

王海波, 占今舜, 谷志勇, 等. 日粮中添加芦丁对湖羊瘤胃细菌菌群多样性及其组成的影响 [J]. 福建农业学报, 2022, 37 (4): 445–452.
WANG H B, ZHAN J S, GU Z Y, et al. Effects of Dietary Rutin on Rumen Microbial Community Diversity and Composition of *Hu* Sheep [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2022, 37 (4): 445–452.

日粮中添加芦丁对湖羊瘤胃细菌菌群多样性及其组成的影响

王海波^{1,2}, 占今舜¹, 谷志勇^{1,3}, 刘宇航^{1,2}, 霍俊宏^{1*}, 赵生国^{2*}

(1. 江西省农业科学院畜牧兽医研究所, 江西 南昌 330200; 2. 甘肃农业大学动物科学技术学院, 甘肃 兰州 730070; 3. 天津农学院动物科学与动物医学学院, 天津 300384)

摘要:【目的】研究日粮中添加芦丁对湖羊瘤胃细菌菌群多样性及组成的影响。【方法】选择3月龄左右、健康且体重相近的湖羊36只, 随机分为3个处理, 每个处理12只(公母各半, 分栏饲养)。对照组(CON组)饲喂基础日粮, 试验组R50和R100分别在基础日粮中添加50、100 mg·kg⁻¹(湖羊体重基础)的芦丁。试验期为70 d, 预试期14 d, 正试期56 d。【结果】1) 3组共产生446个OTUs (Operational taxonomic units), 其中共有OTU为396个, 占总OTU的88.79%, 所有样品共注释了14个门(Phylum)、18个纲(Class)、21个目(Order)、34个科(Family)和99个属(Genus)。2) 相对于CON组, R100组的ACE指数、Shannon指数、Chao1指数显著降低($P < 0.05$)。但CON和R50组中Alpha多样性均无显著差异($P > 0.05$)。3) 通过PCoA分析(Principal co-ordinates analysis)、NMDS分析(Non-metric multi-dimensional scaling analysis)、UPGMA聚类方法(Unweighted pair group method with arithmetic mean clustering analysis)和Anosim分析可知, R100组显著影响微生物群落结构。4) 在门水平, 拟杆菌门(Bacteroidetes)和厚壁菌门(Firmicutes)为两大优势菌门。相比CON组, R100组疣状菌门(Patescibacteria)的相对丰度显著提高, 迷踪菌门(Elusimicrobia)的相对丰度显著降低($P < 0.05$), 但R50组Elusimicrobia的相对丰度显著高于CON组和R100组($P < 0.05$)。5) 在属水平, 优势菌属均为普雷沃菌属_1(*Prevotella_1*)。在已鉴定丰度排名前30的属水平上, R100组新月形单胞菌属_1(*Selenomonas_1*)和琥珀酸菌属(*Succiniclasicum*)的相对丰度显著低于CON组($P < 0.05$), 但与R50组差异不显著($P > 0.05$)。【结论】添加100 mg·kg⁻¹的芦丁能够影响湖羊瘤胃微生物多样性。

关键词: 湖羊; 芦丁; 瘤胃; 微生物

中图分类号: S 826

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2022) 04-0445-08

Effects of Dietary Rutin on Rumen Microbial Community Diversity and Composition of *Hu* Sheep

WANG Haibo^{1,2}, ZHAN Jinshun¹, GU Zhiyong^{1,3}, LIU Yuhang^{1,2}, HUO Junhong^{1*}, ZHAO Shengguo^{2*}

(1. Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang, Jiangxi 330200, China; 2. College of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China; 3. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China)

Abstract: 【Objective】Effects of rutin supplementation in forage on the rumen microbial community diversity and composition of *Hu* sheep were studied. 【Method】Thirty-six healthy 3-month-old *Hu* sheep of similar body weight were randomly divided into 3 groups of 12 animals (half male and female) each for the treatments. The sheep in the control group (CON) were fed a basal diet, while those in two treatment groups on a daily diet supplemented with rutin at a rate of 50 mg (R50) or 100 mg (R100) per kg of animal body weight. The feeding test lasted for 70 d that included 14 d of pre-test and 56 d of

收稿日期: 2021-12-28 初稿; 2022-03-09 修改稿

作者简介: 王海波 (1992-), 男, 博士研究生, 研究方向: 动物遗传育种与繁殖 (E-mail: wanghaibo8815@163.com); 共同第一作者: 占今舜 (1985-), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向: 反刍动物营养 (E-mail: zhanjinshun1985@163.com)

* 通信作者: 霍俊宏 (1975-), 男, 硕士, 研究员, 研究方向: 动物遗传与育种研究 (E-mail: hjh_0222@126.com); 赵生国 (1976-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 动物遗传资源与利用 (E-mail: zhaosg@gsau.edu.cn)

