

# 饲料中全棉籽比例对育肥荷斯坦公牛瘤胃发酵与微生物区系、甲烷排放及肝脏碳代谢相关基因表达的影响

王勇胜<sup>1</sup> 李妍<sup>2</sup> 曹玉凤<sup>1\*</sup> 李秋凤<sup>1\*</sup> 薄文喜<sup>3</sup> 高艳霞<sup>1</sup> 李建国<sup>1</sup>

(1.河北农业大学动物科技学院,保定 071001;2.河北农业大学动物医学院,保定 071001;

3.福成五丰食品有限公司,三河 065200)

**摘要:** 本试验旨在研究饲料中全棉籽比例对育肥荷斯坦公牛瘤胃发酵与微生物区系、甲烷排放及肝脏碳代谢相关基因表达的影响。选取 44 头体重相近、健康的育肥荷斯坦公牛,随机分为 4 组,每组 11 头,各组平均体重差异不显著( $P>0.05$ )。I (对照)、II、III 和 IV 组公牛分别饲喂含有 0、5%、10% 和 15% 全棉籽的饲料。各组饲料能量和粗蛋白质水平基本相同。试验期为 90 d。结果表明:1) 在瘤胃发酵参数中,与 I 组相比,IV 组的氨态氮、微生物蛋白浓度以及乙酸和丙酸比例分别提高了 31.34%、40.00%、2.26% 和 15.20% ( $P<0.05$ ),丁酸比例降低了 4.46% ( $P<0.05$ ),乙酸/丙酸和 pH 无显著变化( $P>0.05$ )。2) 从瘤胃细菌属水平的相对丰度分析,IV 组中普雷沃氏菌属-1、密螺旋体属-2 的相对丰度极显著高于 I、II、III 组 ( $P<0.01$ );IV 组的琥珀酸弧菌科 UCG-002 的相对丰度显著高于 I 组 ( $P<0.05$ );理研菌科 RC9 肠道群、普雷沃氏菌科 UCG003、瘤胃杆菌属、疣微菌科 NK4A214 群、纤维杆菌属、未识别的叶绿体和拟杆菌属的相对丰度各组间的差异均不显著 ( $P>0.05$ )。3) 从瘤胃产甲烷古菌属水平的相对丰度分析,IV 组甲烷短杆菌属、甲烷丝状菌属的相对丰度均为 4 组中最低,并显著低于 I 组 ( $P<0.05$ );III 组 *Abconditabacteria\_unidentified\_SR1* 的相对丰度最高,显著高于 I 组 ( $P<0.05$ );甲烷球形菌属、甲烷微球菌属、甲烷螺菌属的相对丰度各组间均未表现出显著差异 ( $P>0.05$ )。4) 饲料中添加不同比例的全棉籽均降低了育肥荷斯坦公牛的甲烷排放量,其中 IV 组的甲烷排放量比 I 组降低了 22.68% ( $P<0.05$ )。5) 相关分析发现,育肥荷斯坦公牛的平均日增重与甲烷排放量呈显著负相关 ( $P<0.05$ ),甲烷短杆菌、甲烷丝状菌和琥珀酸弧菌科菌群的相对丰度与甲烷排放量呈显著或极显著正相关 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。6) 饲料中添加 15% 的全棉籽后,育肥荷斯坦公牛肝脏中甲基丙二酸单酰辅酶 A 变位酶 (*MUT*)、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (*PEPCK*) 和葡萄糖-6-磷酸酶 (*G6P*) 的 mRNA 表达量均呈上调趋势,其中 *MUT* 的 mRNA 表达量极显著高于 I 组 ( $P<0.01$ ), *PEPCK* 的 mRNA 表达量显著高于 I 组 ( $P<0.05$ )。综上所述,在本试验条件下,饲料中添加 15% 的全棉籽可有效调控荷斯坦公牛瘤胃发酵及微生物区系,显著降低甲烷排放量以及上调肝脏中碳代谢相关基因的表达。

**关键词:** 瘤胃发酵;微生物区系;甲烷排放;碳代谢相关基因;全棉籽;荷斯坦公牛

中图分类号:S823.9

文献标识码:A

文章编号:1006-267X(2019)06-2701-15

收稿日期:2018-11-01

基金项目:国家肉牛牦牛产业技术体系建设项目(CARS-37);公益性行业(农业)科研专项(201503134);河北省现代产业技术体系肉牛创新团队(HBCT2018130202)

