂与其他饲料原料粉料均匀混合后采用粉料形式饲喂)。沙葱粉购于阿拉善浩海生物科技有限公司,其添加量参考前人研究得出的结论[17],复合益生菌制剂(由枯草芽孢杆菌、光合细菌、酵母菌、双歧杆菌和黑曲霉菌组成,总菌落数≥1.5×10^9 CUF/g)由驻马店吉兴隆牧业生物科技有限公司提供,其添加量为厂家推荐添加量。试验用基础饲粮参照我国《肉羊饲养标准》(NY/T 816—2004)配制,然后在基础饲粮的基础上按照试验设计添加各添加剂制成试验饲粮。饲粮组成及营养水平见表 1。各组饲粮常规营养指标检测方法参照《饲料分析及饲料质量检测技术》[18],各营养指标检测使用的仪器如下:粗蛋白质含量,K9840 自动凯氏定氮仪(济南海能仪器有限公司);粗脂肪含量,SOX406 索氏提取仪(济南海能仪器有限公司);粗灰分含量,SRJX-8-13马弗炉(上海实贝仪器设备厂);中性洗涤纤维和酸性洗涤纤维含量,Ankom220 型纤维分析装置(美国 ANKOM 公司);钙和磷含量,V-1500 可见分光光度计(上海美析仪器有限公司)。

表 1　饲粮组成及营养水平(干物质基础)

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

项目 Items	对照组 Control group	沙葱组 AMR group	复合益生菌组 PC group
原料 Ingredients			
羊草 Chinese wildrye	32.00	32.00	32.00
苜蓿 Alfalfa	17.60	17.60	17.60
玉米 Corn	25.00	25.00	25.00
小麦麸 Wheat bran	2.88	2.88	2.88
向日葵仁饼 Sunflower seed meal	17.23	17.23	17.23
豌豆茎叶 Pea stalk	2.77	2.77	2.77
磷酸氢钙 $CaHPO_4$	0.79	0.79	0.79
食盐 NaCl	0.73	0.73	0.73
预混料 Premix[1)]	1.00	1.00	1.00
合计 Total	100.00	100.00	100.00
添加剂 Additives			
复合益生菌制剂 PC preparation			4.35

续表 1

项目 Items	对照组 Control group	沙葱组 AMR group	复合益生菌组 PC group
沙葱粉 AMR powder		0.46	
营养水平 Nutrient levels[2)]			
消化能 DE/(MJ/kg)	16.58	16.65	16.69
粗蛋白质 CP	16.48	16.05	15.22
粗脂肪 EE	3.16	2.96	3.12
粗灰分 Ash	7.13	7.55	9.75
中性洗涤纤维 NDF	33.14	31.82	36.63
酸性洗涤纤维 ADF	21.11	19.52	25.20
钙 Ca	0.77	0.89	1.22
磷 P	0.50	0.48	0.47

[1)] 预混料为每千克饲粮提供 Premix provided the following per kg of diets: $ZnSO_4$ 30 mg, $FeSO_4$ 26 mg, $CuSO_4$ 7.9 mg, $MnSO_4$ 30 mg, $CoSO_4$ 0.1 mg, KI 5.4 mg, VA 3 500 IU, VE 25 IU, VD_3 1 100 IU。

[2)] 消化能为计算值(沙葱粉和复合益生菌的消化能分别为 18.51 和 3.06 MJ/kg),其余均为实测值。DE was a calculated value (according to the digestible energy of AMR and PC preparation was 18.51 and 3.06 MJ/kg, respectively), while the others were measured values.

1.2 样品的采集

饲喂 90 d 后,分别从对照组、沙葱组和复合益生菌组中随机选取体重相近的杜寒杂交羊 4 只,总共 12 只,作为采样对象。屠宰后立即无菌操作采集试验羊的新鲜瘤胃内容物,一部分用 4 层灭菌纱布过滤收集滤液,分装于 10 mL 的离心管中(每只羊 2 管),置实验室-20 ℃保存,用于测定瘤胃液挥发性脂肪酸和氨态氮浓度;另取 2 管未过滤的瘤胃内容物于液氮中保存,用于瘤胃液菌群多样性的测定。

1.3 瘤胃发酵参数和瘤胃液菌群多样性的检测

1.3.1 瘤胃发酵参数的检测

瘤胃液氨态氮浓度的检测采用冯宗慈等[19]改进的方法。瘤胃液挥发性脂肪酸浓度的检测采用王洪荣等[20]方法通过气相色谱仪(GC-9A,日本岛津)检测。使用便携式智能 pH 计(CT-6022,中国柯迪达)检测瘤胃液 pH。

