

研究报告

不同能量代谢率的山羊瘤胃微生物结构与组成的差异性

金磊 周美丽 王禄禄 刘凯珍 王立志*

(四川农业大学动物营养研究所 四川 雅安 625014)

摘要:【背景】能量代谢率是衡量饲料利用效率的一个重要组成部分,提高反刍动物对不同营养物质所含能量的消化代谢率,有助于提高反刍动物对能量的利用效率。【目的】通过高通量测序技术比较不同能量代谢率的山羊瘤胃微生物结构与组成的差异。【方法】以 19 只山羊作为试验动物,通过代谢试验和呼吸测热试验筛选出高能量代谢率表型组(HEU)和低能量代谢率表型组(LEU)山羊各 5 只。分别采集 HEU、LEU 组每只山羊瘤胃内容物,提取微生物总 DNA,用细菌通用引物对细菌 16S rRNA 基因的高可变区进行 PCR 扩增,利用 Illumina MiSeq 平台对扩增子进行高通量测序,并用 QIIME 等软件对测序序列进行生物信息学分析。【结果】拟杆菌门(44.20%±9.39%)、厚壁菌门(16.40%±5.44%)和变形菌门(11.30%±7.42%)在两组山羊瘤胃微生物中均为优势菌门,其中厚壁菌门是两组中共享的优势菌门。LEU 组(6.71%±2.47%)中芽孢杆菌纲相对丰度显著高于 HEU 组($P<0.05$)。两组相对丰度最高的目均为乳酸杆菌目,LEU 组(4.98%±1.88%)乳酸杆菌目相对丰度显著高于 HEU 组($P<0.05$)。在科水平,有 7 个科的相对丰度在组间差异性显著($P<0.05$)。拟杆菌科在两组中均为相对丰度最高的科,LEU 组(3.64%±1.32%)拟杆菌科的相对丰度显著高于 HEU 组($P<0.05$)。在属水平,有 9 个属的相对丰度在组间差异性显著($P<0.05$)。HEU 组(0.61%±0.36%)仅有普雷沃氏菌属的相对丰度显著高于 LEU 组(0.16%±0.07%),其他 8 个属的相对丰度均显著低于 LEU 组($P<0.05$)。其中瘤胃球菌属在 HEU 组(2.53%±0.62%)和 LEU 组(4.19%±1.43%)中均为相对丰度最高的属。【结论】不同能量代谢率的山羊瘤胃微生物结构与组成存在显著性差异。

关键词: 山羊, 能量代谢率, Illumina MiSeq, 微生物

Differences of microbial structure and composition in goat rumens with different energy metabolism efficiency

JIN Lei ZHOU Mei-Li WANG Lu-Lu LIU Kai-Zhen WANG Li-Zhi*

(Animal Nutrition Institute, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China)

Abstract: [Background] Energy metabolism efficiency was an important component of measuring the utilization rate of the diet. Improving the digestion and metabolism efficiency of the energy contained in different nutrients by ruminants was helpful to improve the energy use efficiency of ruminants.

Foundation item: International Science and Technology Cooperation Program of China (2013HH0043)

*Corresponding author: E-mail: wanglizhi08@aliyun.com

Received: March 03, 2017; Accepted: May 26, 2017; Published online (www.cnki.net): June 29, 2017

基金项目: 科技部国际合作项目(2013HH0043)

*通信作者: E-mail: wanglizhi08@aliyun.com

收稿日期: 2017-03-03; 接受日期: 2017-05-26; 网络首发日期(www.cnki.net): 2017-06-29

[Objective] The objective of this study was to compare the structure and composition of ruminal microbiome of goats with different energy metabolism efficiency using Illumina MiSeq sequencing technology. **[Methods]** In total 19 goats were used as experimental animals, among them 5 goats with high energy metabolism efficiency were selected as HEU group and 5 goats with low energy metabolism efficiency as LEU group. Rumen fluid from each goat of HEU and LEU was collected and then total genomic DNA was extracted from the rumen fluids. High variable region of bacterial 16S rRNA genes was amplified by PCR using bacterial universal primers. Analyzing amplicon sequence data on the Illumina MiSeq sequencing platform and biological information analysis using QIIME software were done. **[Results]** Bacteroidetes (44.20%±9.39%), Firmicutes (16.40%±5.44%) and Proteobacteria (11.30%±7.42%) were the dominant bacteria in the rumen microorganisms of goats, among them Firmicutes was the dominant bacteria shared by the two groups. The relative abundance of Bacilli from LEU group (6.71%±2.47%) was significantly higher than that from HEU ($P<0.05$). The relative abundances of Lactobacillales of the two groups were the highest at the order level, and the relative abundance from LEU (4.98%±1.88%) was significantly higher than that from HEU ($P<0.05$). At the family level, the relative abundances of 7 families were significant differences in the two groups ($P<0.05$). The relative abundance of Bacteroidaceae was highest in the two groups, and Bacteroidaceae from group LEU (3.64%±1.32%) was significantly higher than that of group HEU ($P<0.05$). At the genus level, the relative abundances of 9 genus were significant differences ($P<0.05$). Only the relative abundance of *Prevotella* sp. from HEU (0.61%±0.36%) was higher than that in LEU (0.16%±0.07%), but the relative abundances of other 8 genus were significantly lower than LEU ($P<0.05$). The relative abundance of *Ruminococcaceae* sp. was the highest in HEU group (2.53%±0.62%) and LEU (4.19%±1.43%). **[Conclusion]** There are significant differences about structure and composition of rumen microorganisms among goats with different energy metabolism rate.