作者简介:王勇胜(1992—),男,河北冀州人,硕士研究生,研究方向为反刍动物营养。E-mail: 1761036917@qq.com

\* 通信作者:曹玉凤,教授,硕士生导师,E-mail: cyf278@126.com;李秋凤,教授,硕士生导师,E-mail: lqf582@126.com

随着社会经济的快速发展和国民收入水平的提高,牛肉的需求量呈快速增长态势<sup>[1-3]</sup>。在牛肉市场的带动下肉牛养殖规模化比例不断增长,由此带来的环境问题日趋显现,不仅包括粪污处理问题,还有如二氧化碳、甲烷等温室气体浓度的增加所导致的温室效应<sup>[4-5]</sup>。2009年丹麦哥本哈根世界气候大会明确提出了温室效应引起的气候恶化已成为21世纪全球面临的最严重挑战之一,如何减少温室气体的排放,共同保护我们赖以生存的家园是当今全世界的共同课题<sup>[6]</sup>。甲烷是大气中温室气体的重要组成部分,所占比例仅次于水蒸气和二氧化碳,其全球变暖的潜力是二氧化碳的25倍,严重破坏了大气臭氧层<sup>[7]</sup>。牛、羊等反刍动物产生的甲烷约占大气中甲烷排放总量的15%,其中肉牛甲烷排放量占到所有牛总排放量的64%<sup>[8-10]</sup>。除了环境问题,甲烷的产生也会伴随着饲料能量的浪费(2%~15%)。因此,减少反刍动物的甲烷排放对保护环境和提高饲料能量利用率具有双重意义<sup>[11-12]</sup>。

影响反刍动物甲烷排放的因素很多,包括饲料精粗比、油类、脂肪酸、卤族化合物等<sup>[13]</sup>。在实际生产中,除了离子载体外并没有其他有效的甲烷抑制剂可供利用,然而出于食品安全方面的考虑,抗生素在动物营养中的应用日益受到限制,利用饲喂策略和生物措施抑制甲烷生成引起了人们的广泛关注<sup>[12]</sup>。研究表明,饲料中添加脂类物质可以有效抑制甲烷的产生<sup>[14-16]</sup>。我国作为棉花种植大国之一,2016年棉花产量为534.3万t,全棉籽产量约为347.3万t。由于全棉籽中含有16.4%的脂肪,其中不饱和脂肪酸占70%。因此全棉籽具有降低甲烷排放的潜力。Grainger等<sup>[17]</sup>研究发现,用含全棉籽饲料饲喂奶牛12周以后,减少了奶牛甲烷气体的排放。而王平<sup>[18]</sup>、荆元强<sup>[19]</sup>和刘建雷等<sup>[20]</sup>只研究了含全棉籽饲料对肉牛和绵羊瘤胃发酵相关指标的影响,没有探讨对甲烷排放的影响,且研究结果不尽一致。国内外关于全棉籽对肉牛甲烷排放、瘤胃微生物区系及碳代谢相关基因表达方面的研究还未见报道,有待进一步研究。本课题组前期研究了全棉籽饲料对荷斯坦公牛育肥性能、血液生化指标和养分消化率的影响<sup>[21]</sup>,本试验将进一步研究饲料中添加不同比例全棉籽对荷斯坦公牛瘤胃发酵与微生物区系、甲烷排放及肝脏碳代谢相关基因表达的影响,探讨

全棉籽影响荷斯坦公牛生长和甲烷生成的机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验时间与地点

试验于2016年12月至2017年3月在保定市满城县宏达牧业有限公司进行。

### 1.2 试验材料

试验用全棉籽购于新疆喀什,其粗蛋白质含量为23.39%,粗脂肪含量为16.40%,中性洗涤纤维含量为54.89%,酸性洗涤纤维含量为39.84%,钙含量为0.26%,磷含量为0.63%,游离棉酚含量为0.04%~0.05%。

### 1.3 试验动物与试验设计

试验采用单因素完全随机区组设计,将44头健康、膘情正常、体重 $[(286\pm 52)\text{ kg}]$ 相近的荷斯坦公牛,随机分为4组,每组11头,采用散栏饲养。I(对照组)、II、III、IV组公牛分别饲喂含有0.5%、10%和15%全棉籽的饲料,各组饲料能量和粗蛋白质水平基本相同,其组成及营养水平见表1。预试期7d,预试期结束后再进行1次空腹称重,适当调整试验牛,做到各组牛的平均体重差异不显著( $P>0.05$ ),并以此作为正式试验的初始体重,正试期90d。

### 1.4 饲养管理

试验牛采用全混合日粮(TMR)饲喂,按组散栏饲养,牛只自由活动。试验期内每日饲喂2次(07:00和18:00),自由饮水。牛舍每天清扫、清粪,每半月消毒1次,保持牛舍内外的干燥和卫生。

### 1.5 六氟化硫( $\text{SF}_6$ )渗透管及牛鞭的制备<sup>[22]</sup>

#### 1.5.1 $\text{SF}_6$ 渗透管的制作

1) 制备材料包括液氮罐、扳子、冰袋、 $\text{SF}_6$ 气体、渗透管体、管帽、钢网、黑色密封垫、聚四氟乙烯膜等。在饲养试验前3个月开始,制备完成66个渗透管,渗透管由管体、螺帽、圆形钢网、O型密封垫、聚四氟乙烯膜构成。

2) 将组装好的66个渗透管放入液氮中,待管体温度与液氮温度一样时,取出并向渗透管中迅速充入 $\text{SF}_6$ 气体,当管壁结晶不再增多时,迅速将管帽封闭严实。并且将充入气体的渗透管放置室温后称重,气体重量大于1g,即为合格的 $\text{SF}_6$ 渗透管。