1.3.2 基因组 DNA 的提取和 PCR 扩增

采用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)方法对样本的基因组 DNA 进行提取,之后利用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度和浓度,取适量的样品于离心管中,使用无菌水稀释样品至 1 ng/μL。以稀释后的基因组 DNA 为模板,根据测序区域的选择,使用带 Barcode 的特异引物,New England Biolabs 公司的 Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer 和高效高保真酶进行 PCR,确保扩增效率和准确性。测定引物区域为 16S rDNA 基因 V4 区,引物序列信息见表 2。

表 2 测序分析采用的引物信息

Table 2 Information of primer for sequencing analysis

项目 Items	细菌 Bacterial
上游引物 Forward primer	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA
下游引物 Downward primer	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
退火温度 Annealing temperature/℃	50

1.3.3 PCR 产物的混样和纯化

PCR 产物使用 2%浓度的琼脂糖凝胶进行电泳检测;根据 PCR 产物浓度进行等量混样,充分混匀后使用 1×TAE 浓度 2%的琼脂糖凝胶电泳纯化 PCR 产物,剪切回收目标条带。使用 Thermo Fisher Scientific 公司生产的 GeneJET 胶回收试剂盒回

收产物。

1.3.4　文库构建和上机测序

使用 Thermo Fisher Scientific 公司的 Ion Plus Fragment Library Kit 48 rxns 建库试剂盒进行文库的构建,构建好的文库经过 Qubit 定量和文库检测合格后,使用 Thermo Fisher Scientific 公司的 Ion S5TM XL 系统进行上机测序。

1.4　数据统计与分析

试验数据用平均值±标准误表示,所有数据均采用 SAS 9.0 统计软件中的 ANOVA 过程进行单因素方差分析,差异显著者采用 Duncan 氏法进行多重比较,以 $P<0.05$ 为差异显著,$0.05 \leqslant P<0.10$ 为差异趋于显著。

2　结果与分析

2.1　瘤胃发酵参数

由表 3 可知,与对照组相比,饲粮添加沙葱粉或复合益生菌制剂均提高了杜寒杂交羊瘤胃液 pH、丙酸浓度,降低了瘤胃液氨态氮浓度,但差异均未达显著水平($P>0.05$);饲粮添加复合益生菌制剂显著提高了杜寒杂交羊瘤胃液乙酸浓度($P<0.05$);饲粮添加沙葱粉降低了杜寒杂交羊瘤胃液乙丙比,而复合益生菌制剂提高了瘤胃液乙丙比,但差异均未达显著水平($P>0.05$)。

表 3　饲粮中添加沙葱粉或复合益生菌制剂对杜寒杂交羊瘤胃发酵参数的影响

Table 3　Effects of dietary AMR powder or PC preparation on ruminal fermentation parameters of Dorper×thin-tailed *Han* crossed sheep

项目 Items	对照组 Control group	沙葱组 AMR group	复合益生菌组 PC group	*P* 值 *P*-value
pH	6.12±0.04	6.21±0.19	6.21±0.07	0.402
氨态氮 NH_3-N/(mg/dL)	7.73±0.19	7.59±0.33	7.42±0.36	0.775
乙酸 Acetate/(mmol/L)	24.77±0.91^{b}	26.06±1.78^{b}	34.10±2.41^{a}	0.021
丙酸 Propionate/(mmol/L)	9.63±0.08	11.13±1.49	12.13±0.08	0.273
丁酸 Butyrate/(mmol/L)	9.00±0.13	8.91±0.40	9.12±0.24	0.881
乙丙比 Acetate/propionate	2.57±0.08	2.38±0.19	2.81±0.08	0.130

同行数据肩标相同或无字母表示差异不显著($P>0.05$),不同字母表示差异显著($P<0.05$)。下表同。

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

2.2　瘤胃液菌群 PCR 扩增

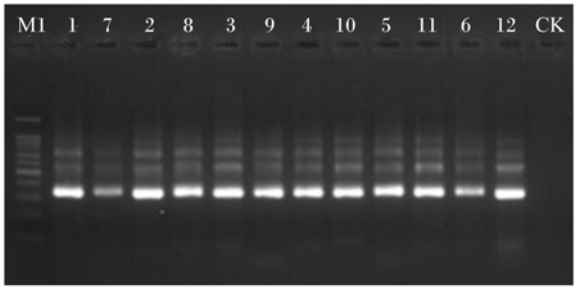
如图 1 所示,对试验所有样本基因 DNA 进行 16S rDNA 基因 V4 区扩增,得到约 300 bp 的目的片段,扩增条带清晰,浓度合适且条带单一,表明纯化后基因组 DNA 中无抑制 PCR 反应的杂质,可以进行高通量基因测序分析杜寒杂交羊瘤胃液菌群多样性。