Keywords: Sheep, Energy metabolism efficiency, Illumina MiSeq, Microorganism

能量是动物体内一切生产和代谢活动的基础,要提高反刍动物对能量的利用效率,关键是提高它们对不同营养物质所含能量的消化代谢率^[1]。瘤胃是反刍动物各种营养物质消化代谢的重要场所,其中的瘤胃微生物在营养物质消化代谢过程中发挥着重要作用。饲料中的三大供能物质(碳水化合物、蛋白质、脂肪)在瘤胃的消化直接影响宿主对饲料能量的利用效率,尤其是饲料中的碳水化合物和蛋白质,70%以上的消化代谢发生在瘤胃,而瘤胃的消化完全依赖于微生物的消化。已有的研究表明,瘤胃微生物在营养物质的消化过程中有着明确的分工。例如,参与纤维素消化的微生物主要有产琥珀酸丝状杆菌、溶纤维丁酸弧菌和瘤胃球菌属等^[2];参与淀粉消化的微生物主要有普雷沃氏菌属、嗜淀粉瘤胃杆菌等^[3];参与蛋白质消化的微生物主要有普雷沃氏菌属、溶纤维丁酸弧菌等^[4]。不同微生物消化营养素以及能量利用的效率存在差

异。因此,反刍动物瘤胃微生物的结构和组成与宿主对饲料能量的代谢效率密切相关。以往受研究技术的限制,研究者采用传统的培养技术^[5]和小规模测序技术^[6]仅明确了小部分瘤胃微生物在能量物质消化利用中的作用,但全面揭示宿主能量代谢率与瘤胃微生物结构与组成关系的研究还未见报道。针对这一问题,本研究拟从遗传背景相同的山羊群体中,通过代谢试验和呼吸测热试验筛选出能量代谢率不同的山羊,采用高通量测序技术比较不同能量代谢率的山羊瘤胃微生物结构与组成的差异性。研究结果将促进人们更清晰地认识瘤胃微生物与宿主能量代谢效率之间的关系,为通过调控瘤胃微生物区系来改善山羊的能量利用效率提供试验依据。

1 材料与amp;方法

1.1 试验动物与饲料

选取 19 只遗传背景一致、年龄 1.5 岁、平均体重 41.60±2.63 kg、阉割的肉用波尔山羊公羊作

为试验动物。整个试验期试羊单笼饲养、自由饮水。饲料的配制参照 National research council (NRC)肉羊饲养标准(2007)和中国肉羊饲养标准(2004), 饲料配方和营养水平见表 1。每日饲料(干物质)按体重 3.5%限制饲喂。

1.2 试验设计与样品采集

整个试验期由 14 d 预饲期、6 d 代谢试验期和 2 d 呼吸测热试验期组成。代谢试验期间山羊单笼饲养, 每日收集山羊排泄的全部粪便和尿液, 取粪和尿总量的 10%, 用 10%盐酸固氮后贮存于-20 °C。代谢试验结束后, 将羊转入呼吸测热笼中, 运用开放式呼吸测热系统测定每只山羊 48 h 氧耗量、

表 1 饲料组成及营养水平(干物质基础)

Table 1 The composition and nutritional ingredient of the diet (dry matter basis)

项目 Items	含量 Content (%)
原料 Ingredients	
苜蓿草粉 Alfalfa meal	34.00
稻草 Rice straw	36.00
玉米 Corn	2.80
大米 Rice	8.40
豆粕 Soybean meal	4.90
小麦麸 Wheat bran	12.90
预混料 Premix ¹	0.50
食盐 NaCl	0.50
营养水平 Nutrition levels ²	
代谢能 Metabolic energy (MJ/kg)	8.10
粗蛋白质 Crude protein	10.63
粗纤维 Crude fiber	24.55
钙 Calcium	0.95
总磷 Total phosphorus	0.35

注: ¹: 预混料是由同一类的多种添加剂或不同类的多种添加剂按一定配比制作而成的匀质混和物, 预混料为每千克饲料提供: Fe 30 mg, Cu 10 mg, Zn 50 mg, Mn 60 mg, VA 2 937 IU, VD 343 IU, VE 30 IU. ²: 营养水平是指饲料中营养成分的含量, 代谢能为计算值, 其余为实测值。

Note: ¹: Premix is a homogeneous mixture made from a variety of additives of the same class or a variety of additives of different kinds according to a certain proportion, Premix provides the following per kg of the diet: Fe: (as ferrous sulfate) 30 mg, Cu: (as copper sulfate) 10 mg, Zn: (as zinc sulfate) 50 mg, Mn: (as manganese sulfate) 60 mg, VA: 2 937 IU, VD: 343 IU, VE: 30 IU. ²: Nutrition level refers to the content of nutrients in the diet, ME is a calculated value and others are measured values.

CO₂ 和 CH₄ 排放量。呼吸测热试验结束的次日晨饲前 1 h 采用胃管法抽取山羊瘤胃内容物, 主要过程为: 将 10 mm 直径聚氯乙烯管连接到一个真空泵(7 mbar), 用开口器打开羊的口腔, 将聚氯乙烯管从羊口腔缓慢插入, 直至瘤胃。打开真空泵电源, 抽取瘤胃内容物, 弃去混入大量唾液的初始瘤胃内容物, 然后再抽取瘤胃内容物约 50 mL 装入充满氮气的样品袋中, 置于冰上。反复拍打样品袋以确保固相微生物充分进入液相, 然后用 4 层纱布过滤得到瘤胃液, 编号分装后迅速将其贮存于-80 °C 用于提取微生物总 DNA。计算 19 只山羊每个个体及群体平均的能量代谢率, 计算公式: 能量代谢率(%)=(总能-粪能-尿能-甲烷能)/总能×100^[7]。将能量代谢率大于群体平均值+0.5 倍标准差的 5 只山羊作为高能量代谢率表型组(High energy metabolism rate group, HEU), 能量代谢率小于群体平均值-0.5 倍标准差的 5 只山羊作为低能量代谢率表型组(Low energy metabolism rate group, LEU)。

1.3 主要试剂和仪器

QIAamp DNA 提取试剂盒、PCR 纯化和回收试剂盒, 德国 Qiagen 公司; NanoDrop 8000 原子分光光度计, 澳大利亚 Thermo Scientific 公司; Taq DNA 聚合酶, 北京全式金生物技术有限公司。QuantiFluor™-ST Fluorometer, 北京普洛麦格生物技术有限公司; PCR 仪, 美国 ABI 公司; Illumina MiSeq 测序系统, 上海美吉生物医药科技有限公司。

1.4 DNA 提取

分别取各瘤胃液样品 2 mL 置于 5 mL 离心管中, 加入 1 mL ASL 缓冲液, 振荡混匀, 用 QIAamp DNA 提取试剂盒提取瘤胃内容物中菌体总 DNA, 具体提取步骤参照试剂盒说明书进行。用 1%琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop 8000 原子分光光度计检测提取的 DNA。提取的 DNA 送往上海美吉公司进行后续的 PCR 扩增及高通量测序。