基金项目: 江西省现代农业产业技术体系建设专项 (JXARS-13-肉羊岗位); 江西现代农业科研协同创新专项 (JXXTCX201702-04)

actual test. 【Result】 (1) Of the 446 OTUs collected in the sheep rumens, 396 (constituted 88.79% of total) were commonly shared by the sheep in the 3 groups that annotated into 14 phyla, 18 classes, 21 orders, 34 families, and 99 genera. (2) The ACE, Shannon, and Chao1 indices of the sheep in the R100 group were significantly lower than those of CON ($P < 0.05$), while the alpha diversity not significantly different between CON and R50 groups ($P > 0.05$). (3) The results of the principal coordinates analysis (PCoA), the non-metric multi-dimensional scaling analysis (NMDS), the unweighted pair group method with arithmetic mean clustering analysis (UPGMA), and the anosim analysis showed that the microbial community was significantly altered by the R100 treatment ($P < 0.05$). (4) Bacteroidetes and Firmicutes were two dominant phyla. R100 significantly increased the relative abundance of Patescibacteria but decreased that of Elusimicrobia ($P < 0.05$). On the other hand, R50 significantly raised the relative abundance of Elusimicrobia over CON or R100 ($P < 0.05$). (5) At genus level, the dominant microbes were *Prevotella_1*. The relative abundance of *Selenomonas_1* and *Succiniclasicum* in the sheep fed with R100 were significantly lower than CON ($P < 0.05$) but not significantly different from R50 ($P > 0.05$). 【Conclusion】 Addition of rutin to forage at a rate of $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ of sheep body weight significantly affected the rumen microbial diversity in *Hu* sheep.

Key words: *Hu* sheep; rutin; rumen; microorganism

0 引言

【研究意义】反刍动物精巧的胃肠发酵系统（瘤胃或瘤-网胃）能够维持胃肠功能，并发酵、转化植物性饲料，产生挥发性脂肪酸（VFA）、甲烷气体等^[1-2]。研究芦丁对湖羊瘤胃细菌菌群多样性及组成的调控，对促进反刍动物对植物性饲料的利用具有重要意义。【前人研究进展】体外发酵试验表明，沙棘黄酮可以提高微生物对氮代谢、糖代谢的能力，降低产甲烷菌、瘤胃球菌、原虫的数量^[3]。而且，黄酮类化合物能增强抗氧化能力，改善动物生长性能^[4-6]，并能通过影响 DNA 和 RNA 的合成抑制微生物繁殖，降低瘤胃微生物的数量^[7-8]；还可直接作用瘤胃产甲烷菌，抑制 CH_4 产生，提高能量利用率^[9]。芦丁（芸香苷、维生素 P）作为一种广泛存在于植物根、茎、叶、花、果实和种子中的黄酮类提取物，不仅可当作治疗药物，还能作为保健品，在呼吸系统、内分泌系统、胃肠系统、免疫保护等方面发挥功能^[6]，具有改善动物生产性能、提高瘤胃代谢和消化能力的作用^[10]。芦丁经胃肠道转运或微生物降解生成槲皮素等代谢产物，发挥抗氧化、抗菌、抗病毒和保护肾、肝脏及胃肠道黏，促进免疫器官发育，增强机体免疫力^[11-12]的功能。研究发现，芦丁能够抑制对绿脓杆菌、变形杆菌等的生长^[6]，并通过瘤胃代谢影响微生物的定植^[13]。【本研究切入点】本课题组成员占今舜等^[14]在日粮中添加芦丁对湖羊生长性能、血清生化指标、激素水平及瘤胃发酵的研究中发现，芦丁能够改善湖羊生长性能，调控纤维素、蛋白质降解效率，影响瘤胃发酵。然而有关日粮中添加芦丁对湖羊瘤胃细菌菌群多样性及其组成的影响有待深入探讨。【拟解决的关键问题】通过高通量测序探究在日粮添加芦丁对湖羊瘤胃细菌菌群多样性及组成的影响，为后续研究芦丁在湖羊

中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试芦丁购自宁波玉健医药有限公司（浙江，宁波），提取自槐米（*Sophora japonica* L.），纯度 $\geq 95\%$ 。

1.2 试验设计

选择 3 月龄左右、健康且体重相近的湖羊 36 只，随机分为 3 个处理，每个处理 12 只湖羊（公母各半，分栏饲养）。对照组（CON 组）饲喂基础日粮，试验组 R50 和 R100 分别在基础日粮中按照湖羊体重分别添加 50 和 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的芦丁，试验期为 70 d（预试期 14 d，正试期 56 d）。

1.3 试验动物及管理

试验于 2019 年 8~10 月在江西省赣州市绿林湾农牧有限公司湖羊养殖场进行。饲养管理按照养殖场的规定执行，每天饲喂 2 次，分别在 8:30 和 17:30 进行饲喂，羊只自由采食，饮水，隔天早上称取余料。

1.4 基础日粮

参考我国《肉羊饲养标准》（NY/T 816—2004）配制基础日粮。其中精料组成及营养水平在前期占今舜等^[14]的研究中进行了详细的描述（消化能为 $13.39 \text{ MJ} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、粗蛋白为 20.06%、中性洗涤纤维为 23.24%、酸性洗涤纤维为 13.78%、钙为 0.66%、磷为 0.45%）。日粮中精料和粗料按照质量比 6:4 先后分开饲喂。粗料为铡碎的紫象草（干物质中含 10.98% 的粗蛋白质、2.90% 的粗脂肪、14.07% 的粗灰分、61.23% 的中性洗涤纤维和 34.67% 的酸性洗涤纤维）。

1.5 样品采集与指标测定

1.5.1 瘤胃液采集 试验结束后，选择各处理组中

平均体重接近 [对照组、R50 和 R100 的平均体重分别为 (29.63±0.63) kg、(30.80±0.84) kg 和 (29.93±0.89) kg] 的湖羊 (公羊) 4 只快速屠宰取出瘤胃，并将瘤胃内容物经 4 层纱布过滤，分装于 5 mL 冻存管放入液氮速冻后 -80 ℃ 保存，用于细菌总 DNA 提取。