2.3　瘤胃液微生物操作分类单元(OTUs)基础分析

2.3.1　瘤胃液细菌高通量测序质量控制与样品多样性指数

本试验测序样品为 12 个,所有样品的平均读长为 253 bp。由表 4 可知,各组去除嵌合体之后的 Clean reads 数分别为:对照组,81 597 条;沙葱组,82 952 条;复合益生菌组,93 805 条。复合益生菌组的 Clean reads 数显著高于对照组和沙葱组($P<0.05$)。为了研究样品的物种组成多样性,对所有样品的 Clean reads 进行聚类,以 97%的一致性,将序列聚类成 OTUs,对照组、沙葱组和复合益生菌组的 OTUs 数分别为 622、616 和 842 个,复合益生菌组显著高于对照组和沙葱组($P<0.05$)。测序覆盖率均为 0.998 3,满足后续测序分析。与对照组相比,复合益生菌组香农指数显著升高($P<0.05$),而沙葱组香农指数虽高于对照组,但差异不显著($P>0.05$)。香农指数反映瘤胃菌群的多样性,数值越大,表明细菌多样性越丰富,因此通过 3 组之间香农指数的比较证明沙葱组和复合益生菌组瘤胃具有更丰富的菌群多样性。此外,复合益生菌组 Chao1 指数显著高于对照组和沙葱组($P<0.05$)。在瘤胃液细菌高通量测序质量控制与样品多样性指数中,复合益生菌组的 Clean reads 数、OTUs 数、香农指数和 Chao1 指数均显著高于对照

组和沙葱组($P<0.05$),而沙葱组和对照组之间各指标差异不显著($P>0.05$)。



第 1、2、3 和 4 孔是沙葱组瘤胃液样品;第 5、6、7 和 8 孔是复合益生菌组瘤胃液样品,第 9、10、11 和 12 孔是对照组瘤胃液样品;M1、CK 分别为电泳 marker 和空白对照。

Lanes 1, 2, 3 and 4 were the rumen fluid samples from AMR group; lanes 5, 6, 7 and 8 were the rumen fluid samples from PC group; lanes 9, 10, 11 and 12 were the rumen fluid samples from control group; M1 and CK were the electrophoresis marker and blank control.

图 1 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 结果

Fig.1 Result of agarose gel electrophoresis for PCR

2.3.2 Venn 图

利用细菌群落中共享和独特的细菌丰度对各组杜寒杂交羊瘤胃微生物进行分析,如图 2 所示。在 97%相似性水平下,12 只杜寒杂交羊瘤胃液共产生 1 628 个 OTUs,其中对照组、沙葱组和复合益生菌组的 OTU 数分别为 971、934 和 1 317 个。对照组、沙葱组和复合益生菌组独有的 OTUs 数分别占 OTUs 总数的 4.79%、5.04%和 29.05%。

2.4 瘤胃液菌群分类学分析

各组瘤胃液细菌在门水平上的组成和相对丰度见表 5。通过 Ion S5TM XL 测序平台,利用单端测序的方法,构建小片段文库对瘤胃的 16S rDNA 基因 V4 区序列进行单端测序后发现,各组在被列出的前 10 种菌门中,相对丰度总和>90%的序列属于以下几个菌门:拟杆菌门(Bacteroidetes)、变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicates)和螺旋体门(Spirochaetes)。由表 5 可知,拟杆菌门、变形菌门和厚壁菌门是 3 组的优势菌门,纤维杆菌门(Fibrobacteres)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、蓝藻细菌门(Cyanobacteria)、软壁菌门(Tenericates)、互养菌门(Synergistetes)和黏胶球形菌门(lentisphaerae)是各组的次要优势菌群,沙葱组、复合益生菌组和对照组分别有 0.68%、1.05%和 0.68%的序列未分类出门类。

表 4 各组瘤胃液细菌高通量测序质量控制与样品多样性指数

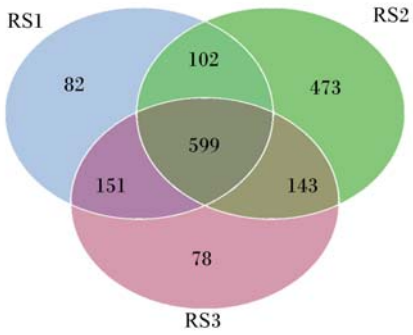
Table 4 Microbial high throughput sequencing quality control and sample diversity indexes in rumen fluid of different groups

项目 Items	对照组 Control group	沙葱组 AMR group	复合益生菌组 PC group	*P* 值 *P*-value
Clean reads 数 Clean reads No./条	81 597±1 109^{b}	82 952±3 185^{b}	93 805±1 995^{a}	0.008
操作分类单元数 OTUs No./个	621.50±41.29^{b}	616.25±24.43^{b}	841.75±69.40^{a}	0.014
覆盖率 Coverage	0.998 3±0.000 3	0.998 3±0.000 3	0.998 3±0.000 3	1.000
香农指数 Shannon index	4.98±0.28^{b}	5.07±0.15^{b}	6.40±0.36^{a}	0.009
Chao1 指数 Chao1 index	609.50±49.39^{b}	601.04±18.79^{b}	828.53±68.21^{a}	0.017

