

蛋白质来源对瘤胃细菌和原虫群体结构的影响

王梦芝, 沈建昭, 刘莹, 董淑红, 喻礼怀, 王洪荣*
(扬州大学动物科学与技术学院, 江苏扬州 225009)

摘要: 以4只瘰管山羊为试验动物, 采用4×4拉丁方设计, 使用克隆测序、遗传指纹以及细胞显微计数等技术, 研究以羽毛粉(A)、玉米蛋白粉(B)、豆粕(C)和鱼粉(D)4种蛋白补充料分别配合的混合日粮对瘤胃细菌和原虫群体结构的影响。结果表明: 细菌的 *R. flavefaciens*、*R. bromii*、*R-7*、*Roseburia faecalis*、Uncultured T33H60F48、Uncultured GRANT42 及1个尚不能定性的类群在组间存在显著差异($P < 0.05$); 原虫的内毛虫、前毛虫、头毛虫、等毛虫4个类群在处理间差异显著($P < 0.05$)。综上可见, 蛋白质源对瘤胃细菌和原虫类群结构有显著影响。

关键词: 蛋白质源; 瘤胃; 细菌; 原虫; 类群结构; 山羊
中图分类号: S827.5 **文献标识码:** A

文章编号: 0258-7033(2011)03-0035-06

瘤胃微生物蛋白质(MCP)是反刍动物小肠氨基酸的主要来源。如何充分利用反刍动物营养生理特点, 使得MCP高效合成是有效调控反刍动物蛋白质营养、节约蛋白质饲料、缓解蛋白质资源短缺的重要途径之一。瘤胃微生物的生长容易受到日粮等因素影响, 利用日粮对MCP合成的调控也有较多报道^[1]。但有关日粮对微生物群体结构影响的研究却较少, 尤其是对细菌和原虫区系内部类群变化的深入研究

更为鲜见。因此, 本研究拟选用羽毛粉、玉米蛋白粉、豆粕和鱼粉等进行动物试验, 并结合分子克隆测序及DNA指纹等技术, 旨在研究蛋白质源影响微生物类群结构的规律与机制, 为瘤胃微生态、宿主氨基酸营养等的研究与调控提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 试验动物与日粮 4只1.2岁、体重相近(26.2±1.6 kg)的瘤胃瘰管徐淮山羊羯羊分单舍饲养、自由饮水。分别饲喂含羽毛粉(A)、玉米蛋白粉(B)、豆粕(C)和鱼粉(D)等的日粮(表1), 参照美国NRC(1981)的山羊营养需要推荐量, 能量供给量为维持需要的

收稿日期: 2009-08-03; 修回日期: 2009-12-22
资助项目: 国家自然科学基金项目(30771567)

作者简介: 王梦芝(1972), 女, 江苏徐州人, 博士, 讲师
* 通讯作者

diets containing three levels of vitamin D₃ (2 500, 3 000 and 3 500 IU/kg). The results showed that there was no effect of 25-OH-D₃ on average body weight, weight gain, feed intake and feed conversions. The ratio of breast meat was increased with increasing in concentrations of 25-OH-D₃ (0, 35, 70 μg/kg) while was decreased significantly ($P < 0.05$) when fed with 105 μg/kg 25-OH-D₃ compared to diets with 35, 70 μg/kg 25-OH-D₃. At 14 d, the concentration of phosphorus in tibia was increased with increasing in concentration of 25-OH-D₃ (0, 35, 70 and 105 μg/kg) while was significant differences between diets with 25-OH-D₃ 70, 105 μg/kg and 0, 35 μg/kg; At 15 to 35 d of age, the weight gain was increased significantly ($P < 0.05$) when fed with the diets containing 3 000, 3 500 IU/kg vitamin D₃ compared to 2 500 IU/kg vitamin D₃. At 14 and 45d of age, the concentration of calcium was increased significantly ($P < 0.05$) when fed with diets containing 3 500 IU/kg vitamin D₃ compared to 2 500 and 3 000 IU/kg vitamin D₃; At 14 and 45 d of age, there were significant effects of interaction between 25-OH-D₃ and vitamin D₃ on the concentration of calcium and phosphorus ($P < 0.01$) and phosphorus ($P < 0.05$) in tibia, respectively. Based on above results, the optimum adding level of 25-OH-D₃ was 70 μg/kg of diet containing 3 000 IU/kg vitamin D₃.