3) 将合格的 $\text{SF}_6$ 渗透管投放到已准备好的恒

温水浴槽中, 温度设定值为 39 ℃, 并通入 40 mL/min 流量的氮气。

一般隔 3 d 称量 1 次。

5) 将最终选定的 12 个渗透管 (P1 ~ P12) 数据

4) 按时称量并仔细记录好渗透管的重量, 一

做线性回归分析 (图 1)。

表 1 饲料组成及营养水平 (干物质基础)

Table 1 Composition and nutrient levels of diets (DM basis)

%

| 项目<br>Items                        | 组别 Groups |        |        |        |
|------------------------------------|-----------|--------|--------|--------|
|                                    | I         | II     | III    | IV     |
| 原料 Ingredients                     |           |        |        |        |
| 玉米 Corn                            | 17.15     | 17.25  | 14.55  | 15.60  |
| 蒸汽压片玉米 Steam-flaked corn           | 19.30     | 16.70  | 16.50  | 13.75  |
| 棉籽粕 Cottonseed meal                | 10.70     | 8.60   | 6.70   | 5.60   |
| 全棉籽 Whole cottonseed               |           | 5.00   | 10.00  | 15.00  |
| 豆粕 Soybean meal                    | 1.47      | 1.47   | 1.47   | 1.57   |
| 玉米干酒糟及其可溶物 Corn DDGS               | 2.00      | 2.00   | 2.00   |        |
| 小苏打 NaHCO <sub>3</sub>             | 0.83      | 0.83   | 0.83   | 0.83   |
| 预混料 Premix <sup>1)</sup>           | 3.15      | 3.15   | 3.15   | 3.15   |
| 全株玉米青贮 Whole corn silage           | 35.00     | 35.00  | 35.00  | 35.00  |
| 谷草 Millet straw                    | 10.40     | 10.00  | 9.80   | 9.50   |
| 合计 Total                           | 100.00    | 100.00 | 100.00 | 100.00 |
| 营养水平 Nutrient levels <sup>2)</sup> |           |        |        |        |
| 综合净能 NE <sub>mf</sub> / (MJ/kg)    | 6.32      | 6.32   | 6.32   | 6.32   |
| 粗蛋白质 CP                            | 12.54     | 12.53  | 12.57  | 12.56  |
| 中性洗涤纤维 NDF                         | 33.16     | 34.61  | 36.05  | 37.33  |
| 酸性洗涤纤维 ADF                         | 17.95     | 19.30  | 20.70  | 22.07  |
| 钙 Ca                               | 0.74      | 0.74   | 0.74   | 0.75   |
| 磷 P                                | 0.41      | 0.42   | 0.42   | 0.42   |

<sup>1)</sup> 预混料为每千克饲料干物质提供 The premix provided the following per kg dry matter of diets: VA 3 400 IU, VD<sub>3</sub> 1 270 IU, VE 40 IU, D-生物素 D-biotin 3 mg, 烟酰胺 nicotinamide 600 mg, β-胡萝卜素 β-carotene 30 mg, Mg 1 100 mg, Cu 10 mg, Mn 40 mg, Zn 30 mg, Co 0.2 mg, I 0.5 mg, Se 0.3 mg。

<sup>2)</sup> 综合净能根据我国《肉牛饲养标准》(NY/T 815—2004) 计算得出, 其余为实测值。NE<sub>mf</sub> was calculated according to the Chinese Feeding Standard of Beef Cattle (NY/T 815—2004), while the other nutrient levels were measured values.

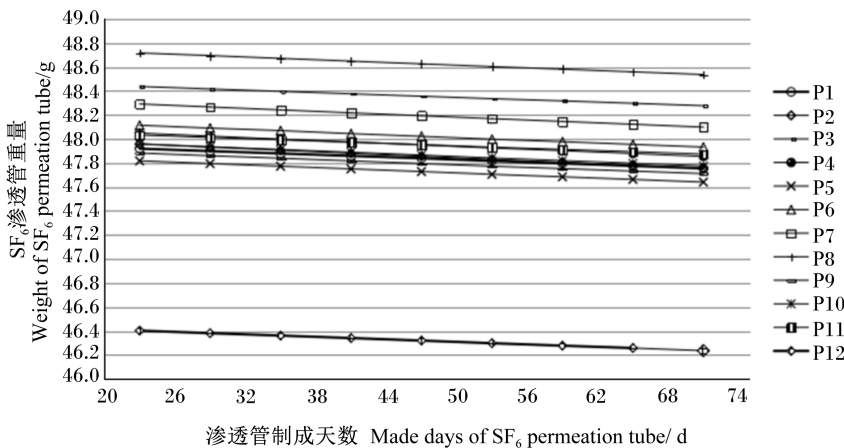


图 1 SF<sub>6</sub> 渗透管重量与 SF<sub>6</sub> 渗透管制成天数的关系

Fig.1 Relationship between weight and made days of SF<sub>6</sub> permeation tube

