



詹彦波, 张丽, 瞿明仁, 等. 不同 pH 对瘤胃细菌数量和菌群结构的影响[J]. 江西农业大学学报, 2024, 46(1): 184–195.

ZHAN Y B, ZHANG L, QU M R, et al. Effects of different pH on number and community structure of rumen bacteria[J]. Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis, 2024, 46(1): 184–195.

不同 pH 对瘤胃细菌数量和菌群结构的影响

詹彦波¹, 张丽², 瞿明仁¹, 邱清华¹, 李川¹, 张阳¹,
张健¹, 赵向辉¹, 李艳娇¹, 欧阳克蕙^{1*}, 汤小思³

(1. 江西农业大学 江西省动物营养重点实验室, 江西 南昌 330045; 2. 湖南省湘阴县动物疫病预防控制中心, 湖南 岳阳 430600; 3. 江西省抚州市畜牧良种场, 江西 抚州 344106)

摘要:【目的】试验旨在研究瘤胃不同 pH 下瘤胃酸中毒相关细菌数量和瘤胃细菌菌群结构的变化。【方法】选取 5 头干奶期荷斯坦奶牛作为瘤胃液供体, 调节瘤胃液 pH 分别为 6.5、5.8、5.5、5.2 和 5.0。培养 3 h 后, 采用 qPCR 技术测定瘤胃酸中毒相关细菌数量, 采用 16S rDNA 高通量测序技术研究瘤胃细菌菌群结构的变化。【结果】(1)瘤胃 pH 对白色瘤胃球菌(*Ruminococcus ablus*)的相对数量没有影响($P>0.05$), 但显著影响了乳酸产生菌和乳酸利用菌的相对数量($P<0.05$)。其中牛链球菌(*Streptococcus bovis*)相对数量随着 pH 的下降而升高, 在 pH 5.0 处极显著高于其余各组($P<0.05$); 埃氏巨型球菌(*Megasphaera elsdenii*)、反刍兽新月单胞菌(*Selenomonas ruminantium*)及乳酸杆菌(*Lactobacillus species*)随 pH 下降呈现先升高后下降的趋势, pH 分别在 pH 5.5 或 pH 5.2 处达到最大值($P<0.05$); (2) α 多样性结果显示, 瘤胃细菌数量和菌群的丰富度及多样性呈现随瘤胃 pH 下降先升高后下降的趋势, 其中 Chao1 指数在 pH 5.5 处, Observed species 和 Shannon 指数在 pH 5.2 处最高($P<0.05$)。 β 多样性结果显示 pH 6.5、pH 5.8 处理组与 pH 5.2、pH 5.0 处理组的菌群构成有明显差异, pH 5.5 处理组样本与其他 4 组样本距离较远, 其菌群构成与其他 4 组具有差异; (3)在菌群组成上, 瘤胃内主要菌门和属的菌群丰度随 pH 的降低也多有改变。pH 5.2、pH 5.0 处理组和 pH 6.5、pH 5.8 处理组菌群结构有显著差异($P<0.05$)。pH 6.5 组与 pH 5.8 组的菌群组成差异不大($P>0.05$), 仅普雷沃氏菌科 UGG-003 菌属(*Prevotellaceae UCG-003*)和琥珀酸弧菌科 UGG 002 菌属(*Succinivibrionaceae UCG 002*)有差异; pH 5.0 处理组与 pH 5.2 处理组的菌群组成较一致($P>0.05$), 仅在螺旋体门(Spirochaetota)、放线菌门(Actinobacteriota)、瘤胃菌属(*Ruminococcus*)和解琥珀菌属(*Succinivibrionaceae*)有差异($P<0.05$); 而 pH 5.5 处理组的菌群构成与其他 4 组有显著差异($P<0.05$)。【结论】环境 pH 改变是瘤胃细菌遭受的一种严重干扰, 会引起瘤胃内乳酸产生菌和乳酸利用菌的相对数量显著改变。瘤胃细菌数量、菌群丰富度和多样性也随瘤胃 pH 的下降表现出先升高后降低的趋势, 其变化规律符合生态学中的“中度干扰假说”。

关键词:低 pH; 瘤胃酸中毒; 瘤胃细菌; 细菌数量; 菌群结构; “中度干扰假说”

中图分类号: S823.9⁺1 文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

文章编号: 1000-2286(2024)01-0184-12



收稿日期: 2023-11-09 修回日期: 2023-11-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(32160807)和江西省主要学科学术和技术带头人培养计划“领军人才”项目(20213BCJL22043)

Project supported by the National Natural Science Foundation of China(32160807) and The “Leading Talents” Project of the Training Plan for Academic and Technical Leaders in Major Disciplines in Jiangxi Province(20213BCJL22043)

作者简介: 詹彦波, 硕士生, orcid.org/0009-0005-4830-3929, 208440211@qq.com; *通信作者: 欧阳克蕙, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事动物营养与饲料科学研究, orcid.org/0000-0002-3837-9824, ouyangkehui@sina.com。

Effects of different pH on number and community structure of rumen bacteria

ZHAN Yanbo¹, ZHANG Li², QU Minren¹, QIU Qinghua¹, LI Chuan¹, ZHANG Yang¹,
ZHANG Jian¹, ZHAO Xianghui¹, LI Yanjiao¹, OUYANG Kehui^{1*}, TANG Xiao'en³

(1. Jiangxi Key Laboratory of Animal Nutrition, Innovation Team of Nutrition and Feed Safety, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 2. Hu'nan Xiangyin Animal Disease Prevention and Control Center, Yueyang 430600, China; 3. Jiangxi Province Fuzhou City Livestock Breeding Farm, Fuzhou, Jiangxi 344000, China)

Abstract: [Objective] The aim of this experiment is to investigate the changes in the number of rumen acidosis related bacteria and the structure of rumen bacterial communities under different pH in the rumen. [Method] Five Holstein cows at dry milk stage were selected as rumen fluid donors, and the pH of rumen fluid was adjusted to 6.5, 5.8, 5.5, 5.2 and 5.0, respectively. After incubation for three hours, qPCR technology was used to determine the number of bacteria associated with rumen acidosis, and 16S rDNA high-throughput sequencing technology was used to study changes in the structure of rumen microbiota. [Result] (1) Ruminal pH did not affect the relative number of *Ruminococcus albus* ($P>0.05$), it significantly affected the relative numbers of lactic acid producing bacteria and lactic acid utilizing bacteria ($P<0.05$). The relative number of *Streptococcus bovis* increased with the decrease of pH, and it was significantly higher at pH 5.0 than other groups ($P<0.05$); The relative number of *Megaphagea elsdenii*, *Selenomonas ruminantium*, and *Lactobacillus species* showed a trend of first increasing and then decreasing with the decrease of pH, which reached a maximum values at pH 5.5 or 5.2, respectively ($P<0.05$); (2) The results of α diversity analysis of rumen bacterial communities showed that the abundance and diversity of rumen bacteria had a trend of first increasing and then decreasing with the decrease of rumen pH, The Chao1 index at pH 5.5, and the Observed Specifications and Shannon indices at pH 5.2 were the highest ones in all groups ($P<0.05$). The results of β diversity analysis of rumen bacterial communities showed that there were significant differences in the microbial community composition between the pH 6.5, pH 5.8 treatment groups and the pH 5.2, pH 5.0 ones. The distance of pH 5.5 treatment group samples was far away from the other four groups, which meant its microbial community composition was different from the other four groups; (3) In terms of microbial community composition, the abundance of the main bacteria at phylum and genus levels in the rumen also varied with the decrease of rumen pH. There was a significant difference in the microbial community structure between the pH 5.2, 5.0 treatment groups and the pH 6.5, 5.8 treatment groups ($P<0.05$). There was no significant difference in the composition between pH 6.5 group and pH 5.8 group ($P>0.05$), in which only the difference of *Prevotellaceae* UCG-003 and *Succinivibrionaceae* UCG 002 were found; The microbial community structure of the pH 5.0 treatment group and the pH 5.2 treatment group was relatively identical ($P>0.05$), and there were differences only in *Spirochaete*, *Actinomycetota* at phylum level, and in *Ruminococcus* and *Succiniaclasticum* at level of fungi ($P<0.05$); the microbial community composition of the pH 5.5 treatment group showed significant differences compared with the other four groups ($P<0.05$). [Conclusion] In summary, change in environmental pH was a serious disturbance to rumen bacteria, which resulted in significant changes in the relative numbers of lactic acid producing and lactic acid utilizing bacteria in the rumen. The number, richness, and diversity of rumen bacteria also showed a trend of first increasing and then decreasing with the decrease of rumen pH, which conforms to the "Intermediate Disturbance Hypothesis".