Key words: 25-hydroxycholecalciferol; vitamin D₃; performance; bone mineralization; Beijing ducks

表1 试验日粮组成与营养成分(干物质基础)

项目	A	B	C	D
日粮组成/%				
玉米	25.47	24.00	20.94	23.73
羽毛粉	4.53	-	-	-
玉米蛋白粉	-	6.00	-	-
豆粕	-	-	9.06	-
鱼粉	-	-	-	6.27
尿素	0.34	0.34	0.34	0.34
磷酸氢钙	0.36	0.36	0.36	0.36
食盐	0.34	0.34	0.34	0.34
预混料添加剂 ^①	0.26	0.26	0.26	0.26
稻草	68.70	68.70	68.70	68.70
合计	100.00	100.00	100.00	100.00
营养成分 ^②				
代谢能/(MJ·kg ⁻¹)	8.38	6.72	7.59	7.14
干物质/%	91.10	89.67	89.80	90.70
粗蛋白/%	10.89	10.88	10.65	10.96
Ca/%	0.43	0.48	0.46	0.53
P/%	0.28	0.27	0.25	0.31
Ca/P	1.54	1.78	1.84	1.71
结构性碳水化合物 ^③	43.40	43.69	43.51	43.26
非结构性碳水化合物 ^③	35.87	35.43	34.71	34.5
SC/NSC	1.21	1.23	1.25	1.25

注: ①每千克预混料添加剂成分: FeSO₄·7H₂O 170 g, CuSO₄·5H₂O 70 g, MnSO₄·5H₂O 290 g, ZnSO₄·7H₂O 240 g, CoCl₂·6H₂O 510 mg, KI 220 mg, Na₂SeO₃ 130 mg; 维生素 A 1 620 000 IU, 维生素 D₃ 324 000 IU, 维生素 E 540 IU, 维生素 K₃ 150 mg, 维生素 B₁ 60 mg, 维生素 B₂ 450 mg, 维生素 B₁₂ 0.9 mg, 维生素 B₅ 1 050 mg, 泛酸钙 750 mg, 叶酸 15 mg。②代谢能为实测总数值后的换算值, 其他指标均为实测值。③SC=NDF-NDFN; NSC=100-[(NDF-NDFN)+CP+EE+ASH]

1.3 倍, 每日 08:00 和 20:00 等量饲喂。

1.2 试验设计与样品采集 按 4×4 拉丁方的设计进行试验, 共 4 个周期, 每期预试期为 14 d、正试期 12 d。每期正试期的第 4 天在 08:00、10:00、12:00、14:00、16:00、18:00、20:00 时各采瘤胃液 10 mL 以测试瘤胃环境参数; 第 5~12 天每天采 1 次瘤胃液约 100 mL, 8 d 的取样时间依次为 08:00、11:00、14:00、17:00、20:00、23:00、02:00、05:00, 把每期每只羊 8 d 的样品充分混合后于 -20℃ 保存, 用于微生物结构分析。

1.3 DNA 的提取与细菌克隆测序分析

1.3.1 DNA 的提取 参考 Zhou 等^[2]的方法进行。756 型紫外分析仪(天津普瑞斯)测定所提取 DNA 浓度和纯度, 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量与片段大小。