1.5.2 SF<sub>6</sub> 渗透管的选择

选择充入 SF<sub>6</sub> 较多的以及释放速率稳定的 SF<sub>6</sub> 渗透管,一般来说,当渗透管中 SF<sub>6</sub> 气体的剩余量低于 170 mg 时,释放速率将不再稳定。试验结束时管中剩余气体的量的计算方法如下:

试验结束时剩余的 SF<sub>6</sub> 重量(mg) = 渗透管投放时

剩余的 SF<sub>6</sub> 重量(mg) - SF<sub>6</sub> 的渗透速率(mg/d) × 渗透管投放天数(d)。

根据对 SF<sub>6</sub> 渗透管的选择规定,选出 12 个合格的 SF<sub>6</sub> 渗透管备用,每个 SF<sub>6</sub> 渗透管的渗透速率均大于 3.0 mg/d,表 2 为最终选出的 12 个 SF<sub>6</sub> 渗透管的数据。线性模型见表 3。

表 2 所选择的 SF<sub>6</sub> 渗透管的相关数据Table 2 Related data of selected SF<sub>6</sub> permeation tubes

g

| 渗透管号<br>Permeation tube<br>number | 空渗透管重量<br>Empty permeation<br>tube weight | 装入 SF <sub>6</sub> 后管重量<br>Tube weight after<br>loading SF <sub>6</sub> | 装入的 SF <sub>6</sub> 重量<br>Loaded SF <sub>6</sub><br>weight | 投放时剩余的 SF <sub>6</sub> 重量<br>SF <sub>6</sub> weight remaining at<br>the time of delivery |
|-----------------------------------|---|---|--|--|
| P1                                | 46.564 0                                  | 47.972 1  | 1.407 2  | 1.189 3  |
| P2                                | 46.823 9                                  | 48.058 8  | 1.234 9  | 0.931 4  |
| P3                                | 47.233 4                                  | 48.514 7  | 1.281 3  | 1.043 0  |
| P4                                | 47.009 6                                  | 48.146 2  | 1.136 6  | 0.844 1  |
| P5                                | 46.804 9                                  | 47.905 5  | 1.100 6  | 0.835 1  |
| P6                                | 47.061 4                                  | 48.203 6  | 1.142 2  | 0.870 7  |
| P7                                | 47.18 15                                  | 48.384 2  | 1.202 7  | 0.916 3  |
| P8                                | 47.560 9                                  | 48.808 2  | 1.247 3  | 0.975 3  |
| P9                                | 46.864 5                                  | 47.964 5  | 1.100 0  | 0.846 3  |
| P10                               | 46.846 0                                  | 48.051 5  | 1.205 5  | 0.928 8  |
| P11                               | 47.022 6                                  | 48.110 1  | 1.087 5  | 0.850 3  |
| P12                               | 45.453 5                                  | 46.484 9  | 1.031 4  | 0.782 4  |

表 3 SF<sub>6</sub> 渗透管渗透速率模型Table 3 Penetration rate model of SF<sub>6</sub> permeation tubes

| 渗透管号<br>Permeation tube<br>number | 回归方程<br>Regression equation | 决定系数<br>R <sup>2</sup> | 渗透速率<br>Penetration<br>rate/(mg/d) |
|-----------------------------------|-----------------------------|------------------------|------------------------------------|
| P1                                | y = -0.003 4x + 47.998      | 0.999 9                | 3.5                                |
| P2                                | y = -0.004 2x + 48.053      | 0.999 8                | 4.1                                |
| P3                                | y = -0.003 3x + 48.512      | 0.999 9                | 3.3                                |
| P4                                | y = -0.004 0x + 48.140      | 0.999 8                | 4.0                                |
| P5                                | y = -0.003 7x + 47.901      | 0.999 9                | 3.7                                |
| P6                                | y = -0.003 8x + 48.200      | 0.999 7                | 3.7                                |
| P7                                | y = -0.004 0x + 48.382      | 0.999 9                | 4.0                                |
| P8                                | y = -0.003 8x + 48.802      | 0.999 9                | 3.7                                |
| P9                                | y = -0.003 6x + 47.963      | 0.999 8                | 3.5                                |
| P10                               | y = -0.003 8x + 48.046      | 0.999 9                | 3.8                                |
| P11                               | y = -0.003 3x + 48.108      | 0.999 9                | 3.3                                |
| P12                               | y = -0.003 5x + 46.483      | 0.999 9                | 3.5                                |

### 1.5.3 牛轭及采气装置制作

牛轭主要是由三型聚丙烯管 (PPR) 管根据牛的大小, 经过截取、热熔机链接等程序制作而成。牛轭制作好后将提前准备好的二通阀 (B-14DKM4-S4-A) 拧到牛轭上, 最后检测其是否合格。采气装置主要由聚四氟乙烯 (PTFE) 粗管 (PFR-T4-047-100)、快插插套 (SS-QC4-B-400)、快插插头 (SS-QC4-S-200)、四氟乙烯 (PTFE) 细管 (PFR-T2-030-100)、接头 (B-200-6-1)、毛细不锈钢管 [美国 Vici 公司, 外径 1/16 in (1 in=2.54 cm), 内径 1/200 in] 以及过滤器 (B-2F-15) 顺次连接制成, 制成后再将采气装置固定到公牛的笼头 (笼头是指套在牛头上的用来系缰绳挂嚼子的用具, 用绳子做成) 上。以上部件中牛轭和笼头为本实验室制作, 其他部件购于美国 Swagelok 公司。

