



日粮中添加不同比例微贮棉秆对湖羊瘤胃微生物区系的影响

李与琦^{1,2}, 阳建华¹, 张涛², 孙新文¹, 王新峰^{1*}, 毛胜勇², 成艳芬^{2*}, 朱伟云²

¹石河子大学动物科技学院, 新疆 石河子 832003

²南京农业大学消化道微生物研究室, 江苏 南京 210095

摘要:【目的】本试验旨在利用 16S rDNA 高通量测序技术研究不同比例微贮棉秆的添加对断奶湖羊瘤胃微生物区系的影响。【方法】选择日龄相近、体重相似的湖羊 30 只, 根据日粮中微贮棉秆的含量随机分为 3 组: 对照组(S0)、50%微贮棉秆组(S50)和 100%微贮棉秆组(S100), 每组随机屠宰 6 只分析生长性能, 并取瘤胃液进行瘤胃发酵参数和微生物区系分析。【结果】饲喂 50%微贮棉秆能够显著提高湖羊日增重和屠宰率($P<0.05$)。Bacteroidetes 和 Firmicutes 是湖羊瘤胃的优势菌门, Prevotella 和 Unclassified Bacteroidales 是湖羊瘤胃的优势菌属。日粮中添加 100%微贮棉秆可以显著降低湖羊瘤胃菌群的多样性($P<0.05$); 显著降低 Unclassified Bacteroidales 和 BF311 的相对丰度($P<0.05$)。三条代谢通路甜菜素生物合成、吲哚生物碱生物合成和加压素调节水的重吸收随着微贮棉秆比例升高而显著增加($P<0.05$)。【结论】饲喂 50%微贮棉秆在提高日增重的同时对湖羊瘤胃微生物菌群结构与功能影响较小。在生产实践中, 微贮秸秆添加量应低于 50%。

关键词: 微贮棉秆, 断奶湖羊, 微生物区系

我国棉花的栽种已有悠久的历史, 新疆地区作为中国的三大产棉区之一, 棉花种植面积达到 3700 多万亩, 占全国棉花种植面积的 80%^[1]。大面积的棉花种植为新疆本土带来了极其丰富的棉秆资源, 其年产量约占秸秆总量的三分之一, 位居新疆农作物秸秆产量之首^[2]。但棉花秸秆因其半纤维素含量低、木质素和游离棉酚含量高等特点

很难被饲料化利用^[3-4], 大量秸秆被农户在田间地头焚烧或丢弃, 这既会占用大量农村土地、影响环境卫生, 还会成为火灾隐患。因此, 这就造成了一个两难的局面: 一方面新疆各地畜牧业发展正在面临饲草料供应不足的难题, 另一方面每年棉花收获后产生的大量棉秆不能得到充分合理的利用, 如何更科学、合理有效地利用棉花秸秆资

基金项目: 国家自然科学基金(31360558); 动物消化道营养国际联合研究中心开放课题; 江苏省“一带一路”技术合作项目(BZ2018055)

*通信作者。Tel: +86-993-2058077; E-mail: 王新峰, wxf-4@163.com; 成艳芬, yanfencheng@njau.edu.cn

收稿日期: 2019-10-02; 修回日期: 2019-12-02; 网络出版日期: 2019-12-27

源变得越来越重要。

使用微生物处理棉秆是一种理想的棉秆利用途径,棉花秸秆的微贮只需要添加少量高效的微生物活性菌种,用量少、成本低,且微贮制作过程简单,制作季节长,可常年使用^[5-7]。陈柯等^[8]以风干秸秆和发酵秸秆饲喂山羊,结果表明微生物发酵秸秆能够提高山羊的生产性能,并能提高山羊的免疫功能。李建臻等^[9]研究微贮水稻秸秆的营养价值及其对麻羊消化率、采食量的影响,结果表明微贮秸秆质地柔软湿润、适口性好,饲喂微贮秸秆后麻羊的采食量及增重均有提高。刘家平等^[10]使用不同处理的棉花秸秆饲喂小尾寒羊,结果表明以微贮棉花秸秆为主要日粮的试验组的日增重、经济效益均显著高于对照组。为进一步挖掘棉秆的饲用价值,为棉秆的微贮发酵提供合适的条件依据,本试验选用早期断奶湖羊为试验动物,使用不同比例微贮发酵棉秆饲喂湖羊并分析其瘤胃微生物区系的变化,探究发酵棉秆对湖羊瘤胃菌群的影响,为微贮棉秆在畜牧业中的合理使用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验设计与试验动物

试验于2017年4月20日至2017年7月1日在新疆生产建设兵团农六师新湖总场晨旺养殖专业合作社进行,试验采用单因子随机试验设计的方法,随机选择试验组和对照组,选用50-60日龄体质健康、体重相似(16-18 kg)的公湖羊30只,分为3组,每组10只。分别饲喂3种添加不同微贮棉秆比例的混合粗饲料,即S0组:饲喂100%青干草;S50组:饲喂50%青干草+50%微贮棉秆;S100组:饲喂100%微贮棉秆。

1.2 试验日粮与饲养管理

试验中所用棉花秸秆通过自动采棉机打碎,采取切断揉软的方式改变棉花秸秆的结构,使其便于与微贮制剂充分接触,每段秸秆长度约为3 cm。微贮棉秆配方:棉花秆和甜菜渣比例为7:3(干物质基础),添加0.2%菌液、0.2%尿素和0.05%食盐,使混合体系水分含量保持在65%-70%,青贮窖密封混合发酵90 d。试验中采用的复合菌剂(植物发酵复合菌剂,新疆石大德润生物科技公司)主要由枯草芽孢杆菌(3.4×10^5 CFU/mL)、酵母菌(9.7×10^9 CFU/mL)、乳酸菌(6.4×10^9 CFU/mL)等菌种复合而成。各组基础日粮营养水平见表1。

试验羊在条件一致的圈舍内饲管,采用全舍饲饲养管理。7 d 预饲,预饲期内进行分组编号、圈舍清理和疫病防治。试验羊采用分栏饲喂的方式,每天早晚饲喂2次(09:30、19:30),先粗后精,在饲喂同等精料补充料(表2)的条件下,饲喂微贮棉秆混合料,试验羊自由采食粗饲料并自由饮水,每次饲喂前清理料槽中剩余的饲草,称重并记录。试验开始和结束连续2 d 早晨空腹称重,计算日增重,用以分析生长性能。120日龄时,每组随机选取6只进行屠宰并采集瘤胃液, -20 °C 保存以备DNA提取,并分析瘤胃发酵参数。

表1. 基础日粮营养水平(干物质基础)

Table 1. Composition and nutrient levels of the basal diet (DM basis)

Items	Treatments		
	S0	S50	S100
Metabolic energy/%	12.77	12.86	12.56
CP/%	6.18	7.59	8.89
NDF/%	46.95	59.51	70.22
ADF/%	31.95	46.22	61.12
Ca/%	0.41	0.42	0.43
P/%	0.24	0.26	0.29

S0: 100% dried hay; S50: 50% dried hay + 50% fermented cotton stalk; S100: 100% fermented cotton stalk.