1.5.2 瘤胃液微生物 DNA 的提取、测序以及分析
湖羊瘤胃液中总 DNA 提取送至苏州金唯智生物科技有限公司，参照试剂盒说明进行细菌总 DNA 提取，并使用 Qubit® dsDNA HS Assay Kit 检测 DNA 浓度。以 20~30 ng 的 DNA 为模板，使用设计 PCR 引物 (F: CCTACGRRBGCASCAGKVRVGAAT, R: GGACTACNVGGGTWTCTAATCC) 扩增原核生物 16S rRNA 基因 V3~V4 的 2 个高度可变区。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测，按 Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA) 仪器使用说明书进行双端测序，对测序结果原始图像数据利用软件 Bcl2fastq (v2.17.1.14) 进行图像碱基识别，质量分析，得到原始测序数据。原始数据通过 Qiime 1.9.1 软件进行拼接，使用 Cutadapt 1.9.1 和 Vsearch 1.9.6 软件去除低质量序列和嵌合体进行优化得到有效数据。使用 Vsearch 1.9.6 在相似性 97% 的水平上进行聚类成为 OTUs (Operational taxonomic units)，以 Silva_132 16S rRNA database (<http://www.arb-silva.de/>) 为参考，利用 RDP classifier 2.2 (Ribosomal Database Program) 贝叶斯算法对 OTU 的代表性序列进行物种分类学分析。通过软件 Qiime 1.9.1 对检测样品 α 多样性指数进行评估。经 Qiime 1.9.1 和 R 语言作图，基于 Brary-Curtis 距离矩阵，进行 PCoA 作图分析；基于 beta 多样性距离矩阵，用 R 语言进行 NMDS 作图，并采用 UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic mean) 聚类方法进行样本聚类。

1.6 数据统计分析

数据经 Excel 2013 初步整理后，采用 SPSS 26.0 进行单因素方差分析 (One-way ANOVA)，用 Duncan 氏法进行多重比较，试验结果均以平均值±标准差 (M±SD) 表示，*P*<0.05 表示差异显著，*P*<0.01 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 OTU 分析和物种注释

本试验中 12 个样品平均每个样品测得 103 929 条原始 PE reads，经过质量优化平均获得 90653 条有效序列，其平均长度为 453 bp，有效序列获取率为

87.39%。以 97% 的一致性对瘤胃微生物进行 OTUs 聚类绘制 Venn 图 (图 1) 可知，共得到 446 个 OTU。其中，3 个处理组共享 396 个 OTU，占总 OTU 数的 88.79%。同时，CON 组和 R50 组共享 416 个 OTU，CON 组和 R100 组共享 404 个 OTU，R50 组和 R100 组共享 402 个 OTU。且 CON 和 R50 组分别特有 15 个、1 个 OTU。其中，CON 组主要以拟杆菌门的 3 个菌属，分别为 uncultured_rumen_bacterium (OTU83、OTU48、OTU213、OTU396、OTU397 和 OTU417)、普雷沃菌属_1 (OTU438、OTU84、OTU422 和 OTU425) 及理研菌科_RC9_gut_group (OTU51) 为主。通过以 Silva 132 为参考数据库，利用 RDP classifier 贝叶斯算法对 OTU 的代表性序列进行物种分类学注释，所有样品共注释了 14 个门 (Phylum)、18 个纲 (Class)、21 个目 (Order)、34 个科 (Family) 和 99 个属 (Genus)。通过对序列进行随机抽样的方法，以抽到的序列数与它们所能代表 OTU 的数目构建稀释曲线 (图 2) 可知，随着测序深度的增加，

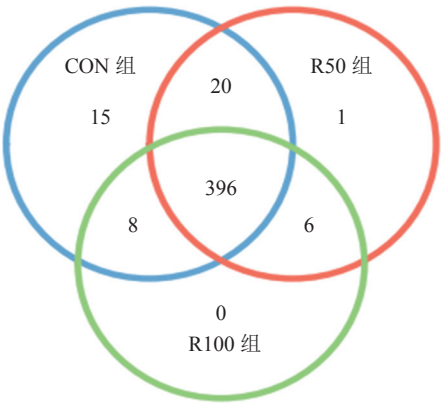


图 1 OTUs 分布维恩图

Fig. 1 Venn diagrams of OTU distribution

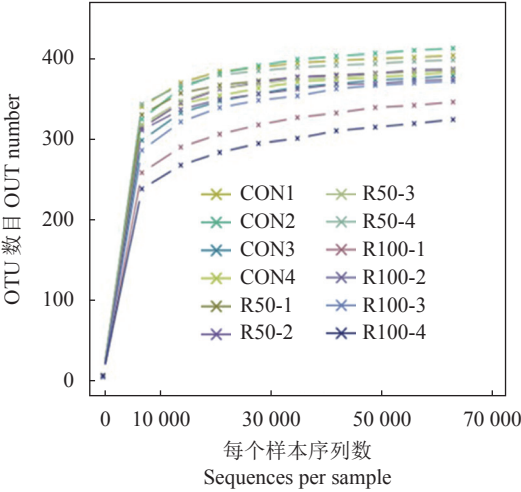


图 2 OTUs 的稀释曲线

Fig. 2 Rarefaction curves of OTUs

OTU 的数量先增加最后趋向平坦，持续抽样新物种出现的速率降低，检测到的 OTU 数目不再增加，测序数据量较为合理。

2.2 Alpha 多样性分析

日粮中添加芦丁对瘤胃液微生物 Alpha 多样性的影响见表 1。由表可知 1，日粮中添加芦丁显著影响瘤胃液微生物 Alpha 多样性。相比较 CON 组和 R50 组，R100 组 ACE 指数、Shannon 指数显著降低 ($P<0.05$)。R100 组 Chao1 指数与 CON 组相比显著降低 ($P<0.05$)，与 R50 组无显著差异。同时，CON 组和 R50 组 Alpha 多样性均无显著差异 ($P>0.05$)。

