



生物发酵稻秸对湖羊消化道上皮形态及微生物区系的影响

程心茗, 高健, 薛天涵, 成艳芬*, 朱伟云

南京农业大学 动物消化道营养国际联合研究中心 消化道微生物实验室, 江苏 南京 210095

程心茗, 高健, 薛天涵, 成艳芬, 朱伟云. 生物发酵稻秸对湖羊消化道上皮形态及微生物区系的影响[J]. 微生物学报, 2023, 63(4): 1514-1530.

CHENG Xinming, GAO Jian, XUE Tianhan, CHENG Yanfen, ZHU Weiyun. Effects of bio-fermented rice straw on the epithelial morphology and microbiota of digestive tract of Hu sheep[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(4): 1514-1530.

摘要:【目的】本研究旨在通过显微观察和 16S rRNA 基因高通量测序技术来探究饲喂生物发酵稻秸对湖羊肠道上皮形态及微生物区系的影响。【方法】试验选择 70 日龄、体重相近 (25.15±0.47) kg 的湖羊公羔 21 只, 根据饲料中粗饲料的组成随机分为 3 组: 稻秸组、生物发酵稻秸组和苜蓿干草组, 饲料精粗比为 6:4, 试验持续 7 周, 其中适应期 3 周, 正试期 4 周, 结束后屠宰取样, 采集瘤胃、空肠和结肠上皮组织进行观察测量, 收集对应肠段内容物用于微生物区系和代谢产物测定。【结果】与稻秸组相比, 饲喂生物发酵稻秸显著提高湖羊瘤胃中纤维杆菌 (*Fibrobacteres*) 的相对丰度和挥发性脂肪酸 (volatile fatty acids, VFA) 的含量, 促进瘤胃上皮的发育; 显著提高湖羊空肠中厚壁菌门 (*Firmicutes*) 和疣微菌门 (*Verrucomicrobia*) 的相对丰度, 改变空肠微生物菌群结构, 促进空肠上皮组织的发育; 改变湖羊结肠微生物菌群结构。【结论】饲喂生物发酵稻秸有利于湖羊肠道上皮的发育, 并增加消化道内的微生物多样性。

关键词: 生物发酵稻秸; 湖羊; 消化道; 微生物区系

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFD1300302); 国家自然科学基金(32061143034, 32161143028)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFD1300302) and the National Natural Science Foundation of China (32061143034, 32161143028).

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-25-84395523, E-mail: yanfencheng@njau.edu.cn

Received: 2022-08-24; Accepted: 2022-10-27; Published online: 2022-11-07

Effects of bio-fermented rice straw on the epithelial morphology and microbiota of digestive tract of Hu sheep

CHENG Xinming, GAO Jian, XUE Tianhan, CHENG Yanfen*, ZHU Weiyun

Laboratory of Gastrointestinal Microbiology, National Center for International Research on Animal Gut Nutrition, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

Abstract: [Objective] To investigate the effects of bio-fermented rice straw on intestinal epithelial morphology and microflora of Hu sheep by microscopic observation and 16S rRNA gene high-throughput sequencing technology. [Methods] Twenty-one male lambs aged 70 d with similar body weight (25.15 ± 0.47) kg were randomly divided into three groups based on the composition of dietary roughage, namely, the rice straw group, the bio-fermented rice straw group, and the alfalfa hay group, with dietary concentrate to forage ratio of 6:4. The experiment lasted for 7 weeks, including 3 weeks of the adaptation period and 4 weeks of the experimental period. At the end of the experiment, all animals were sacrificed to collect samples. Epithelial tissues of the rumen, jejunum, and colon were collected for morphological observation. The content of corresponding intestinal segments was collected for the analysis of microbiota and metabolites. [Results] Compared with the rice straw group, the bio-fermented rice straw group significantly increased the relative abundance of *Fibrobacteres* and the content of volatile fatty acids (VFA) in the rumen of Hu sheep, and promoted the development of the rumen epithelium. The bio-fermented rice straw significantly increased the relative abundance of *Firmicutes* and *Verrucomicrobia* in the jejunum of Hu sheep. It changed the structure of the jejunal microbial community and promoted the development of jejunal epithelial tissues. Moreover, the colonic microbial structure of Hu sheep was also changed by the bio-fermented rice straw. [Conclusion] Feeding bio-fermented rice straw is beneficial to the development of intestinal epithelium and increases the microbial diversity in the digestive tract of Hu sheep.

Keywords: bio-fermented rice straw; Hu sheep; digestive tract; microbiota

水稻是中国最主要的粮食作物之一, 作为最大的水稻生产国, 我国每年的水稻产量高达2亿t以上。水稻秸秆是水稻收获种子和果实后, 所剩余的农业副产品, 在我国可被用作燃料、饲料和肥料等^[1]。与其他作物秸秆相比, 稻秸中的磷和钾元素更丰富, 作为肥料有利于改良盐碱土, 改善土壤的理化性质^[2], 因此我国的稻秸资源主要作为肥料使用(包括直接还田), 约占总稻秸产量的36.6%。目前我国仍有30%的稻秸被焚烧和弃置乱堆, 大量秸秆被焚烧后会

产生有毒有害气体, 造成环境污染的同时还带来了安全隐患^[3]。因此, 如何更科学、合理、有效地利用水稻秸秆资源是当前亟需解决的问题。稻秸有着丰富和可再生的木质纤维素生物质资源, 可以作为反刍动物的粗饲料。然而稻秸中钙磷含量较低、硅酸盐含量较高, 容易在瘤胃中沉积, 并严重影响其他营养素的吸收, 因此直接饲喂会导致反刍动物采食量、消化率, 以及生长性能下降。

生物发酵技术作为一种绿色节能的技术,

在畜牧业中有着广泛的应用前景。通过向饲料原料中添加活性微生物或酶制剂等,进行一定时间的生物发酵,可以有效改善其营养价值。生物发酵是通过使微生物附着在饲料表皮的气孔以及横切面上,微生物在饲料上分泌各种酶类物质,能破坏饲料最外层的表皮结构,进入瘤胃后更易于瘤胃微生物的定殖及发酵,利于瘤胃微生物的生长^[4]。尹珺伊等^[5]的研究发现,通过生物发酵处理玉米秸秆,可以降低秸秆中中性洗涤纤维和酸性洗涤纤维含量,显著提高粗蛋白和乳酸含量,改善玉米秸秆的感官品质和营养品质。肠道中的微生物会受日粮结构、外源微生物、环境因素等的影响^[6],对于反刍动物,瘤胃是现阶段研究的重点,稳定的瘤胃微生态是宿主动物正常营养代谢的重要保障。Xu 等^[7]的研究发现生物发酵技术使稻秸具有疏松多孔的结构,易于瘤胃中微生物的定殖,并使稻秸中中性洗涤溶解物增加,瘤胃中 *Bacteroidetes*、*Fibrobacteres* 以及 *Fibrobacter* 的相对丰度提高,从而促进了瘤胃对稻秸的降解与代谢。

消化道的组织结构对反刍动物消化吸收营养物质具有重要的影响,据报道,生物发酵能够促进体外瘤胃发酵水稻秸秆总挥发性脂肪酸(volatile fatty acids, VFA)产生, VFA 尤其是丁酸对瘤胃上皮和肠道上皮的发育具有促进作用^[7]。Mentschel 等^[8]的研究发现,增加瘤胃乳头的高度和表面积,能提高瘤胃对营养物质吸收的效率。张兴夫等^[9]以生物发酵玉米秸秆作为唯一粗饲料的全混合日粮饲喂羔羊,结果表明可以显著提高羔羊瘤胃上皮基底层、棘突层、颗粒层和角质层的厚度,以及乳头高度、宽度和密度,提高瘤胃吸收 VFA 的能力。此外,生物发酵处理有助于提高劣质饲草的适口性,提高反刍动物对秸秆的采食。李成云等^[10]研究了不同添加剂处理对生物发酵稻草的营养价值及延边

黄牛采食量的影响,结果表明发酵稻秸可以显著提高黄牛的采食量。反刍动物的后肠道对碳水化合物的消化吸收有着重要的作用,可以提高纤维素和半纤维素的消化率,为机体提供能量^[11]。较高的发酵饲料采食量可能影响后肠道对饲料养分的消化吸收,王娇^[12]通过以甜高粱和苜蓿混合青贮饲喂卡拉库尔羊,结果发现小肠的绒毛高度和宽度显著增加,有利于小肠对营养物质的消化吸收。小肠形态变化影响小肠对营养物质的消化吸收功能,绒毛高度和隐窝深度直接反应小肠内健康^[13]。

综上所述,生物发酵处理可能通过改善秸秆适口性和可消化养分含量,从而影响胃肠道微生物组成与上皮发育。但是,具体效果尚不明确。因此,本研究选用湖羊为实验动物,通过饲喂生物发酵稻秸来探究其对湖羊消化道上皮形态及微生物区系的影响,为生物发酵稻秸在畜牧业中的实践和应用提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 试验设计和饲养管理