在前 10 种菌门中,沙葱组拟杆菌门、变形菌门、纤维菌门和疣微菌门的相对丰度高于对照组,而螺旋体门、厚壁菌门、蓝藻细菌门、软壁菌门、互养菌门和黏胶球形菌门的相对丰度低于对照组,但差异均不显著($P>0.05$);复合益生菌组拟杆菌门、疣微菌门和互养菌门的相对丰度显著高于对照组($P<0.05$),变形菌门的相对丰度显著低于对照组($P<0.05$)。

各组瘤胃液细菌在科水平上的组成和相对丰度见表 6。在科水平上,瘤胃液细菌以普雷沃氏菌科(Prevotellaceae)和琥珀酸弧菌科(Succinivibrionaceae)为主。普雷沃氏菌科的相对丰度各组之间差异不显著($P>0.05$);复合益生菌组琥珀酸弧菌科和氨基酸球菌科(Acidaminococcaceae)的相对丰度显著低于对照组($P<0.05$),相反地,复合益生菌组拟杆菌目 RF16 组(Bacteroidales_RF16_group)和理研菌科(Rikenellaceae)的相对丰度则显著高于对照组($P<0.05$);沙葱组氨基酸球菌科

的相对丰度显著低于对照组($P<0.05$);沙葱组和复合益生菌组纤维杆菌科的相对丰度均高于对照组,但差异不显著($P>0.05$)。



RS1:沙葱组 AMR group;RS2:复合益生菌组 PC group;RS3:对照组 control group。图 3 同 The same as Fig.3。

图 2　各组杜寒羊瘤胃液菌群多样性 Venn 图

Fig.2　Venn diagram of microbial diversity in rumen fluid of Dorper×thin-tailed *Han* crossed sheep in different groups

2.5　瘤胃液菌群主成分分析(PCA)

PCA 是一种应用方差分析,对多维数据进行降维,从而提取出数据中最主要的元素和结构的方法,应用 PCA 能够提取出最大程度反映样品间差异的 2 个坐标轴,从而将多维数据的差异反映在二维坐标图上,揭示复杂数据背景下的简单规律。样品的群落组成越相似,则它们在 PCA 图中的距离越接近。如图 3 所示,第 1 主成分和第 2 主成分的贡献率分别为 25.08%和 15.41%。对照组和沙葱组各自菌群结构相似度较高,样品间可以很好地聚在一起,而复合益生菌组菌群结构相似度相对其他 2 组较差。总体来看,3 组杜寒羊瘤胃液菌群结构差异明显,彼此间可以很好地分开。

3　讨　论

3.1　瘤胃发酵参数

反刍动物瘤胃液 pH 是反映瘤胃微生物代谢平衡状况和发酵状况的综合指标之一[21]。韩正康等[22]和 Murphy 等[23]研究报道反刍动物瘤胃液 pH 的范围是 5.50~6.80,最适 pH 范围是 6.00~6.30,同时也有研究表明瘤胃液 pH 的高低一定程度影响瘤胃微生物的活性,Mould 等[24]研究发现,当瘤胃液 pH 在 6.00 以下时,瘤胃液中的纤维素分解菌的活性将受到完全抑制。本试验所有杜寒杂交羊瘤胃液 pH 的变化范围在 6.12~6.21,均在最适 pH 范围之内,且远高于纤维分解菌活性受到完全抑制所要求的 pH 范围(pH<6.00)。瘤胃氨态氮作为瘤胃微生物生长和蛋白质合成的重要氮源,其浓度适宜范围为 5.00~30.00 mg/dL[25],本试验中各组瘤胃液氨态氮浓度(7.73~7.59 mg/dL)均在适宜范围内。反刍动物采食饲粮后,饲粮中的可溶性碳水化合物就会在瘤胃微生物的作用下产生挥发性脂肪酸,动物机体所需消化能的 70%~80%由这些挥发性脂肪酸提供[26]。乙酸、丙酸和丁酸是饲粮经微生物发酵后产生的几种重要的挥发性脂肪酸,约占瘤胃挥发性脂肪酸总量的 95%[27]。依据乙酸、丙酸和丁酸间的比例,可将瘤胃发酵类型分为乙酸型、丙酸型和丁酸型,乙酸型和丙酸型一般通过乙酸浓度与丙酸浓度的比例即乙丙比确定。本试验中,饲粮中添加沙葱粉降低了杂交肉羊瘤胃液乙丙比,发酵类型有向丙酸型靠近的趋势;相反,赵国芬[28]研究得出饲粮中添加沙葱粉可以提高绵羊瘤胃液乙丙比,研究结果不同可能是因动物品种、饲粮结构和沙葱粉添加量不同。复合益生菌组与对照组相比,提高了瘤胃液乙丙比,发酵类型有向乙酸型转变的趋势,而有研究表明单一的酵母或米曲霉可以显著地提高瘤胃液丁酸和丙酸的浓度[29],与本试验得出的结论相反,可能的原因是多种益生菌复合对瘤胃发酵模式产生了与单一益生菌不同的组合效应。