表 1 瘤胃液细菌群 Alpha 多样性分析
Table 1 Alpha diversity analysis on microbial community in rumen fluid

项目 Items	CON组 CON Group	R50组 R50 group	R100组 R100 group
ACE 指数 ACE index	405.40±7.47 a	395.08±3.34 a	372.51±9.07 b
赵氏指数 Chao1 index	409.07±7.63 a	398.95±4.10 ab	377.80±12.46 b
香农指数 Shannon index	6.52±0.17 a	6.69±0.14 a	5.92±0.23 b
辛普森指数 Simpson index	0.97±0.01 ab	0.98±0.00 a	0.95±0.01 b

注：同行数据后的大写字母不同表示差异极显著 ($P<0.01$)，小写字母不同表示差异显著 ($P<0.05$)，相同或无字母表示差异不显著 ($P>0.05$)。下表同。

Note: Different uppercase letters on the same line indicate extremely significant differences ($P<0.01$), lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$), while the same or no letters mean no significant difference ($P>0.05$). The same as below.

2.3 Beta 多样性分析

基于 Brary-Curtis 距离矩阵的 PCoA 作图分析 (图 3) 可知，PC1 和 PC2 对样本差异的贡献率分别为 21.48% 和 20.00%，且样本点的距离越近，相似度越高。NMDS 分析可知，不同样本间的差异程度通过点间的距离体现，由图 4 可知， $Stress<0.097$ ，表明 NMDS 可以准确反映样本间的差异程度。由 PCoA 分析 (图 3)、NMDS 分析 (图 4) 和 UPGMA 聚类方法 (图 5) 可知，R100 组与 CON 和 R50 组在微生物群落结构上存在差异，而 CON 和 R50 组群落组成相似。Anosim 分析结果见图 6。图 6 中 a ($R=0.156$, $P=0.223$)、b ($R=0.417$, $P=0.064$) 和 c ($R=0.469$, $P=0.035$) 中的 R 值逐渐增大，表明日粮中添加芦丁能够影响微生物结构分布，且 R50 与 R100 两组之间存在显著差异 ($P<0.05$)，CON 组和 R50 组之间、CON 和 R100 组之间无显著差异。

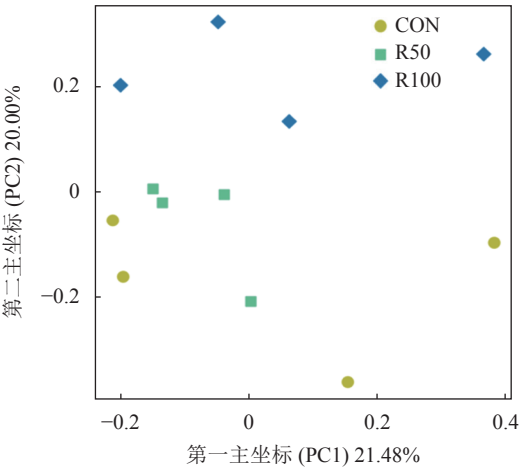


图 3 主坐标分析

Fig. 3 Principal coordinate analysis

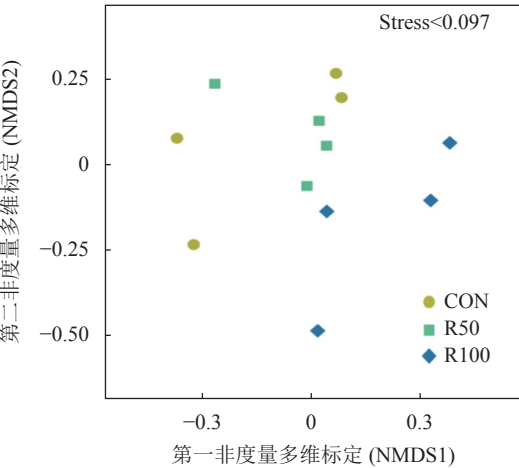


图 4 非度量多维标定法

Fig. 4 Non-metric multi-dimensional scaling

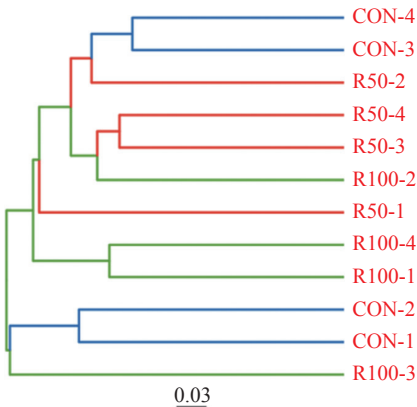


图 5 湖羊瘤胃微生物 UPGMA 聚类方法

Fig. 5 UPGMA on microbes in rumen of Hu sheep

2.4 湖羊瘤胃液中微生物群落组成

日粮中添加芦丁对湖羊瘤胃液中微生物在门和属水平的分布见表 2~3。在门水平，由表 2 可知：拟杆菌门 (Bacteroidetes) 和厚壁菌门 (Firmicutes)