1.5 PCR 扩增和高通量测序

用细菌通用引物对 515F (5'-GTGCCAGCMGC CGCGGTAA-3')和 806R (5'-GGACTACVSGGGTA

TCTAAT-3'), 以瘤胃内容物菌群总 DNA 为模板, 针对细菌 16S rRNA 基因的 V4 区进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(50 μ L): *Taq* 酶(5 U/ μ L) 0.25 μ L, 10 \times Buffer 5.0 μ L, dNTPs (10 mmol/L) 1.0 μ L, 引物 (10 μ mol/L)各 1.25 μ L, 模板 DNA (50 ng/ μ L) 1.0 μ L, 补 ddH₂O 至 50 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 循环 30 次; 72 $^{\circ}$ C 5 min。

PCR 产物用含溴化乙锭的 2%琼脂糖凝胶电泳鉴定, 并用 PCR 纯化试剂盒纯化和回收。回收的 PCR 产物用 QuantiFluor™-ST fluorometer 定量。送上海美吉生物医药科技有限公司, 利用 Illumina MiSeq 测序平台构建文库及 MiSeq 测序。

构建文库过程: 连接“Y”字形接头; 使用磁珠筛选去除接头自连片段; 利用 PCR 扩增进行文库模板的富集; 氢氧化钠变性, 产生单链 DNA 片段。

MiSeq 测序流程: DNA 片段的一端与引物碱基互补, 固定在芯片上; 另一端随机与附近的另一个引物互补, 也被固定住, 形成“桥”; PCR 扩增, 产生 DNA 簇; DNA 扩增子线性化成为单链; 加入改造过的 DNA 聚合酶和带有 4 种荧光标记的 dNTP, 每次循环只合成一个碱基; 用激光扫描反应板, 读取每个模板序列第一轮反应所聚合上去的核苷酸种类; 将“荧光基团”和“终止基团”化学切割, 恢复 3'端粘性, 继续聚合第 2 个核苷酸; 统计每轮收集到的荧光信号结果, 获知模板 DNA 片段的序列。

1.6 数据统计分析

试验测序得到的原始数据以 Fastq 文件格式保存, 先用 QIIME 1.8.0 软件^[8]对原始数据进行初次质控, 去除序列平均碱基质量值<Q20、未知碱基数>6 及同聚物太大的序列, 只保留 240–500 bp 长度的序列。去除 Barcode 和引物序列, 然后用 Mothur^[9]拼接质控后的序列, 再在 QIIME 软件中按照序列相似性大于 97%的标准, 使用 Uclust^[10]聚类算法将序列聚类为 OTU (Operational taxonomic units), 从中挑选出每个 OTU 的相对丰度最高的序列作为代表序列。利用 PyNAST 法^[11], 将代表序列与基因数据库(Green genes)中的参考序列进行比对, 用

QIIME 软件剔除嵌合体和 Singletons, 并使用 RDF 分类器^[12]对代表序列从门到属进行物种注释。基于 OTU table 和 rep_set. tree 文件及抽样的最大深度, 绘制 OTU 稀释曲线并比较 α 多样性指数的组间差异性; 结合各个样品的 OTU 种类及其丰度进行计算, 获得样品间 Unweighted unifracs 距离矩阵, 并利用加权组平均法(UPGMA)进行聚类分析, 然后绘制 PCoA 聚类图; 根据属水平上物种的结构和组成, 用 R x64 3.0.2 软件绘制核心菌群的聚类热图。用 SPSS 18.0 软件, 对 HEU 和 LEU 组山羊菌群相对丰度的差异性进行独立性样本 *t* 检验, 以 $P<0.05$ 表示差异显著, $P<0.01$ 表示差异极显著, 结果用平均值 \pm 标准差表示。

2 结果与分析

2.1 不同能量代谢率的山羊对饲料营养物质的消化

19 只山羊对饲料的平均能量代谢率为 48.91% \pm 2.67%, 变异系数(CV)为 5.46。由表 2 可知, HEU 组的 DM、OM 和 CP 的表观消化率极显著($P<0.01$)高于 LEU 组, NDF 的表观消化率显著($P<0.05$)高于 LEU 组, EE 和 ADF 的表观消化率在组间差异不显著($P>0.05$)。

表 2 饲料营养物质的表观消化率

Table 2 Apparent digestibility of dietary nutrients (%)

项目 Items	HEU (n=5)	LEU (n=5)
干物质 Dry matter (DM)	59.75 \pm 1.06	55.99 \pm 1.27
有机物 Organism (OM)	62.67 \pm 1.66	58.56 \pm 1.50
粗脂肪 Crude fat (EE)	75.25 \pm 9.47	71.27 \pm 5.56
粗蛋白 Crude protein (CP)	66.09 \pm 1.89	61.13 \pm 0.72
酸性洗涤纤维	55.73 \pm 6.20	48.73 \pm 11.91
Acid detergent fiber (ADF)		
中性洗涤纤维	58.59 \pm 1.87	54.00 \pm 3.31
Neutral detergent fiber (NDF)		

注: 同行数据无字母表示差异不显著($P>0.05$), 不同小写字母表示差异显著($P<0.05$), 不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$)。下同。

Note: In the same row, values with no letter superscripts mean no significant difference ($P>0.05$); while with different small letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$), and with different capital letter superscripts mean extremely significant difference ($P<0.01$). The same as below.