## 1.6 样品的采集与处理

### 1.6.1 瘤胃液的采集与处理

在试验结束前 1 周, 每组选取 5 头牛, 在晨饲 2.0 h 后, 将瘤胃管的一端伸入到牛的瘤胃中进行瘤胃液的采集, 每头牛约抽取 150.0 mL, 并马上用 4 层无菌粗纱布过滤后收集滤液, 分装于 10 mL 的离心管中, 用于测定瘤胃液中各项指标, 包括 pH、氨态氮 ( $\text{NH}_3\text{-N}$ )、微生物蛋白 (MCP)、挥发性脂肪酸 (VFA) 浓度及微生物区系。瘤胃液 pH 现场立即用酸度计测定, 测定瘤胃微生物区系的瘤胃液  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  保存, 其他瘤胃液置于  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  保存 (在用于测定  $\text{NH}_3\text{-N}$  浓度的瘤胃液中加入 0.1 mL 6 mol/L 的盐酸进行固氮)。

### 1.6.2 气体的采集与处理

试验采用  $\text{SF}_6$  示踪气体色谱法测定反刍动物甲烷排放量<sup>[23]</sup>。于试验结束前 20 天, 每组选出 3 头生长发育正常、食欲良好、健康的荷斯坦公牛, 将已知渗透速率的  $\text{SF}_6$  渗透管投放进牛的瘤胃中, 在试验结束前 3 天进行气体采样, 记录好每天采样的开始时间和结束时间, 要经常检查设备是否完好无损, 确保气体的纯度, 收集 24 h 以后及时更换牛轭。同时, 每天收集 1 管牛舍周围的气体, 用于校正甲烷和  $\text{SF}_6$  的浓度。

### 1.6.3 肝脏的采集与处理

在试验结束时, 每组选取 4 头牛, 采用活体肝脏取样器 (武汉市科立博器材有限公司产品) 采集肝脏样品。在荷斯坦公牛的右侧倒数第 2~3 肋

间, 肩关节至髂结节中间位置连线的交叉点上, 用活体肝脏取样器采取肝组织数次, 共采集 4 g 左右, 取出后用生理盐水冲洗干净, 将其用无菌剪刀分成 2 份, 一部分置于 0.5 mL 离心管中加入 RNA 保存液, 另一部分用锡箔纸包好后分装于已标记好的纱布袋中, 并立刻放入液氮冻存, 随后在  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  超低温冰箱中保存。

## 1.7 测定的指标及方法

### 1.7.1 营养成分含量的测定

全棉籽和饲料中粗脂肪、钙和磷含量分别按照国家标准 GB/T 6433—2006<sup>[24]</sup>、GB/T 6436—2002<sup>[25]</sup>、GB/T 6437—2002<sup>[26]</sup> 中方法进行测定; 中性洗涤纤维和酸性洗涤纤维含量分别按照国家标准 GB/T 20806—2006<sup>[27]</sup> 和农业行业标准 NY/T 1459—2007<sup>[28]</sup> 中方法, 使用全自动纤维仪 (ANK-OM-A2000i, 美国) 进行测定; 粗蛋白质含量按照国家标准 GB/T 6432—1994<sup>[29]</sup> 中方法, 使用全自动凯氏定氮仪 (FOSS-8400, 丹麦) 进行测定。

### 1.7.2 瘤胃发酵参数的测定

瘤胃液 pH 用 UB-7 型精密仪测定; 采用靛酚蓝比色技术<sup>[30]</sup> 测定瘤胃液  $\text{NH}_3\text{-N}$  浓度; 采用差速离心法和凯氏定氮法<sup>[31]</sup> 测定瘤胃液 MCP 浓度; 利用 Agilent 7890A 气相色谱检测仪, 采用外标分析法<sup>[32]</sup> 测定瘤胃液 VFA 浓度。

### 1.7.3 瘤胃微生物区系的测定

分别对细菌 16S V4 区和古菌的 18S V4 区进行高通量测序, 由北京诺禾致源科技有限公司完成。对测序得到的原始数据进行拼接、过滤后即有效数据 (clean data), 然后对有效数据进行操作分类单元 (OTU) 聚类 and 物种分类分析<sup>[33]</sup>。对 OTU 进行丰度和  $\alpha$  多样性等分析, 得到样品内物种丰富度和均匀度信息、不同样品或分组间的共同和特有 OTU 信息等。

1) OTU 分析: 利用 Uparse 软件 (Uparse v7.0.1001) 对所有样品的全部 Effective Tags 进行聚类<sup>[34]</sup>。