3.2　瘤胃液菌群高通量测序质量控制指数

本试验分别对 12 只杜寒杂交羊的瘤胃液进行高通量测序,得到的有效序列经过去杂和修剪后共获得 1 033 416 条优质序列,平均每个样品测序深度为 86 118 条,高于张梅梅[30]对 24 只绵羊和山羊瘤胃菌群的测序深度(平均每只羊测序深度 22 295 条)。吕佳颖[31]研究了在精料配比相同的饲粮中添加不同单一粗饲料对育肥羔羊瘤胃微生物区系的影响,得出各组样本文库覆盖率均接近 99.80%。本试验各组样品测序覆盖率均为 99.83%,与吕佳颖[31]的试验结果相似,高于张梅梅[30]对绵羊和山羊瘤胃菌群测序的样本覆盖率(98%~99%),可能原因是动物个体差异、不同饲粮结构、取样方式等对样本覆盖率有一定的影响。

Mao 等[32]研究显示,样品测序覆盖率大于 97%表明试验取样充分,而本试验的样品测序覆盖率为 99.83%,证明本试验瘤胃液取样充分,样品通过菌群高通量测序能够真实地反映饲粮中添加沙葱粉或复合益生菌制剂对杜寒杂交羊瘤胃菌群多样性的影响。

表 5 各组瘤胃液细菌在门水平上的组成和相对丰度

Table 5 Bacteria composition and relative abundance at phylum level in rumen fluid of different groups %

项目 Items	对照组 Control group	沙葱组 AMR group	复合益生菌组 PC group	*P* 值 *P*-value
拟杆菌门 Bacteroidetes	37.32±5.14[b]	40.44±1.35[b]	66.75±4.95[a]	0.001
变形菌门 Proteobacteria	37.04±9.54[a]	39.03±2.81[a]	12.67±5.73[b]	0.036
厚壁菌门 Firmicates	13.86±1.14	9.59±1.55	9.02±1.20	0.054
螺旋体门 Spirochaetes	8.64±5.39	5.25±0.46	1.46±0.73	0.320
纤维杆菌门 Fibrobacteres	0.45±0.27	3.82±2.85	1.59±0.82	0.407
疣微菌门 Verrucomicrobia	0.16±0.10[b]	0.19±0.14[b]	5.73±1.98[a]	0.010
蓝藻细菌门 Cyanobacteria	1.27±0.39	0.52±0.24	0.93±0.23	0.282
软壁菌门 Tenericates	0.49±0.20	0.24±0.06	0.45±0.20	0.653
互养菌门 Synergistetes	0.11±0.04[b]	0.09±0.03[b]	0.34±0.10[a]	0.047
黏胶球形菌门 Lentisphaerae	0.16±0.09	0.15±0.07	0.01±0.01	0.266
其他 Others	0.68±0.12	0.68±0.14	1.05±0.31	0.324

表 6 各组瘤胃液细菌在科水平上的组成和相对丰度

Table 6 Bacteria composition and relative abundance at family level in rumen fluid of different groups %

项目 Items	对照组 Control group	沙葱组 AMR group	复合益生菌组 PC group	*P* 值 *P*-value
普雷沃氏菌科 Prevotellaceae	33.84±5.45	36.59±1.54	49.39±5.96	0.097
琥珀酸弧菌科 Succinivibrionaceae	34.87±9.42[a]	37.87±2.62[a]	11.37±5.73[b]	0.036
螺旋体科 Spirochaetaceae	8.64±0.05	5.25±0.46	1.46±0.73	0.320
拟杆菌目_RF16 组 Bacteroidales_RF16_group	0.16±0.08[b]	0.38±0.28[b]	7.97±2.09[a]	0.002
纤维杆菌科 Fibrobacteraceae	0.45±0.27	3.82±2.85	1.59±0.82	0.407
拟杆菌目_BS11 肠道组 Bacteroidales_BS11_gut_group	1.05±0.26	2.15±0.31	3.11±1.47	0.300
理研菌科 Rikenellaceae	1.44±0.36[b]	0.80±0.30[b]	4.66±0.81[a]	0.002
疣微菌科 Ruminococcaceae	2.15±0.54	2.90±0.92	1.88±0.47	0.565
毛罗菌科 Lachnospiraceae	2.74±0.98	2.28±0.39	0.86±0.12	0.130
氨基酸球菌科 Acidaminococcaceae	3.14±0.67[a]	0.98±0.53[b]	0.68±0.12[b]	0.013
其他 Others	11.52±0.64[ab]	6.98±0.60[b]	17.03±3.07[a]	0.012