试验所用的生物发酵稻秸购自金湖金正农作物秸秆专业合作社,具体制作方法如下:将成熟的水稻收获后稻草同步捡拾打捆,每吨添加 4 g “S102 秸秆微贮宝”复合乳酸菌剂(江苏省农业科学院),打捆后裹包生物发酵 40 d。选用 21 头 70 日龄左右、体重为(25.15±0.47) kg 的湖羊公羔作为试验动物,随机分为 3 组,每组 7 头。根据日粮中粗饲料的组成随机分为 3 组, SRS 组(试验组,粗饲料为生物发酵稻秸)、AH 组(正对照组,粗饲料为苜蓿干草)、RT 组(负对照组,粗饲料为稻秸)。试验持续 7 周,其中适应期 3 周,正试期 4 周。参照动物饲养标准设计日粮,精粗比为 6:4,日粮组成及营养成分见表 1。试验动物为单笼饲喂(1.2 m×1.4 m),适应期内

表 1 饲料成分和营养组成(干物质基础)

Table 1 Feed ingredient and nutrient composition

Feed ingredients	TMR (% DM)			Nutrition composition	SRS	AH	RT
	SRS	AH	RT				
Corn	33.00	30.00	33.00	Metabolizable energy (MJ/kg)	8.16	8.21	8.14
Bean pulp	18.50	0.00	18.50	Digestible energy (MJ/kg)	9.58	9.60	9.58
Rice straw	0.00	0.00	40.00	Crude protein (%)	12.67	12.80	12.79
Alfalfa hay	0.00	40.00	0.00	Crude fat (%)	13.49	12.76	14.59
Bio-fermented rice straw	40.00	0.00	0.00	Ether extract (%)	2.36	2.51	2.28
Wheat middlings	5.00	24.50	5.00	Ca (%)	0.33	0.53	0.48
Zeolite	0.00	2.50	0.00	Total phosphorus (%)	0.47	0.46	0.25
Limostone	0.50	0.00	0.50				
NaHCO ₃	0.50	0.50	0.50				
Premix	2.50	2.50	2.50				

SRS: Bio-fermented rice straw group; AH: Alfalfa hay group; RT: Rice straw group. Premix contains vitamin A 60–75 KIU, vitamin D3 1–15 KIU, vitamin E≥50 mg, CuSO₄ 150–500 mg, ZnSO₄ 100–1 400 mg, FeSO₄ 300–800 mg, and MnSO₄ 200–1 000 mg per kg.

均饲喂以苜蓿干草为粗饲料的全混合日粮。正试期每天饲喂 2 次(上午 8:30 和下午 5:00), 试验期间动物自由采食和饮水。

1.2 样品采集

正式试验开始前, 于晨饲前对所有试验动物进行称重, 记为初始体重。试验期间动物自由采食和饮水, 每天晨饲前清理并记录剩余饲料的重量。试验第 1 天和第 29 天收集饲料样品并于-20 °C冻存, 用于饲料养分分析。结束试验当天晨饲前记录体重, 计算日增重。试验结束后(第 29 天)对所有动物进行屠宰取样, 分离不同胃肠道组织, 采集瘤胃、空肠及结肠中的内容物, 于-20 °C冻存, 用于发酵参数和微生物测定。清理胃肠道内容物后生理盐水冲洗各肠道, 取 1 cm×1 cm 的瘤胃上皮组织, 测定瘤胃上皮发育状态, 包括瘤胃乳头密度、长度、宽度。分别在瘤胃上皮、空肠中段和腹侧囊结肠中间取厚度为 6 μm 的组织, 使用 4% (质量体积分数)多聚甲醛溶液固定, 用于光学显微镜下观察。钝性分离瘤胃上皮层, 使用 PBS 漂洗后, 于液氮中冻存, 用于测定瘤胃上皮细胞紧

密连接蛋白和营养素转运相关基因表达量。

1.3 测定指标及方法

1.3.1 饲料营养成分

底物的干物质含量参照朱伟云等^[14]的方法进行测定。饲料粗蛋白含量使用凯氏定氮法测定, 具体步骤参照 Krishnamoorthy 等^[15]的方法。参照 Chopra 等^[16]的方法使用索氏提取器测定粗脂肪。粗纤维含量参照 van Soest 等^[17]的方法, 使用 ANKOM 200i 纤维分析仪进行测定。钙、磷含量的测定方法参照 Association of Official Analytical Chemists (AOAC)^[18]。代谢能和消化能的测定方法参照 Sibbald^[19]。

1.3.2 发酵参数

pH 值采用便携式 pH 计(HI 9024C; HANNA Instruments)测定所有肠道内容物的 pH 值, 使用前采用标准液进行校正。参照 Brusetti 等^[20]的方法, 使用比色法测定肠道内容物中氨态氮(ammonia nitrogen, NH₃-N)含量。肠道内容物中的乳酸含量使用乳酸试剂盒(南京生物工程研究所)测定, 具体操作参照说明书。瘤胃、结肠内容物中挥发性脂肪酸(volatil fatty acids, VFA)的

浓度参照 Jin 等^[21]的方法, 使用安捷伦高效气相色谱仪(岛津 GC-2014AFsc)测定, 测定参数为: 汽化室温 220 °C; 色谱柱用毛细吸管柱 FUSED SILICA, 柱温条件为 40 °C, 4 min; 40–10 °C (40 °C/min); 110 °C, 2 min; 110–150 °C (40 °C/min); 150 °C, 5 min。使用氢离子的火焰检测器, 载气为氮气, 检测器温度为 250 °C。微生物蛋白含量使用考马斯亮蓝法测定, 具体步骤参照 Makkar 等^[22]的方法。

1.3.3 胃肠道上皮结构

取瘤胃上皮组织样品, 观察记录单位面积瘤胃上皮乳头总量(n), 在其四角及中心部位共随机选取 15 个瘤胃乳头, 并用游标卡尺测定长度和宽度。

单个乳头面积 S_i (cm²)=长×宽×2;

单位面积的瘤胃上皮乳头表面积为 S (cm²)= $\sum S_i/15 \times n$ 。

从 4%多聚甲醛溶液中取出瘤胃、空肠及结肠上皮组织进行脱水、漂洗、石蜡包埋、切片, 染色^[23-24], 利用光学显微镜观察, 测定瘤胃乳头的 5 个区域(图 1), 每张切片选择 3 个乳头, 测定并记录瘤胃乳头上皮的棘基层、颗粒层和角质层的厚度。参考 Steele 等^[25]的方法, 用 Image-Pro Plus 软件(Media Cybernetics)分析瘤胃上皮乳头细胞层的数据结果。参照 Odongo 等^[23]的方法, 利用光学显微镜观察空肠上皮组织, 选择每个切片的 15 个不同部位, 测量绒毛高度和隐窝深度, 随后计算绒隐比(villus height/crypt depth)。

1.3.4 消化道微生物及基因表达量分析

微生物基因组 DNA 使用 CTAB 法提取, 具体步骤参照 Zoetendal 等^[26]的方法。DNA 样品采用 Nanodrop 2000 超微量分光光度计(Thermo Fisher Scientific)进行质检, 样品质量合

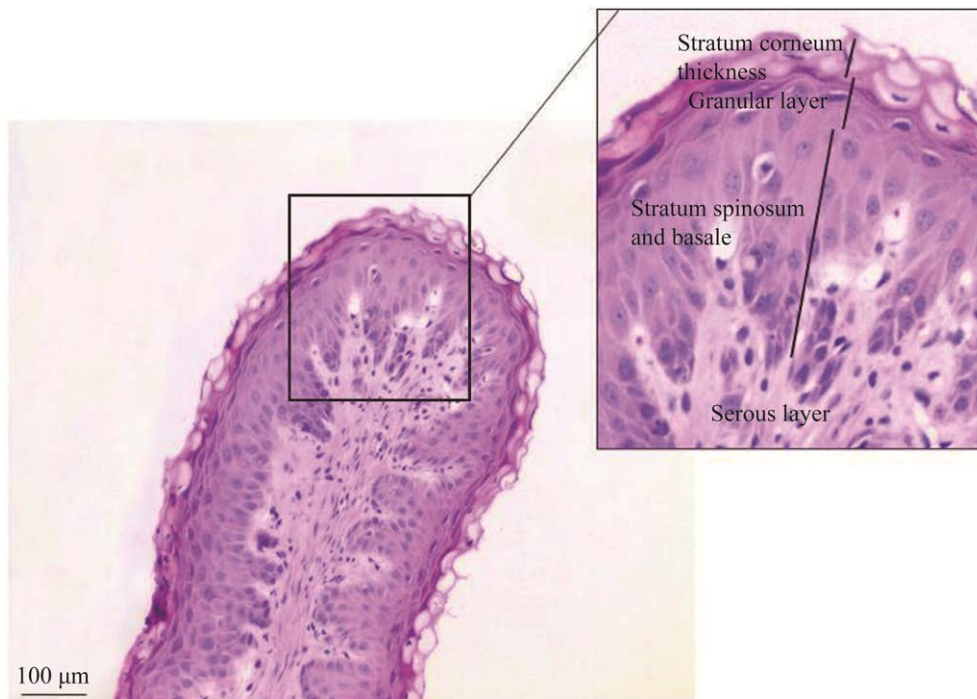


图 1 光学显微镜下瘤胃上皮乳头的组织形态

Figure 1 Tissue morphology of rumen epithelium under the light microscope.