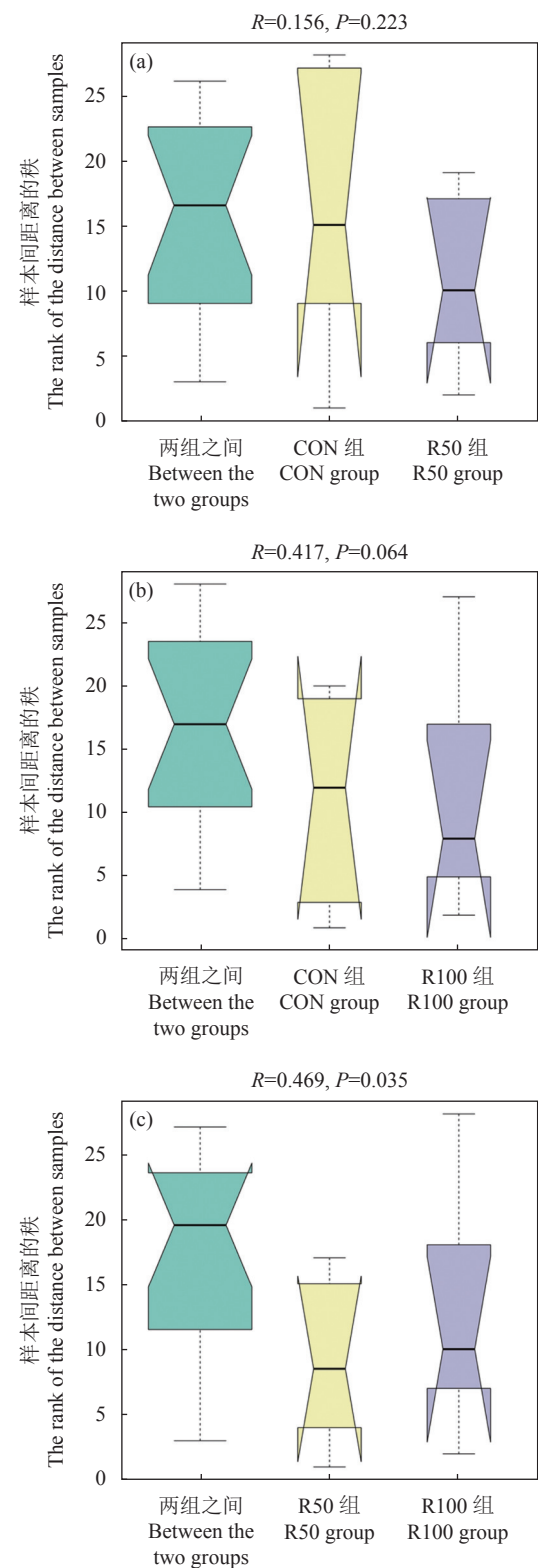


图 6 湖羊瘤胃微生物群落结构 Anosim 分析

Fig. 6 Anosim analysis on microbial community structure in rumen of *Hu* sheep

两大优势菌门的相对丰度超过 88.31%，在 CON 组分别占 52.84% 和 35.47%，在 R50 组分别占 59.18% 和 31.56%，在 R100 组分别占 62.76% 和 29.67%。日粮中添加芦丁在门水平显著影响迷踪菌门（*Elusimicrobia*）

和骺骨细菌门（*Patescibacteria*）的相对丰度（ $P<0.05$ ）。相比 CON 组，R100 组显著提高 *Patescibacteria* 的相对丰度，降低 *Elusimicrobia* 的相对丰度（ $P<0.05$ ），同时 R50 组 *Elusimicrobia* 的相对丰度显著高于 CON 组和 R100 组（ $P<0.05$ ），其他各处理组之间在门水平均无显著差异（ $P>0.05$ ）。在属水平上，由表 3 可知，CON 组、R50 组和 R100 组优势菌属均为普雷沃菌属_1（*Prevotella_1*）和理研菌科_RC9_gut_group（*Rikenellaceae_RC9_gut_group*），在 CON 组分别占 20.28% 和 12.16%，在 R50 组分别占 26.34% 和 11.05%，在 R100 组分别占 26.79% 和 18.60%。在已鉴定丰度排名前 30 的菌属中，日粮中添加芦丁能显著影响新月形单胞菌属_1（*Selenomonas_1*）、琥珀酸菌属（*Succiniclacticum*）、*f_Bacteroidales_RF_16_group_Unclassified* 和 *f_Lachnospiraceae_Unclassified* 的相对丰度。其中，与 CON 组相比，R100 组中 *Selenomonas_1*、*f_Bacteroidales_RF_16_group_Unclassified*、*Succiniclacticum* 的相对丰度显著降低（ $P<0.05$ ），但与 R50 组差异不显著（ $P>0.05$ ）。同时，R100 组中 *f_Lachnospiraceae_Unclassified* 极显著低于 R50 组（ $P<0.01$ ）。其他各处理组之间在属水平均无显著差异（ $P>0.05$ ）。

表 2 芦丁对湖羊瘤胃微生物相对丰度的影响（门水平）
Table 2 Effect of rutin on microbial relative abundance in rumen of *Hu* sheep (at phylum level) (单位: %)

项目 Items	CON组 CON group	R50组 R50 group	R100组 R100 group
拟杆菌门 Bacteroidetes	52.84±3.03	59.18±3.02	62.76±6.39
厚壁菌门 Firmicutes	35.47±1.87	31.56±1.39	29.67±5.23
变形菌门 Proteobacteria	5.80±2.10	1.97±1.22	1.67±0.75
互养菌门 Synergistetes	1.68±0.97	2.70±1.53	0.77±0.53
广古菌门 Euryarchaeota	1.43±1.15	0.67±0.13	2.12±1.52
螺旋体门 Spirochaetes	0.54±0.21	1.65±0.70	1.08±0.41
放线菌门 Actinobacteria	1.33±1.32	0.61±0.29	0.85±0.42
纤维杆菌门 Fibrobacteres	0.36±0.09	0.31±0.06	0.37±0.14
骺骨细菌门 Patescibacteria	0.17±0.06 b	0.30±0.06 ab	0.56±0.18 a
迷踪菌门 Elusimicrobia	0.06±0.04 b	0.80±0.40 a	0.00±0.00 c
软壁菌门 Tenericutes	0.27±0.14	0.22±0.11	0.07±0.03
Kiritimatiellaota	0.05±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01
蓝藻菌门 Cyanobacteria	0.00±0.00	0.01±0.00	0.05±0.04
k_Bacteria_Unclassified	0.02±0.02	0.01±0.01	0.02±0.02