3.3 门水平上瘤胃液菌群多样性

Kim 等[33]对核糖体数据库(Ribosomal Database Project,RDP)存储的瘤胃菌群 16S rRNA 基因序列进行 Meta 分析,最终得出反刍动物瘤胃优势菌群(按相对丰度由大到小)为厚壁菌门、拟杆菌门和变形菌门,本试验与上述研究得出一致的结果。但 Qin 等[34]和 Ley 等[35]研究报道反刍动物瘤胃优势菌群为厚壁菌门和拟杆菌门,张梅梅[30]研究发现山羊和绵羊采食添加单宁的饲粮后,其瘤胃优势菌群为拟杆菌门和厚壁菌门,与本研究得出不同的结论,可能的原因是动物品种、饲粮结构、动物日龄和采样方式等不同。本试验中,瘤胃优势菌群按照相对丰度由大到小依次为拟杆菌门、变形菌门和厚壁菌门,说明饲粮中添加绿色营养功能性添加剂沙葱粉或复合益生菌制剂并未对杜寒杂交羊瘤胃优势菌群的构成造成影响,而与 Kim 等[33]所得结论相比菌群的优势地位发生了改变。拟杆菌门和厚壁菌门分别主要负责分解

瘤胃内非纤维和纤维类物质,与对照组相比,饲粮中添加复合益生菌制剂显著地提高了拟杆菌门的相对丰度,这可能会提高瘤胃内非纤维类物质的分解效率,发酵产生更多的丙酸;沙葱组和复合益生菌组厚壁菌门的相对丰度有低于对照组的趋势,表明这 2 组杂交羊瘤胃内纤维类物质的消化率可能会下降,产生少量的乙酸。沙葱组厚壁菌门的相对丰度降低的可能原因是沙葱中的活性物质黄酮类化合物针对性地抑制了厚壁菌门细菌细胞壁的形成[36]。沙葱组变形菌门的相对丰度高于对照组和复合益生菌组,可能的原因是饲粮中的沙葱为变形菌门细菌提供了其生长的必需营养物质。

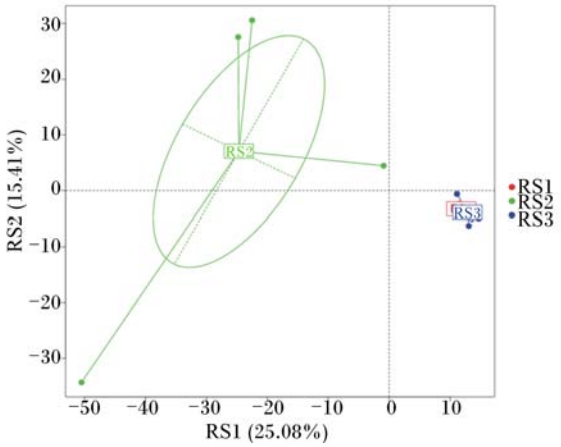


图 3　各组瘤胃液菌群多样性主成分分析

Fig.3　PCA of bacterial diversity in rumen fluid of different groups

3.4　科水平上瘤胃液菌群多样性

在科水平上,各组的优势菌科为普雷沃氏菌科和琥珀酸弧菌科。普雷沃氏菌科是拟杆菌门的主要细菌,含较多活性较高的半纤维素分解菌,广泛定植于瘤胃和畜禽后肠道,负责碳水化合物和蛋白质的分解[37]。本研究发现沙葱组和复合益生菌组普雷沃氏菌科的相对丰度与对照组相比表现出增高的趋势,说明饲粮中添加沙葱粉或复合益生菌制剂均能在一定程度上提高普雷沃氏菌科的数量,进而可能提高半纤维素被分解的效率。琥珀酸弧菌科作为优势菌科之一,极有可能具有与普雷沃氏菌科相同的分解半纤维素和碳水化合物的本领[38],其相对丰度在沙葱组和对照组之间差异不显著,复合益生菌组则显著低于对照组,可能的原因是与其拮抗、竞争的菌群在复合益生菌的作用下,数量增加、活性升高,最终抑制了该菌群相对丰度的增加。

4　结　论

饲粮中添加沙葱粉或复合益生菌制剂均可不同程度地丰富杜寒杂交羊瘤胃液菌群的多样性,且改变了瘤胃菌群前 10 种菌门中优势菌群的相对丰度;沙葱粉和复合益生菌制剂分别推动瘤胃发酵类型向丙酸型和乙酸型转变。

参考文献:

[1] 王志,肖定汉.奶牛饲养管理与营养代谢性疾病[M].北京:中国农业大学出版社,1989:2.