格的标准:吸光值 $OD_{260/280}$ 在 1.80 至 2.00 之间。引物信息如表 2 所示,所有引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。使用荧光定量 Quant Studio™ 5 Flex System 和 SYBR® Premix Ex Tag™ 试剂盒进行实时荧光定量核酸扩增(real-time quantitative polymerase chain reaction, qPCR)定量分析,反应体系为 20 μ L,其中包括 SYBR GREEN 10 μ L, ROXII 0.4 μ L,正反向引物各 0.4 μ L, DNA 模板 2 μ L, 无酶水 6.8 μ L。反应体系的配制在超净工作台中完成,并置于冰浴中进行。荧光反应程序为:95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环;95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s。每个样品均含有 3 个孔的重复,并且每一批测定中包含有一个阴性对照和一个阴性空白。最后以内参基因 *GAPDH* 的表达量为参照,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法计算目的基因的相对表达量。

按指定测序区域(V3-V4 区)合成带有 barcode 的特异性引物,将质检合格的 DNA 样品进行扩增,使用 Agencourt AMPure XP 磁珠纯化 PCR 的扩增产物,然后将其溶于洗脱缓冲液中,贴标签完成建库。使用 Agilent 2100

Bioanalyzer 对文库片段范围和浓度进行检测,合格文库使用 HiSeq 2500 平台进行测序。测序所得原始数据通过 QIIME 软件进行片段拼接和质量过滤^[27],利用 UPARSE 将对过滤后的序列进行分类操作单元(operational taxonomic unit, OTU)聚类,相似性达到 97%及以上的序列归为同一类 OTU。参照 Schloss 等^[28]的方法使用 Mothur 软件对样品进行多样性分析和主坐标分析(principal coordinates analysis, PCoA),并用 Greengenes 数据库为 OTU 进行分类注释^[29]。测序原始数据提交至 SRA 数据库,登录号为 PRJNA869438。

1.4 统计分析

采用统计 SPSS 26.0 (SPSS Inc., Chicago)软件对微生物代谢产物及上皮形态的试验数据进行单因素方差分析,组间采用 Tukey 法进行多重比较,其中 $P < 0.05$ 表示数据结果差异显著。试验结果使用平均值 \pm 标准误表示,微生物多样性指数和菌群相对丰度数据使用非参数检验进行分析。PCoA 分析基于 unweighted-unifrac 算法,采用 QIIME 软件进行分析,使用 Graphpad Prism 8.0 (La Jolla)进行作图。

表 2 实时荧光定量 PCR 引物序列表

Table 2 Primers sequences used for quantitative real-time PCR analysis

Gene name	Primer sequence (5'→3')	Gene ID/Reference	Amplicon size (bp)
<i>Claudin-1</i>	F: CACCCTTGGCATGAAGTGTA	[30]	216
	R: AGCCAATGAAGAGAGCCTGA		
<i>Claudin-4</i>	F: AAGGTGTACGACTCGCTGCT	[30]	238
	R: GACGTTGTTAGCCGTCAG		
<i>ZO-1</i>	F: CGACCAGATCCTCAGGGTAA	[30]	163
	R: AATCACCCACATCGGATTCT		
<i>DRA</i>	F: CCTAAAATCAACCTCCACA	NW_014639013.1	145
	R: TCATCATCAGTTCCAGCAA		
<i>PAT-1</i>	F: TGGACTGCCCCCGTGTAT	NW_011942300.1	391
	R: CCAGAGCGGCTGCTTAGAT		
<i>MCT-1</i>	F: ATCTACGCGGGATTCTTTGGAT	[31]	72
	R: AAGGTCCATCAGCGTTTCAAAC		

F: Forward primer; R: Reverse primer.

2 结果与分析

2.1 生物发酵稻秸对湖羊生长性能及消化道发酵参数的影响

与 RT 组相比, SRS 组湖羊的体增重和日增重均显著增加[(4.39±0.67) vs. (7.04±0.45) kg, (0.15±0.02) vs. (0.24±0.02), $P<0.05$]. 与其他 2 组相比, SRS 组饲料转化率有升高的趋势($P=0.07$). 由表 3 可见, 与 AH 组相比, SRS 组湖羊瘤胃

内容物的 pH 值、异丁酸和异戊酸的浓度显著升高($P<0.05$), 丙酸、丁酸和戊酸的浓度显著降低($P<0.05$), 氨态氮及微生物蛋白的浓度无显著差异($P>0.05$). 在湖羊空肠内容物中, 与 RT 组相比, SRS 组的氨态氮浓度显著降低($P<0.05$), pH 值及微生物蛋白浓度均无显著差异($P>0.05$). 3 组湖羊结肠内容物中的 pH 值、微生物蛋白、氨态氮和 VFA 的浓度均无显著差异($P>0.05$).

表 3 饲喂生物发酵稻秸对湖羊各肠道微生物代谢产物的影响

Table 3 Effects of feeding bio-fermented rice straw on microbial fermentation metabolites in the intestinal of Hu sheep

Items	Groups			P value
	AH	SRS	RT	
Rumen				
pH	6.05±0.11b	6.43±0.06a	6.45±0.08a	<0.05
NH ₃ -N (mg/dL)	11.42±1.11	10.65±1.71	13.55±1.60	0.08
MCP (mg/mL)	36.17±3.43	37.86±5.85	40.93±8.90	0.87
TVFA (mmol/L)	191.40±16.58a	148.79±9.16b	140.33±8.45b	<0.05
Acetate (mmol/L)	115.86±10.52	93.26±5.73	90.95±5.58	0.06
Propionate (mmol/L)	42.81±5.55a	28.56±2.46b	29.24±2.56b	<0.05
Isobutyrate (mmol/L)	1.59±0.29b	2.74±0.16a	2.52±0.17a	<0.05
Butyrate (mmol/L)	26.36±1.48a	18.39±2.06b	12.23±1.71c	<0.05
Isovalerate (mmol/L)	1.80±0.20b	3.78±0.32a	3.71±0.31a	<0.05
Valerate (mmol/L)	2.98±0.22a	2.06±0.20b	1.69±0.13b	<0.05
Jejunum				
pH	7.09±0.31	7.23±0.27	6.69±0.16	0.31
NH ₃ -N (mg/dL)	15.29±2.12ab	10.53±2.10b	23.08±4.23a	<0.05
MCP (mg/mL)	25.63±2.05	26.68±1.74	24.42±1.79	0.70
Colon				
pH	6.79±0.09	6.68±0.09	6.67±0.18	0.78
NH ₃ -N (mg/dL)	5.38±1.27	7.52±0.64	9.38±1.39	0.07
MCP (mg/mL)	39.14±3.99	37.31±5.59	47.31±8.01	0.48
TVFA (mmol/L)	154.62±10.25	157.46±12.22	171.85±14.47	0.59
Acetate (mmol/L)	103.70±6.90	107.94±7.91	117.63±9.13	0.47
Propionate (mmol/L)	29.34±2.09	29.40±2.12	27.52±2.57	0.80
Isobutyrate (mmol/L)	1.85±0.12	1.75±0.52	2.11±0.18	0.73
Butyrate (mmol/L)	15.45±2.65	14.97±2.93	19.73±2.98	0.45
Isobutyrate (mmol/L)	1.74±0.15ab	1.14±0.20b	2.03±0.23a	<0.05
Valerate (mmol/L)	2.53±0.44	2.26±0.24	2.84±0.35	0.52

SRS: Bio-fermented rice straw group; AH: Alfalfa hay group; RT: Rice straw group. a-c: Significant differences, $P<0.05$.