Keywords: low pH; ruminal acidosis; rumen bacteria; number of bacteria; community structure; "Intermediate disturbance hypothesis"

【研究意义】稳定的 pH 和瘤胃微生物在瘤胃发酵和瘤胃正常活动中发挥着至关重要的作用^[1~2],也是反刍动物维持正常生理功能的必要保证^[3~4]。瘤胃酸中毒是现代反刍动物生产中的常见疾病,主要发病特征是瘤胃内 pH 下降,瘤胃微生物区系紊乱,瘤胃正常生理功能受损。但瘤胃酸中毒发生时瘤胃 pH 下降与瘤胃微生物区系变化的关系如何,其结果各不相同。【前人研究进展】大多数研究^[5~7]认为,随着饲料中精料水平的提高,瘤胃 pH 降低,瘤胃中微生物菌群多样性和丰富度会显著降低。一些学者^[8~10]发现相反的结果,增加精料水平导致瘤胃 pH 降低时可以提高瘤胃菌群的多样性和丰富度指数,其机制尚未见清楚解释。有生态学理论认为,当某个群落遭到外来干扰时,中等程度的干扰频率能维持群落较高的物种多样性。如果干扰强度过低,少数竞争力强的物种将在群落中取得完全优势;如果干扰强度过高,只有那些生长速度快、侵占能力特强的物种才能生存下来。只有当干扰强度中等时,物种生存的机会才是最多的,群落多样性最高,即中等程度的干扰下能够维持物种的高多样性,称之为“中度干扰假说”^[11]。那么上述现象^[5~10]或许可以解释为不同比例精料下瘤胃 pH 下降程度不同,从而导致对瘤胃微生物的干扰程度不一样,使得人们观察到了不同的结果。课题组前期研究发现,随着瘤胃 pH 的下降,瘤胃微生物的菌群密度、理化特性[如 H⁺-ATPase 活性、胞内 pH(pHi)和细胞跨膜 pH 差(Δ pH)]均呈现先升高再下降的趋势^[12],这些与瘤胃微生物区系的改变有何关系尚不清楚。【本研究切入点】进一步了解不同 pH 下瘤胃微生物区系的动态变化,同时验证“中度干扰假说”与瘤胃微生物多样性的关系。【拟解决的关键问题】本研究拟从群落学角度,采用体外可控试验,通过设计连续变化的低 pH 条件,研究瘤胃 pH 连续变化过程中瘤胃内几个瘤胃酸中毒相关细菌(白色瘤胃球菌、埃氏巨型球菌、反刍兽新月单胞菌、牛链球菌和乳酸杆菌)的数量及瘤胃菌群结构的变化规律,以期理解日粮结构变化这种人为干扰下瘤胃微生物菌群变化的规律,进一步解读瘤胃酸中毒的发生机制提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 试验动物及饲粮

选取江西阳光乳业集团现代牧场的 5 头干奶期荷斯坦奶牛[(41.0±6.36)月龄,3~4 胎]作为瘤胃液供体。采用全混合日粮(TMR)饲喂,饲粮精粗比为 40:60,饲粮组成见表 1。日饲喂 2 次(08:00 和 18:00),保证 5% 左右的剩料量。

表 1 饲粮组成及营养水平
Tab.1 Composition of diets and nutritional level

原料 Ingredients	含量/% Content	营养水平 ¹⁾ Nutritional level	
苜蓿干草 Alfalfa hay	20	产奶净能/(MJ·kg ⁻¹)NE _L	7.31
羊草干草 <i>Leymus chinensis</i> hay	20	粗蛋白/% CP	14.29
酒糟 Distillers grains	10	酸性洗涤纤维/% ADF	15.58
象草 <i>Pennisetum purpureum</i> Schum.	10	中性洗涤纤维/% NDF	37.83
玉米 Corn	23	粗灰分/% Ash	7.15
麦麸 Wheat bran	5	钙/% Ca	0.83
豆粕 Soybean meal	4.5	磷/% P	0.67
棉粕 Cotton meal	3		
菜粕 Rapeseed meal	2.5		
预混料 Premix ¹⁾	2		
合计 Total	100		

1)每千克预混料含有:Cu 2 525 mg,Fe 4 150 mg,Zn 10 025 mg,Mn 4 200 mg,Co 60 mg,Se 100 mg,I 200 mg,VA 1 100 000 IU,VD₃ 360 000 IU,VE 10 000 mg,生物素 200 mg, β -胡萝卜素 300 mg。2)产奶净能为计算值,其余为实测值。

1)One kilogram of premix contained the following: Cu 2 525 mg, Fe 4 150 mg, Zn 10 025 mg, Mn 4 200 mg, Co 60 mg, Se 100 mg, I 200 mg, VA 1 100 000 IU, VD₃ 360 000 IU, VE 10 000 mg, biotin 200 mg, β -carotene 300 mg. 2) NE_L is the calculated value, while the others are the measured values.