表 2. 精料补充料配方及营养水平(%)

Table 2. Concentrate supplement formula and nutritional levels

Items	Levels	Nutrient content	Levels
Corn	56.00	CP	19.60
Wheat bran	17.50	CF	10.38
Soybean meal	12.50	Ash	15.83
Cottonseed meal	10.90	Ca	1.26
CaHPO ₄	1.00	P	0.53
Stone powder	1.00	NaCl	1.05
Salt	0.10	Energy	37.05
Trace element	1.00		
Total	100.00		

1.3 测定项目及方法

pH 值采用 pH211 型台式酸度计(HANNA instruments, 意大利)直接测定。

参照 Weatherburn 的方法^[11]测定氨态氮(苯酚-次氯酸钠比色法)和乳酸(对羟基联苯比色法)。配制苯酚溶液和次氯酸钠溶液用于氨态氮测定, 1000 mL 苯酚溶液含有 C₅H₄FeN₆Na₂O₃ 50 mg, 结晶苯酚 9.9757 g; 1000 mL 次氯酸钠溶液含有 NaOH 5 g, Na₂HPO₄·7H₂O 38 g, 次氯酸钠溶液 50 mL。测定时将 1 mL 待测样品加入 4 mL 0.2 mol/L HCl 溶液中混匀, 加入 2.5 mL 苯酚试剂和 2.5 mL 次氯酸钠溶液摇匀, 60 °C 水浴 10 min。反应结束后冷却, 在 560 nm 波长测定 OD 值, 样品中 NH₄Cl 浓度利用标准曲线得出。配制标准乳酸溶液、20% 硫酸铜溶液、对-羟基联苯试剂和 5% 氢氧化钠溶液用于乳酸测定。1000 mL 标准乳酸溶液含有乳酸钙 1.730 g; 100 mL 20% 硫酸铜溶液含有硫酸铜 20 g; 100 mL 对-羟基联苯试剂含有对-羟基联苯 1.5 g, 5% NaOH 溶液 20 mL。测定时在 1 mL 发酵饲料浸提液中加入一滴硫酸铜溶液、6 mL 浓硫酸, 100 °C 水浴 5 min, 冷却后加入 0.2 mL 对-羟基联苯试剂, 30 °C 水浴 30 min,

冷却后在 560 nm 波长测定 OD 值。

参照 Makkar 的方法^[12]利用考马斯亮蓝测定瘤胃中的微生物蛋白。1000 mL 考马斯亮蓝溶液含有考马斯亮蓝 G250 100 mg, 85% 磷酸溶液 100 mL, 过滤后使用。测定时将样品解冻离心后弃上清, 将底物加入 0.5 mL NaOH, 水浴、离心后取上清加入考马斯亮蓝, 在 595 nm 波长测定 OD 值。

1.4 总 DNA 提取

参照 Zoetendal^[13]的方法对 DNA 进行提取。解冻的瘤胃液涡旋后在 4 °C 条件下 10000×g 离心 15 min, 弃上清, 将沉淀物转移至锆珠管中, 加入 CTAB 缓冲液之后利用珠磨法对细胞进行破壁处理, 然后利用酚-氯仿-异戊醇(DNA 提取液)对总基因组 DNA 进行抽提。DNA 样品质量采用 Nanodrop 2000(Thermo Fisher Scientific, Madison, Wisconsin, 美国)可见分光光度仪进行检测, 样品质量合格的标准为: 吸光值 OD_{260/280} 在 1.80 至 2.00 之间。

1.5 湖羊瘤胃液的高通量分析

瘤胃液完成 DNA 提取并确定质量合格后, 利用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检验。按指定测序区域(V3+V4 区), 合成带有 barcode 的特异引物。PCR 扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶进行电泳检验, 使用 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒 (AXYGEN Corporation, 美国)回收 PCR 扩增产物。将 PCR 产物用 QuantiFluor™-ST 荧光定量系统(Promega Corporation, 美国)进行定量检测, 然后使用 Illumina Miseq 测序平台对样品进行测序。

测序原始数据经 QIIME(version 1.9)进行序列拼接与质量过滤, 删除小于 250 bp 的序列, 去除序列尾部质量值小于 20 的碱基, 拼接时两条序列 overlap 长度大于 10 bp。使用 UCHIME 对过滤后的序列进行 OTU(Operational Taxonomic Units)聚

类, 将相似性达到 97% 及以上的序列归为同一 OTU。在此基础上, 利用 QIIME(version 1.9) 进行 α 多样性和 β 多样性分析, 并利用 Greengene 数据库 (version 13.8) 进行分类信息注释。在 Galaxy(<http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>) 进行 LEfSe 分析及菌群功能预测^[14]。测序原始数据提交至 SRA 数据库, 登录号为 SRP149061。

1.6 数据处理与分析

数据通过 Excel2016 初步整理后, 采用 IBM SPSS Statistics 20.0 软件(IBM Corp, 美国)进行统计分析, 利用单因素 ANOVA 中的 Duncan 法比较羔羊生长性能和瘤胃发酵参数的差异, 利用非参数 Kruskal-Wallis 秩和检验比较湖羊瘤胃微生物菌群的差异, 使用 GraphPad Prism 7 软件(GraphPad Software, 美国)处理分析过的数据。置信区间为 95%, 其中 $P < 0.1$ 为有上升或下降趋势, $P < 0.05$ 为差异显著。数据以平均值 \pm 标准误的形式表示。

2 结果和分析

2.1 饲喂微贮棉秆对湖羊生长性能的影响

饲喂不同比例微贮棉秆对湖羊生长性能的影响结果见表 3。由表 3 可知, 三组间日增重差异显著($P < 0.05$), 其中 S50 组最高, 为 56.6 ± 18.3 g/d, 比 S100 组提高了 21.38%。S50 组屠宰率最高, S100 组最低, 三组间存在显著差异($P < 0.05$), 且 S50 组屠宰率比 S100 组提高了 6.03%。采食量和料重比的结果随着饲料中微贮棉秆比例的增加而增加, 三者从低到高分别是 S0 组、S50 组和 S100 组, 三组间存在显著差异($P < 0.05$)。