2.2 不同能量代谢率的山羊对饲料能量的代谢

由表 3 可知, HEU 组的 GE、DE 和 ME 极显著($P<0.01$)高于 LEU 组, FE 极显著($P<0.01$)低于 LEU 组; HEU 组的 DE/GE、ME/GE 极显著($P<0.01$)高于 LEU 组, FE/GE 极显著($P<0.01$)低于 LEU 组, 其他指标在组间差异不显著($P>0.05$)。

2.3 不同能量代谢率的山羊瘤胃微生物多样性分析

2.3.1 样品序列及 OTU 统计

测序共获得 602 481 条有效序列, 平均每个样品含有 $60\ 248\pm 23\ 334$ 条序列。基于相似性大于 97% 的原则, 将获得的有效序列进行聚类, 共获得 19 526 个 OTU, 不考虑处理效应, 平均每个样品含 $5\ 181\pm 1\ 014$ 个 OTU。其中 HEU 组有 10 726 个 OTU, LEU 组 11 243 个, 两组间共享的 OTU 有 2 443 个(图 1)。经计算, HEU 组和 LEU 组的序列覆盖度(Coverage)分别为 77.22%和 78.27%。

样品稀释曲线如图 2 所示, 在试验的测序深度下, 各条曲线最终均趋于平缓, 说明试验的测序量足以覆盖各样品的大多数微生物。在相同测序深度下, OTU 数由高到低的 HEU 组内样品依次为 HEU2、HEU1、HEU5、HEU4 和 HEU3, 而 LEU

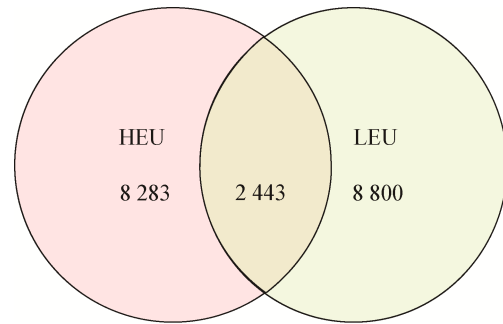


图 1 OTU 维恩图

Figure 1 OTU venn diagram

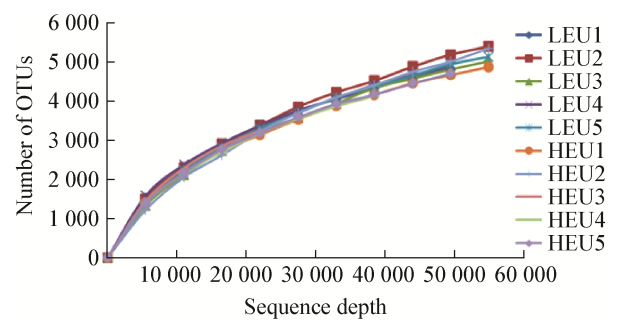


图 2 各样品的稀释曲线

Figure 2 Rarefaction curves of each sample

组内各样品 OTU 数由高到低分别为 LEU2、LEU5、LEU3、LEU4 和 LEU1。

2.3.2 Alpha 多样性分析

表 4 列出了 HEU 组和 LEU 组样品的 PD_whole_tree 指数、Chao1 指数和 Shannon 指数, Alpha 多样性指数主要用于评价样品中微生物的丰富性和均匀性。由表 4 可以看出, 在同一测序深度下(16 501 条序列), LEU 组的 Alpha 多样性指数在数值上均大于 HEU 组, 但差异不显著($P>0.05$)。

2.3.3 Beta 多样性分析

根据样本 OTU 的种类及其相对丰度, 通过计算各个样本间加权遗传距离矩阵绘制 PCoA 聚类图。由图 3 可知, HEU 组的样品依据所处组别而相互聚类到一起, 表明 HEU 组内相似性比组间相似性高; LEU 组样品并没有依据其组别而表现出明显的组内聚集。HEU 组组内个体聚集度相对高于 LEU 组, 说明 HEU 组组内个体间微生物结构与组成的相似性高于 LEU 组。

表 3 HEU 和 LEU 组山羊对饲料能量的代谢

Table 3 Dietary energy metabolism of goats in high and low energy utilization capacity group

项目 Items	HEU (n=5)	LEU (n=5)
能量的采食和排泄 Energy intake and output (MJ/d)		
总能 Gross energy (GE)	18.39±0.16 ^A	18.04±0.19 ^B
粪能 Fecal energy (FE)	7.06±0.44 ^A	7.93±0.24 ^B
尿能 Urine energy (UE)	0.46±0.11	0.50±0.09
甲烷能 Methane energy (E _{CH₄})	1.26±0.16	1.17±0.16
消化能 Digestible energy (DE)	11.33±0.47 ^A	10.12±0.19 ^B
代谢能 Metabolic energy (ME)	9.55±0.45 ^A	8.37±0.25 ^B
能量利用率 Energy utilization (%)		
DE/GE	61.62±2.39 ^A	56.07±1.12 ^B
ME/GE	51.94±2.43 ^A	46.40±1.21 ^B
FE/GE	38.38±2.39 ^A	43.93±1.12 ^B
UE/GE	2.50±0.58	2.79±0.52
E _{CH₄} /GE	6.85±0.86	6.51±0.94

表 4 组间 α 多样性指数的差异性比较

Table 4 Comparison of alpha diversity indices between groups

α 多样性指数 Alpha diversity indices	HEU (n=5)	LEU (n=5)
PD_whole_tree	203.42±14.26	218.05±6.87
Chao1	5 251.32±486.57	5 526.24±267.18
Shannon	8.45±0.45	8.60±0.41

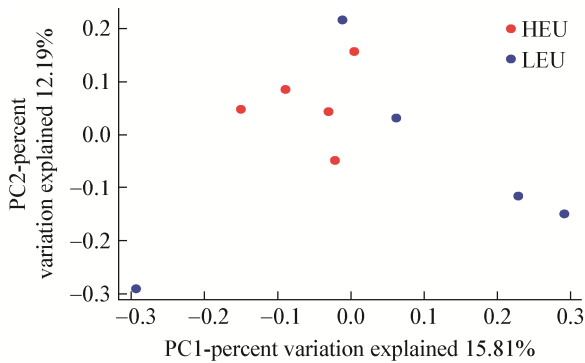


图 3 Principal coordinate analysis 聚类分析

Figure 3 Cluster analysis by principal coordinate analysis

2.3.4 不同分类水平上的物种组成分析

将试验所得有效序列在不同分类水平上进行物种注释和统计,结果表明,在门水平上共注释得到 48 个菌。厚壁菌门(Firmicutes, 16.40%±5.44%)、拟杆菌门(Bacteroidetes, 44.20%±9.39%)和变形菌门(Proteobacteria, 11.30%±7.42%)在两组中均为优势

菌门,其在 HEU 组和 LEU 组中的相对丰度依次为 13.59%±2.36%、45.27%±8.17%、10.35%±9.11% 和 19.00%±6.25%、42.59%±11.11%、12.46%±6.29%。厚壁菌门是两组中共享的优势菌门。两个处理组中,相对丰度大于 0.1%的门共有 19 个,在组间的差异性均不显著($P>0.05$),其在门水平上的菌群组成见图 4。