1.2 试验设计

试验采用体外法,培养液 pH 分别调节为 6.5、5.8、5.5、5.2、5.0,每个处理 5 个重复。晨饲前采集瘤胃液,混合后使用 4 层纱布对瘤胃液进行过滤除杂,测定瘤胃 pH 值为 6.82,保存于保温瓶中并迅速转运至实验室备用。参考 Menke 等^[13]的方法配制人工唾液,按瘤胃液:人工唾液=1:2 配制混合培养液,39 ℃及饱和 CO₂下保存备用。用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 调节 pH 值为 6.5、5.8、5.5、5.2、5.0,然后往每个发酵瓶加入 0.4 g 底物(风干的干奶期奶牛饲粮)和 60 mL 培养液,通入 CO₂至饱和,并用橡胶塞密封。放入恒温摇床 39 ℃下培养 3 h 后冰浴终止发酵,用于瘤胃细菌的测定。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 瘤胃细菌 DNA 提取

DNA 提取方法采用两步珠磨法^[14]前处理后参照 DNA 试剂盒(D5625-01, Omega Bio-tek 公司)说明书。提取得到的 DNA 样品用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测进行质量检测,检测后,将样品放入-20 ℃保存以备后续试验使用。

1.3.2 瘤胃细菌实时荧光定量 PCR 分析

试验按照试剂盒(AQ601-01-V2,北京全式金生物技术有限公司)使用说明书进行,用 PCR 仪(T100, BIO-RAD 公司)进行检测。基因引物序列见表 2。

表 2 瘤胃细菌实时定量 PCR 基因引物序列
Tab.2 Primers for real-time quantitative PCR of rumen bacteria

引物名称 Synthesized name	引物序列 Synthesized sequence	温度/℃ <i>T_m</i>	产物长度/bp Fragment length	来源 Source
16S rDNA	F:CGGCAACGAGCGCAACCC R:CCATTGTAGCACGTGTGTAGCC	60	130	Denman 等 ^[15]
白色瘤胃球菌 <i>R. albus</i>	F:CCCTAAAAGCAGTCTTAGTTCG R:CCTCCTTGCGGTTAGAACA	53	175	Koike 等 ^[16]
反刍兽新月单胞菌 <i>S. ruminantium</i>	F:CAATAAGCATTCGCGCTGGG R:TTCACTCAATGTCAAGCCCTGG	55	133	Stevenson 等 ^[17]
牛链球菌 <i>S. bovis</i>	F:TTCCTAGAGATAGGAAGTTTCTTCGG R:ATGATGGCAACTACAATAGGGGT	56	128	Stevenson 等 ^[17]
乳酸杆菌 <i>Lactobacillus</i>	F:AGCGAACAGTAGATACCC R:GATGGCATAGATGTCAAGACC	48	233	李颖 ^[18]
埃氏巨型球菌 <i>M. elsdenii</i>	F:GACCGAAACTGCGATGCTAGA R:TCCAGAAAGCCGCTTTCGCCACT	56	129	Fernando 等 ^[19]

每个样本 3 个重复,PCR 扩增采用 20μL 反应体系,体系组成见表 3。PCR 扩增反应程序如下:① 95 ℃预变性 30 s;② 95 ℃变性 5 s,60 ℃退火/延伸 20 s 并采集荧光信号,共 40 个循环;③ 溶解曲线分析,以 20 ℃/s 的速度从 95 ℃降至 65 ℃,再以 20 ℃/s 的速度缓慢加热至 95 ℃,在 95 ℃保持 0 s,在 65 ℃保持 15 s,结束时 4 ℃保存。

表 3 荧光定量 PCR 扩增体系
Tab.3 Realtime PCR reaction system

试剂 Composition	使用量/μL Volume
SYBR® Premix Ex <i>Taq</i> II (Tli RNaseH Plus)(2×)	10.0
PCR 正向引物 Forward primer(10 μmol·L ⁻¹)	0.8
PCR 反向引物 Reverse primer(10 μmol·L ⁻¹)	0.8
DNA 模板 Template(<100 ng) ^{*2}	2.0
ddH ₂ O(灭菌蒸馏水 Sterilized distilled water)	6.4
总计 Total	20.0

计算方法:目的基因相对定量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算,以瘤胃液总细菌(general bacteria, GB)DNA作为内参基因,用对照组的基因进行校正。荧光定量PCR基因相对表达量表示成目的基因占GB的百分比。 ΔCt 值表示某样品目的基因临界循环数(Ct)与内参基因 Ct 值的差值,而 $\Delta\Delta Ct$ 值表示试验组样品平均 ΔCt 与对照组平均 ΔCt 的差值。

1.3.3 瘤胃细菌高通量检测

对提取好的DNA样品进行细菌高通量测序以分析其菌群结构和多样性的变化,16S rDNA基因V3-V4高变区域所用引物序列为338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')和806R(5'-GGACTACNNGGTATCTAAT-3')。本试验测序数据处理和生物学信分析由北京奥维森基因科技有限公司在Illumina Miseq PE300平台上进行,通过高通量测序,以16S rDNA序列大于97%的相似度为标准,使用Mothur 1.31.2软件进行 α 多样性分析。基于Weighted Unifrac距离,使用R(v3.1.1)软件包的pheatmap进行聚类分析。经过OTU聚类分析,分析主成分和主坐标,使用UniFrac算法利用系统进化的信息来比较样品间物种群落差异,并进行 β 多样性分析。评估瘤胃细菌多样性和检测样本在门、属两水平上的群落结构。

1.4 数据统计与分析

试验数据用Excel 2016初步整理后,采用SPSS 24.0统计分析软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA),并使用Duncan's法进行多重比较检验,以 $P<0.05$ 为差异显著性判断标准。对pH和检测出的瘤胃细菌进行Pearson相关性分析,以 $P<0.05$ 为差异显著判断标准。

2 结果与分析

2.1 不同pH对几种瘤胃酸中毒相关细菌数量的影响

白色瘤胃球菌是瘤胃内主要的纤维降解菌,埃氏巨型球菌和反刍兽新月单胞菌是瘤胃内主要的乳酸利用菌,牛链球菌和乳酸杆菌是瘤胃内主要的乳酸产生菌,它们都和瘤胃酸中毒的发生密切相关。几种瘤胃酸中毒相关细菌的qPCR结果见图1。由图1可见,瘤胃内主要纤维降解菌白色瘤胃球菌受瘤胃pH的影响不大($P>0.05$),但主要乳酸利用菌(埃氏巨型球菌、反刍兽新月单胞菌)和乳酸产生菌(牛链球菌、乳酸杆菌)的相对数量均随pH下降而有显著变化($P<0.05$)。埃氏巨型球菌、反刍兽新月单胞菌和乳酸杆菌相对数量随着瘤胃pH的下降先升高后降低,其中埃氏巨型球菌在pH 5.5处达到最高($P<0.05$),反刍兽新月单胞菌、乳酸杆菌在pH 5.2处达到最高($P<0.05$)。而牛链球菌随着瘤胃pH的下降逐渐升高,在pH 5.0处显著高于pH 6.5和pH 5.8处($P<0.05$)。