2.2 饲喂微贮棉秆对湖羊瘤胃发酵参数的影响

由表 4 可以看出, 三组间氨态氮和微生物蛋白浓度无显著差异($P > 0.05$), 乳酸浓度随饲料中微贮棉秆比例的增加而增加, 且三组间差异显著($P < 0.05$)。pH 值随饲料中微贮棉秆比例的增加而显著降低($P < 0.05$)。

表 3. 微贮棉秆对湖羊生长性能的影响

Table 3. Effects of fermented cotton stalk on growth performance of lambs

Items	Treatments			P-value
	S0	S50	S100	
Original weight/kg	16.21 \pm 2.7	17.51 \pm 1.9	17.43 \pm 1.6	0.393
Final weight/kg	19.32 \pm 2.7	20.43 \pm 2.1	20.11 \pm 1.9	0.801
Daily body weight gain/(g/d)	51.93 \pm 17.8 ^b	56.62 \pm 18.3 ^a	44.51 \pm 16.2 ^c	< 0.001
Slaughter rate/%	41.51 \pm 0.5 ^b	43.14 \pm 0.7 ^a	40.52 \pm 0.2 ^c	< 0.001
Feed intake/kg	0.62 ^c	0.91 ^b	1.04 ^a	< 0.001
F/G	11.87 ^c	16.04 ^b	23.57 ^a	< 0.001

S0: 100% green hay; S50: 50% green hay + 50% fermented cotton stalk; S100: 100% fermented cotton stalk. ^{a,b,c} Significant differences, $P < 0.05$.

表 4. 微贮棉秆对湖羊瘤胃发酵参数的影响

Table 4. Effects of fermented cotton stalk on rumen fermentation parameters of lambs

Items	Treatments			P-value
	S0	S50	S100	
NH ₃ -N/(μ g/mL)	0.12 \pm 0.02	0.14 \pm 0.03	0.12 \pm 0.07	0.219
Lactate/(μ g/mL)	0.20 \pm 0.03 ^c	0.56 \pm 0.03 ^b	1.14 \pm 0.07 ^a	< 0.001
pH value	6.52 \pm 0.22 ^a	6.42 \pm 0.11 ^b	6.22 \pm 0.14 ^c	< 0.001
Microbial crude protein/(μ g/mL)	11.86 \pm 0.67	11.99 \pm 0.62	11.69 \pm 0.48	0.937

S0: 100% green hay; S50: 50% green hay + 50% fermented cotton stalk; S100: 100% fermented cotton stalk. ^{a,b,c} Significant differences, $P < 0.05$.

2.3 饲喂微贮棉秆对湖羊瘤胃菌群多样性的影响

去掉低质量序列后,得到 656564 条高质量序列, S0、S50 和 S100 组的有效序列分别为 37807 ± 1928 、 32815 ± 3408 和 38806 ± 2399 条。

不同比例微贮棉秆对瘤胃菌群 α 多样性的影响见表 5。由表 5 可知, S0 组与 S50 组 OTU 数量、Chao1 指数及 Shannon 指数均显著高于 S100 组 ($P < 0.05$)。

主坐标分析结果显示 S0 组和 S50 组比较接近, 两组间差异较小, 但 S100 组与 S0 组和 S50 组之间距离较远, 说明差异较大(图 1)。

2.4 饲喂微贮棉秆对湖羊瘤胃菌群组成的影响

通过图 2-A 可以看出, *Bacteroidetes* 和 *Firmicutes* 是组成湖羊瘤胃微生物门水平的主要菌群, 两者之和占湖羊瘤胃微生物总菌的 87.35%–89.34%。*Bacteroidetes* 是断奶湖羊瘤胃内门水平上的第一大菌群, 平均相对丰度为 64.64%; *Firmicutes* 排在第二位, 平均丰度为 23.60%。添加微贮棉秆对瘤胃菌群门水平没有显著影响 ($P > 0.05$)。

表 5. 微贮棉秆对湖羊瘤胃菌群多样性和丰度的影响
Table 5. Effects of fermented cotton stalk on rumen bacterial diversity and abundance of lambs

Items	Treatments			P-value
	S0	S50	S100	
Number of OTU	1039.00 ± 19.53^a	1056.00 ± 24.85^a	950.00 ± 13.17^b	0.004
Coverage /%	99.54 ± 0.02	99.53 ± 0.03	99.50 ± 0.01	0.491
Chao1 index	1105.26 ± 16.49^a	1130.32 ± 17.00^a	1032.00 ± 15.43^b	0.002
Shannon index	8.40 ± 0.13^a	8.62 ± 0.09^a	8.06 ± 0.10^b	0.006

S0: 100% green hay; S50: 50% green hay + 50% fermented cotton stalk; S100: 100% fermented cotton stalk. ^{a,b} Significant differences, $P < 0.05$.

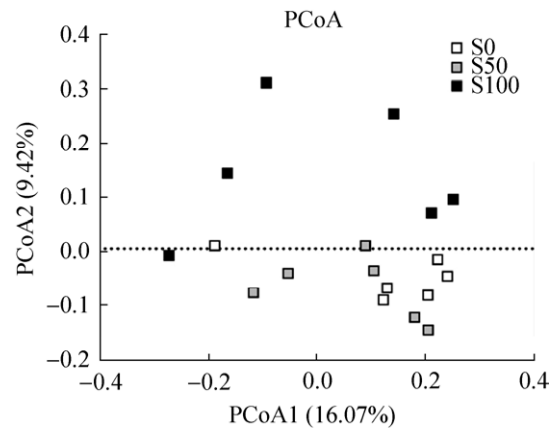


图 1. 微贮棉秆对湖羊瘤胃菌群影响的 PCoA 分析

Figure 1. PCoA analysis of rumen microbiota of lambs. S0: 100% green hay; S50: 50% green hay + 50% fermented cotton stalk; S100: 100% fermented cotton stalk.