1.3.2 细菌克隆测序分析 以豆粕组微生物的 DNA 为模板, 用细菌 16S rDNA 兼并引物进行 PCR 扩增^[3], 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物大小。用 Gel Extraction 试剂盒(Sangon Comp.)从琼脂糖凝胶中回收、纯化约 1 000 bp 的 PCR 产物, 将之与 pMD 18-T 载体连接, 并转化到感受态大肠杆菌 DH5α 中, 再经氨苄青霉素抗性平板 α 互补筛选阳性克隆, 富集后碱裂解法提取质粒, 用原引物 PCR 鉴定插入子正确后交由 Sangon Comp. 测序。将所测得的序列用 NCBI 上的 Vecscreen 去除质粒污染、用 BLAST 与 GenBank 序列进行相似性比对、用 MEGA3.1 软件以邻接法进行聚类分析。

1.4 微生物多样性分析

1.4.1 聚合酶链式反应(PCR) 分别以细菌 16S rDNA V6-8 引物^[4]、原虫 rDNA 的 ITS1 引物^[5]进行 PCR 扩增(表 2)。1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物质量与片段大小。

1.4.2 SSCP 检测与图谱分析 SSCP 检测参照 Schmalenberger 等方法^[6]进行, 图谱分析参照 Carriqo 等^[7]进行。将图谱数字化, 给其中每个清晰可辨的条带命名, 并计算不同泳道(底物)间 Jaccard 相似性指数(C_j)。C_j=j/(a+b+j)。式中, j 为两泳道共有条带数; a、b 为两泳道各自条特有的带数。

1.4.3 细菌凝胶图谱条带的定性和相对定量分析

用细菌 V6-8 引物同时做样品 DNA 和上述测序克隆株的 PCR-SSCP 条带匹配分析(即样品和上述 14 个测序克隆株同时做 PCR, 并将其 PCR 产物同时做 SSCP 检测), 将样品 SSCP 指纹中与某克隆子具有相同迁移率的条带定为该克隆子菌, 并用 BandScan 4.30 分析条带灰度值和计算该条带百分比。逐一对照样品中清晰可辨条带定性与相对定量, 以确定细菌 SSCP 图谱中各样品的组带所代表的细菌和其相对比例。

1.5 瘤胃原虫计数 以 MFS 染液(NaCl 8 g, 甲基绿 0.6 g, 福尔马林溶液 100 mL, 定容至 1 000 mL)染色, 用血球计数板在显微镜(奥林巴斯 CKX41, 日本)下计数(100×)和分类计数(400×)。原虫个数/mL=N/4×D×16×10×1 000=N×D×4×10⁴。式中, N 为计数的 4 个中方格的原虫总数; D 为稀释倍数。

1.6 瘤胃 pH、氨氮浓度和微生物蛋白测定 用 pHS-3C 型 pH 计于各取样时点立时测定 pH, 采用

表2 试验所用引物信息

引物	引物序列(5'→3')	版本	产物/bp	备注	合成单位
细菌 16S rDNA 全序列 ^[5]	F:GTG CCA GCM GCC GCG G	S-D-B-530-a-S-16	962	M=C:A,(1:1) Y=C:T,(1:1)	上海生工 Songon Comp.
	R:TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT	S-D-B-1492-b-A-21			
细菌 16S rDNA V6-8 ^[6]	F:GAA CGC GAA GAA CCT TAC	S-D-B-338-a-S-18	443	-	
	R:CGG TGT GTA CAA GAC CC	S-D-B-518-b-A-17			
原虫 rDNA ITS1 ^[7]	F:AAC AAG GTT TCC GTA GGT	S-D-P-1738-a-S-18	213	-	
	R:ACT TCG CTG CGT TCT TCA	S-D-P-1951-b-A-18			