2.2 不同pH对瘤胃细菌多样性及菌群结构的影响

2.2.1 不同pH对瘤胃细菌 α 多样性的影响

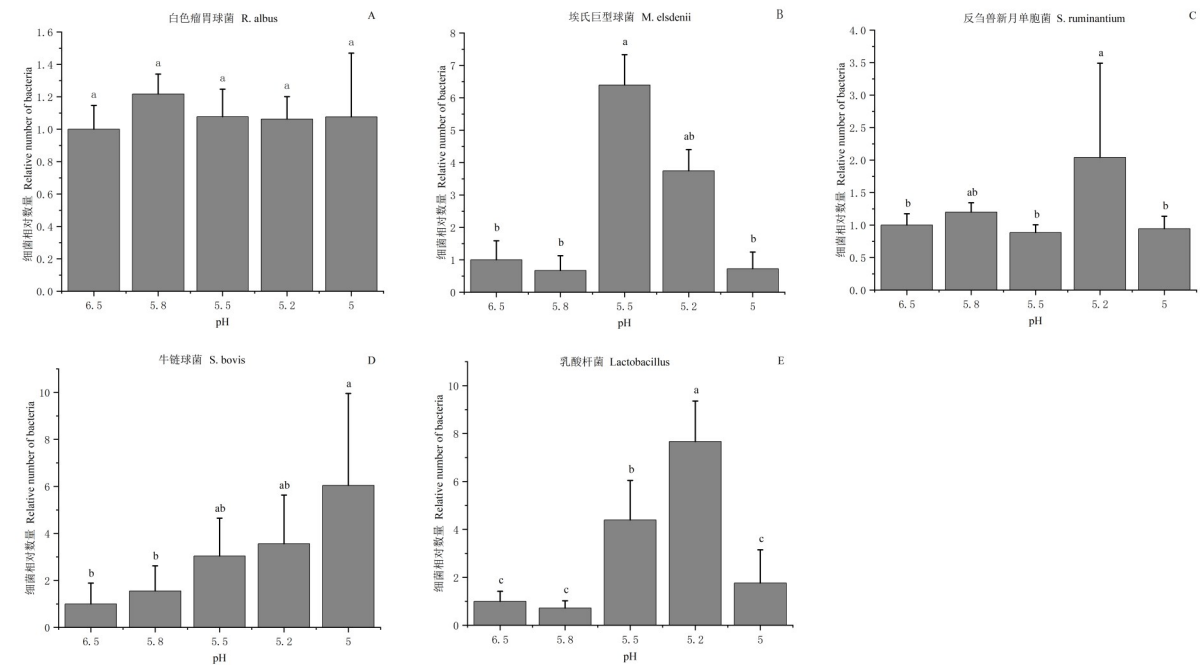
由表4可知,各组高通量测序的样品覆盖度均达到97%以上,表明测序深度优良,能够反映瘤胃细菌的种类及结构。瘤胃细菌Observed species指数随pH的降低先升高后降低,且在pH 5.2时物种数目最多,pH 6.5与pH 5.2之间差异显著($P<0.05$)。Chao1指数由大到小依次为pH 5.5、pH 5.2、pH 5.0、pH 5.8和pH 6.5,其中pH 6.5与pH 5.5、pH 5.2之间差异显著($P<0.05$)。Shannon指数随pH的降低先升高后降低,在pH 5.2时达到最大值,pH 6.5和pH 5.8之间无差异($P>0.05$),pH 6.5、pH 5.8与pH 5.2之间差异显著($P<0.05$)。Simpson指数各组之间无差异($P>0.05$)。

2.2.2 不同pH对瘤胃细菌 β 多样性的影响

由图2可知,主成分I(PC I)和主成分II(PC II)的贡献值分别为34.45%($P<0.05$)和8.12%($P>0.05$)。pH 6.5处理组样本与pH 5.8处理组样本相互聚集,表明其菌群构成无明显差异;pH 5.0处理组样本pH 5.2处理组样本相互聚集,同样表明其菌群构成无明显差异;而pH 5.5处理组样本与其他4组样本距离较远,表明其菌群构成与其他4组具有差异。

2.2.3 不同pH对瘤胃细菌门水平组成影响分析

通过高通量测序技术对连续变化的pH下瘤胃细菌16SrDNA基因V3-V4高变区域进行测定。检测出门水平下相对丰度较高的前10个菌见表5。由表5可知,干奶期奶牛在不同pH下的优势菌门均为拟杆菌门(Bacteroidota)和厚壁菌门(Firmicutes)。拟杆菌门的菌群丰度随pH的不断降低而减小。厚壁菌门、疣微菌门(Verrucomicrobiota)、螺旋体门(Spirochaetota)、放线菌门(Actinobacteriota)菌群相对丰度随



A:白色瘤胃球菌;B:埃氏巨型球菌;C:反刍兽新月单胞菌;D:牛链球菌;E:乳酸杆菌。数据柱形标注不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),相同小写字母表示差异不显著($P>0.05$)。

A: *Ruminococcus ablus*; B: *Megasphaera elsdenii*; C: *Selenomonas ruminantium*; D: *Streptococcus bovis*; E: *Lactobacillus* species. Value columns with different small letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$), while with the same small letter superscripts mean no significant difference ($P>0.05$).

图1 不同pH对瘤胃细菌相对数量的影响
Fig.1 Effects of different pH on rumen bacterial number

表4 不同pH对瘤胃细菌α多样性指数的影响
Tab.4 Effects of different pH on rumen bacterial α diversity index

分类 Taxon	pH 6.5	pH 5.8	pH 5.5	pH 5.2	pH 5.0	标准误 SEM	P值 P-value
Coverage	0.978 6	0.978 2	0.977 4	0.977 8	0.978 2	0.000 2	0.207
Observed species	2 067.94 ^{bc}	2 037.00 ^c	2 159.76 ^{ab}	2 172.76 ^a	2 083.98 ^{abc}	16.632	0.022
Chao1	2 745.57 ^c	2 795.80 ^{bc}	2 945.91 ^a	2 903.66 ^{ab}	2 850.13 ^{abc}	21.864	0.014
PD wholetree	127.10	126.47	130.72	133.13	129.86	0.871	0.082
Simpson	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.000 2	0.066
Shannon	8.57 ^b	8.54 ^b	8.70 ^{ab}	8.85 ^a	8.74 ^{ab}	0.036 5	0.034

同行数据肩标不同字母表示差异显著($P<0.05$),相同字母表示差异不显著($P>0.05$)。
Values in the same row with different letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$), while with the same letter superscripts mean no significant difference ($P>0.05$).

pH的降低而升高。变形菌门(Proteobacteria)菌群丰度随pH的降低先上升后降低。髌骨细菌门(Patesci-bacteria)、脱硫杆菌门(Desulfobacterota)随pH的降低而先降低后升高。蓝藻门(Cyanobacteria)和纤维杆菌门(Fibrobacterota)菌群相对丰度在不同pH各组间均无显著差异($P>0.05$)。由表5可见,pH 6.5处理组与pH 5.8处理组各菌门丰度没有显著差异($P>0.05$);而pH 5.5处理组的大多数菌门的丰度与pH 6.5处理组和pH 5.8处理组有显著差异($P<0.05$);pH 5.2处理组同样与pH 6.5处理组和pH 5.8处理组的菌群结构有显著差异($P<0.05$),但与pH 5.5处理组仅在Patescibacteria和疣微菌门有显著差异($P<0.05$),其他均与pH 5.5处理组无显著差异($P>0.05$);pH 5.0处理组与pH 5.2处理组仅在螺旋体门和放线菌门有差异($P<0.05$),其他均与pH 5.2处理组无显著差异($P>0.05$)。