图 2-B 为饲喂不同比例微贮棉秆后瘤胃菌群在属水平上的变化, 共有 20 个属相对丰度大于 1%。其中 *Prevotella* 和 *Unclassified Bacteroidales* 是组成湖羊瘤胃微生物属水平的主要菌群, 两者之和占湖羊瘤胃微生物的 50.04%–55.59%。*Prevotella* 是湖羊瘤胃属水平上的第一大类菌群, 平均丰度为 30.63%; *Unclassified Bacteroidales* 排在第二位, 平均丰度为 21.34%。

2.5 饲喂微贮棉秆对湖羊瘤胃菌群组成差异的影响

LEfSe 分析湖羊日粮中添加不同比例微贮棉秆后微生物菌群的差异如图 3-A 所示。LDA 值超过 2.0 的差异物种有 23 个, 其中 8 个物种的 LDA 效应在 S0 组相对较高, 6 个物种的 LDA 效应在 S50 组相对较高, 9 个物种的 LDA 效应在 S100 组相对较高。23 个物种在进化分支中的种属关系如图 3-B 所示。

将三组中 LDA 值超过 4.0 的物种 *Unclassified Bacteroidales*、*BF311* 和 *Bacteroidaceae* 的相对丰

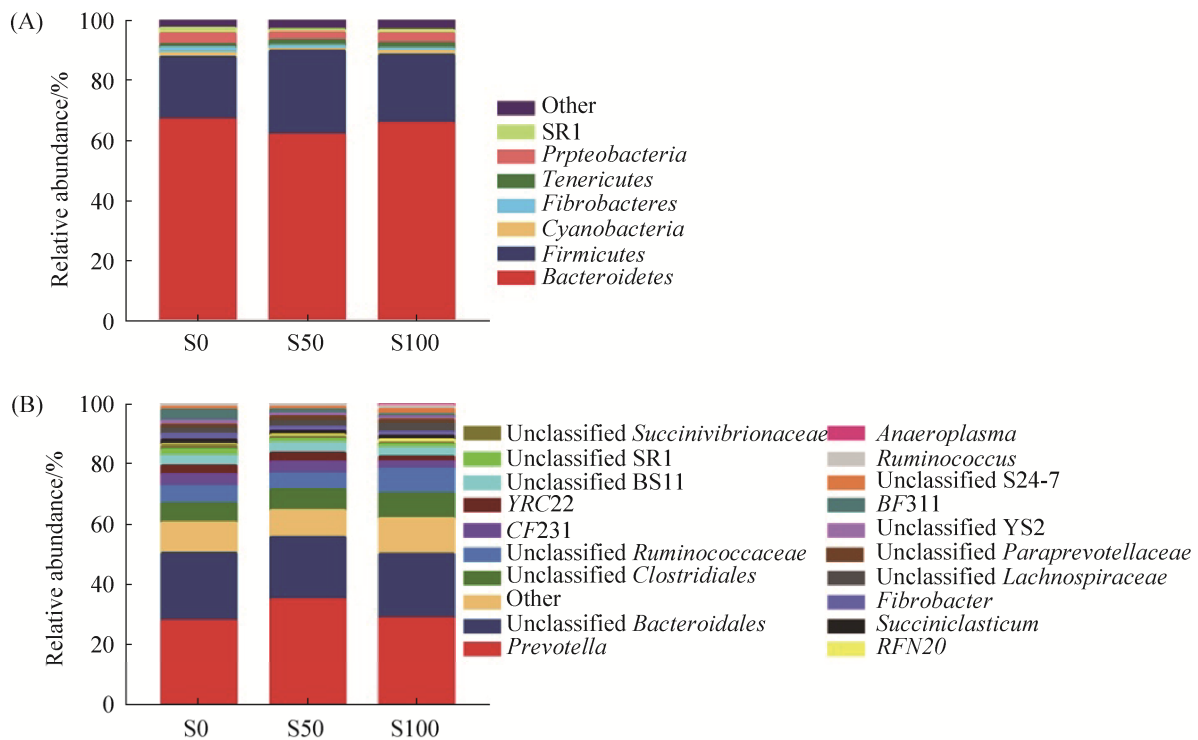


图 2. 微贮棉秆对湖羊瘤胃微生物在门水平和属水平上的影响

Figure 2. Composition of rumen microbiota at the level of phylum and genus in lambs. S0: 100% green hay; S50: 50% green hay + 50% fermented cotton stalk; S100: 100% fermented cotton stalk.

度做单独分析, 结果见图 4。图中实线代表各样品对应 OTU 的相对丰度平均值, 虚线代表各样品对应 OTU 的相对丰度中位数。

2.6 微贮棉秆对湖羊瘤胃微生物代谢功能的影响

微贮棉秆对湖羊瘤胃微生物代谢显著影响的十条 KEGG 通路见图 5-A, 其中 Betalain biosynthesis (图 5-B)、Indole alkaloid biosynthesis (图 5-C)和 Vasopressin-regulated water reabsorption (图 5-D)三条通路随着微贮棉秆比例升高而显著增加($P<0.05$)。

3 讨论

不同结构组成的饲料具有不同的适口性及营养水平, 其不仅影响反刍动物的采食量, 还会影

响反刍动物对饲料的消化利用效果, 进而影响反刍动物的生长性能^[15]。本研究中随着微贮棉秆在饲料中比例的增加, 湖羊的采食量也随之增加。饲喂青干草和微贮棉秆各一半时, 湖羊的日增重和屠宰率显著高于其他两组, 这说明适当添加微贮棉秆可以在提高湖羊采食量的同时提高湖羊的日增重及屠宰率。高飞(2011)^[16]使用微生态制剂处理过的玉米秸秆饲喂白绒山羊, 发现饲喂加入微生态制剂的饲料能够显著提高肉羊的育肥性能。郑爱荣等^[17]研究微贮小麦秸秆对杜寒杂交羊生产性能的影响, 结果表明微贮小麦秸秆能够提高杜寒杂交羊的日增重, 具有较好的经济效益, 这与本试验结果一致。