冯宗慈等^[8]的比色法测定氮氮浓度、王梦芝等^[5]的方法分离原虫和细菌、凯氏定氮法测定原虫及细菌蛋白。

1.7 统计分析 采用 Excel 整理数据和作图、SPSS v11.5 的 One-Way-ANOVA 进行方差分析和 LSD 多重比较。

2 结果

2.1 细菌克隆测序与归组分析 所提取的微生物 DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 在 1.68~1.91 之间,0.7%琼脂糖凝胶电泳检测表明提取的 DNA 片段在 20 kb 以上。

1.2 %琼脂糖凝胶电泳检测细菌 16S rDNA 全序列 PCR 产物约为 1 kb 左右的片段,经克隆测序获得有效序列 14 个 (XHGR1-XHGR14), 并已获 GenBank 登陆号:EU595379-EU595392。综合邻接聚类、Blast 以及序列相似性分析结果,以相似性 90%以上为界 (不包括 90%)将克隆子明确分为 8 组 (表 3),以便下一步分析各组细菌在处理间的变化情况。

表3 细菌克隆的归组分析

组别	克隆号	参照序列	相似性/%	比例/%
1	1,4,7,11	R. bromii YE282 DQ882649.1	94-95	26.7
2	2	R. flavefaciens LP-C14-Adx AF104834.1	96	6.7
3	3,6,8	Rumen bacterium R-7AB239481.1	98	20
4	5	Uncultured bacterium Thompsons46 AY854333.1	96	6.7
5	9,10	Uncultured bacterium T33H60F48 AB270100.1	91-98	13.3
6	12	Roseburia faecalis M6/1 AY804149.1	91	6.7
7	13	Uncultured bacterium Thompsons14 AY854309.1	97	6.7
8	14,15	Uncultured rumen bacterium GRANT42 AY858421.2	96	13.3

的更亮。原虫 SSCP 图谱中共有 20 条清晰可辨的条带,A、B、C 和 D 各组分别为 13、12、12 和 12 条。A、B 和 C 组指纹特征为第 7、13 条带,但 D 组为第 1、4、5 条带。另外,A 和 B 组的第 13 条带较 C 组更亮。表 4 显示,细菌和原虫组间相似指数存在不同程度的差异。总体看来,细菌和原虫群体结构日粮蛋白源影响显著。

2.3 对细菌群体结构的影响 样品 DNA 和测序克隆的 SSCP 条带匹配分析表明,所测克隆的序列基本覆盖了样品图谱的优势条带,可为图谱中条带所

2.2 微生物多样性分析 图 1 表明,细菌 V6-8 和原虫 ITS1 区段的 PCR 产物分别约为预期的 400 bp 和 200 bp 左右的片段。

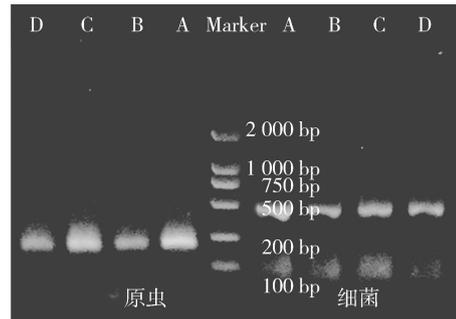


图1 微生物的 PCR 产物

图 2 可见,细菌 SSCP 图谱中共有 18 条清晰可辨的条带,A、B、C 和 D 各组分别为 11、13、13 和 12 条;A 和 D 组的特征条带为第 1、5、16 条带,而 B 组为第 2 条带,C 组为第 7、17 条带;D 组中的第 16 条带相对在 A 组较亮,而 C 组中的第 18 条带比 B 组

代表的菌种定性。另外,克隆 3 和 6 的迁徙率相同,也反映了 SSCP 在分离等长而序列不同的 DNA 片段有一定的局限性。由表 5 可见,除第 1 条所代表的未知种类菌群、Uncultured Thompsons46 和 Uncultured Thompsons14 等类群外,其他类群组间都存在显著或极限著差异。第 1 条带代表的未知菌,以及 R. bromii YE282、R-7 和 Uncultured Thompsons46 等类群变异较小(CV <14.53%),以 Roseburia faecalis M6/1 的 CV 最大为 32.91%。尽管各组菌群组成有明显的差异,但 R. bromii 和 R. flavefaciens 等瘤胃球菌属菌在各