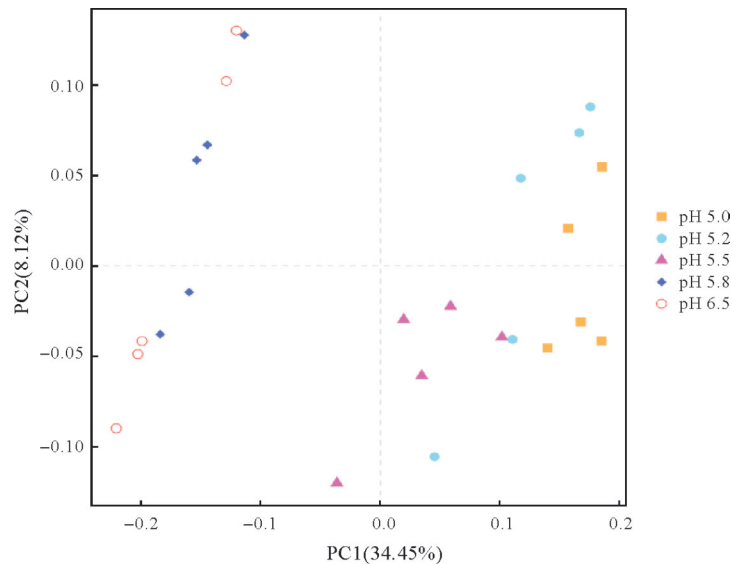


图2 不同pH对瘤胃细菌β多样性指数的影响
Fig.2 Effects of different pH on rumen bacteria β diversity index

表 5 不同 pH 对门水平上瘤胃菌群丰度的影响

Tab.5 Effect of different pH on the abundance of rumen microflora at the phylum level							
分类 Taxon	pH 6.5	pH 5.8	pH 5.5	pH 5.2	pH 5.0	标准误 SEM	P 值 P-value
Bacteroidota 拟杆菌门	82.51 ^a	80.79 ^{ab}	76.20 ^{bc}	72.52 ^{cd}	70.30 ^d	0.011 8	<0.001
Firmicutes 厚壁菌门	12.45 ^c	14.01 ^c	18.74 ^b	21.56 ^{ab}	23.20 ^a	0.010 3	<0.001
Proteobacteria 变形菌门	2.26 ^a	2.61 ^a	1.34 ^b	1.46 ^b	1.43 ^b	0.001 3	<0.001
Patescibacteria 骸骨细菌门	1.28 ^{cd}	1.10 ^d	1.59 ^{bc}	1.96 ^a	1.90 ^{ab}	0.000 8	<0.001
Verrucomicrobiota 疣微菌门	0.47 ^b	0.45 ^b	0.57 ^b	0.89 ^a	0.97 ^a	0.000 5	<0.001
Spirochaetota 螺旋体门	0.24 ^c	0.26 ^c	0.49 ^b	0.57 ^b	0.88 ^a	0.000 5	<0.001
Cyanobacteria 蓝藻门	0.21	0.23	0.27	0.26	0.26	0.000 1	0.419
Fibrobacterota 纤维杆菌门	0.25	0.24	0.25	0.18	0.17	0.000 1	0.103
Actinobacteriota 放线菌门	0.10 ^c	0.13 ^{bc}	0.28 ^b	0.29 ^b	0.57 ^a	0.000 4	<0.001
Desulfobacterota 脱硫杆菌门	0.14 ^{ab}	0.11 ^b	0.15 ^{ab}	0.21 ^a	0.19 ^a	0.000 1	0.028

同行数据肩标不同字母表示差异显著($P<0.05$),相同字母表示差异不显著($P>0.05$)

Values in the same row with different letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$), while with the same letter superscripts mean no significant difference ($P>0.05$).

2.2.4 不同 pH 对瘤胃细菌属水平组成影响分析

本试验检测出相对丰度大于 1% 的瘤胃细菌菌属有 13 个,其中普雷沃氏菌属(*Prevotella*)占绝对优势地位(表 6)。由表 6 可知,普雷沃氏菌属(*Prevotella*)、普雷沃氏菌科 UCG-003 菌属(*Prevotellaceae* UCG-003)随 pH 的降低而降低;*uncultured_rumen_bacterium* 菌属、解琥珀菌属(*Succiniclasticum*)、*Candidatus Saccharimonas* 菌属菌群丰度随 pH 的降低而升高。普雷沃氏菌科 UCG-001 菌属(*Prevotellaceae* UCG-001)、瘤胃菌属(*Ruminococcus*)相对丰度随 pH 的降低而先降低后升高;理研菌科 RC9 菌属(*Rikenellaceae* RC9 gut group)、琥珀酸弧菌科 UCG 002 菌属(*Succinivibrionaceae* UCG 002)、克里斯藤森菌属 R7(*Christensenellaceae* R7 group)相对丰度随 pH 的升高而先升高后降低。由表 6 可知,属水平上,pH 6.5 处理组与 pH 5.8 处理组的菌群结构非常相似,13 个属中仅普雷沃氏菌科 UCG-003 菌属和琥珀酸弧菌科 UCG 002 菌属有显著差异($P<0.05$);pH 5.2 处理组与 pH 5.0 处理组菌群结构更为接近,仅在瘤胃菌属有差异($P<0.05$);但 pH 5.2、pH 5.0 处理组和 pH 6.5、pH 5.8 处理组菌群结构有显著差异($P<0.05$),仅在理研菌科 RC9 菌属和普雷沃氏菌科 UCG-001 菌属上没有差异($P>0.05$);而 pH 5.5 处理组的菌群结构与 pH 5.2、pH 5.0 处理组和 pH 6.5、pH 5.8 处理组均有差异,但其中有部分菌属和 pH 6.5、pH 5.8 组的组成相似($P>0.05$),部分菌属和 pH 5.2、pH 5.0 组相似($P>0.05$)。

表 6 不同 pH 对属水平上瘤胃菌群丰度的影响
Tab.6 Effects of different pH on the abundance of rumen microflora at the genus level

分类 Taxon	pH 6.5	pH 5.8	pH 5.5	pH 5.2	pH 5.0	标准误 SEM	P 值 P-value
普雷沃氏菌属 <i>Prevotella</i>	64.62 ^a	62.75 ^a	59.07 ^{ab}	52.20 ^{bc}	51.24 ^c	0.014 7	0.001
未培养瘤胃杆菌属 <i>Uncultured rumen bacterium</i>	4.32 ^b	4.55 ^{ab}	4.47 ^b	5.83 ^a	5.78 ^a	0.002 2	0.036
理研菌科 RC9 菌属 <i>Rikenellaceae</i> RC9 gut group	3.61	3.87	3.75	4.96	4.53	0.001 8	0.072
普雷沃氏菌科 UGG-003 菌属 <i>Prevotellaceae</i> UCG-003	3.82 ^a	3.39 ^b	2.10 ^c	1.93 ^{cd}	1.57 ^d	0.001 9	<0.001
普雷沃氏菌科 UGG-001 菌属 <i>Prevotellaceae</i> UCG-001	2.50 ^{bc}	2.31 ^b	2.77 ^{ab}	2.82 ^{ab}	2.89 ^a	0.000 6	0.007
琥珀酸弧菌科 UGG 002 菌属 <i>Succinivibrionaceae</i> UCG 002	0.96 ^b	1.33 ^a	0.40 ^c	0.41 ^c	0.34 ^c	0.000 8	<0.001
瘤胃菌属 <i>Ruminococcus</i>	0.79 ^c	0.76 ^c	1.39 ^b	1.40 ^b	1.75 ^a	0.000 9	<0.001
解琥珀菌属 <i>Succiniclasticum</i>	1.04 ^d	1.31 ^{cd}	2.22 ^{bc}	2.52 ^b	4.02 ^a	0.002 6	<0.001
克里斯藤森菌属 R7 群 <i>Christensenellaceae</i> R7 group	0.56 ^b	0.60 ^b	1.10 ^a	1.02 ^a	1.003 ^a	0.000 6	<0.001
<i>Candidatus saccharimonas</i>	0.42 ^c	0.41 ^c	0.82 ^b	1.27 ^a	1.49 ^a	0.001 0	<0.001

同行数据肩标不同字母表示差异显著($P<0.05$),相同字母表示差异不显著($P>0.05$)。

Values in the same row with different letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$), while with the same letter superscripts mean no significant difference ($P>0.05$).