2) 样品复杂度分析 ( $\alpha$  多样性): 使用 Qiime 软件 (Version 1.7.0) 计算  $\alpha$  多样性指数。

3) 多样品比较分析 ( $\beta$  多样性): 用 Qiime 软件 (Version 1.7.0) 计算 Unifrac 距离。使用 R 软件 (Version 2.15.3) 绘制主坐标分析 (PCoA) 图。

### 1.7.4 气体样品的分析

$\text{CH}_4$  浓度使用美国安捷伦 7890A 气相色谱仪

采用单点校样法进行测定。所需材料:密封气体进样针(美国安捷伦)、1 L 气袋(大连化工设计院)、高纯氢气(99.99%)、高纯氮气(99.999%)、甲烷标准气(36.9 mg/L)。分析条件:检测器为氢火焰离子化检测器(FID),色谱柱为安捷伦 GS-GasPro 柱,气化室温度 200 °C,柱温 60 °C,检测器温度 220 °C,高纯氮气压力 68.95 kPa,氢气流速 30 mL/min,空气流速 400 mL/min,尾吹 25 mL/min,分流比为 20:1,保留时间 1.33 min,手动进样 1 mL。

SF<sub>6</sub> 浓度使用美国安捷伦 7890A 气相色谱仪采用单点校样法进行测定。所需材料:密封气体进样针、1 L 气袋、高纯氢气(99.99%)、高纯氮气(99.999%)、SF<sub>6</sub> 标准气(100 mg/L)。分析条件:检测器为电子捕获检测器(ECD),色谱柱为安捷伦 GS-GasPro 柱,气化室温度 200 °C,柱温 25 °C,检测器温度 250 °C,高纯氮气压力 34.475 kPa,分流比为 20:1,尾吹 25 mL/min,保留时间 2.77 min,手动进样 1 mL。

### 1.7.5 肝脏中碳代谢相关基因表达的测定

1) 样品总 RNA 的提取与完整性检测。取 50~100 mg 肝脏样品,按照 TRIzol 试剂盒(Ambion,美国)说明书提取肝脏组织中的总 RNA,取少量总 RNA 与染色剂溴化乙锭(EB)(Thermo,美国)混合,用 1.2% 琼脂糖凝胶进行电泳,电泳结束后将其放入凝胶成像系统(SIM,美国)内,观察条带是否完整清晰。

2) 反转录。本利用 QuantiTect 反转录试剂盒(Qiagen,德国)对总 RNA 进行反转录。将合成的 cDNA 放入 -20 °C 冰箱中储存待测。

3) 荧光定量 PCR。本试验所用引物均根据 NCBI 中已报道的牛基因序列<sup>[35]</sup> 进行设计,由上海生工生物技术有限公司代为合成,详见表 4,以  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)作为内参基因。荧光定量 PCR 反应体系(20  $\mu$ L)如下:iQ<sup>TM</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Supermix 10  $\mu$ L,上游引物 2  $\mu$ L,下游引物 2  $\mu$ L,cDNA 5  $\mu$ L,无核酸酶水 1  $\mu$ L。反应程序为:95 °C 预变性 3 min;95 °C 变性 15 s;60 °C,15 s 退火;72 °C,20 s 延伸,40 个循环。

表 4 引物序列

Table 4 Primer sequences

| 基因<br>Genes                | 登录号<br>Accession No. | 引物序列<br>Primer sequences<br>(5'—3')                 | 扩增产物大小<br>Amplification<br>product size/bp |
|----------------------------|----------------------|---|--|
| 葡萄糖-6-磷酸酶 <i>G6P</i>       | NM_001076124         | F:GCCAACCTACAGATTTTCGGTG<br>R:CAATGCCTGACAAGACTCCAG | 140  |
| 磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 <i>PEPCK</i>   | NM_174737            | F:ATGACAACCTGCTGGTTGGCT<br>R:GCTGACTGAGGCCGTTTTTG   | 123  |
| 甲基丙二酸单酰辅酶 A 变位酶 <i>MUT</i> | NM_1739392           | F:GGGATTCCCAAAGTGGCTGA<br>R:TCTTCGGGCAGCACATTCTT    | 177  |

## 1.8 数据统计分析

应用 SPSS 19.0 统计软件的 ANOVA 程序进行方差分析,差异显著时用 Duncan 氏法进行组间的多重比较,试验数据用平均值 $\pm$ 标准差表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 饲料中全棉籽比例对育肥荷斯坦公牛瘤胃发酵参数的影响

由表 5 可以看出,各组瘤胃液 pH 没有显著差异( $P>0.05$ ),均在正常范围;IV 组的瘤胃液 NH<sub>3</sub>-N

浓度比 I 组提高了 31.34% ( $P<0.05$ ); III 和 IV 组的 MCP 浓度分别比 I 组提高了 45.45% ( $P<0.05$ ) 和 40.00% ( $P<0.05$ )。随着饲料中全棉籽比例的增加,VFA 中乙酸和丙酸的比例均有上升趋势,且 IV 组的乙酸和丙酸比例分别比 I 组提高了 2.26% ( $P<0.05$ ) 和 15.20% ( $P<0.05$ ); IV 组丁酸比例比 I 组降低了 4.46% ( $P<0.05$ ); 乙酸/丙酸随饲料中全棉籽比例的增加而呈下降趋势,但各组间差异不显著 ( $P>0.05$ )。