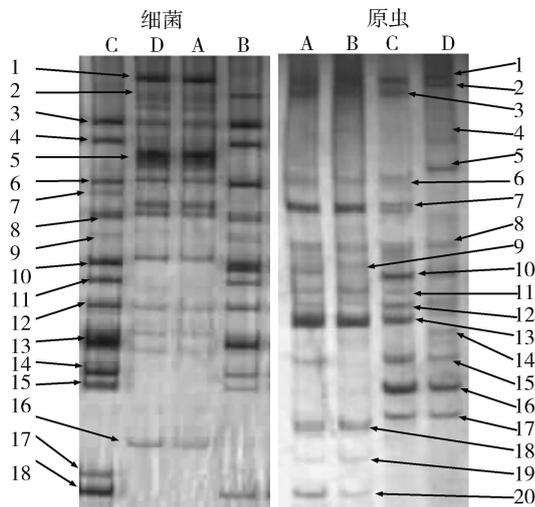


图2 微生物 SSCP 凝胶图谱

表4 相似性指数矩阵

项目	B	C	D
细菌			
A	0.333	0.263	0.917
B		0.733	0.389
C			0.563
原虫			
A	0.733	0.667	0.471
B		0.600	0.263
C			0.412

组菌群中所占比例都相对较高(31.03%~36.35%)。

2.4 对原虫群体结构的影响 表6表明,除双毛亚

科原虫外其他各类群在组间都有显著差异。内毛属以A组最高;C组的前毛属和头毛属都在4组中最低;B组的等毛科显著高于A、C组,与D组无显著差异。尽管各组原虫类群有明显的差异,但内毛属原虫在各组所占比例都相对较高(73.68%~75.87%)。

3 讨论

3.1 对细菌群体的影响 孙云章^[9]克隆测序及 DGGE 分析表明,高精料时牛链球菌和普雷沃氏菌为瘤胃优势群体,分别占总克隆数的 63.4%和 16.8%,表明瘤胃细菌的类群结构与日粮密切相关。本研究也发现,部分细菌类群如 *R. flavefaciens* 等在日粮处理间变化显著;而另一部分类群如 Uncultured T33H60F48 等则相对稳定,与前人的研究较的一致。纤维降解菌及其酶活性对纤维素有一定依赖性,对 pH 也相对敏感,易受到影响。本研究羽毛粉组的 *R. flavefaciens* 类群比例高于其他组,可能与该组 pH 较高有关;同时该组 *Roseburia faecalis* 类群也显著高于其他组,可能由于该菌为乙酸利用菌,与纤维降解菌有交互饲喂关系,而相应性提高所致。淀粉降解菌 *R. bromii* 类群比例在 pH 较低鱼粉组最高,可能与其对高精料、低 pH 的耐受性有关。另外, *R. bromii*、R-7 和 Uncultured Thompsons46 类群的变异较小,可能与它们是常在的主要功能菌有关,如 *R. bromii* 即是一类常见的瘤胃淀粉降解菌;但同样为常在的主要功