表 3 芦丁对湖羊瘤胃微生物相对丰度的影响（属水平）
Table 3 Effect of rutin on microbial relative abundance in rumen of *Hu* sheep (at genus level) (单位: %)

项目 Items	CON组 CON group	R50组 R50 group	R100组 R100 group
普雷沃菌属_1 <i>Prevotella</i> _1	20.28±5.92	26.34±3.35	26.79±7.98
理研菌科_RC9_gut_group <i>Rikenellaceae</i> _RC9_gut_group	12.16±2.99	11.05±2.13	18.60±4.48
<i>f_F082_Unclassified</i>	3.47±0.41	5.83±1.64	5.09±1.07
<i>f_Muribaculaceae_Unclassified</i>	4.83±1.60	5.55±1.93	1.98±1.35
新月形单胞菌属 <i>Selenomonas</i> _1	5.10±1.40 a	2.56±0.40 ab	1.51±0.52 b
<i>f_Prevotellaceae_Unclassified</i>	2.67±0.53	2.61±0.52	3.65±1.55
瘤胃球菌属_2 <i>Ruminococcus</i> _2	0.80±0.19	2.11±1.31	5.11±3.26
<i>f_Veillonellaceae_Unclassified</i>	2.53±0.81	3.14±0.98	2.10±0.77
<i>Ruminococcaceae_NK4A214_group</i>	2.73±0.73	2.14±0.42	2.26±0.63
<i>Christensenellaceae_R-7_group</i>	1.95±0.11	1.66±0.31	2.89±1.99
<i>Quinella</i>	1.86±0.78	2.17±0.86	2.46±1.05
<i>[Eubacterium]_coprostanoligenes_group</i>	3.99±3.71	0.56±0.16	1.94±1.02
琥珀酸弧菌属 <i>Succinivibrio</i>	3.46±1.52	0.81±0.52	1.21±1.02
<i>f_Bacteroidales_RF16_group_Unclassified</i>	3.11±0.87 a	0.89±0.27 b	1.32±0.29 b
<i>Prevotellaceae_UCG-003</i>	2.29±0.97	1.48±0.39	1.45±0.21
<i>Fretibacterium</i>	1.54±0.97	2.55±1.52	0.72±0.52
<i>Prevotellaceae_UCG-001</i>	1.30±0.43	1.91±0.79	1.49±0.46
<i>Lachnospiraceae_ND3007_group</i>	0.94±0.54	1.37±0.49	2.15±0.95
甲烷短杆菌属 <i>Methanobrevibacter</i>	1.38±1.16	0.61±0.13	2.11±1.52
<i>f_Lachnospiraceae_Unclassified</i>	1.21±0.15 AB	1.87±0.42 A	0.52±0.14 B
瘤胃球菌属_1 <i>Ruminococcus</i> _1	1.15±0.37	1.41±0.28	0.78±0.14
密螺旋体属_2 <i>Treponema</i> _2	0.53±0.21	1.65±0.70	1.08±0.41
<i>Veillonellaceae_UCG-001</i>	1.43±0.52	1.04±0.24	0.49±0.15
<i>f_Bifidobacteriaceae_Unclassified</i>	1.32±1.32	0.61±0.30	0.85±0.42
琥珀酸菌属 <i>Succiniclasticum</i>	1.67±0.61 a	0.73±0.25 ab	0.26±0.12 b
<i>f_Bacteroidales_BS11_gut_group_Unclassified</i>	0.50±0.21	1.00±0.39	0.78±0.54
<i>Succinivibrionaceae_UCG-002</i>	1.58±0.71	0.61±0.52	0.00±0.00
厌氧弧菌属 <i>Anaerovibrio</i>	0.98±0.27	0.73±0.23	0.48±0.28
<i>Ruminococcaceae_UCG-002</i>	0.42±0.19	0.66±0.13	0.65±0.17
<i>Lachnospiraceae_NK3A20_group</i>	0.58±0.18	0.61±0.06	0.55±0.09

3 讨论

瘤胃微生物主要由真菌、细菌和原虫组成，通过高通量测序技术可以快速高效地了解群落的种类和结构^[15]，可通过α和β多样性对微生物群落的多样性进行评估^[16]。本试验研究发现，对照组的

OTU 数目大于添加芦丁的试验组，添加芦丁导致微生物多样性降低。这可能是因为芦丁作为黄酮类化合物，可引起 DNA 和 RNA 的合成，抑制微生物繁殖，降低瘤胃微生物的数量，并能改善瘤胃消化代谢及碳水化合物的发酵影响微生物群落的多样性^[7,8,13,15,17]。本试验研究发现饲料中添加 50 mg·kg⁻¹