在纲水平上共注释得到 150 个菌,相对丰度大于 0.1%的有 34 个,HEU 组芽孢杆菌纲(Bacilli)相对丰度显著低于 LEU 组($P<0.05$)。在目水平上共注释得到 300 个菌,相对丰度大于 0.1%的菌有 47 个。其中,HEU 组中隶属于厚壁菌门(Firmicutes)的乳酸杆菌目(Lactobacillales)、芽孢杆菌目(Bacillales)和嗜酸菌门下的 RB41 目的相对丰度均显著低于 LEU 组($P<0.05$) (表 5)。

在科水平上,共注释得到 300 个菌,相对丰度大于 0.1%的有 47 种。共有 7 个科的相对丰度在组间存在显著性差异($P<0.05$),详见表 5。其中厚壁菌门下有 4 个科存在较大的组间差异性,HEU 组中肠球菌科(Enterococcaceae)、乳杆菌科(Lactobacillaceae)、芽孢杆菌科(Bacillaceae)和梭菌科(Clostridiaceae)的相对丰度显著低于 LEU 组($P<0.05$)。

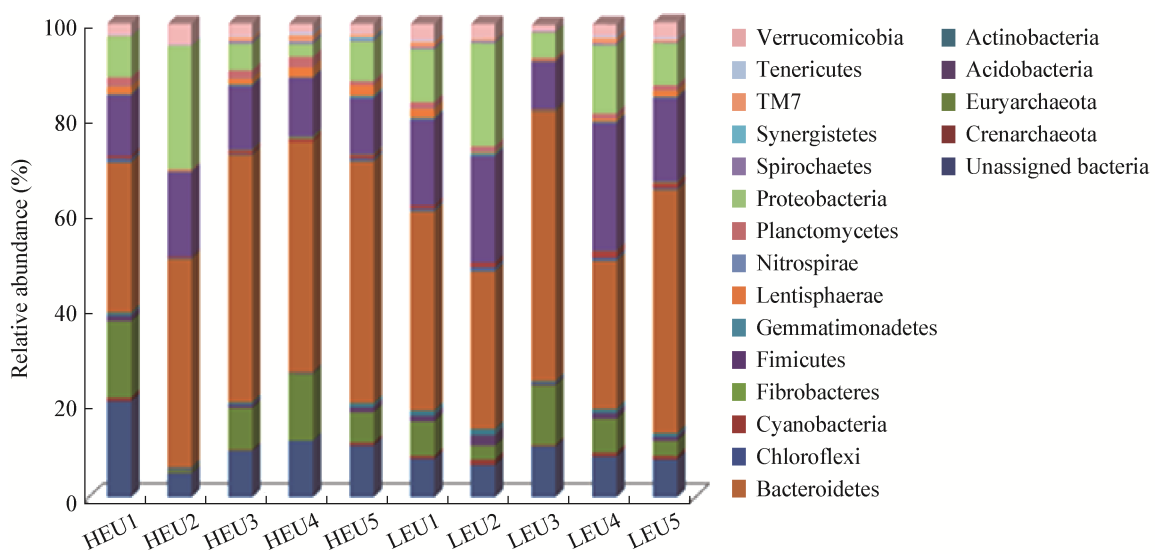


图 4 门水平上的菌群组成

Figure 4 Composition of microbial at phylum level

表 5 HEU 和 LEU 组从纲到属水平上相对丰度差异性显著的菌群分布

Table 5 Distribution of microbes whose relative abundance is significant different between HEU and LEU from class to genus level (%)

分类单元 Taxa	相对丰度 Relative abundance		P value	
	HEU (n=5)	LEU (n=5)		
纲 Class	Bacilli	2.83±1.38	6.71±2.47	0.015
目 Order	Lactobacillales	2.17±1.09	4.98±1.88	0.020
	Bacillales	0.65±0.34	1.72±0.73	0.018
科 Family	RB41	0.15±0.11	0.29±0.15	0.031
	Enterobacteriaceae	1.27±0.44	2.43±0.86	0.027
	Bacillaceae	0.51±0.26	1.57±0.73	0.016
	Clostridiaceae	0.18±0.04	0.27±0.05	0.020
	Sinobacteraceae	0.08±0.04	0.21±0.09	0.018
	Shewanellaceae	0.07±0.04	0.24±0.12	0.035
	Lactobacillaceae	0.71±0.59	2.23±1.11	0.020
	Bacteroidaceae	1.84±0.60	3.64±1.32	0.025
	*Enterococcaceae (Other) sp.	1.13±0.38	2.15±0.75	0.025
属 Genus	<i>Lactobacillus</i> sp.	0.71±0.59	2.23±1.02	0.020
	<i>Bacillus</i> sp.	0.49±0.25	1.49±0.71	0.018
	<i>Clostridium</i> sp.	0.09±0.04	0.15±0.04	0.043
	* <i>Ruminococcaceae</i> sp.	2.53±0.62	4.19±1.43	0.044
	<i>Shewanella</i> sp.	0.07±0.04	0.24±0.12	0.035
	<i>Bacteroides</i> sp.	0.75±0.27	1.43±0.52	0.031
	* <i>Bacteroidaceae</i> sp.	0.46±0.19	1.11±0.45	0.017
	(<i>Prevotella</i>) sp.	0.61±0.36	0.16±0.07	0.027

属水平上共注释得到 857 种菌,限于属种类多且部分属的相对丰度较低,几乎没有研究价值或培养技术等限制无法对其功能进行研究,因而仅对相对丰度大于 0.1%的 69 个属进行多样性研究。分析得知,共有 9 个属的相对丰度在组间存在显著性差异($P<0.05$),详见表 5。其中 HEU 组中厚壁菌门下的 5 个属[肠球菌科的 Other 属、乳杆菌属(*Lactobacillus* sp.)、芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)、梭菌属(*Clostridium* sp.)和**Ruminococcaceae* sp.]、隶属于变形菌门(Proteobacteria)的希瓦氏菌属(*Shewanella* sp.)和拟杆菌门的 2 个属[拟杆菌属(*Bacteroides* sp.)和**Bacteroidaceae* sp.]共 8 个属的相对丰度均显著低于 LEU 组,HEU 组(0.61%±0.36%)仅有属于拟杆菌门的普雷沃氏菌属[(*Prevotella*) sp.]相对丰度显著($P<0.05$)高于 LEU 组(0.16%±0.07%)。