表5 蛋白质对细菌群体结构的影响

条带	克隆	A/%	B/%	C/%	D/%	SEM	P	CV(N=16)/%	参比序列	相似度/%	组别
1	-	10.23	10.08	9.20	9.10	0.8548	0.457	12.44	Unknown	-	
2	2 944 bp	14.90 ^C	11.73 ^A	11.68 ^A	10.83 ^A	1.0361	0.010	16.87	<i>R. flavefaciens</i> LP-C14-Adx	96	2
3+4	1 和 11 958/957	21.45 ^{AB}	22.65 ^B	19.35 ^A	25.38 ^C	1.4480	0.010	13.06	<i>R. bromii</i> YE282	95	1
5	3 或 6* 970/941	12.23 ^{AB}	12.93 ^{AB}	11.75 ^A	15.15 ^C	0.7631	0.004	12.73	Rumen R-7	98	3
6	5 950 bp	-	6.30	7.50	-	4.154 ^(F)	0.088	14.53	Uncultured Thompsons46	96	4
7	10 954 bp	8.98 ^C	7.83 ^B	6.15 ^A	6.33 ^A	0.7972	0.012	21.36	Uncultured T33H60F48	98	5
8	12 954 bp	9.80 ^C	5.35 ^A	5.70 ^A	5.15 ^A	0.6436	0.000	32.91	<i>Roseburia</i> <i>faecalis</i> M6/1	91	6
9	13 932 bp	9.78	7.73	9.30	7.63	1.4692	0.384	24.40	Uncultured Thompsons14	97	7
10	14 954 bp	11.45 ^{AB}	14.98 ^D	11.90 ^B	9.90 ^A	0.8103	0.000	17.92	Uncultured GRANT42	96	8
11	-	-	-	5.70 ^A	8.55 ^C	14.926 ^(F)	0.008	25.32	Unknown	-	
Total		98.82	99.58	98.23	98.02						

注:*3号与6号克隆迁徙率相同。数据肩标(F)指前面积数值为方差分析的F值。同行数据肩标相邻字母表示差异显著(P<0.05),相隔字母表示差异极显著(P<0.01)。下表同

表6 蛋白质对原虫群体结构和瘤胃发酵的影响

项目	A	B	C	D	SEM	P
原虫密度/($\times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$)	19.27 ^A	19.60 ^A	22.61 ^B	22.19 ^B	0.4272	0.000
内毛虫/%	75.87 ^B	74.41 ^{AB}	74.25 ^{AB}	73.68 ^A	0.8821	0.029
双毛虫/%	8.03	8.38	8.11	8.33	0.3500	0.712
前毛虫/%	2.94 ^{AB}	3.11 ^B	2.32 ^A	2.81 ^{AB}	0.2933	0.019
头毛虫/%	2.65 ^B	3.12 ^B	2.04 ^A	2.79 ^B	0.2530	0.008
等毛虫/%	6.97 ^A	7.86 ^B	6.95 ^A	7.55 ^{AB}	0.3423	0.052
合计/%	96.45	96.87	93.66	95.14		
pH	6.27 ^B	6.20 ^A	6.27 ^B	6.19 ^A	0.0289	0.000
氨氮浓度/($\text{mg} \cdot 100\text{mL}^{-1}$)	11.08 ^A	12.06 ^A	15.04 ^B	14.28 ^B	0.5447	0.027
细菌蛋白量/($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	5.5312 ^A	5.8509 ^A	7.7086 ^C	6.9389 ^B	0.1734	0.000
原虫蛋白量/($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	5.2348 ^A	5.5106 ^A	6.2652 ^B	6.4963 ^B	0.1530	0.000

能菌的 *R. flavofaciens* 的变异度却较大,可能与其易受到 pH 等多因素影响有关。而 *Roseburia faecalis* 的 CV 最大,可能是该菌与其他菌的交互饲喂关系,使其易受代谢物及 pH 等因素的影响所致。