的芦丁对瘤胃菌群的丰度及多样性均无显著性影响，但添加 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的芦丁显著降低 α 多样性的 ACE 指数、Chao1 指数、Shannon 指数。通过 PCoA、NMDS 和 UPGMA 聚类方法对 β 多样性分析可知，添加 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的芦丁对瘤胃微生物群落有显著的影响。日粮中添加 50 、 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 芦丁不能改变瘤胃优势菌群，这与前期研究发现瘤胃优势菌群相一致^[18-19]。其中，对照组、 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 芦丁组和 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 芦丁组中 Bacteroidetes 和 Firmicutes 占比与牦牛^[20]、水牛^[21]、蒙古羊^[22]、湖羊^[23] 等反刍动物瘤胃优势菌为 Bacteroidetes 和 Firmicutes 的结果相似。拟杆菌门是一类革兰氏阴性菌，在核酸、脂质、蛋白质等有机物的转换和非纤维类碳水化合物化合物的降解中发挥重要功能^[15, 24-25]。厚壁菌门中含有大量纤维素分解菌属，主要促进纤维的分解^[15]。本研究发现，日粮中添加 50 、 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 芦丁能使瘤胃中的 Firmicutes 与 Bacteroidetes 的比值较对照组分别降低 20.56% 和 37.23%。变形菌门在肠道富集，容易引起炎症或外源性病原体的入侵，造成微生物群落失衡^[18, 26]。同时，芦丁对绿脓杆菌、大肠杆菌、变形杆菌等的生长具有抑制作用^[6]。日粮中添加 50 和 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 芦丁能使变形菌门的相对丰度较对照组分别降低 71.55%，81.38%，有利于维持菌群的平衡，增强机体抵抗外源性病原体的入侵^[18]。本试验研究发现添加 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的芦丁显著提高 Patescibacteria 丰度，降低 Elusimicrobia 的相对丰度。但 Elusimicrobia 在胃肠中占比较低，其功能作用研究也鲜有报道，需进一步探讨。

日粮中添加 50 和 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 芦丁不会影响育肥湖羊瘤胃优势菌属 *Prevotella_1* 和 *Rikenellaceae_RC9_gut_group* 分布，这一结果与孙美杰等^[23] 研究结果中育肥湖羊瘤胃优势菌属的结果一致。*Prevotella* 和 *Rikenellaceae_RC9_gut_group* 能够促进养分利用^[20, 27-28]。*Prevotella_1* 是 *Prevotella* 中主要的类群^[29]，参与木聚糖发酵、半纤维素和果胶的降解以及蛋白质和多肽的代谢及丙酸的生成^[2, 30]。本试验研究发现，各处理组中 *Prevotella-1* 占比最高，这与之之前报道的瘤胃液中优势菌为普氏菌属^[20, 31] 的结果相一致，但添加 50 和 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ BW 的芦丁组 *Prevotella-1* 分别较对照组分别提高了 29.39% 和 32.10%，这有利于促进瘤胃发酵^[2]。体外试验表明，芦丁能够提高饲料的降解率，降低 CH_4 产量^[32]。进一步通过体内试验证明芦丁能提高瘤胃碳水化合物发酵效率和瘤胃细菌合成

蛋白质的能力，增加乙酸、丙酸和 MCP 浓度^[10]。以上结果表明，日粮中添加芦丁有利于提高瘤胃优势菌属 *Prevotella_1* 的相对丰度，促进瘤胃氮代谢及对相关代谢产物的吸收利用^[2]。

4 结论

在本研究条件下，添加日粮中添加芦丁能提高瘤胃液中拟杆菌门的相对丰度，降低瘤胃中厚壁菌门和变形菌门的相对丰度。添加 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的芦丁能影响瘤胃微生物的 α 多样性和 β 多样性，并显著降低月形单胞菌属和琥珀酸属的相对丰度。

参考文献：

- [1] MORGAVI D P, RATHAHAO-PARIS E, POPOVA M, et al. Rumen microbial communities influence metabolic phenotypes in lambs [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 1060.
- [2] YU J K, CAI L Y, ZHANG J C, et al. Effects of thymol supplementation on goat rumen fermentation and rumen microbiota *in vitro* [J]. *Microorganisms*, 2020, 8 (8) : 1160.
- [3] 白齐昌, 郝小燕, 项斌伟, 等. 沙棘黄酮对绵羊体外产气量、瘤胃发酵参数和微生物菌群的影响 [J]. *动物营养学报*, 2020, 32 (3) : 1405-1414.
- BAI Q C, HAO X Y, XIANG B W, et al. Effects of sea buckthorn flavone on gas production, rumen fermentation parameters and microflora population of sheep *in vitro* [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020, 32 (3) : 1405-1414. (in Chinese)
- [4] 王霞, 刘莹莹, 曾青华, 等. 桑叶黄酮对动物氧化应激的作用 [J]. *中兽医医药杂志*, 2020, 39 (1) : 98-101.
- WANG X, LIU Y Y, ZENG Q H, et al. Reviewed on flavonoids in *Folium Mori* on animal oxidative stress [J]. *Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine*, 2020, 39 (1) : 98-101. (in Chinese)
- [5] HEIM K E, TAGLIAFERRO A R, BOBILYA D J. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships [J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2002, 13 (10) : 572-584.
- [6] GANESHPURKAR A, SALUJA A K. The pharmacological potential of rutin [J]. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2017, 25 (2) : 149-164.
- [7] CUSHNIE T P T, LAMB A J. Antimicrobial activity of flavonoids [J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2005, 26 (5) : 343-356.
- [8] OSKOEI A N, ABDULLAH N, OSKOEI A. Effects of flavonoids on rumen fermentation activity, methane production, and microbial population [J]. *BioMed Research International*, 2013: 349129.
- [9] BODAS R, PRIETO N, GARCÍA-GONZÁLEZ 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.
- [10] CUI K, GUO X D, TU Y, et al. Effect of dietary supplementation of