表5 饲料中全棉籽比例对育肥荷斯坦公牛瘤胃发酵参数的影响

Table 5 Effects of dietary whole cottonseed ratio on rumen fermentation parameters of fattening Holstein bulls

| 项目<br>Items                                 | 组别 Groups          |                     |                      |                     | SEM  | P 值<br>P-value |
|---|--------------------|---------------------|----------------------|---------------------|------|----------------|
|   | I                  | II                  | III                  | IV                  |      |                |
| pH  | 6.73               | 6.83                | 6.67                 | 6.80                | 0.19 | 0.428          |
| 氨态氮 NH <sub>3</sub> -N/(mg/dL)              | 9.35 <sup>b</sup>  | 10.49 <sup>ab</sup> | 10.50 <sup>ab</sup>  | 12.28 <sup>a</sup>  | 1.26 | 0.023          |
| 微生物蛋白 MCP/(mg/mL)                           | 0.55 <sup>b</sup>  | 0.62 <sup>ab</sup>  | 0.80 <sup>a</sup>    | 0.77 <sup>a</sup>   | 0.08 | 0.024          |
| 总挥发性脂肪酸 Total VFA/(mmol/L)                  | 96.65 <sup>b</sup> | 97.88 <sup>b</sup>  | 104.03 <sup>ab</sup> | 106.60 <sup>a</sup> | 2.55 | 0.016          |
| 挥发性脂肪酸中各组分比例 Percentage of individual VFA/% |                    |                     |                      |                     |      |                |
| 乙酸 Acetate (A)                              | 65.54 <sup>b</sup> | 67.38 <sup>ab</sup> | 66.49 <sup>ab</sup>  | 67.80 <sup>a</sup>  | 3.89 | 0.029          |
| 丙酸 Propionate (P)                           | 20.46 <sup>b</sup> | 20.79 <sup>b</sup>  | 21.91 <sup>b</sup>   | 35.66 <sup>a</sup>  | 1.64 | 0.012          |
| 丁酸 Butyrate                                 | 11.98 <sup>b</sup> | 10.03 <sup>ab</sup> | 9.79 <sup>ab</sup>   | 7.52 <sup>a</sup>   | 1.02 | 0.014          |
| 乙酸/丙酸 A/P                                   | 3.32               | 3.26                | 3.08                 | 2.98                | 0.23 | 0.429          |

同行数据肩标不同大写字母表示差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 无字母或相同字母表示差异不显著 ( $P > 0.05$ )。下表同。

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

## 2.2 饲料中全棉籽比例对育肥荷斯坦公牛瘤胃细菌相对丰度和群落多样性的影响

### 2.2.1 饲料中全棉籽比例对育肥荷斯坦公牛瘤胃细菌相对丰度的影响

由表6可知, 从属水平的相对丰度分析, 普雷沃氏菌属在瘤胃中占据绝对优势。IV组的普雷沃氏菌属-1、密螺旋体属-2的相对丰度极显著高于

其他组 ( $P < 0.01$ ); IV组的琥珀酸弧菌科 UCG-002的相对丰度较I和II组显著升高 ( $P < 0.05$ ); 理研菌科 RC9 肠道群、普雷沃氏菌科 UCG003、瘤胃杆菌属、疣微菌科 NK4A214 群、纤维杆菌属、未识别的叶绿体和拟杆菌属的相对丰度各组间的差异均不显著 ( $P > 0.05$ )。

表6 瘤胃细菌在属水平上的相对丰度

Table 6 Relative abundances of rumen bacteria at genus level

%

| 项目<br>Items  | 组别 Groups                |                          |                          |                          | SEM  | P 值<br>P-value |
|--|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|------|----------------|
|  | I                        | II                       | III                      | IV                       |      |                |
| 普雷沃氏菌属-1 <i>Prevotella_1</i>                           | 38.48±4.20 <sup>Bb</sup> | 38.79±1.89 <sup>Bb</sup> | 43.26±3.77 <sup>Bb</sup> | 50.44±2.54 <sup>Aa</sup> | 2.64 | 0.006          |
| 琥珀酸弧菌科<br>UCG-002 <i>Succinivibrionaceae_UCG-002</i>   | 7.48±0.98 <sup>a</sup>   | 8.25±1.20 <sup>a</sup>   | 9.38±0.35 <sup>ab</sup>  | 10.62±1.47 <sup>b</sup>  | 0.88 | 0.034          |
| 理研菌科 RC9 肠道群<br><i>Rikenellaceae_RC9_gut_group</i>     | 2.10±0.17                | 2.55±0.22                | 3.06±0.92                | 2.02±0.80                | 0.51 | 0.131          |
| 普雷沃氏菌科<br>UCG-003 <i>Prevotellaceae_UCG-003</i>        | 1.96±0.12                | 2.14±0.04                | 2.25±0.31                | 2.38±0.41                | 0.21 | 0.142          |
| 瘤胃杆菌属 <i>Ruminobacter</i>                              | 1.88±0.03                | 1.96±0.12                | 2.04±0.16                | 2.04±0.27                | 0.14 | 0.054          |
| 疣微菌科 NK4A214 群<br><i>Ruminococcaceae_NK4A214_group</i> | 1.83±0.07                | 2.02±0.23                | 2.07±0.29                | 1.78±0.13                | 0.16 | 0.070          |
| 纤维杆菌属 <i>Fibrobacter</i>                               | 1.42±0.55                | 1.53±0.28                | 1.50±0.29                | 1.49±0.13                | 0.28 | 0.061          |
| 密螺旋体属-2 <i>Treponema_2</i>                             | 1.11±0.29 <sup>Bb</sup>  | 1.16±0.20 <sup>Bb</sup>  | 1.16±0.15 <sup>Bb</sup>  | 2.27±0.68 <sup>Aa</sup>  | 0.32 | 0.001          |
| 未识别的叶绿体<br><i>Unidentified_Chloroplast</i>             | 0.63±0.14                | 0.54±0.18                | 0.48±0.02                | 0.44±0.13                | 0.11 | 0.061          |
| 拟杆菌属 <i>Bacteroides</i>                                | 0.04±0.01                | 0.03±0.00                | 0.03±0.01                | 0.02±0.01                | 0.01 | 0.403          |