瘤胃中的氨态氮来自于饲料中蛋白质与尿素

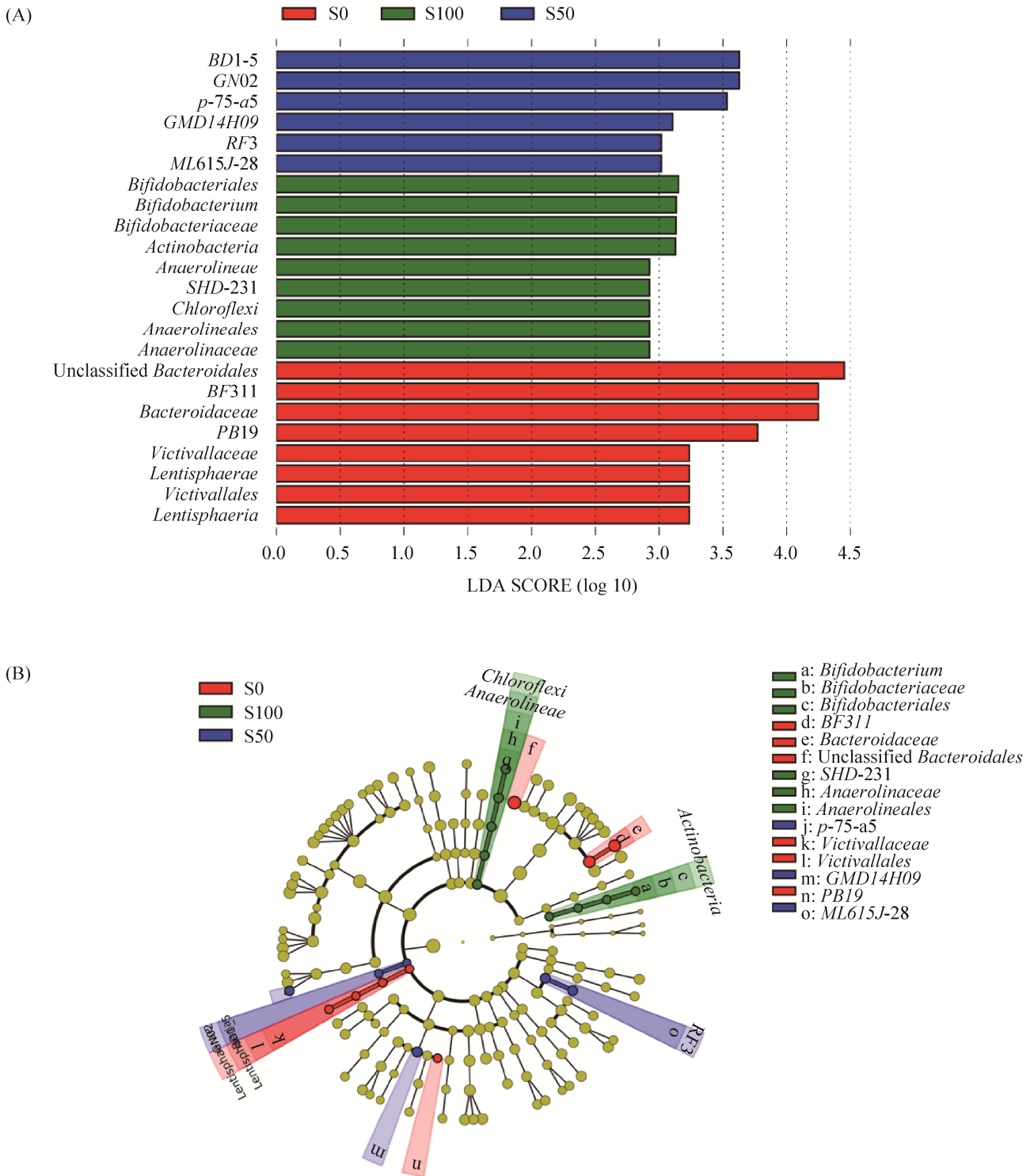


图 3. LEfSe 分析微贮棉秆对湖羊瘤胃菌群的影响

Figure 3. LEfSe analysis of rumen microbiota in Hu sheep fed with fermented cotton stalk. S0: 100% green hay; S50: 50% green hay+50% fermented cotton stalk; S100: 100% fermented cotton stalk.

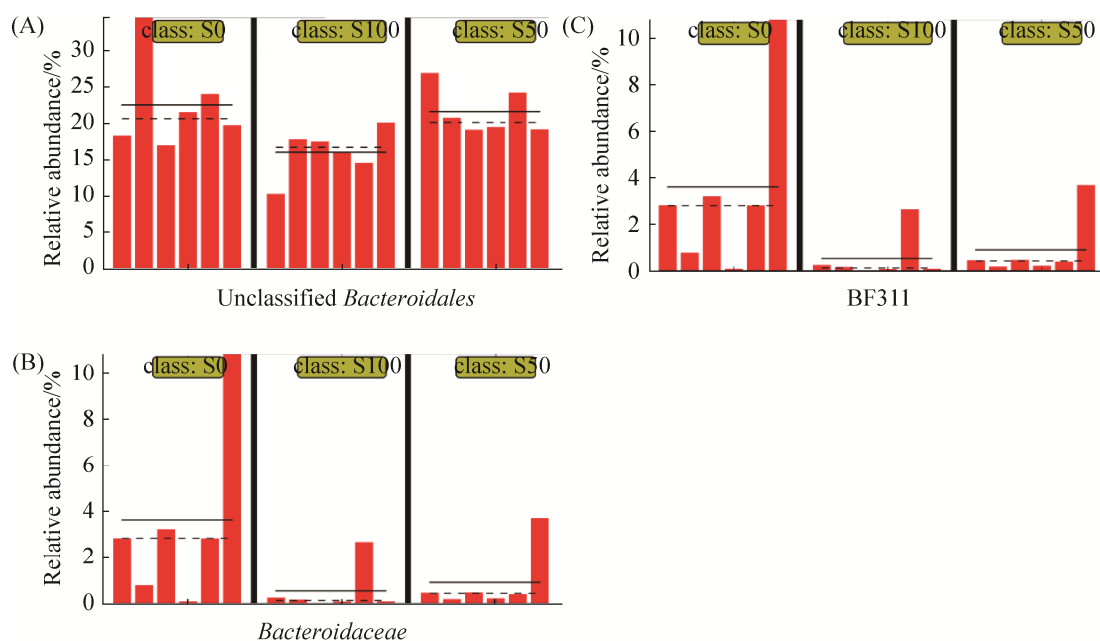


图 4. LDA 分析微贮棉秆对湖羊瘤胃菌群的影响

Figure 4. LDA analysis of rumen microbiota in Hu sheep fed with fermented cotton stalk. S0: 100% green hay; S50: 50% green hay + 50% fermented cotton stalk; S100: 100% fermented cotton stalk.

等物质的降解, 氨态氮的浓度在很大程度上影响着瘤胃内微生物蛋白的产量。本试验中, 不同处理组对湖羊血清中的尿素氮和微生物蛋白的含量无显著影响, 但有先增加再降低的趋势。Argyle 等^[18]报道, 当瘤胃内 pH 值低于 6.2 时, 会降低瘤胃内纤维降解菌活性。完全饲喂微贮棉秆的 S100 组的 pH 值和乳酸浓度显著高于其他两组, 这表明发酵棉秆在饲料中的添加并非越多越好, 需要有一个合适的比例。

瘤胃消化功能的正常运行与宿主动物的健康状况密切联系, 而瘤胃微生物的组成与结构是影响瘤胃发酵功能的重要因素, 其与宿主之间的关系是互惠共生的^[19-21]。诸多要素影响瘤胃微生物区系的结构, 其中最重要的因素是日粮的组成^[22]。本研究中完全饲喂微贮棉秆的 S100 组 Shannon 指数最低且 OTU 数量最少, 说明其菌群多样性最低。