[2] MIZRAHI I. Rumen symbioses[M]. Berlin: Springer Berlin Heidelberg,2013:533-544.

[3] WANG H F, YANG W R, YANG Y X, et al. The study on the effects of Chinese herbal mixtures on growth, activity of post-ruminal digestive enzymes and serum antioxidant status of beef cattle[J]. Agricultural Sciences in China,2011,10(3):448-455.

[4] BODAS R, PRIETO N, GARCÍA-GONZÁLES R, et al. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites[J]. Animal Feed Science and Technology,2012,176(1/2/3/4):78-93.

[5] 潘龙,卜登攀,王加启,等.柴胡中草药对奶牛瘤胃菌群多样性及纤维分解菌的影响[J].草业学报,2015,24(3):221-225.

[6] 董晓丽.益生菌的筛选鉴定及其对断奶仔猪、犊牛生长和消化道微生物的影响[D].博士学位论文.北京:中国农业科学院,2013:49-69.

[7] 占今舜,邬彩霞,刘明美,等.饲粮添加苜蓿黄酮对奶牛瘤胃菌群的影响[J].草业学报,2017,26(7):82-89.

[8] 宋丽霞.沙葱多糖对肉羊免疫和抗氧化机能影响的研究[D].硕士学位论文.呼和浩特:内蒙古农业大学,2011.

[9] KUMAR P P N V, PAMMI S V N, KOLLU P, et al. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using Boerhaavia diffusa, plant extract and their anti bacterial activity[J]. Industrial Crops & Products,2014,52(1):562-566.

[10] 赵春艳.沙葱中黄酮类化合物的分离纯化、结构鉴定及其对小鼠免疫抗氧化机能影响的研究[D].博士学位论文.呼和浩特:内蒙古农业大学,2008.

[11] MUQIER,QI S,WANG T,et al.Effects of flavonoids from *Allium mongolicum* Regel on growth performance and growth-related hormones in meat sheep[J].Animal Nutrition,2017,3(1):33-38.
[12] 刘建涛,王彬,张维民,等.葱属植物生物活性物质的研究进展[J].食品科学,2007,28(4):348-350.
[13] 包雨洪.沙葱多糖对绵羊瘤胃发酵、纤维素降解及血液生化指标的影响[D].硕士学位论文.呼和浩特:内蒙古农业大学,2009.
[14] 张霞.沙葱提取物对绵羊瘤胃发酵和微生物区系的影响[D].硕士学位论文.呼和浩特:内蒙古农业大学,2007.
[15] 邵明旭.小尾寒羊肠道正常菌群高通量测序分析及羊源微生态制剂的研制[D].硕士学位论文.泰安:山东农业大学,2016.
[16] 杨德莲,童津津,张婕,等.葡萄籽原花青素对奶牛瘤胃体外发酵参数及微生物区系的影响[J].动物营养学报,2018,30(2):717-725.
[17] 卢媛.沙葱、地椒风味活性成分及其对绵羊瘤胃发酵和羊肉风味的影响[D].硕士学位论文.呼和浩特:内蒙古农业大学,2002.
[18] 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,2007:48-80.
[19] 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.
[20] 王洪荣,张洁.不同碳水化合物结构日粮对山羊瘤胃发酵和微生物氨基酸组成的影响[J].中国农业科学,2011,44(5):1071-1076.
[21] 张昌吉,刘哲,郝正里,等.含不同秸秆的全饲粮颗粒料对绵羊瘤胃代谢参数的影响[J].草业科学,2008,25(1):82-86.
[22] 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,1988:16.
[23] MURPHY J J,KENNELLY J J.Effect of protein concentration and protein source on the degradability of dry matter and protein *in situ*[J].Journal of Dairy Science,1987,70(9):1841-1849.
[24] MOULD F L,ØRSKOV E R.Manipulation of rumen fluid pH and its influence on cellulolysis in sacco,dry matter degradation and the rumen microflora of sheep offered either hay or concentrate[J].Animal Feed Science and Technology,1983,10(1):1-14.
[25] 王加启.反刍动物营养学研究方法[M].北京:现代教育出版社,2011.
[26] BANNINK A,FRANCE J,LOPEZ S,et al.Modelling the implications of feeding strategy on rumen fermentation and functioning of the rumen wall[J].Animal Feed Science and Technology,2008,143(1):3-26.
[27] 冯仰廉.反刍动物营养学[M].北京:科学出版社,2004.
[28] 赵国芬.沙葱和油料籽实对绵羊瘤胃发酵、营养物质消化流通及胴体品质影响的研究[D].博士学位论文.呼和浩特:内蒙古农业大学,2005:63-129.
[29] IQBAL M F,CHENG Y F,ZHU W Y,et al.Mitigation of ruminant methane production:current strategies,constraints and future options[J].World Journal of Microbiology and Biotechnology,2008,24(12):2747-2755.
[30] 张梅梅.日粮中添加单宁对绵羊和绒山羊瘤胃细菌数量和多样性影响[D].硕士学位论文.呼和浩特:内蒙古农业大学,2015:51-55.
[31] 吕佳颖.粗饲料来源对育肥羔羊生产性能和瘤胃微生物区系的影响[D].硕士学位论文.兰州:兰州大学,2017:10-34.
[32] MAO S,ZHANG R,WANG D,et al.The diversity of the fecal bacterial community and its relationship with the concentration of volatile fatty acids in the feces during subacute rumen acidosis in dairy cows[J].BMC Veterinary Research,2012,8:237.
[33] KIM M,MORRISON M,YU Z.Status of the phylogenetic diversity census of ruminal microbiomes[J].FEMS Microbiology Ecology,2011,76(1):49-63.
[34] QIN J J,LI R Q,RAES J,et al.A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing[J].Nature,2010,464(7285):59-65.
[35] LEY R E,LOZUPONE C A,HAMADY M,et al.Worlds within worlds:evolution of the vertebrate gut microbiota[J].Nature Reviews Microbiology,2008,6(10):776-788.
[36] CUSHNIE T P T,LAMB A J.Antimicrobial activity of flavonoids[J].International Journal of Antimicrobial Agents,2005,26(5):343-356.
[37] 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.
[38] 周斐然.甜高粱青贮有氧稳定性、瘤胃降解率及其对瘤胃菌群影响的研究[D].硕士学位论文.阿拉尔:塔里木大学,2017.