2.3.5 共享属分析

HEU 组和 LEU 组组间共有 69 个共享属,相对丰度大于 0.5%的共享属有 30 个,占共享属总菌群相对丰度的 84.54%,针对 30 个共享属绘制聚类热图。由图 5 可知,除 LEU3 和 HEU1 外,其他各个样品依据所处组别不同而相互聚类到一起,表明组内共享菌群相似性比组间高。由系统发育树可以看出,HEU 组中 HEU3 和 HEU4 聚为一簇,LEU 组中 LEU1 和 LEU5 聚为一簇,它们的菌群相似性相对高于同组内其他样品。整体上,共享属的相对丰度在各个样品间存在较大差异。

3 讨论

以往研究表明,反刍动物的能量代谢效率主要受饲料精粗比、饲草种类、饲料添加剂等因素的影响^[13-16]。但本试验结果表明,即使饲喂同一饲料

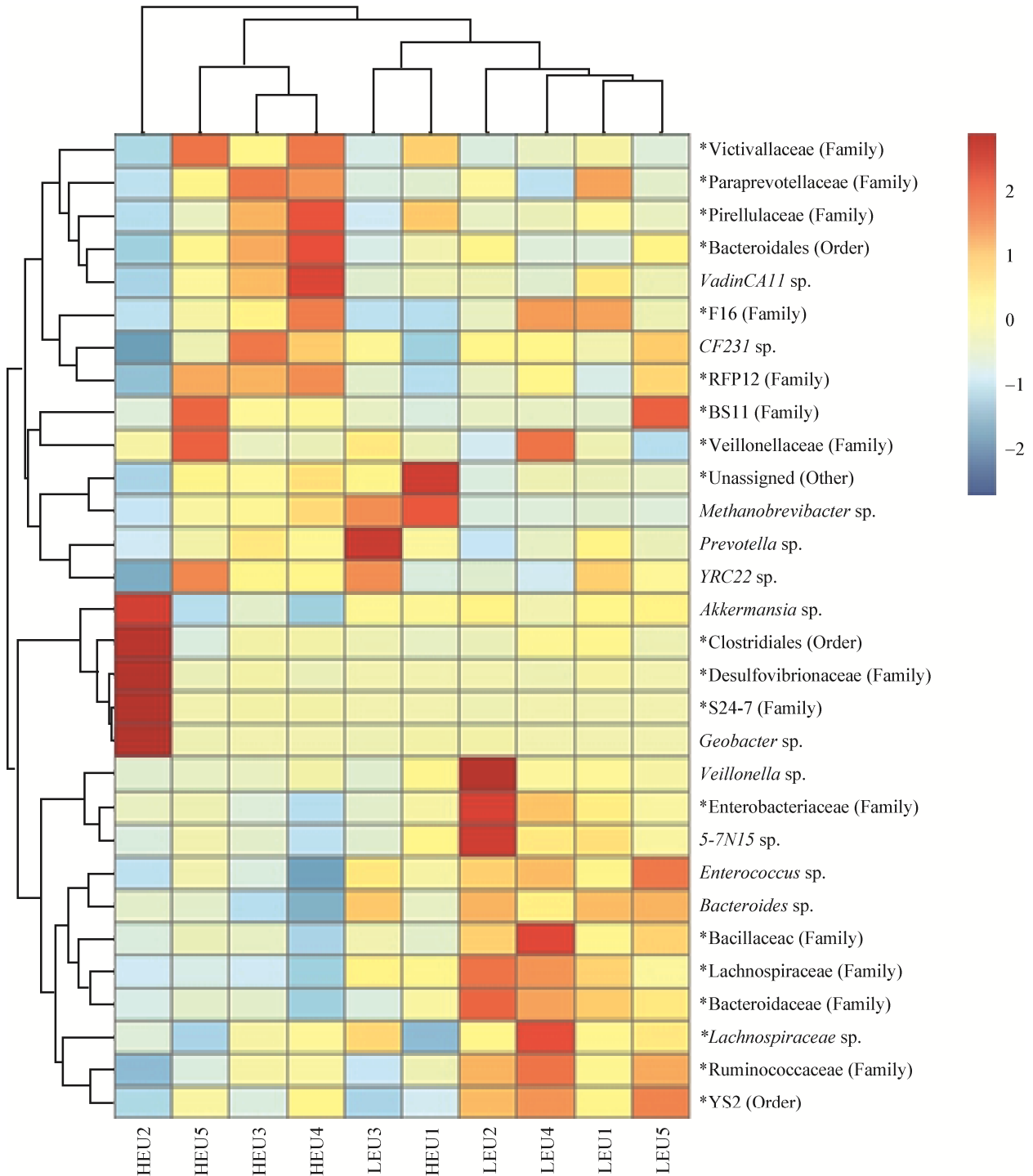


图 5 共享菌群在属水平上的聚类热图

Figure 5 Log-scaled percentage heatmap of bacteria community structure at the shared-genus level

注：越偏红色表示相对丰度越高，越偏蓝色表示丰度越低。对于不能分类到属水平，但仍然出现在各样品中的共享序列，用其最高分类水平表示。

Note: The closer to red, the higher of their relative abundance, while the closer to blue, the lower of their relative abundance. The shared sequences, which could not be classified to any genus but still existed in samples, were expressed using the highest classification level that can be assigned to them.