LEfSe 分析的结果也显示, LDA 值超过 4.0 的 *Bacteroidaceae* 和 *BF311* 在 S0 组中的相对丰度最高, 在 S100 组中的相对丰度最低。有研究表明, 饲料成分越复杂, 瘤胃微生物多样性越高^[23]。董瑞阳(2014)^[24]研究饲料中添加不同比例玉米青贮对瘤胃微生物菌群的影响, 结果表明当玉米青贮与苜蓿干草的比例从 10 kg : 6 kg 上升到 23 kg : 2 kg 时, 瘤胃内总菌数量减少。Kong 等^[25]通过荧光定量法研究不同日粮组成对瘤胃微生物群落的影响, 结果表明同时饲喂大麦青贮与干草饲料的奶牛瘤胃微生物群落比仅饲喂干草饲料的更为丰富, 这与本试验结果一致。

湖羊 20 日龄时在其瘤胃内就可以发现 *Bacteroidetes* 和 *Firmicutes* 菌^[26]。Shoai 等^[27]通过代谢模型也证明了 *Bacteroidetes* 和 *Firmicutes* 是肠道中主要的菌门。本研究中不管是否在断奶湖羊

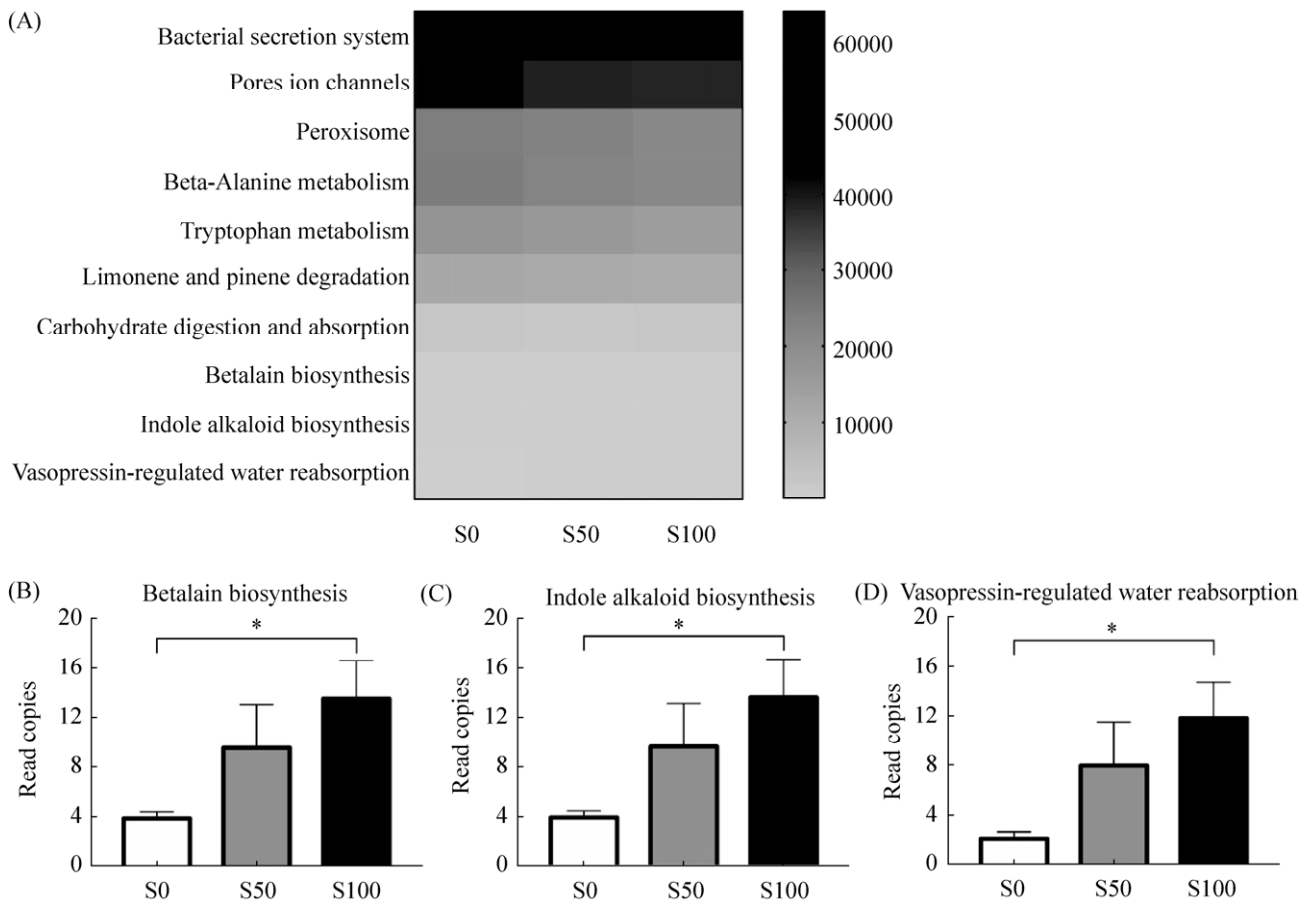


图 5. 瘤胃菌群 KEGG 代谢通路的差异分析

Figure 5. Structure of KEGG pathway with differences in rumen flora. S0: 100% green hay; S50: 50% green hay+ 50% fermented cotton stalk; S100: 100% fermented cotton stalk. The error bars represent the standard error of the mean (n=6). * $P < 0.05$.

的日粮中添加微贮棉秆, *Bacteroidetes*(拟杆菌门)和 *Firmicutes*(硬壁菌门)都是组成湖羊瘤胃门水平微生物的主要类群。大量研究表明, 瘤胃内 *Bacteroidetes* 和 *Firmicutes* 的丰度水平会影响反刍动物的日增重, Myer 等^[28]研究来自不同饲喂效果的奶牛的瘤胃微生物, 发现 *Bacteroidetes* (53%–63%)和 *Firmicutes*(23%–33%) 在每个样品中都占主导地位, 且 *Firmicutes* 数量的增加与脂肪的沉积有关; Elie 等^[29]研究瘤胃微生物在调节乳成分的潜在作用时也证明了随着 *Firmicutes* 的增加会提高乳脂产量与脂肪沉积。本研究中随着

微贮棉秆在断奶湖羊日粮中比例的不断升高, *Firmicutes* 的丰度出现先升高、后降低的情况, 说明当微贮棉秆和青干草在日粮中的添加量各一半时, 有助于断奶湖羊的增重, 这与实际日增重的结果相一致。

反刍动物瘤胃内栖息着各种各样的微生物, 主要包括原虫、细菌和厌氧真菌。粗饲料中的纤维物质就是依靠这些微生物的快速降解从而转化为营养物质满足反刍动物的能量需求, 而纤维素的降解主要受到纤维素降解菌的影响^[30–32]。有研究表明, *Prevotella* 菌属含有丰富的水解淀粉蛋白,