3.2 对原虫群体的影响 瘤胃原虫具有较大的条件依赖性和环境适应性,研究发现舍饲期到放牧期山羊瘤胃内毛虫占原虫总数由 95% 降至 83%,而密毛虫比例却有所提高。Hristov 等^[10]报道中等精料水平转为高精料水平时, *Entodinium* 从 89% 上升到 91%,中等精料水平存在的其他种属却未能检出。本研究也发现部分种属原虫组间差异显著。其中鱼粉组的 *Isotricha* 比例高于羽毛粉组,可能是由于该属原虫以降解可溶性蛋白为主,并可被可溶性蛋白刺激生长,而据 CNCPS 体系对饲料蛋白质的划分,鱼粉所含的在零时间点可迅速溶解的组分 A 即较高所致。*Entodinium* 在瘤胃蛋白降解中起主要作用,其 *E. caudatum* 和 *E. simplex* 有较高的 deaminase 活性。本研究中鱼粉组氨氮浓度比豆粕组低,其 *Entodinium* 比例低于后者可能就是原因之一;另外 *Isotricha* 属原虫可降低氨氮浓度,该组中该属比例高也是其氨氮浓度低的原因之一。但 Ivan 等^[11]研究表明, *Entodinium* 使青贮玉米氨氮浓度增加,却没有使豆科牧草有显著变化,所以原虫对不同的蛋白质底物的作用不同。本研究中羽毛粉和玉米蛋白粉两种抗性蛋白情况也有所不同,前者 *Entodinium* 比例同样也高于后者,但其氨氮浓度却低于后者,这可能是与其底物蛋白质的特异性有关(本研究所选用的蛋白质饲料其结构与降解性能差异都较大)。这也正说明了微生物与底物间互作所导致的其类群变化和瘤胃 N 代谢的复杂性,而对此尚需进一步开展试验进行研究。

4 组原虫的 SSCP 指纹图谱特征及组间相似性程度有广泛不同,与细胞计数的结果一致地表明原虫群体受到了蛋白质源的影响。但本试验并未对其图谱的条带做类似细菌的克隆测序与扫描分析,仅是通过细胞形态分类计数检测其群体结构组成。与遗传指纹相比,形态分类凸显了 2 个弊端:其一是主观性较强;其二是所分辨的种类较少(细胞计数的 5 个属 & SSCP 的 20 个条带)。因此,下一步应对其指纹图谱进行深入的遗传分析以求建立更为简单、客观而又有效的研究瘤胃原虫的群体结构特征的分子方法。

3.3 原虫与细菌的互作 瘤胃原虫与细菌间形成了捕食者与猎物的捕食关系,使得它们之间相互依存和制约,表现为群体数量的消长变化。部分研究也表明,原虫的部分或完全驱除可使细菌增加甚至 2 倍的量。Nhan 等^[12]报道细菌密度有伴随原虫密度下降而提高的趋势。本研究中豆粕组原虫蛋白量比鱼粉组低,而细菌蛋白量比鱼粉组高,原虫与细菌群体量的消长除了日粮特性的影响外,可能还与其类群间功能或营养上的互作有一定的关系。如 *Entodiniomorphid* 利用乳酸可防止 pH 的下降,而利于纤维素降解菌的生长,而 *Holotrich* 则产生乳酸,不利于纤维素菌发酵。Ghorban 等^[13]报道 *Entodinium* 的显著增加伴随着部分种类细菌如 *Str. bovis*、*Amylolytic bacteria* 等的显著下降。在本研究中羽毛粉组的内毛虫最高,该组 *R. flavofaciens* 类群也显著高于其他 3 组,可能与他们营养生理上的协作有一定的关联。瘤胃微生物类群组成较为复杂,各种日粮条件下其类群间的互作关系更是复杂多变,这在一定程度上影响了对瘤胃微生态营养的有效调控。因而进一步探讨和掌握瘤胃微生物类群间的互作关系和其群体

结构的变化规律, 可为更好地调控瘤胃发酵和微生物蛋白合成提供必要的科学依据。

4 结 论

蛋白质源对瘤胃微生物类群有显著影响, 细菌的 *R.flavofaciens*、*R.bromii*、*R-7*、*Roseburia faecalis*、Uncultured T33H60F48、Uncultured GRANT42 及 1 个尚不能定性的类群在蛋白质处理间差异显著; 原虫的内毛虫、前毛虫、头毛虫、等毛虫在处理间有显著差异。