Effects of Dietary *Allium mongolicum* Regel Powder or Probiotic Complex Preparation on Ruminal Fermentation Parameters and Rumen Fluid Bacterial Diversity of Dorper× Thin-Tailed *Han* Crossbred Sheep

DING He　LIU Wangjing　AO Changjin*　Khas-Erdene　LI Shuyi　LI Ying　ZHANG Zuozhong
(*College of Animal Science*, *Inner Mongolia Agricultural University*, *Hohhot* 010018, *China*)

Abstract: The aim of this study was to evaluate the effects of dietary *Allium mongolicum* Regel (AMR) powder or probiotic complex (PC) preparation on ruminal fermentation parameters and rumen fluid bacterial diversity of Dorper×thin-tailed *Han* crossbred sheep. Thirty Dorper×thin-tailed *Han* crossbred sheep with similar body weight were randomly divided into 3 groups and each group had 10 sheep. The diets of the three groups were as follows: control group, basal diet only; AMR group, basal diet+0.46% AMR powder; PC group, basal diet+4.35% PC preparation. The adding amounts of AMR powder and PC preparation were according to the dry matter of the basal diet. After feeding 90 days, four sheep with similar body weight were randomly selected, the rumen fluid of every sheep was sampled after slaughter to detect ruminal fermentation parameters, and the rumen fluid bacterial diversity was determined high-throughput sequencing method. The results showed as follows: 1) compared with the control group, the concentration of acetic acid of rumen fluid in PC group was significantly increased ($P<0.05$), the acetate/propionate of rumen fluid in AMR group was lowed and that in PC group was increased, but the differences were not significant ($P>0.05$). 2) The Shannon index of rumen fluid in PC group was significantly lower than that in control group ($P<0.05$), and that in AMR group was higher than that in control group, but the difference was not significant ($P>0.05$). 3) Within top 10 bacteria at phylum level, there were differences between control and AMR group in the relative abundance of each bacterial phylum, but the differences were not significant ($P>0.05$); The relative abundance of Bacteroidetes, Verrucomicrobia and Synergistetes in PC group were significantly higher than those in control group ($P<0.05$), however, the relative abundance of Proteobucteria was significantly lower than that in control group ($P<0.05$). At family level, the relative abundance of Acidaminococcaceae in AMR group and PC group was significantly higher than that in control group ($P<0.05$). The results indicate that AMR powder and PC preparation supplementations can change the type of rumen fermentation, and make the rumen fluid bacterial diversity more abundant at different extents, respectively. [***Chinese Journal of Animal Nutrition***, **2019**, **31**(**1**):**324-333**]

Key words: *Allium mongolicum* Regel powder; probiotic complex preparation; Dorper×thin-tailed *Han* crossbred sheep; rumen fermentation; bacterial diversity

* Corresponding author, professor, E-mail: changjinao@aliyun.com

(责任编辑　管景颖)