可以起到高效降解纤维素的作用^[33]。谢晓^[34]研究饲喂苜蓿干草对湖羊瘤胃微生物菌群的影响,发现瘤胃发酵半小时后 *Prevotella* 菌属快速定植于粗饲料表面并进行粗纤维降解; Purushe 等^[35]通过基因组分析也证明了 *Prevotella* 菌属在肠道中强大的非纤维素多糖降解作用。在本研究中, *Prevotella* 在 S50 组中有着较高的丰度,这说明适当添加微贮棉秆在饲料中可以提高瘤胃对粗纤维的降解能力。

PICRUSt 可以利用已测得的瘤胃微生物基因组 16S rDNA 序列对菌群的代谢功能进行预测,不仅能分析出相应的 KEGG 通路,还能得到每个样本中相关的拷贝数。在饲料中添加微贮棉秆有利于增强抗利尿激素血管加压素在肾脏中对水循环的调节,改善湖羊抗利尿激素血管加压素对尿液的重吸收能力,完全饲喂微贮棉秆的 S100 组与完全饲喂青干草的 S0 组相比,与加压素调节水重吸收的相关序列拷贝数明显增多,这暗示着饲喂微贮棉秆能改善湖羊体内加压素调节水重吸收的能力,具体的代谢机制还需进一步研究。

4 结论

日粮中添加 100% 微贮棉秆会降低瘤胃微生物多样性,对其菌群结构和功能产生显著影响;日粮中添加 50% 微贮棉秆对瘤胃微生物多样性、菌群结构及功能的影响较小,且能提高湖羊日增重。因此微贮棉秆在断奶湖羊中的使用量不应超过 50%。

参考文献

- [1] Gao RF, Zhang JS. Study on exploiting and utilizing cotton stalks of Xinjiang as feed. *Chinese Journal of Animal Science*, 2016, 52(8): 76–79. (in Chinese)
- [2] Liu YF, Tang SZ, Sang DJ. Current situation of utilization and development of cotton straw as feed resource in Xinjiang. *China Dairy Cattle*, 2009, (9): 27–30. (in Chinese)
- [3] Wei M, Luo QJ, Pan R, Li CL. Initial evaluation on nutritional value of cotton stalk. *Journal of Xinjiang Agricultural University*, 2003, 26(1): 1–4. (in Chinese)
- [4] Zheng Z, Lai XQ, Deng XD, Dai ZG. Technique of cotton stalks returned to field and preliminary calculation of stalk nutrient quantity in Xinjiang. *Acta Gossypii Sinica*, 2000, 12(5): 264–266. (in Chinese)
- [5] Zhang ZJ, Guo TJ, Zhao J, Sang DJ, Shi Y, Cui JW. Effects of steam explosion and fermentation after steam explosion on nutrient value of cotton stalk. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2018, 30(9): 3720–3725. (in Chinese)
- [6] Cui YX, Pan XL, Zhang SX, Pan Q, Wang ZG. The research progress of fermentation cotton stalk utilization. *Acta Ecologiae Animalis Domastici*, 2011, 32(1): 90–93. (in Chinese)
- [7] Kong L, Bao QB, Liu C, Yu L. Application of microbial fermentation feed. *Feed Review*, 2014, (2): 16–19. (in Chinese)
- [8] Chen K, Chen H, Liu DJ. Effects of fermented feed on goat

- production performance. *China Feed*, 2018, (2): 25–29. (in Chinese)
- 陈柯, 陈华, 刘大军. 微生物发酵秸秆对山羊生产性能的影响及其机理研究. *中国饲料*, 2018, (2): 25–29.
- [9] Li JZ, Xu G, Yang M, Cao YC, Liu CL, Liu S, Du LJ. Study on nutrition value of rice straw storage and effect of feeding sheep. *China Herbivore Science*, 2016, 36(1): 61–63. (in Chinese)
- 李建臻, 徐刚, 杨苗, 曹雨辰, 刘昌林, 刘水, 杜龙基. 微贮稻秸营养价值及饲喂肉羊效果研究. *中国草食动物科学*, 2016, 36(1): 61–63.
- [10] Liu JP, Liu DS, Zhang YH, He YX. Experiment on effect of micro-storage cotton straw in raising sheep. *Xinjiang Xumuye*, 2016, (11): 36–37. (in Chinese)
- 刘家平, 刘东山, 张运海, 何玉新. 微贮棉花秸秆养羊效果试验. *新疆畜牧业*, 2016, (11): 36–37.
- [11] Weatherburn MW. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry*, 1967, 39(8): 971–974.
- [12] Makkar HPS, Sharma OP, Dawra RK, Negi SS. Simple determination of microbial protein in rumen liquor. *Journal of Dairy Science*, 1982, 65(11): 2170–2173.
- [13] Zoetendal EG, Akkermans ADL, De Vos WM. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(10): 3854–3859.
- [14] Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, Huttenhower C. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology*, 2011, 12(6): R60.
- [15] Zhang YG, Hu HC, Shi LG, Peng WQ, Li M, Huang Y, Xu TS, Zhou HL. Effects of different proportions of roughage on growth, nutrient digestibility and blood biochemical indices of Hainan black goat. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2018, 45(11): 3086–3094. (in Chinese)
- 张亚格, 胡海超, 施力光, 彭维祺, 李茂, 黄艳, 徐铁山, 周汉林. 不同配比粗饲料对海南黑山羊生长、养分消化及血液生化指标的影响. *中国畜牧兽医*, 2018, 45(11): 3086–3094.
- [16] Gao F. Study on the effects of probiotics feed on feeding mutton. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2011, 40(10): 131–133. (in Chinese)
- 高飞. 微生态制剂饲料饲喂肉羊效果研究. *河南农业科学*, 2011, 40(10): 131–133.
- [17] Zheng AR, Wang YX, Zheng CL, Zheng AW, Li JW, Wang WQ. Effect of straw micro-storage on production performance of hybrid sheep. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2016, 48(8): 55–58. (in Chinese)
- 郑爱荣, 王跃先, 郑春雷, 郑爱武, 李焦魏, 王卫秦. 秸秆微贮饲料对杜寒杂交羊生产性能的影响. *畜牧与兽医*, 2016, 48(8): 55–58.
- [18] Argyle JL, Baldwin RL. Modeling of rumen water kinetics and effects of rumen pH changes. *Journal of Dairy Science*, 1988, 71(5): 1178–1188.
- [19] Langille MGI, Zaneveld J, Caporaso JG, McDonald D, Knights D, Reyes JA, Clemente JC, Burkepille DE, Vega Thurber RL, Knight R, Beiko RG, Huttenhower C. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(9): 814–821.
- [20] Jiang X, Cui ZQ, Liu X, Zhang LY, Liu S, Zhang YG. Effect of fermented corn gluten meal on growth, blood indices, ruminal flora and nutrient digestibility in calves. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2019, 50(2): 46–55. (in Chinese)
- 姜鑫, 崔梓琪, 刘鑫, 张立阳, 刘帅, 张永根. 发酵玉米蛋白粉对犊牛生长、血液指标、瘤胃菌群和营养物质消化的影响. *东北农业大学学报*, 2019, 50(2): 46–55.
- [21] Yang L, Wang BH, Jin Y. Advances in rumen microflora and nutrient deposition in ruminants. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2017, (15): 85–87, 90. (in Chinese)
- 杨蕾, 王柏辉, 靳焱. 反刍动物瘤胃菌群与机体营养沉积研究进展. *黑龙江畜牧兽医*, 2017, (15): 85–87, 90.
- [22] Kelsen J, Wu GD. The gut microbiota and IBD//Mamula P, Markowitz J, Baldassano R. Pediatric Inflammatory Bowel Disease. New York: Springer, 2013: 35–42.
- [23] Fonty G, Gouet P, Jouany JP, Senaud J. Establishment of the microflora and anaerobic fungi in the rumen of lambs.