参考文献:

- [1] Ipharraguerre I R, Clark J H. Impacts of the source and amount of crude protein on the intestinal supply of nitrogen fractions and performance of dairy cows[J]. J Dairy Sci, 2005, 88:E22-E37.
- [2] Zhou J, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(2):316-322.
- [3] Lane D J. 16S/23S rRNA sequencing [M]. // Stackebrandt E, Goodfellow M. eds. NY: John Wiley & Sons: Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics, 1st ed. Chichester, 1991:115-175.
- [4] Ovreas L, Forney L, Daae F L, et al. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelevannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA[J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63:3367-3373.
- [5] 王梦芝, 王洪荣, 曹恒春, 等. 特定氨基酸缺省底物对体外培养混合瘤胃微生物及其发酵的影响 [J]. 中国农业科学, 2008, 41(7):2136-2142.
- [6] Schmalenberger A, Tebbe C C. Bacterial diversity in maize rhizospheres: conclusions on the use of genetic profiles based on PCR-amplified partial small subunit rRNA genes in ecological studies[J]. Mol Ecol, 2003, 12:251-262.
- [7] Carriqo J A, Pinto F R, Simas C, et al. Assessment of band-based similarity coefficients for automatic type and subtype classification of microbial isolates analyzed by pulsed-field gel electrophoresis[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(11):5483-5490.
- [8] 冯宗慈, 高民. 通过比色法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.
- [9] 孙云章. 不同底物下瘤胃微生物发酵特性及细菌菌群变化的分子描述[D]. 南京: 南京农业大学, 2005.
- [10] Hristov A N, Ivan M, Rode L M, et al. Fermentation characteristics and ruminal ciliate protozoal populations in cattle fed medium- or high-concentrate barley-based diets?[J]. J Anim Sci, 2001, 79: 515-524.
- [11] Ivan M, Neill L, Forster R, et al. Effects of Isotricha, Dasytricha, on ruminal fermentation and duodenal in wethers fed different diets[J]. J Dairy Sci, 2000, 83:776-787.
- [12] Nhan N T H, Ngu N T, Thiet N, et al. Determination of the optimum level of a soybean oil drench with respect to the rumen ecosystem, feed intake and digestibility in cattle[J]. Livestock Res Rural Dev, 2007, 19:117.
- [13] Ghorbani G R, Morgavi D P, Beauchemin K A, et al. Effects of bacterial direct-fed microbials on ruminal fermentation, blood variables, and the microbial populations of feedlot cattle[J]. J Anim Sci, 2002, 80:1977-1986.

Effects of Dietary Protein Sources on Bacterial and Protozoal Community Structure in Goat Rumen

WANG Meng-zhi, SHEN Jian-zhao, LIU Ying, DONG Shu-hong, YU Li-huai, WANG Hong-rong*
(College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Jiangsu Yangzhou 225009, China)

Abstract: The objectives of this paper were to investigate the effect of protein sources on rumen microbial population, including bacteria and protozoa. Four goats fitted with rumen cannulas, were used in a 4×4 Latin square design. And formula diets were divided into 4 groups according to their nitrogen sources, which was feather meal (A), corn gluten meal (B), soybean meal (C), and fish meal (D), respectively. The cloning and sequence analysis, SSCP fingerprint, and cell-counting techniques were applied in this study. The results showed that significant differences were found in several kinds of bacteria, such as *R.flavofaciens*, *R.bromii*, *R-7*, *Roseburia faecalis*, Uncultured T33H60F48, Uncultured GRANT42, and an unknown group, and also, there were marked differences in 4 protozoal genera, such as *Entodinium*, *Epidinium*, *Ophryoscolex*, and *Isotrichidae*, among protein sources. In conclusion, the protein sources had important effects on ruminal bacterial and protozoal community structure.

Key words: protein sources; rumen; bacteria; protozoa; community structure; goat