2.2 生物发酵稻秸对湖羊消化道上皮形态的影响

如表 4 所示, 与 AH 组相比, SRS 组的瘤胃乳头密度、宽度和高度, 乳头单位面积和乳头总面积均无显著差异($P>0.05$)。图 2 和表 4 结果显示, SRS 组和 AH 组瘤胃上皮的总厚度和角质层厚度显著高于 RT 组($P<0.05$), 并且饲喂生物发酵稻秸对棘基层的厚度无显著影响($P>0.05$)。湖羊空肠上皮的结果显示, 与 RT 组相比, SRS 组的绒毛高度和隐窝深度显著增加($P<0.05$), 但 3 组湖羊空肠的绒毛隐比无显著差异($P>0.05$)。由图 2 结果可知, SRS 组、AH 组和 RS 组的结肠上皮形态无明显差异。

2.3 生物发酵稻秸对湖羊瘤胃上皮细胞紧密连接蛋白和 VFA 转运蛋白相关基因表达的影响

如表 5 所示, 与 AH 组相比, SRS 组中的

Claudin-1、*Claudin-4*、*ZO-1*、*PAT-1* 基因的表达量显著下调($P<0.05$), *DRA* 基因表达量显著上调($P<0.05$)。与 RT 组相比, SRS 组瘤胃上皮 *ZO-1* 基因表达量显著下调($P<0.05$)。

2.4 饲喂生物发酵稻秸对湖羊瘤胃、空肠及结肠菌群的影响

表 6 显示了饲喂 SRS、AH、RT 对湖羊瘤胃、空肠及结肠微生物 α 多样性的影响。饲喂 SRS 显著增加了湖羊瘤胃微生物 Sobs、Chao1、Ace 和 Shannon 指数($P<0.05$), 对 Simpson 指数无显著影响($P>0.05$)。与 AH 组相比, SRS 组湖羊空肠微生物 Chao1 指数、ACE 指数和 Shannon 指数显著升高($P<0.05$)。SRS 组与 AH 组的结肠微生物 α 多样性各项指标均无显著差异($P>0.05$)。图 3 显示了基于 unweighted-unifrac 距离算法的 PCoA 结果, 在瘤胃、空肠及结肠中 3 组均明显分开, 存在显著差异($P<0.05$)。

表 4 饲喂生物发酵稻秸对湖羊瘤胃上皮及空肠上皮形态的影响

Table 4 Effects of feeding bio-fermented rice straw on the morphology of rumen epithelium and jejunum epithelium of Hu sheep

Items	Groups			P value
	AH	SRS	RT	
Rumen papillae development				
Height of papillae (mm)	5.19±0.54	4.32±0.33	4.20±0.34	0.21
Width of papillae (mm)	2.34±0.11	2.22±0.15	2.07±0.10	0.31
Density of papillae (number/cm ²)	72.43±4.19	63.71±7.74	60.57±7.43	0.44
Area of papillae (mm ² /number)	12.30±1.65	9.76±1.02	8.73±0.84	0.13
Total area of papillae (mm ² /cm ²)	917.46±168.42a	594.62±76.27ab	496.72±40.71b	<0.05
Rumen papillae morphology				
Total thickness (μm)	124.83±2.39a	123.64±1.43a	112.22±2.45b	<0.05
Stratum corneum thickness (μm)	20.30±1.16a	17.66±1.12a	13.24±0.89b	<0.05
Granular layer (μm)	25.23±1.17	25.26±1.10	21.98±1.06	0.08
Stratum spinosum and basale (μm)	79.31±2.14	80.73±1.69	77.10±1.78	0.39
Jejunal epithelium morphology				
Height of villus (μm)	652.14±8.32a	611.81±9.6b	545.82±9.34c	<0.05
Depth of crypt (μm)	322.30±4.28a	313.78±3.53a	285.47±4.93b	<0.05
Villus height/crypt depth	2.03±0.10	1.95±0.10	1.91±0.02	0.08

SRS: Bio-fermented rice straw group; AH: Alfalfa hay group; RT: Rice straw group. a-c: Significant differences, $P<0.05$.

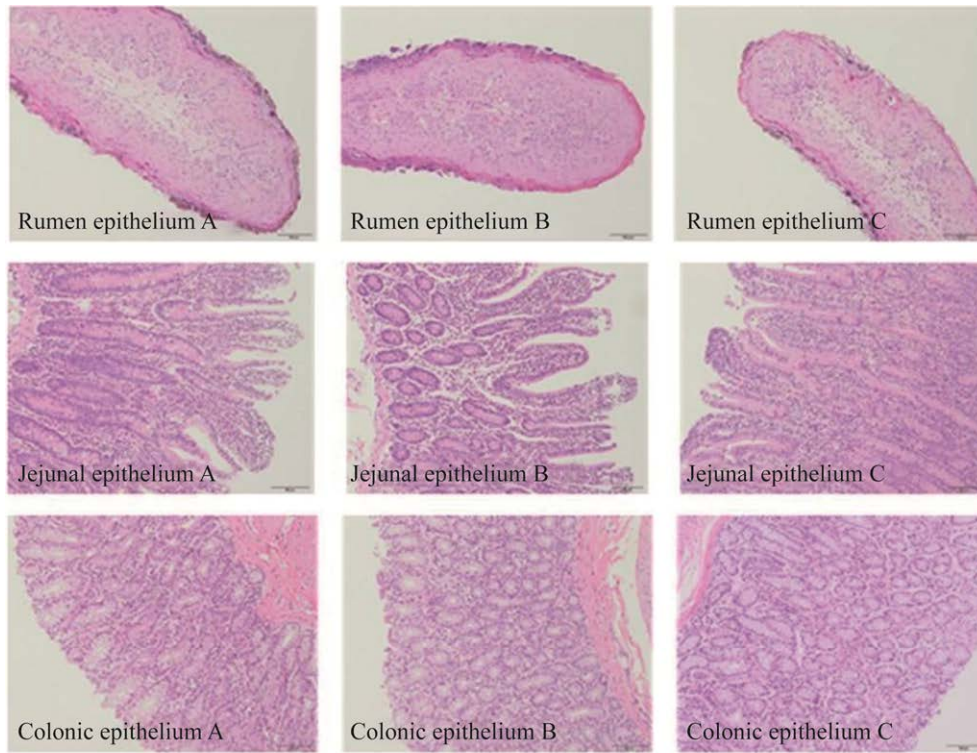


图 2 光学显微镜下瘤胃乳头、空肠上皮及结肠上皮的组织形态

Figure 2 Tissue morphology of rumen, jejunum and colon epithelium under the light microscope. SRS: Bio-fermented rice straw group; AH: Alfalfa hay group; RT: Rice straw group.

表 5 饲喂生物发酵稻秸对湖羊瘤胃上皮紧密连接蛋白和 VFA 转运蛋白相关基因的影响

Table 5 Effects of feeding bio-fermented rice straw on genes related to rumen epithelial tight junction protein and VFA transporter of Hu sheep

Items	Groups			P value
	AH	SRS	RT	
<i>MCT1</i>	1.06±0.16	0.61±0.14	1.05±0.14	0.07
<i>Claudin-1</i>	1.01±0.08a	0.74±0.06b	0.91±0.07ab	<0.05
<i>Claudin-4</i>	1.03±0.12a	0.60±0.07b	0.84±0.05ab	<0.05
<i>ZO-1</i>	1.02±0.09a	0.64±0.07b	1.17±0.11a	<0.05
<i>PAT</i>	2.18±0.46a	0.68±0.09b	0.90±0.10b	<0.05
<i>DRA</i>	1.44±0.47b	3.70±0.45a	4.30±0.47a	<0.05

SRS: Bio-fermented rice straw group; AH: Alfalfa hay group; RT: Rice straw group. a-c: Significant differences, $P<0.05$.

瘤胃微生物中的优势菌门为 *Bacteroidetes* 与 *Firmicutes*，两者的相对丰度占到 80%以上。与 AH 组相比，SRS 组 *Fibrobacteres* 和 *Verrucomicrobia* 的相对丰度显著升高 ($P<0.05$)，*Actionbacteria*

的相对丰度显著降低 ($P<0.05$)。空肠微生物中的优势菌门均为 *Firmicutes* 和 *Actinobacteria*。与 AH 组相比，SRS 组 *Firmicutes* 和 *Verrucomicrobia* 的相对丰度显著升高 ($P<0.05$)。结肠微生物中的

表 6 饲喂生物发酵稻秸对湖羊各肠道内容物微生物 α 多样性的影响

Table 6 Effects of feeding bio-fermented rice straw on the alpha diversity of microbial community in the intestinal of Hu sheep

Items	Groups			<i>P</i> value
	SRS	AH	RT	
Rumen				
Coverage (%)	99.40±0.02b	99.59±0.03a	99.42±0.02b	<0.05
OTU number	975.86±25.11a	652±47.41b	903.29±16.41a	<0.05
Chao1 index	1 160.29±28.29a	795.69±49.62b	1 085.30±26.58a	<0.05
Ace index	1 144.76±25.45a	784.74±49.97b	1 075.70±21.99a	<0.05
Shannon index	4.90±0.07a	4.39±0.17b	4.68±0.04ab	<0.05
Simpson index	0.03±0.00	0.04±0.01	0.04±0.00	0.26
Jejunum				
Coverage (%)	99.48±0.02ab	99.52±0.03a	99.40±0.03b	<0.05
OTU number	487.71±19.60a	372.86±34.30b	592.29±52.22a	<0.05
Chao1 index	608.62±28.29a	460.26±39.84b	741.08±58.01a	<0.05
Ace index	1 144.76±25.45a	784.74±49.97b	1 075.70±21.99a	<0.05
Shannon index	4.90±0.07a	4.39±0.17b	4.68±0.04ab	<0.05
Simpson index	0.03±0.00	0.04±0.01	0.04±0.00	0.26
Colon				
Coverage (%)	99.48±0.02ab	99.52±0.03a	99.40±0.03b	<0.05
OTU number	809.29±38.36	776.00±59.58	912.57±19.61	0.05
Chao1 index	974.25±44.43ab	937.47±64.10b	1 125.29±33.61a	<0.05
Ace index	963.32±39.18ab	924.66±61.74b	1 099.37±30.90a	<0.05
Shannon index	4.76±0.12	4.61±0.17	4.83±0.08	0.55
Simpson index	0.02±0.00	0.03±0.01	0.03±0.00	0.73