- Journal of General Microbiology*, 1987, 133(7): 1835–1843.
- [24] 董瑞阳. 粗饲料组合对泌乳牛与干奶牛甲烷产量、瘤胃发酵模式及微生物菌群的影响. 河南农业大学硕士学位论文, 2014.
- [25] Kong YH, He ML, McAlister T, Seviour R, Forster R. Quantitative fluorescence *in situ* hybridization of microbial communities in the rumens of cattle fed different diets. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(20): 6933–6938.
- [26] 岳喜新. 蛋白水平及饲喂量对早期断奶羔羊生长性能及消化代谢的影响. 塔里木大学硕士学位论文, 2011.
- [27] Shoaie S, Karlsson F, Mardinoglu A, Nookaew I, Bordel S, Nielsen J. Understanding the interactions between bacteria in the human gut through metabolic modeling. *Scientific Reports*, 2013, 3: 2532.
- [28] Myer PR, Smith TPL, Wells JE, Kuehn LA, Freetly HC. Rumen microbiome from steers differing in feed efficiency. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0129174.
- [29] Jami E, White BA, Mizrahi I. Potential role of the bovine rumen microbiome in modulating milk composition and feed efficiency. *PLoS One*, 2014, 9(1): e85423.
- [30] Aschenbach JR, Penner GB, Stumpff F, Gäbel G. RUMINANT NUTRITION SYMPOSIUM: Role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH. *Journal of Animal Science*, 2011, 89(4): 1092–1097.
- [31] Guo TT, Hu DD, Fu ZL, Li N, Xu XF. Effects of mannan oligosaccharides on rumen microflora structure of dairy cows based on 16S rDNA high-throughput sequencing technology. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2018, 30(10): 4048–4058. (in Chinese)
- 郭婷婷, 胡丹丹, 付子琳, 李娜, 徐晓锋. 基于 16S rDNA 高通量测序分析技术研究甘露寡糖对奶牛瘤胃菌群结构的影响. *动物营养学报*, 2018, 30(10): 4048–4058.
- [32] Wu SG, Wang GT, Angert ER, Wang WW, Li WX, Zou H. Composition, diversity, and origin of the bacterial community in grass carp intestine. *PLoS One*, 2012, 7(2): e30440.
- [33] Hu DD, Guo TT, Li N, Zhang LL, Xu XF. Effect of fructooligosaccharide on the structure and diversity of rumen bacterial community in dairy cow by 16S rDNA sequencing technology. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2018, 45(10): 2761–2771. (in Chinese)
- 胡丹丹, 郭婷婷, 李娜, 张力莉, 徐晓锋. 以 16S rDNA 高通量测序法研究果寡糖对奶牛瘤胃菌群结构及多样性的影响. *中国畜牧兽医*, 2018, 45(10): 2761–2771.
- [34] 谢骁. 低质粗饲料日粮干预对湖羊瘤胃发酵和微生物菌群的影响. 浙江大学博士学位论文, 2018.
- [35] Purushe J, Fouts DE, Morrison M, White BA, Mackie RI, Coutinho PM, Henrissat B, Nelson KE. Comparative genome analysis of *Prevotella ruminicola* and *Prevotella bryantii*: Insights into their environmental niche. *Microbial Ecology*, 2010, 60(4): 721–729.

Effect of different proportions fermented cotton stalk intake on rumen microflora of lambs

Yuqi Li^{1,2}, Jianhua Yang¹, Tao Zhang², Xinwen Sun¹, Xinfeng Wang^{1*}, Shengyong Mao², Yanfen Cheng^{2*}, Weiyun Zhu²

¹College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832003, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

²Laboratory of Gastrointestinal Microbiology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] The objective of this study was to assess the effect of fermented cotton stalk in the diet on rumen microflora of weaned lambs by using high-throughput sequencing technology. [Methods] Thirty Hu sheep were selected and randomly divided into three groups according to different proportions of fermented cotton stalk in the diet: the control (S0), 50% fermented cotton stalk (S50) and 100% fermented cotton stalk (S100), six sheep were randomly slaughtered in each group to analyze their growth performance, rumen fermentation parameters and microflora analysis. [Results] Feeding 50% fermented cotton stalk can significantly improve the daily gain and slaughter rate of lambs ($P<0.05$). *Bacteroidetes* and *Firmicutes* are the dominant phylum in the rumen, *Prevotella* and Unclassified *Bacteroidales* are the dominant genus of the rumen of the lambs. Adding 100% fermented cotton stalk to the diet could significantly reduce both the diversity of rumen microflora and the relative abundance of Unclassified *Bacteroides* and *BF311* ($P<0.05$). Three metabolic pathways significantly increased as the proportion of fermented cotton stalk increased ($P<0.05$). [Conclusion] Feeding 50% fermented cotton stalk had little effect on the structure and function of rumen microflora while increasing daily weight. In production practice, the content of fermented stalk should be lower than 50%.

Keywords: fermented cotton stalks, weaning lambs, microflora

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31360558), by the Open Topic of the National Center for International Research on Animal Gut Nutrition and by the Jiangsu Province "Belt and Road" Technical Cooperation Project (BZ2018055)

*Corresponding author. Tel: +86-993-2058077; E-mail: Xinfeng Wang, wxf-4@163.com; Yanfen Cheng, yanfencheng@njau.edu.cn

Received: 2 October 2019; Revised: 2 December 2019; Published online: 27 December 2019