3 讨 论

3.1 不同 pH 对几种瘤胃酸中毒相关细菌数量的影响

瘤胃环境发生改变会导致瘤胃内某些特定细菌数量发生变化^[20],其中瘤胃 pH 对瘤胃细菌的生长和繁殖有巨大影响,在调节瘤胃微生物动态平衡中发挥关键作用。当瘤胃 pH 降至 6.0 以下时,首先发现原虫大量减少,纤维降解菌又对瘤胃 pH 的变化特别敏感^[21],所以大部分纤维降解菌包括产琥珀酸丝状杆菌、瘤胃球菌和溶纤维丁酸弧菌都有明显降低^[22-23];当 pH 下降到 5.5 时,大部分微生物的生长受到抑制,但埃氏巨球菌和反刍兽新月单胞菌依旧能维持生长甚至含量有所提高^[24],但利用乳酸的能力下降^[25]。牛链球菌成为瘤胃中的优势菌群,导致瘤胃内乳酸积累,引发更严重的瘤胃酸中毒^[26-28]。当瘤胃 pH 降到 5.0 以下时,大部分微生物不能存活,大量革兰氏阴性菌凋亡裂解^[29],瘤胃菌群结构多样性急剧减少,但乳酸杆菌因其较强的酸耐受力而能大量增殖^[23],并成为瘤胃绝对优势菌群,其代谢产物乳酸大量积累,引发急性瘤胃酸中毒^[30]。在本研究中,纤维降解菌白色瘤胃球菌随 pH 的降低变化不大,这与大多数研究结果不同。说明影响白色瘤胃球菌的因素可能更多的是因为纤维含量的改变^[8,31],而不是直接由瘤胃 pH 的变化引起的。本试验中牛链球菌随 pH 的降低而升高,这和前人的研究^[32]相吻合;但埃氏巨型球菌、反刍兽新月单胞菌和乳酸杆菌随 pH 的降低先升高后降低,分别在 pH 为 5.5 和 5.2 时数量最多,这可能与它们自身的适应性及耐酸性(乳酸利用菌埃氏巨球菌和反刍兽新月单胞菌最适生长 pH 均为 6.0~6.5^[33],而其耐受酸度的 pH 阈值分别为 5.6 和 5.4^[34];乳酸杆菌最适生长 pH 值为 4~6,最低能耐受的 pH 为 3.0^[35])相符。

3.2 不同 pH 对瘤胃细菌菌群多样性的影响

大多数研究^[5-7,36-37]发现,瘤胃酸中毒发生时,瘤胃菌群的多样性及丰富度伴随着 pH 降低而下降,Shannon 指数、Chao1 指数均降低。而 Ogata 等^[38]和 Wang 等^[39]研究表明,饲料能量水平提高或者发生酸中毒

后,能显著降低丰富度指数,对多样性指数没影响。还有一些学者发现相反的结果,增加精料水平提高了瘤胃菌群的多样性和丰富度指数^[8-10],其机制尚未清楚。在本研究中,随pH的降低,瘤胃菌群丰富度和多样性都呈先升高后降低的趋势,分别在pH 5.5和pH 5.2处达到最高,这与前人的研究均不同。

生态学研究表明,不同强度的干扰会对群落多样性产生巨大影响^[11]。闫海冰等^[40]发现,与未干扰地相比,随干扰强度加大,干扰样地土壤微生物多样性指数不断提高。项珍龙^[41]发现,水环境因子以及河流底质类型对着生藻类、底栖动物和鱼类的Shanon指数的影响大多呈现单峰曲线。Sommer等^[42]通过对改变营养液的浓度,发现当营养液浓度达到一个中等程度时,海洋浮游植物的Shanon指数达到最大;Major等^[43]发现将干扰强度设定在范围0%~100%时,干扰强度达到30%左右时,加拿大北部的维管束植物的多样性达到一个最大值。

本研究中,瘤胃菌群丰富度及多样性均随着pH的降低呈现先升后降的趋势,分别在pH 5.5或pH 5.2处达到最高,说明瘤胃微生物群落多样性和丰富度对瘤胃环境pH干扰的响应也符合“中度干扰假说”。这与瘤胃酸中毒发生的规律也基本符合。

3.3 不同pH对瘤胃细菌菌群结构的影响

瘤胃微生物群落结构对反刍动物的健康起着关键的调节作用^[44-45]。瘤胃细菌是瘤胃中最主要的微生物群,而厚壁菌门和拟杆菌门被确定为瘤胃核心微生物群^[46]。研究^[38,47-50]表明,与对照日粮相比,诱导奶牛亚急性瘤胃酸中毒的日粮显著降低了瘤胃pH值,增加了厚壁菌门和放线菌门的比例,并降低了拟杆菌门和变形菌门的相对丰度。拟杆菌门中的普雷沃氏菌属是瘤胃优势菌属,能与其他细菌起到协同作用,促进蛋白质、淀粉和多糖的降解^[46]。琥珀酸弧菌属在牛瘤胃中最早被发现,它的主要作用是发酵糊精。解琥珀酸菌属可以分解琥珀酸并转化为丙酸。有研究^[47,50]表明,高精料日粮下,瘤胃区系中普雷沃氏菌属相对丰度较低,而琥珀酸菌属相对丰度较高。Peteri等^[36]研究通过16S rDNA探究酸中毒对瘤胃微生物的影响发现酸中毒下螺旋体属丰富度增加,随pH的降低,氨基酸瘤胃球菌相对丰度升高,琥珀酸菌属相对丰度降低。

本研究结果与上述研究结果不尽相同,说明酸中毒造成的瘤胃微生物的组成结构变化有部分原因是由于不断降低的pH造成的,也可能有日粮蛋白质、纤维含量改变等^[51-52]其他原因。同时本研究在不同pH下检测到荷斯坦奶牛瘤胃中大量与未分类和未培养的属相关的细菌,表明荷斯坦奶牛可能具有更多样化的瘤胃微生物组,并且在不同品种间表现出很大的差异^[39,53]。另外,本研究结果还显示,pH 6.5处理组与pH 5.8处理组在菌群结构上极相似(仅普雷沃氏菌科 UGG-003 菌属和琥珀酸弧菌科 UGG 002 菌属有差异);pH 5.0处理组与pH 5.2处理组的菌群结构较一致(仅在螺旋体门、放线菌门、瘤胃菌属和解琥珀酸菌属有差异);而pH 5.5处理组的菌群结构不同于其他4组。 β 多样性结果也验证了这一结果。

4 结 论

瘤胃pH由6.5下降到5.0时,白色瘤胃球菌的数量变化不大,牛链球菌随pH的降低而升高。埃氏巨型球菌、反刍兽新月单胞菌和乳酸杆菌相对数量随着瘤胃pH的下降先升高后降低,在pH 5.5或pH 5.2处达到最高。

随着pH的降低,瘤胃细菌数量、菌群丰富度和多样性先升高后降低,分别在pH 5.5或pH 5.2处达到最高,变化趋势符合“中度干扰假说”。瘤胃细菌菌群结构随pH的下降发生改变,其中pH 6.0、pH 5.8处理组与pH 5.2、pH 5.0处理组显著地属于两个不同的群落,pH 5.5处理组则居于中间过渡群落。

致谢:中央引导地方科技发展资金(20221ZDF03017)、国家现代农业产业技术体系(CARS-37)和江西省牛羊产业技术体系(JXARS-13)同时对本研究给予了资助,谨致谢意!