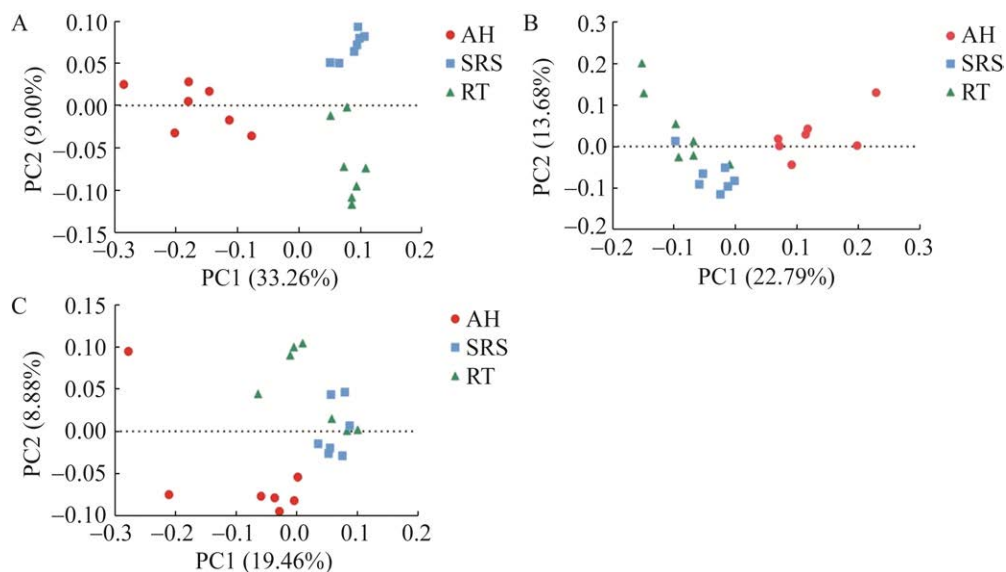
SRS: Bio-fermented rice straw group; AH: Alfalfa hay group; RT: Rice straw group. a-c: Significant differences, $P < 0.05$.

图 3 SRS 组、AH 组和 RT 组湖羊瘤胃(A)、空肠(B)和结肠(C)微生物的 PCoA 图

Figure 3 PCoA diagram of rumen (A), jejunum (B) and colon (C) of Hu sheep in SRS, AH and RT groups.

优势菌门均为 *Bacteroidetes* 和 *Firmicutes*, 并且与 AH 组和 RS 组相比, SRS 组 *Actinobacteria* 的相对丰度显著增加 ($P < 0.05$)。

表 7 和图 4 展示了湖羊瘤胃、空肠及结肠中鉴定出的相对丰度大于 1% 的菌属。结果显示, 本研究中湖羊的瘤胃优势菌属均为 *Prevotella* 和 *Ruminococcus*, 与 AH 组相比, SRS 组湖羊瘤胃中 *Prevotella* 和 *Ruminococcus* 的相对丰度显著降低 ($P < 0.05$)。本研究中湖羊空肠的优势菌属为 *Butyrivibrio* 和 *Ruminococcus*,

与 AH 组相比, SRS 组中 *Olsenella* 的相对丰度显著下降, *Mogibacterium* 的相对丰度显著升高 ($P < 0.05$)。本研究中湖羊结肠的优势菌属为 *Akkermansia* 和 *Succinivibrio*, 而 3 组间结肠微生物的相对丰度均无显著差异 ($P > 0.05$)。

3 讨论

生物发酵技术即以一系列植物类的农副产品作为原料, 通过利用微生物发酵, 将其中的糖类、脂肪和蛋白质等大分子物质转化为有机

表 7 SRS 组、AH 组和 RT 组湖羊瘤胃微生物组成(属水平)

Table 7 Ruminal microbial composition of Hu sheep in SRS, AH and RT groups (genera level)

Items	Groups			P value
	SRS	AH	RT	
Rumen				
<i>Prevotella</i>	22.80±0.67b	45.24±1.83a	21.04±1.38b	<0.05
<i>Succinivibrio</i>	2.84±0.37	5.62±1.23	2.49±0.17	0.76
<i>Ruminococcus</i>	2.48±0.10	3.52±1.05	2.65±0.27	0.87
<i>Butyrivibrio</i>	1.25±0.07b	3.51±0.34a	1.98±0.24ab	<0.05
CF231	1.16±0.10	1.01±0.40	1.22±0.11	0.20
<i>Fibrobacter</i>	3.42±0.50a	0.95±0.24b	3.86±0.80a	<0.05
Jejunum				
<i>Butyrivibrio</i>	19.50±3.75	20.61±2.83	13.34±3.61	0.24
<i>Ruminococcus</i>	7.87±1.44	13.36±5.13	12.12±1.73	0.27
<i>Olsenella</i>	0.00±0.00b	5.07±2.48a	0.00±0.00b	<0.05
<i>Mogibacterium</i>	13.40±1.58a	4.64±0.92b	9.94±2.61ab	<0.05
<i>Clostridium</i>	1.88±0.41	0.92±0.39	2.56±0.71	0.07
Colon				
<i>Prevotella</i>	0.71±0.36ab	8.55±2.75a	0.46±0.25b	<0.05
<i>Succinivibrio</i>	1.65±0.46	6.72±2.50	2.81±1.76	0.78
A57N15	7.49±0.79	6.30±1.20	10.10±1.51	0.09
<i>Akkermansia</i>	8.67±4.31	5.18±1.99	4.44±1.08	0.68
<i>Ruminococcus</i>	3.68±0.66	4.60±1.08	2.24±0.30	0.11
CF231	2.25±0.73	2.63±1.22	0.86±0.21	0.41
<i>Oscillospira</i>	1.81±0.16	2.39±0.32	2.39±0.28	0.15
<i>Coprococcus</i>	1.91±0.99	2.37±0.67	1.84±0.45	0.66
<i>Phascolarctobacterium</i>	1.70±0.19	2.13±0.64	2.06±0.35	0.83
<i>Ruminobacter</i>	2.01±1.97	1.63±1.26	0.34±0.29	0.27
<i>Clostridium</i>	1.08±0.46	1.34±0.65	0.94±0.21	0.75
<i>Butyrivibrio</i>	0.54±0.11ab	1.16±0.43a	0.24±0.05b	<0.05

SRS: Bio-fermented rice straw group; AH: Alfalfa hay group; RT: Rice straw group.

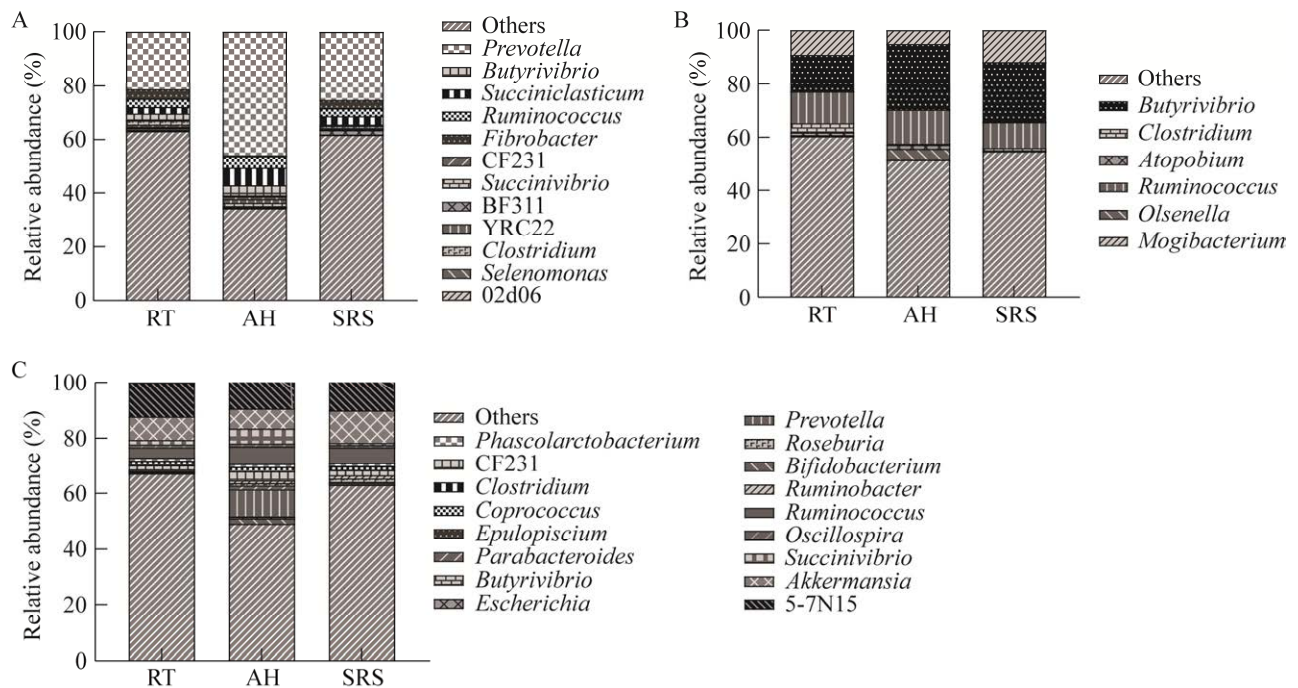


图 4 SRS 组、AH 组和 RT 组湖羊瘤胃(A)、空肠(B)和结肠(C)微生物的组成(属水平)