并且遗传背景相同的山羊,其能量代谢率也存在显著的个体差异。这在以往的研究中还未见正式的报道。但前人的研究曾发现,给具有相同遗传背景的肉牛提供相同饲料时,肉牛对饲料的利用效率存在显著的个体差异^[17];这种现象在猪、禽的研究中也有相关报道^[18-19]。这说明饲料利用效率的个体差异现象是普遍存在的。因此,能量代谢率作为衡量饲料利用效率的一个重要因素,其存在显著的个体差异也应该是一种正常现象。

在本研究中,HEU 组山羊能量的代谢率极显著高于 LEU 组。通过能量代谢分析发现,导致 HEU 组能量代谢率较高的原因主要是由于 HEU 组粪能极显著低于 LEU 组,这就意味着导致两组山羊能量代谢率出现差异的原因是 HEU 组山羊提高了对饲料能量的消化率。进一步分析发现,HEU 组山羊能量消化率的提高主要是由饲料中粗蛋白质和中性洗涤纤维等有机物消化率的提高贡献的。对于反刍动物而言,瘤胃是其营养物质消化利用的主要场所,饲料中 70%以上的蛋白质和纤维是在瘤胃中被消化的。反刍动物瘤胃自身不能分泌消化酶,营养物质在瘤胃中的消化完全依赖于其中共生的微生物。因此,导致本研究中两组山羊能量代谢率出现差异的根本原因可能是由于瘤胃微生物结构与组成的差异造成的。根据这个思路,我们采用高通量测序技术对比了两组山羊瘤胃微生物的差异。

本研究发现,LEU 组山羊瘤胃内乳酸杆菌属(*Lactobacillus* sp.)的相对丰度显著高于 HEU 组。以往的研究发现,瘤胃内乳酸杆菌的相对丰度与瘤胃乳酸的浓度呈正相关^[20],而瘤胃内乳酸的浓度又与瘤胃的功能密切相关。瘤胃内乳酸浓度过高会导致瘤胃微生物菌群失衡、反刍停滞、瘤胃酸中毒等,而且会降低瘤胃对营养物质的消化利用效率^[21-22]。LEU 组有机物消化率低的原因,可能正是与其瘤胃中过高的乳酸杆菌丰度有关。但本研究没有检测瘤胃乳酸的浓度,这种推测正确与否还需要进一步研究证实。

前人研究认为,瘤胃球菌属(*Ruminococcaceae* sp.)是瘤胃中主要的纤维降解菌,该属所含的白色瘤胃球菌和黄色瘤胃球菌能分泌大量的纤维素酶和半纤维素酶^[23-24],其丰度的提高能显著促进瘤胃内营养物质的消化利用。但是,本研究中 HEU 组山羊对饲料中性洗涤纤维的消化率显著高于 LEU 组,瘤胃球菌属的相对丰度却显著低于 LEU 组,这与以往人们的认识不一致。造成这种差异的原因,可能是由于以往研究瘤胃微生物只能采用纯培养技术和小规模测序技术,由于技术的限制,瘤胃球菌属在纤维中降解的作用被过分夸大了。因为瘤胃中的纤维降解菌除瘤胃球菌外,还有产琥珀酸丝状杆菌、溶纤维丁酸弧菌和梭菌等。已有大量研究表明,瘤胃球菌属的相对丰度在瘤胃微生物中仅占很小的比例^[5,25],并且 Kobayashi 等^[26]通过实时定量 PCR 分析发现最主要的纤维降解菌是产琥珀酸丝状杆菌,而不是瘤胃球菌。

本研究中 HEU 组山羊的能量消化率显著高于 LEU 组,还可能与其瘤胃中普雷沃菌属(*Prevotella* sp.)的相对丰度较高有关。Avguštin 等^[27]研究表明,普雷沃菌属主要包括布氏普雷沃氏菌、短普雷沃氏菌和栖瘤胃普雷沃氏菌,普雷沃菌属虽然不能降解纤维素,但其中的栖瘤胃普雷沃氏菌却是瘤胃中主要的蛋白降解菌之一;布氏普雷沃氏菌和栖瘤胃普雷沃氏菌均能降解淀粉、木聚糖等营养物质^[28];短普雷沃氏菌能以葡萄糖、乳糖和纤维二糖等作为发酵底物^[27]。由此可见,反刍动物瘤胃内的普雷沃菌属对多种营养物质的降解都有着极其重要的作用。可能正是因为 HEU 组山羊瘤胃内的普雷沃菌属丰度较高,提高了饲料中蛋白质、淀粉和半纤维素等有机物的消化率,从而提高了 HEU 组山羊的能量消化率。

本研究发现厚壁菌门(Firmicutes)在两组山羊瘤胃中均为优势菌门。研究表明,动物胃肠道中厚壁菌门的相对丰度与饲料中干草含量呈显著正相关^[29]。本研究的山羊饲料中含有大量的苜蓿草粉和稻草,这可能是导致厚壁菌门是两组山羊瘤胃中共

有的优势菌门的重要原因。以往的研究还发现,拟杆菌门(Bacteroidetes)和变形菌门(Proteobacteria)在很多草食动物胃肠道微生物中均为优势菌门^[30-33],这与本研究结果一致。

4 结论

能量代谢率不同的两组山羊瘤胃微生物,在门水平上,拟杆菌门、厚壁菌门和变形菌门在两组山羊瘤胃微生物中均为优势门,厚壁菌门是两组共有的优势菌门;从纲到属水平,有1个纲3个目7个科和9个属在组间差异性显著;在组间差异显著的菌群中,HEU组仅有普雷沃氏菌属的相对丰度显著高于LEU组,其他菌群相对丰度均显著低于LEU组。