参考文献 References:

- [1] 司丽炜,韩红燕.牛羊瘤胃微生物多样性及其影响因素[J].中国饲料,2020(21):8-14.
SI L W, HAN H Y. Rumen microbial diversity of cattle and sheep and its influencing factors[J]. China feed, 2020(21):8-14.
- [2] 聂春桃,尚相龙,杨梓曼,等.不同水平葛根素对肉牛瘤胃体外发酵指标及养分降解率的影响[J].江西农业大学学报,2021,43(6):1381-1387.

- NIE C T, SHANG X L, YANG Z M, et al. Effects of puerarian at different levels on rumen fermentation indices and nutrient degradability of beef cattle in vitro[J]. *Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis*, 2021, 43(6): 1381-1387.
- [3] FLINT H J, BAYER E A, RINCON M T, et al. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis[J]. *Nature reviews microbiology*, 2008, 6(2): 121-131.
- [4] DEUSCH S, CAMARINHA S A, CONRAD J, et al. A structural and functional elucidation of the rumen microbiome influenced by various diets and microenvironments[J]. *Frontiers in microbiology*, 2017, 8: 1605.
- [5] 李蒋伟, 周力, 马博研, 等. 饲料非纤维性碳水化合物/中性洗涤纤维对藏羊瘤胃发酵参数及菌群结构的影响[J]. *四川农业大学学报*, 2022, 40(2): 253-259.
- LI J W, ZHOU L, MA Y B, et al. Effects of dietary non fibrous carbohydrates/neutral detergent fibers on rumen fermentation parameters and microbial community structure in Tibetan sheep[J]. *Journal of Sichuan agricultural university*, 2022, 40(2): 253-259.
- [6] 李岚捷, 成述儒, 刁其玉, 等. 不同NFC/NDF水平饲料对犊牛瘤胃发酵参数和微生物区系多样性的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2017, 48(12): 2347-2357.
- LI L J, CHENG S R, DIAO Q Y, et al. Effects of different NFC/NDF levels on rumen fermentation parameters and microbial diversity in calves[J]. *Acta veterinaria et zootechnica Sinica*, 2017, 48(12): 2347-2357.
- [7] MAO S Y, ZHANG R Y, WANG D S, et al. Impact of subacute ruminal acidosis (SARA) adaptation on rumen microbiota in dairy cattle using pyrosequencing[J]. *Anaerobe*, 2013, 24: 12-19.
- [8] 徐琴. 饲料和品种对山羊瘤胃微生物多样性的影响[D]. 雅安: 四川农业大学, 2015.
- XU Q. The impact of ration and goat breeds on the composition and the relative abundance of microbial species in goat rumen [D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2015.
- [9] 韩旭峰. 日龄、日粮精粗比对陕北白绒山羊瘤胃微生物区系影响的研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2015.
- HUANG X F. Effects of age and dietary forage-to-concentrateratios on rumen microbial flora of the Shanbei White-cashmere Goat[D]. Xianyang: Northwest A&F University, 2015.
- [10] 韦玥瑞. 日粮类型对内蒙古绒山羊瘤胃甲烷产生及微生物多样性影响的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2020.
- WEI Y R. Effects of diet types on rumen methane production and microbial diversity in Inner Mongolia Cashmere Goats[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2020.
- [11] CONNELL J H. Diversity in tropical rain forests and coral reefs[J]. *Science*, 1978, 199(4335): 1302-1310.
- [12] 张丽, 李川, 邱清华, 等. 不同pH下瘤胃微生物菌群密度及理化特性的变化[J]. *动物营养学报*, 2023, 35(1): 450-459.
- ZHANG L, LI C, QIU Q H, et al. Changes of rumen microbial population density and physicochemical properties at different pH[J]. *Chinese journal of animal nutrition*, 2023, 35(1): 450-459.
- [13] MENKE K H, RAAB L, SALEWSKI A, et al. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro[J]. *The journal of agricultural science*, 1979, 93(1): 217-222.
- [14] PAZ H A, ANDERSON C L, MULLER M J, et al. Rumen bacterial community composition in holstein and jersey cows is different under same dietary condition and is not affected by sampling method[J]. *Frontiers in microbiology*, 2016, 7: 1206.
- [15] DENMAN S, MCSWEENEY C. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen[J]. *FEMS microbiology ecology*, 2006, 58(3): 572-582.
- [16] KOIKE S, KOBAYASHI Y. Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*[J]. *FEMS microbiology letters*, 2001, 204(2): 361-366.
- [17] STEVENSON D, WEIMER P. 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.
- [18] 李颖. 猴头菇多糖缓解山羊亚急性瘤胃酸中毒效果及作用机理[D]. 福州: 福建农林大学, 2019.
- LI Y. Effect and mechanism of *Hericium erinaceus* polysaccharides in alleviating subacute rumen acidosis in goats[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2019.
- [19] FERNANDO S, PURVIS H T, NAJAR F, et al. Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet[J]. *Applied and environmental microbiology*, 2010, 76(22): 7482-7490.
- [20] MICKDAM E, KHIAOSA A R, METZLER Z B-U, et al. Rumen microbial abundance and fermentation profile during severe