Figure 4 Microbial composition (genera level) of rumen (A), jejunum (B) and colon (C) in the Hu sheep of the SRS, AH and RT groups.

酸和可溶性多肽等小分子物质,形成适口性好、营养价值高的生物发酵饲料,更易于被反刍动物消化吸收。Xu 等^[7]的研究发现,通过生物发酵后的秸秆干物质、中性洗涤纤维和半纤维素含量显著降低,并通过体外发酵技术表明生物发酵显著提高了稻秸的纤维素降解率,降低了甲烷的体积比,增加了氨态氮和 VFA 浓度。VFA 是反刍动物瘤胃微生物生长繁殖的碳源,反映了瘤胃中消化和代谢的情况,同时也是动物机体重要的能量物质,为反刍动物提供一半甚至更多的可消化能^[32]。丁酸是影响瘤胃结构和功能的重要因素之一,它能够维持瘤胃和肠道上皮细胞的结构完整性,提高机体对营养物质的吸收和利用^[33]。本研究结果发现,与 RT 组相比, SRS 组的丙酸、丁酸和 TVFA 的浓度显著增加($P < 0.05$),结合瘤胃上皮 VFA 转运基因表达的结果,我们推测饲喂生物发酵稻秸可

能改变了湖羊瘤胃上皮的物理屏障结构,使瘤胃发酵生成的 VFA 更易于以被动扩散的方式通过瘤胃上皮进入血液,从而提高动物的生长性能。

反刍动物瘤胃中有大量微生物,包括细菌、真菌、甲烷菌和原虫等。这些微生物功能强大,可以降解饲料中 70%–80%的可消化干物质与 50%的粗纤维,生成 VFA、乳酸、氨态氮等多种代谢产物,还能合成 B 族维生素与菌体蛋白供给动物营养^[34]。瘤胃微生物区系会随着饲料组成和环境变化发生一些适应性地改变^[35]。本研究中微生物 α 多样性结果显示, SRS 组 Chao1 指数、ACE 指数和 Shannon 指数显著高于 AH 组。PCoA 图的分析结果显示, 3 处理湖羊瘤胃微生物群落有着较为明显的差异。上述结果证明了饲喂生物发酵稻秸改变了湖羊瘤胃微生物菌群结构,增加了瘤胃微生物的相对丰度和多样性,

同时细菌数量的增加可能会提高微生物对营养物质的消化与吸收^[36]。*Firmicutes* 和 *Bacteroidetes* 是反刍动物瘤胃中的优势菌门, *Prevotella* 是反刍动物瘤胃 *Bacteroidetes* 中相对丰度最高的属^[37]。*Fibrobacteres* 作为瘤胃厌氧发酵中的纤维素分解菌存在^[38]。本研究结果显示, 与 AH 组相比, SRS 组 *Fibrobacteres* 的相对丰度显著升高。这可能是生物发酵稻秸对湖羊瘤胃微生物菌群起到了一定的调节作用, 促进了动物机体对粗饲料中所含纤维素的降解能力。各处理组湖羊瘤胃的优势菌属是 *Prevotella* 和 *Ruminococcus*。*Prevotella* 可以限制水解寡肽的酶的活性且与瘤胃中蛋白质发酵和氨态氮的浓度, 特别是寡肽分解具有高度的相关性^[39-40]。*Ruminococcus* 是 *Firmicutes* 中占主导地位的菌属, 它包括了白色瘤胃球菌和黄色瘤胃球菌这 2 种纤维分解菌, 能通过分泌大量的纤维素酶与半纤维素酶来降解植物纤维。

肠道微生物有助于维持动物机体内环境的稳态, 能影响动物机体免疫系统的发育和肠道上皮的修复更新, 并参与脂类相关的代谢调控^[41]。本研究结果显示各组的优势菌属均为 *Butyrivibrio* 和 *Ruminococcus*。后肠段的微生物数量在 10^{10} – 10^{12} 个/mL, 其中厌氧菌占到 95% 以上^[42]。虽然后肠微生物发酵对反刍动物维持机体健康同样具有重要的意义, 但是目前关于后肠微生物组成的研究较少。我们研究发现, SRS 组与 AH 组结肠微生物 α 多样性的各项指标均无显著差异, 3 组的 OTU 数目存在显著差异, 说明饲喂生物发酵稻秸对湖羊结肠微生物菌群结构没有显著影响, 但是微生物的相对丰度发生改变。

瘤胃是反刍动物特有的消化器官, 同时也是反刍动物在断奶后主要的消化场所。瘤胃上皮由密集的瘤胃乳头组成, 其功能不仅可以吸

收和转运瘤胃中的 VFA 等代谢产物, 还执行着屏障功能, 能够阻止脂多糖、组胺等有害物质进入血液循环。瘤胃上皮形态主要受日粮组成结构和营养水平等因素的影响^[43-44]。李蒋伟等^[45]的研究表明, 日粮中的精粗比会影响瘤胃的上皮形态, 当日粮中精粗比的比例为 1:1 时, 早期断奶藏羔羊的瘤胃乳头及角化层发育更好。Tamate 等^[46]的研究表明, 日粮的化学组成与结构会影响犊牛瘤胃乳头的发育。张庆丽^[47]的研究表明, 低能低蛋白组的羔羊瘤胃乳头长度和宽度均显著降低。Baldwin 等^[48]的研究还揭示了, 瘤胃上皮角质层的厚度会影响瘤胃上皮营养素被吸收运转的效率。瘤胃上皮的角质层由 3–4 层细胞构成, 与瘤胃内容物直接接触, 起到了保护瘤胃上皮的作用, 并最终脱落到瘤胃内。而颗粒层中没有皮脂腺, 能自由地运输水分。本研究结果显示, SRS 组和 AH 组瘤胃上皮总厚度、角质层厚度均显著高于 RT 组 ($P < 0.05$)。上述结果说明饲喂生物发酵稻秸可能比饲喂稻秸更有利于湖羊瘤胃上皮的生长发育, 并提高了湖羊瘤胃上皮对营养素转运和吸收的效率。

小肠也是动物对营养物质进行消化吸收的重要场所, 动物机体摄取的营养会影响小肠黏膜的发育^[49]。绒毛高度、隐窝深度和绒隐比都是衡量小肠吸收功能的重要指标, 绒毛越高, 相对吸收的表面积越大, 吸收能力也就越强^[50]。张庆丽^[47]研究发现, 低能低蛋白日粮会显著降低羔羊空肠的绒毛高度、宽度与表面积。小肠隐窝是小肠上皮凹陷形成的管状结构, 隐窝深度和小肠上皮细胞更新速度呈正相关^[51]。绒隐比能够综合反映小肠的吸收功能, 绒隐比的增加表示小肠吸收作用的加强^[52]。本研究结果显示, 与 RT 组相比, SRS 组湖羊空肠的绒毛高度和隐窝深度显著增加 ($P < 0.05$), 说明饲喂生物

发酵稻秸会促进湖羊空肠上皮的生长发育, 从而提高动物机体对营养物质的吸收。

饲料被反刍动物摄取进入胃肠道, 其中蛋白质和碳水化合物需要经酶降解成游离态氨基酸、小肽及葡萄糖等小分子物质, 并且通过相应的转运载体转运才能进一步被瘤胃吸收和利用^[53]。瘤胃上皮中的紧密连接蛋白主要由跨膜蛋白 Occludin 家族、膜周蛋白家族 ZO 及 Claudin 蛋白家族组成。Claudin-1 基因表达和细胞间紧密连接骨架蛋白有关, PAT1 蛋白和 DRA 蛋白与挥发性脂肪酸的转运有关^[54]。与 AH 组相比, SRS 组湖羊瘤胃上皮中的 Claudin-1、Claudin-4、ZO-1 和 PAT1 基因的表达量显著下调($P<0.05$), DRA 基因表达量显著上调($P<0.05$)。与 RT 组相比, SRS 组的 ZO-1 基因表达量显著下调($P<0.05$)。与瘤胃发酵参数的试验结果联系起来看, 我们推测饲喂生物发酵稻秸可能改变了湖羊瘤胃上皮的物理屏障结构, 使瘤胃发酵产生的 VFA 更易于扩散, 增加了 VFA 进入瘤胃上皮细胞的量, 进而更易于反刍动物对其的吸收和利用, 以供其自身的生长发育。也有研究发现, 细胞因子基因的表达上调并不一定会引起相应的蛋白的表达量增加^[55], 其具体影响机理还需更深一步地探讨。