REFERENCES

- [1] Mu AL, Wu NK, Liu FX, et al. Study on energy requirement and metabolic rule of 4~6 months calves[J]. Journal of Domestic Animal Ecology, 2007, 28(1): 23-26 (in Chinese)
穆阿丽, 吴乃科, 刘法孝, 等. 4~6月龄杂交犊牛能量需要量及其代谢规律的研究[J]. 家畜生态学报, 2007, 28(1): 23-26
- [2] Kim M, Yu ZT. Quantitative comparisons of select cultured and uncultured microbial populations in the rumen of cattle fed different diets[J]. Journal of Animal Science and Biotechnology, 2012, 3: 28
- [3] Li XP, Jiao JZ, Yan QX, et al. Developmental changes in bacterial colonization and digestive function in ileum of lambs[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2016, 28(3): 731-738 (in Chinese)
李小鹏, 焦金真, 颜琼娴, 等. 山羊羔羊回肠细菌群落定植与消化功能的发育性变化[J]. 动物营养学报, 2016, 28(3): 731-738
- [4] Fernando SC, Purvis HT, Najjar FZ, et al. Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(22): 7482-7490
- [5] Girija D, Deepa K, Xavier F, et al. Analysis of cow dung microbiota-a metagenomic approach[J]. Indian Journal of Biotechnology, 2013, 12(3): 372-378
- [6] Chaudhary PP, Sirohi SK, Saxena J, et al. Diversity analysis of methanogens in rumen of *Bubalus bubalis* by 16S ribotyping and sequence analysis[J]. Gene, 2012, 493(1): 13-17
- [7] Song XW, Wang HM, Zhang GF, et al. Effects of dietary energy level on production performance and energy utilization efficacy of lactating *Laoshan* dairy goats[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2016, 28(4): 1099-1104 (in Chinese)
宋晓雯, 王慧敏, 张广凤, 等. 饲料能量水平对泌乳期崂山奶山羊生产性能及能量利用效率的影响[J]. 动物营养学报, 2016, 28(4): 1099-1104
- [8] Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. Nature Methods, 2010, 7(5): 335-336
- [9] Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, et al. 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
- [10] Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than blast[J]. Bioinformatics, 2010, 26(19): 2460-2461
- [11] Caporaso JG, Bittinger K, Bushman FD, et al. PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment[J]. Bioinformatics, 2010, 26(2): 266-267
- [12] Cole JR, Wang Q, Cardenas E, et al. The ribosomal database project: improved alignments and new tools for rRNA analysis[J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37(S1): D141-D145
- [13] Dong QM, Zhao XQ, Shi JJ, et al. Effect of dietary composition on the digestive and energy metabolisms of yak calves[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2012, 21(3): 281-286 (in Chinese)
董全民, 赵新全, 施建军, 等. 日粮组成对牦犊牛消化和能量代谢的影响[J]. 草业学报, 2012, 21(3): 281-286
- [14] Tang ZH, Zhou L, Zou CX, et al. Effect of sugarcane tops silage and corn straw silage on the growth performance, digestion and metabolism, and blood biochemical indexes of growing buffalo[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2016, 43(1): 92-100 (in Chinese)
唐振华, 周玲, 邹彩霞, 等. 青贮甘蔗尾、青贮玉米秸秆对生长水牛生长性能、消化代谢及血液生化指标的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2016, 43(1): 92-100
- [15] Cui X, Diao QY, Zhang NF, et al. Effects of dietary energy levels on growth performance, digestion and metabolism of nutrients of weaned heifers[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2014, 45(11): 1815-1823 (in Chinese)
崔祥, 刁其玉, 张乃锋, 等. 日粮能量水平对断奶犊牛生长性能及营养物质消化代谢的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2014, 45(11): 1815-1823
- [16] Xiao Y, Tao DY, Zhao MM, et al. Effects of *Bacillus licheniformis* on methane emission, digestion and metabolism of mutton sheep[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2016, 28(2): 515-523 (in Chinese)
肖怡, 陶大勇, 赵明明, 等. 地衣芽孢杆菌对肉羊甲烷排放及消化代谢的影响[J]. 动物营养学报, 2016, 28(2): 515-523
- [17] Richardson EC, Herd RM. Biological basis for variation in residual feed intake in beef cattle. 2. Synthesis of results following divergent selection[J]. Australian Journal of Experimental Agriculture, 2004, 44(5): 431-440
- [18] Tan C, Wang ZS, Wang LZ, et al. Relationship between the rumen microbiome and residual feed intake in beef cattle: a review[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2015, 27(10): 2987-2993 (in Chinese)
谭翠, 王之盛, 王立志, 等. 肉牛剩余采食量与瘤胃微生物

- 菌群关系[J]. 动物营养学报, 2015, 27(10): 2987-2993
- [19] Pu L, Yue HJ, Zhang LC, et al. Current progress in feed utilization efficiency of pig[J]. Journal of China Agricultural University, 2016, 21(4): 77-85 (in Chinese)
蒲蕾, 岳慧洁, 张龙超, 等. 猪饲料利用效率的研究进展[J]. 中国农业大学学报, 2016, 21(4): 77-85
- [20] Coe ML, Nagaraja TG, Sun YD, et al. Effect of virginiamycin on ruminal fermentation in cattle during adaptation to a high concentrate diet and during an induced acidosis[J]. Journal of Animal Science, 1999, 77(8): 2259-2268
- [21] Nocek JE. Bovine acidosis: implications on laminitis[J]. Journal of Dairy Science, 1997, 80(5): 1005-1028
- [22] Kleen JL, Cannizzo C. Incidence, prevalence and impact of SARA in dairy herds[J]. Animal Feed Science and Technology, 2012, 172(S1/2): 4-8
- [23] Wood TM, Wilson CA, Stewart CS. Preparation of the cellulase from the cellulolytic anaerobic rumen bacterium *Ruminococcus albus* and its release from the bacterial cell wall[J]. Biochemical Journal, 1982, 205(1): 129-137
- [24] Doerner KC, White BA. Assessment of the endo-1,4-beta-glucanase components of *Ruminococcus flavefaciens* FD-1[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1990, 56(6): 1844-1850
- [25] Stevenson DM, Weimer PJ. Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 75(1): 165-174
- [26] Kobayashi Y, Shinkai T, Koike S. Ecological and physiological characterization shows that *Fibrobacter succinogenes* is important in rumen fiber digestion-review[J]. Folia Microbiologica, 2008, 53(3): 195-200
- [27] Avguštin G, Wallace RJ, Flint HJ. Phenotypic diversity among ruminal isolates of *Prevotella ruminicola*: proposal of *Prevotella brevis* sp. nov., *Prevotella bryantii* sp. nov., and *Prevotella albensis* sp. nov., and redefinition of *Prevotella ruminicola*[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1997, 47(2): 284-288
- [28] Purushe J, Fatus DE, Morrison M, et al. Comparative genome analysis of *Prevotella ruminicola* and *Prevotella bryantii*: insights into their environmental niche[J]. Microbial Ecology, 2010, 60(4): 721-729
- [29] Chen YH, Penner GB, Li MJ, 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
- [30] Jami E, Mizrahi I. Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals[J]. PLoS One, 2012, 7(3): e33306
- [31] de Filippo C, Cavalieri D, di Paola M, et al. PP90 impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(33): 14691-14696
- [32] Pope PB, Denman SE, Jones M, et al. Adaptation to herbivory by the tammar wallaby includes bacterial and glycoside hydrolase profiles different from other herbivores[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(33): 14793-14798
- [33] Ley RE, Hamady M, Lozupone C, et al. Evolution of mammals and their gut microbes[J]. Science, 2008, 320(5883): 1647-1651