- subacute ruminal acidosis and its modulation by plant derived alkaloids in vitro[J].Anaerobe,2016,39:4-13.
- [21] JOUANY J.Optimizing rumen functions in the close-up transition period and early lactation to drive dry matter intake and energy balance in cows[J].Animal reproduction science,2006,96(3/4):250-264.
- [22] OGUNADE I,PECH C A,SCHWEICKART H.Metatranscriptomic analysis of sub-acute ruminal acidosis in beef cattle[J].Animals,2019,9(5):232.
- [23] PETRI R,SCHWAIGER T,PENNER G,et al.Characterization of the core rumen microbiome in cattle during transition from forage to concentrate as well as during and after an acidotic challenge[J].PLoS one,2013,8(12):83424.
- [24] 刘烨彤.慢性酸中毒对瘤胃发酵功能及瘤胃微生物数量变化的影响[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2009.
- LIU Y T.Effects of chronic acidosis on rumen fermentation function and rumen microbial abundance[D].Hohhot:Inner Mongolia Agricultural University,2019.
- [25] CHEN L,SHEN Y,WANG C,et al.*Megasphaera elsdenii* lactate degradation pattern shifts in rumen acidosis models[J].Frontiers microbiology,2019,10:162.
- [26] MATTHEWS C,CRISPIE F,LEWIS E,et al.The rumen microbiome:a crucial consideration when optimising milk and meat production and nitrogen utilisation efficiency[J].Gut microbes,2019,10(2):115-132.
- [27] PLAIZIER J C,LI S C,DANSCHER A M,et al.Changes in microbiota in rumen digesta and feces due to a grain-based sub-acute ruminal acidosis(SARA)challenge[J].Microbial ecology,2017,74(2):485-495.
- [28] CHIBISA G E,BEAUCHEMIN K A,KOENIG K M,et al.Optimum roughage proportion in barley-based feedlot cattle diets: total tract nutrient digestibility,rumination,ruminal acidosis,short-chain fatty absorption,and gastrointestinal tract barrier function[J].Journal of animal science,2020,98(6):1-14.
- [29] 李冲,石凤霞.奶牛瘤胃酸中毒机制及其营养调控措施的研究进展[J].中国饲料,2016(3):5-8.
- LI C,SHI F X.Research progress on mechanism of rumen acidosis and nutritional regulation measures in dairy cows[J].China feed,2016(3):5-8.
- [30] CAMMACK K M,AUSTIN K J,LAMBERSON W R,et al.Ruminant nutrition symposium:tiny but mighty:the role of the rumen microbes in livestock production[J].Journal of animal science,2018,96(2):752-770.
- [31] PETRI R M,FORSTER R J,YANG W,et al.Characterization of rumen bacterial diversity and fermentation parameters in concentrate fed cattle with and without forage[J].Journal of applied microbiology,2012,112(6):1152-1162.
- [32] 陈伟,欧阳克蕙,熊小文.牛链球菌与反刍动物瘤胃酸中毒关系的研究进展[J].黑龙江畜牧兽医,2016(9):80-83.
- CHEN W,OUYANG K H,XIONG X W,et al.Research progress on the relationship between *Streptococcus bovis* and rumen acidosis in ruminants[J].Heilongjiang animal science and veterinary medicine,2016(9):80-83.
- [33] ASANUMA N,HINO T.Molecular characterization,enzyme properties and transcriptional regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase and pyruvate kinase in a ruminal bacterium,*Selenomonas ruminantium*[J].Microbiology,2001,147(3):681-690.
- [34] 陈连民.山羊瘤胃中主要乳酸代谢菌代谢机制及其调控瘤胃酸中毒的应用研究[D].扬州:扬州大学,2017.
- CHEN L M.An application study on the metabolic mechanism of major lactic acid metabolizing bacteria in the rumen of goats and their regulation of rumen acidosis[D].Yangzhou:Yangzhou University,2017.
- [35] 向微微.羊源乳酸杆菌分离及对小鼠结肠炎保护作用的研究[D].乌鲁木齐:新疆农业大学,2022.
- XIANG W W.Isolation of lactobacillus from sheep and its protective effect on colitis in mouse[D].Urumqi:Xinjiang Agricultural University,2022.
- [36] PETRI R M,POURAZAD P,KHIAOSA A R,et al.Temporal dynamics of in-situ fiber-adherent bacterial community under ruminal acidotic conditions determined by 16S rRNA gene profiling[J].PLoS One,2017,12(8):e182271.
- [37] PLAIZIER J C,DANSCHER A M,AZEVEDO P A,et al.A grain-based SARA challenge affects the composition of epimural and mucosa-associated bacterial communities throughout the digestive tract of dairy cows[J].Animals,2021,11(6):1658.
- [38] OGATA T,MAKINO H,ISHIZUKA N,et al.Long-term high-grain diet altered the ruminal pH,fermentation,and composition and functions of the rumen bacterial community,leading to enhanced lactic acid production in Japanese black beef cattle during fattening[J].PLoS one,2019,14(11):e225448.
- [39] WANG Q,ZENG Y,ZENG X,et al.Effects of dietary energy levels on rumen fermentation,gastrointestinal tract histology,and bacterial community diversity in fattening male Hu lambs[J].Frontiers in microbiology,2021,12:2437.
- [40] 闫海冰,李璟,陈颂,等.不同干扰强度对华北落叶松-云杉混交林土壤细菌群落组成及多样性的影响[J].山西农业大

- 学学报(自然科学版),2022,42(4):85-95.
- YAN H B, LI J, CHEN S, et al. Effects of different interference intensities on the composition and diversity of soil bacterial communities in North China Larch spruce mixed forest[J]. Journal of Shanxi agricultural university(nature science edition), 2022, 42(4): 85-95.
- [41] 项珍龙. 在浑太河流域水生态系统检验中度干扰假说[D]. 大连: 大连海洋大学, 2017.
- XIANG Z L. Test of the intermediate disturbance hypothesis in the Huntai River Basin water ecosystem[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2017.
- [42] SOMMER U. An experimental test of the intermediate disturbance hypothesis using cultures of marine phytoplankton[J]. Limnology and oceanography, 1995, 40(7): 1271-1277.
- [43] MAYOR S J, CAHILL J J F, HE F, et al. Regional boreal biodiversity peaks at intermediate human disturbance[J]. Nature communications, 2012, 3(10): 1142.
- [44] ZEBELI Q, METZLER-ZEBELI B U. Interplay between rumen digestive disorders and diet-induced inflammation in dairy cattle[J]. Research in veterinary science, 2012, 93(3): 1099-1108.
- [45] ZHANG R, LIU J, JIANG L, et al. The remodeling effects of high-concentrate diets on microbial composition and function in the hindgut of dairy cows[J]. Frontiers in nutrition, 2022(8): 809406.
- [46] 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(1): 14567.
- [47] MAO S Y, ZHANG R Y, WANG D S, et al. Impact of subacute ruminal acidosis (SARA) adaptation on rumen microbiota in dairy cattle using pyrosequencing[J]. Anaerobe, 2013, 24: 12-19.
- [48] PLAIZIER J C, LI S, Danscher A M, et al. Changes in microbiota in rumen digesta and feces due to a grain-based subacute ruminal acidosis (SARA) challenge[J]. Microbial ecology, 2017, 74(2): 485-495.
- [49] CHEN Y, PENNER G, LI M, et al. Changes in bacterial diversity associated with epithelial tissue in the beef cow rumen during the transition to a high-grain diet[J]. Applied and environmental microbiology, 2011, 77(16): 5770-5781.
- [50] NAGATA R, KIM Y, OHKUBO A, et al. Effects of repeated subacute ruminal acidosis challenges on the adaptation of the rumen bacterial community in Holstein bulls[J]. Journal of dairy science, 2018, 101(5): 4424-4436.
- [51] 杨磊, 赵启南, 李长青, 等. 不同能量水平日粮对舍饲戈壁短尾羊妊娠母羊血清生化指标和瘤胃微生物区系的影响[J]. 饲料研究, 2023, 46(14): 5-10.
- YANG L, ZHAO Q N, LI C Q, et al. Effects of diets with different energy levels on serum biochemical indicators and rumen microbial flora of pregnant goats fed in shed with Gobi Short Tail Sheep[J]. Feed research, 2023, 46(14): 5-10.
- [52] 李毓敏, 聂洪辛, 庞凯悦, 等. 牦牛日粮精粗比转换对瘤胃微生物菌群的影响[J]. 饲料研究, 2023, 46(20): 7-12.
- LI Y M, NIE H X, PANG K Y, et al. The effect of conversion of yak dietary concentrate to crude ratio on rumen microbiota[J]. Feed research, 2023, 46(20): 7-12.
- [53] WANG Y, CAO P, 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.