4 结论

饲喂生物发酵稻秸促进湖羊瘤胃上皮组织和瘤胃乳头发育, 增加空肠绒毛高度与隐窝深度, 改善空肠上皮形态, 但对结肠发酵参数和上皮形态没有显著影响。生物发酵稻秸改变湖羊消化道的内环境与菌群结构, 增加消化道中的微生物多样性。生物发酵技术能够通过促进瘤胃及空肠发育和改善肠道微生物结构, 提高稻秸的饲喂价值, 从而缓解国内粗饲料短缺, 且秸秆利用不足的状况。

参考文献

- [1] 高祥照, 马文奇, 马常宝, 张福锁, 王运华. 中国作物秸秆资源利用现状分析[J]. 华中农业大学学报, 2002, 21(3): 242-247.
GAO XZ, MA WQ, MA CB, ZHANG FS, WANG YH. Analysis on the current status of utilization of crop straw in China[J]. Journal of Huazhong Agricultural, 2002, 21(3): 242-247 (in Chinese).
- [2] 刘巽浩, 王爱玲, 高旺盛. 实行作物秸秆还田促进农业可持续发展[J]. 作物杂志, 1998(5): 1-5.
LIU XH, WANG AL, GAO WS. Implementing crop straw returning to field to promote agricultural sustainable development[J]. Crops, 1998(5): 1-5 (in Chinese).
- [3] 高利伟, 马林, 张卫峰, 王方浩, 马文奇, 张福锁. 中国作物秸秆养分资源数量估算及其利用状况[J]. 农业工程学报, 2009, 25(7): 173-179.
GAO LW, MA L, ZHANG WF, WANG FH, MA WQ, ZHANG FS. Estimation of nutrient resource quantity of crop straw and its utilization situation in China[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2009, 25(7): 173-179 (in Chinese).
- [4] WANG DD, ZHAO CC, LIU SM, ZHANG T, YAO JH, CAO YC. Effects of *Piromyces* sp. CN₆ CGMCC 14449 on fermentation quality, nutrient composition and the *in vitro* degradation rate of whole crop maize silage[J]. AMB Express, 2019, 9(1): 121.
- [5] 尹珺伊, 刘秋瑾, 王欢, 金振华, 孙金艳, 史同瑞. 复合益生菌协同复合酶发酵对玉米秸秆青贮品质的影响[J]. 中国饲料, 2022(9): 136-140.
YIN JY, LIU QJ, WANG H, JIN ZH, SUN JY, SHI TR. Effect on quality of corn straw silage of fermented with compound probiotics and compound enzyme[J]. China Feed, 2022(9): 136-140 (in Chinese).
- [6] 马晨, 张和平, 刘彩虹, 赵洁. 牛瘤胃与肠道微生物多样性的研究进展[J]. 动物营养学报, 2014, 26(4): 852-862.
MA C, ZHANG HP, LIU CH, ZHAO J. Research advance in ruminal and intestinal microbes diversity in cattle[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2014, 26(4): 852-862 (in Chinese).
- [7] XU Y, AUNG M, SUN ZY, ZHOU YQ, CHENG YF, HAO LZ, PADMAKUMAR V, ZHU WY. Bio-fermentation improved rumen fermentation and decreased methane concentration of rice straw by altering the particle-attached microbial community[J]. Fermentation, 2022, 8(2): 72.

- [8] MENTSCHER J, LEISER R, MÜLLING C, PFARRER C, CLAUS R. Butyric acid stimulates rumen mucosa development in the calf mainly by a reduction of apoptosis[J]. *Archiv Für Tierernaehrung*, 2001, 55(2): 85-102.
- [9] 张兴夫, 杜瑞平, 王丽芳, 宋利文, 朱春侠, 祁云霞, 杨坤, 金海. 全株玉米青贮混合日粮对育肥羔羊胃肠道形态及抗氧化能力的影响[J]. *饲料工业*, 2020, 41(13): 34-38.
ZHANG XF, DU RP, WANG LF, SONG LW, ZHU CX, QI YX, YANG K, JIN H. Effect of corn silage mixed diet on gastrointestinal morphology and antioxidant capacity in fattening lambs[J]. *Feed Industry*, 2020, 41(13): 34-38 (in Chinese).
- [10] 李成云, 宋铁镇, 秦炜赅. 不同添加剂处理对鲜稻草青贮营养价值及适口性的影响[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2006(9): 59-60.
LI CY, SONG TZ, QIN WZ. Effects of different additive treatments on nutritional value and palatability of fresh rice straw silage[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2006(9): 59-60 (in Chinese).
- [11] 孔祥浩, 贾志海, 郭金双. 反刍动物后肠道对碳水化合物的消化吸收研究进展[J]. *中国畜牧杂志*, 2005, 41(2): 36-38.
KONG XH, JIA ZH, GUO JS. Advance in carbohydrate digestion and absorption in hindgut of ruminants[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2005, 41(2): 36-38 (in Chinese).
- [12] 王娇. 甜高粱与苜蓿混合青贮对卡拉库尔羊消化道组织形态、酶活性及菌群的影响[D]. 阿拉尔: 塔里木大学硕士学位论文, 2021.
WANG J. Effects of mixed silage of sweet sorghum and alfalfa on tissue morphology, enzyme activity and flora of Karakul sheep digestive tract[D]. Alar: Master's Thesis of Tarim University, 2021 (in Chinese).
- [13] TIVEY DR, SMITH MW. Cytochemical analysis of single villus peptidase activities in pig intestine during neonatal development[J]. *The Histochemical Journal*, 1989, 21(9): 601-608.
- [14] 朱伟云, 毛胜勇, 王全军, 姚文, Theodorou MK. 厌氧真菌体外发酵筛选技术的研究[J]. *南京农业大学学报*, 2001, 24(3): 44-48.
ZHU WY, MAO SY, WANG QJ, YAO W, THEODOROU MK. Study on the screening of anaerobic fungi by *in vitro* fermentation[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2001, 24(3): 44-48 (in Chinese).
- [15] KRISHNAMOORTHY U, MUSCATO TV, SNIFFEN CJ, van SOEST PJ. Nitrogen fractions in selected feedstuffs[J]. *Journal of Dairy Science*, 1982, 65(2): 217-225.
- [16] CHOPRA S, KANWAR JS. *Analytical Agricultural Chemistry*[M]. India: Kalyani Publishers, 1976.
- [17] van SOEST PJ, ROBERTSON JB, LEWIS BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition[J]. *Journal of Dairy Science*, 1991, 74(10): 3583-3597.
- [18] WILLIAM H. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 13th ed[M]. Washington DC: AOAC International Publisher, 1980.
- [19] SIBBALD IR. A bioassay for true metabolizable energy in feeding stuffs[J]. *Poultry Science*, 1976, 55(1): 303-308.
- [20] BRUSETTI L, BORIN S, MORA D, RIZZI A, RADDADI N, SORLINI C, DAFFONCHIO D. Usefulness of length heterogeneity-PCR for monitoring lactic acid bacteria succession during maize ensiling[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2006, 56(1): 154-164.
- [21] JIN W, MENG ZX, WANG J, CHENG YF, ZHU WY. Effect of nitrooxy compounds with different molecular structures on the rumen methanogenesis, metabolic profile, and methanogenic community[J]. *Current Microbiology*, 2017, 74(8): 891-898.
- [22] MAKKAR HPS, SHARMA OP, DAWRA RK, NEGI SS. Simple determination of microbial protein in rumen liquor[J]. *Journal of Dairy Science*, 1982, 65(11): 2170-2173.
- [23] ODONGO NE, ALZAHAL O, LINDINGER MI, DUFFIELD TF, VALDES EV, TERRELL SP, MCBRIDE BW. Effects of mild heat stress and grain challenge on acid-base balance and rumen tissue histology in lambs[J]. *Journal of Animal Science*, 2006, 84(2): 447-455.
- [24] HOLLE SA, BIRTLES MJ. An immunocytochemical method for studying patterns of cell proliferation in the wool follicle[J]. *New Zealand Veterinary Journal*, 1990, 38(3): 89-93.
- [25] STEELE MA, SCHIESTEL C, ALZAHAL O, DIONISSOPOULOS L, LAARMAN AH, MATTHEWS JC, MCBRIDE BW. The periparturient period is associated with structural and transcriptomic adaptations of rumen papillae in dairy cattle[J]. *Journal of Dairy Science*, 2015, 98(4): 2583-2595.