- rutin on lactation performance, ruminal fermentation and metabolism in dairy cows [J]. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2015, 99 (6) : 1065–1073.
- [11] 占今舜, 钟小军, 杨群, 等. 芦丁的生物活性功能及其在反刍动物生产中的应用 [J]. *动物营养学报*, 2019, 31 (7) : 2952–2957.
- ZHAN J S, ZHONG X J, YANG Q, et al. Bio-active functions of rutin and its application in ruminant production [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2019, 31 (7) : 2952–2957. (in Chinese)
- [12] GHORBANI A. Mechanisms of antidiabetic effects of flavonoid rutin [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017, 96: 305–312.
- [13] 郭旭东. 芦丁对奶牛泌乳性能、瘤胃消化代谢和对大鼠乳腺发育的影响[D]. 北京: 中国农业科学院, 2011.
- GUO X D. Studies of rutin's role on lactation performance, the rumen digestion and metabolism in dairy cows, and the development of mammary glands in rats[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2011. (in Chinese)
- [14] 占今舜, 霍俊宏, 钟小军, 等. 饲料中添加芦丁对湖羊生长性能、血清生化指标和激素水平及瘤胃发酵的影响 [J]. *动物营养学报*, 2021, 33 (5) : 2717–2726.
- ZHAN J S, HUO J H, ZHONG X J, et al. Effects of diet added with rutin on growth performance, serum biochemical indexes and hormone levels, and rumen fermentation of Hu sheep [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2021, 33 (5) : 2717–2726. (in Chinese)
- [15] LV F, WANG X J, PANG X, et al. Effects of supplementary feeding on the rumen morphology and bacterial diversity in lambs [J]. *PeerJ*, 2020, 8: e9353.
- [16] MA Y B, WANG W W, ZHANG H J, et al. Supplemental *Bacillus subtilis* DSM 32315 manipulates intestinal structure and microbial composition in broiler chickens [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 15358.
- [17] WANG W M, LI C, LI F, et al. Effects of early feeding on the host rumen transcriptome and bacterial diversity in lambs [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 32479.
- [18] AUFFRET M D, DEWHURST R J, DUTHIE C A, et al. The rumen microbiome as a reservoir of antimicrobial resistance and pathogenicity genes is directly affected by diet in beef cattle [J]. *Microbiome*, 2017, 5 (1) : 159.
- [19] REQUENA T, COTTER P, SHAHAR D R, et al. Interactions between gut microbiota, food and the obese host [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2013, 34 (1) : 44–53.
- [20] XUE D, CHEN H, LUO X L, et al. Microbial diversity in the rumen, reticulum, omasum, and abomasum of yak on a rapid fattening regime in an agro-pastoral transition zone [J]. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, 2018, 56 (10) : 734–743.
- [21] SINGH K M, AHIR V B, TRIPATHI A K, et al. Metagenomic analysis of Surti buffalo (*Bubalus bubalis*) rumen: A preliminary study [J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39 (4) : 4841–4848.
- [22] ZENG Y, ZENG D, NI X Q, et al. Microbial community compositions in the gastrointestinal tract of Chinese Mongolian sheep using Illumina MiSeq sequencing revealed high microbial diversity [J]. *AMB Express*, 2017, 7 (1) : 75.
- [23] 孙美杰, 姜君, 徐诣轩, 等. 不同尿素添加水平对育肥湖羊瘤胃发酵及微生物菌群结构的影响 [J]. *南京农业大学学报*, 2022, 45 (2) : 323–332.
- SUN M J, JIANG J, XU Y X, et al. Effects of incremental urea supplementation in diet on rumen fermentation and microbial communities in fattening Hu lambs [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2022, 45 (2) : 323–332. (in Chinese)
- [24] MICHAUD L, LO GIUDICE A, TROUSSELLIER M, et al. Phylogenetic characterization of the heterotrophic bacterial communities inhabiting a marine recirculating aquaculture system [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 107 (6) : 1935–1946.
- [25] STEVENSON D M, WEIMER P J. Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 75 (1) : 165–174.
- [26] 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.
- [27] 曲湘勇, 陈继发, 匡佑华, 等. 饲料添加蒙脱石和枯草芽孢杆菌对产蛋鸡盲肠菌群和肠道通透性的影响 [J]. *动物营养学报*, 2019, 31 (4) : 1887–1896.
- QU X Y, CHEN J F, KUANG Y H, et al. Effects of dietary montmorillonite and *Bacillus subtilis* on cecal microflora and intestinal permeability of laying hens [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2019, 31 (4) : 1887–1896. (in Chinese)
- [28] PITTA D W, PINCHAK E, DOWD S E, et al. Rumen bacterial diversity dynamics associated with changing from bermudagrass hay to grazed winter wheat diets [J]. *Microbial Ecology*, 2010, 59 (3) : 511–522.
- [29] HENDERSON G, YILMAZ P, KUMAR S, et al. Improved taxonomic assignment of rumen bacterial 16S rRNA sequences using a revised SILVA taxonomic framework [J]. *PeerJ*, 2019, 7: e6496.
- [30] STROBEL H J. Vitamin B12-dependent propionate production by the ruminal bacterium *Prevotella ruminicola* 23 [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58 (7) : 2331–2333.
- [31] MCCANN J C, LUAN S Y, CARDOSO F C, et al. Induction of subacute ruminal acidosis affects the ruminal microbiome and epithelium [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 701.
- [32] MOUFIDA A, AMINA B, RABAH A, et al. Effect of natural bioflavonoid on in vitro ruminal microbiota activity in sheep rumen liquor [J]. *Journal of BioScience and Biotechnology*, 2017, 6 (1) : 31–35.

(责任编辑: 张梅)