- [26] ZOETENDAL EG, AKKERMANS AD, de vos WM. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(10): 3854-3859.
- [27] BOLGER AM, LOHSE M, USADEL B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(15): 2114-2120.
- [28] SCHLOSS PD, WESTCOTT SL, RYABIN T, HALL JR, HARTMANN M, HOLLISTER EB, LESNIEWSKI RA, OAKLEY BB, PARKS DH, ROBINSON CJ, SAHL JW, STRES B, THALLINGER GG, van HORN DJ, WEBER CF. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(23): 7537-7541.
- [29] DESANTIS TZ, HUGENHOLTZ P, LARSEN N, ROJAS M, BRODIE EL, KELLER K, HUBER T, DALEVI D, HU P, ANDERSEN GL. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(7): 5069-5072.
- [30] LIU JH, XU TT, LIU YJ, ZHU WY, MAO SY. A high-grain diet causes massive disruption of ruminal epithelial tight junctions in goats[J]. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2013, 305(3): R232-R241.
- [31] LAARMAN AH, RUIZ-SANCHEZ AL, SUGINO T, GUAN LL, OBA M. Effects of feeding a calf starter on molecular adaptations in the ruminal epithelium and liver of Holstein dairy calves[J]. *Journal of Dairy Science*, 2012, 95(5): 2585-2594.
- [32] SPEARS JW, SCHLEGEL P, SEAL MC, LLOYD KE. Bioavailability of zinc from zinc sulfate and different organic zinc sources and their effects on ruminal volatile fatty acid proportions[J]. *Livestock Production Science*, 2004, 90(2/3): 211-217.
- [33] ASCHENBACH JR, PENNER GB, STUMPFF F, GÄBEL G. Ruminant nutrition symposium: role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH[J]. *Journal of Animal Science*, 2011, 89(4): 1092-1107.
- [34] 王志, 肖定汉. 奶牛饲养管理与营养代谢性疾病[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1989.
WANG Z, XIAO DH. *Feeding Management and Nutritional Metabolic Diseases in Dairy Cows*[M]. Beijing: China Agricultural University Press, 1989.
- [35] GHAFARI MH, TAHMASBI AM, KHORVASH M, NASERIAN AA, GHAFARI AH, VALIZADEH H. Effects of pistachio by-products in replacement of alfalfa hay on populations of rumen bacteria involved in biohydrogenation and fermentative parameters in the rumen of sheep[J]. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2014, 98(3): 578-586.
- [36] 任伟忠. 奶牛干奶前期饲喂不同粗饲料日粮对其生产性能、血液指标及瘤胃发酵的影响[D]. 保定: 河北农业大学硕士学位论文, 2019.
REN WZ. Effects of different roughage diets fed to the dry cows during the first phase of the dry period on its performance, blood indexes and rumen fermentation[D]. Baoding: Master's Thesis of Hebei Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [37] SINGH KM, AHIR VB, TRIPATHI AK, RAMANI UV, SAJNANI M, KORINGA PG, JAKHESARA S, PANDYA PR, RANK DN, MURTY DS, KOTHARI RK, JOSHI CG. Metagenomic analysis of Surti buffalo (*Bubalus bubalis*) rumen: a preliminary study[J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(4): 4841-4848.
- [38] ASMA Z, SYLVIE C, LAURENT C, JÉRÔME M, CHRISTOPHE K, OLIVIER B, ANNABELLE TM, FRANCIS E. Microbial ecology of the rumen evaluated by 454 GS FLX pyrosequencing is affected by starch and oil supplementation of diets[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2013, 83(2): 504-514.
- [39] PURUSHE J, FOUTS DE, MORRISON M, WHITE BA, MACKIE RI, the North American Consortium for Rumen Bacteria, COUTINHO PM, HENRISSAT B, NELSON KE. Comparative genome analysis of *Prevotella ruminicola* and *Prevotella bryantii*: insights into their environmental niche[J]. *Microbial Ecology*, 2010, 60(4): 721-729.
- [40] NIU WJ, HE Y, WANG HB, XIA CQ, SHI HT, CAO BH, SU HW. Effects of *Leymus chinensis* replacement with whole-crop wheat hay on blood parameters, fatty acid composition, and microbiomes of Holstein bulls[J]. *Journal of Dairy Science*, 2018, 101(1): 246-256.
- [41] BÄCKHED F, DING H, WANG T, HOOPER LV, KOH GY, NAGY A, SEMENKOVICH CF, GORDON JI. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(44): 15718-15723.
- [42] MCNEIL NI. Nutritional implications of human and mammalian large intestinal function[J]. *World Review*

- of Nutrition and Dietetics, 1988, 56: 1-42.
- [43] BEHARKA AA, NAGARAJA TG, MORRILL JL, KENNEDY GA, KLEMM RD. Effects of form of the diet on anatomical, microbial, and fermentative development of the rumen of neonatal calves[J]. *Journal of Dairy Science*, 1998, 81(7): 1946-1955.
- [44] WANG YH, XU M, WANG FN, YU ZP, YAO JH, ZAN LS, YANG FX. Effect of dietary starch on rumen and small intestine morphology and digesta pH in goats[J]. *Livestock Science*, 2009, 122(1): 48-52.
- [45] 李蒋伟, 王志有, 侯生珍, 雷云, 贾建磊, 周力, 桂林生. 日粮精粗比对育肥藏羊瘤胃组织形态及微生物菌群的影响[J]. *草业学报*, 2021, 30(3): 100-109.
- LI JW, WANG ZY, HOU SZ, LEI Y, JIA JL, ZHOU L, GUI LS. Effects of dietary concentrate: roughage ratio on rumen morphology and microbial flora in fattening Tibetan sheep[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2021, 30(3): 100-109 (in Chinese).
- [46] TAMATE H, MCGILLIARD AD, JACOBSON NL, GETTY R. Effect of various dietaries on the anatomical development of the stomach in the calf[J]. *Journal of Dairy Science*, 1962, 45(3): 408-420.
- [47] 张庆丽. 早期能量与蛋白限制饲养对 1 月龄断奶羔羊胃肠道发育的影响[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2010.
- ZHANG QL. Effects of early energy and protein restricted feeding on gastrointestinal development of weaned lambs at the age of 1 month[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest Agricultural and Forestry University, 2010.
- [48] BALDWIN RL 6th, JESSE BW. Developmental changes in glucose and butyrate metabolism by isolated sheep ruminal cells[J]. *The Journal of Nutrition*, 1992, 122(5): 1149-1153.
- [49] CHEN Z, XIE J, WANG B, TANG J. Effect of γ -aminobutyric acid on digestive enzymes, absorption function, and immune function of intestinal mucosa in heat-stressed chicken[J]. *Poultry Science*, 2014, 93(10): 2490-2500.
- [50] 贺琴, 王自蕊, 游金明, 陈丽玲, 熊昊. 酵母壁多糖对断奶仔猪生长性能和小肠黏膜形态结构的影响[J]. *动物营养学报*, 2016, 28(11): 3536-3541.
- HE Q, WANG ZR, YOU JM, CHEN LL, XIONG H. Effects of yeast cell wall polysaccharides on growth performance and small intestinal mucosa morphology of weaned piglets[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2016, 28(11): 3536-3541 (in Chinese).
- [51] CASPARY WF. Physiology and pathophysiology of intestinal absorption[J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1992, 55(1): 299S-308S.
- [52] PAULINI I, MEHTA T, HARGIS A. Intestinal structural changes in african green monkeys after long term psyllium or cellulose feeding[J]. *The Journal of Nutrition*, 1987, 117(2): 253-266.
- [53] 景小平, 彭全辉, 胡瑞, 李倩, 周婷, 裴朝曦, 赵索南, 杨涛, 马朝银, 王之盛. 冷季补饲对藏羊小肠形态发育及营养物质转运载体基因表达量的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2017, 48(2): 260-271.
- JING XP, PENG QH, HU R, LI Q, ZHOU T, PEI ZX, ZHAO SN, YANG T, MA CY, WANG ZS. Effects of supplementation in cold season on morphological development of small intestine and the expression of nutrient transporter gene[J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2017, 48(2): 260-271 (in Chinese).
- [54] BILK S, HUHN K, HONSCHA KU, PFANNKUCHE H, GÄBEL G. Bicarbonate exporting transporters in the ovine ruminal epithelium[J]. *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systems and Environmental Physiology*, 2005, 175(5): 365-374.
- [55] HOLLMANN M, MILLER I, HUMMEL K, SABITZER S, METZLER-ZEBELI BU, RAZZAZI-FAZELI E, ZEBELI Q. Downregulation of cellular protective factors of rumen epithelium in goats fed high energy diet[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e81602.