## 2.2.2 饲料中全棉籽比例对对育肥荷斯坦公牛瘤胃细菌群落多样性的影响

### 2.2.2.1 瘤胃细菌 16S rRNA 基因 $\alpha$ 多样性

瘤胃细菌 16S rRNA 基因  $\alpha$  多样性指数见表 7。反映物种丰富度的 ACE 指数和 Chao1 指数以及反映物种多样性的 Shannon 指数各组间差异

均未达到显著水平 ( $P>0.05$ )。4 个组的覆盖率 (Good's\_coverage) 均大于 98%, 表明瘤胃液的测序量是合理的, 可以较好地反映瘤胃液中细菌群落种类和结构多样性。物种观测数的范围是 1 827.40~2 011.40, 表现为 I 组>II 组>III 组>IV 组, IV 组显著少于 I、II 和 III 组 ( $P<0.05$ )。

表 7 瘤胃细菌群落  $\alpha$  多样性指数

Table 7 Alpha diversity indexes of bacterial community in rumen

| 项目<br>Items                 | 组别 Groups                    |                              |                             |                              | SEM    | P 值<br>P-value |
|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|--------|----------------|
|                             | I                            | II                           | III                         | IV                           |        |                |
| ACE 指数 ACE index            | 2 446.53±174.87              | 2 443.73±182.53              | 2 312.83±141.47             | 2 235.04±163.23              | 105.15 | 0.162          |
| Chao1 指数 Chao1 index        | 2 422.57±133.01              | 2 408.65±142.06              | 2 332.02±210.91             | 2 199.77±168.58              | 105.25 | 0.173          |
| Shannon 指数<br>Shannon index | 7.91±0.20                    | 7.93±0.16                    | 8.14±0.29                   | 8.20±0.18                    | 0.14   | 0.575          |
| 覆盖率<br>Good's_coverage/%    | 98.99±0.16                   | 98.89±0.54                   | 99.07±0.15                  | 99.09±0.14                   | 0.01   | 0.719          |
| 物种观测数<br>Observed_species   | 2 011.40±136.29 <sup>a</sup> | 1 976.20±104.01 <sup>a</sup> | 1 934.80±86.77 <sup>a</sup> | 1 827.40±115.95 <sup>b</sup> | 70.97  | 0.020          |

### 2.2.2.2 瘤胃细菌 16S rRNA 基因 $\beta$ 多样性

由图 2 可以看出, 基于 Weighted Unifrac 距离来进行 PCoA 的第一主成分 (PC1) 的贡献率为 61.65%, 第二主成分 (PC2) 的贡献率为 14.92%。样品间距离反映了物种组成结构的相似性, 样品间距离越近, 说明物种群落的相似性越高, 反之, 则样品间群落差异越大。由图 2 可知, 同一组中的样品间的物种群落结构相似性很高, 各组瘤胃细菌构成总体上可以分开。

## 2.3 饲料中全棉籽比例对对育肥荷斯坦公牛瘤胃中产甲烷古菌相对丰度和群落多样性的影响

### 2.3.1 饲料中全棉籽比例对对育肥荷斯坦公牛瘤胃中产甲烷古菌相对丰度的影响

由表 8 可知, 从属水平的相对丰度分析, IV 组甲烷短杆菌属、甲烷丝状菌属的相对丰度均为最低, 分别为 78.99% 和 0.03%, 显著低于 I 和 II 组 ( $P<0.05$ ); Absconditabacteria\_unidentified\_SR1 的相对丰度以 III 组最高, 为 0.05%, 显著高于 I 组 ( $P<0.05$ ); 甲烷球形菌属、甲烷微球菌属、甲烷螺菌属的相对丰度各组间均未表现出显著差异 ( $P>0.05$ )。

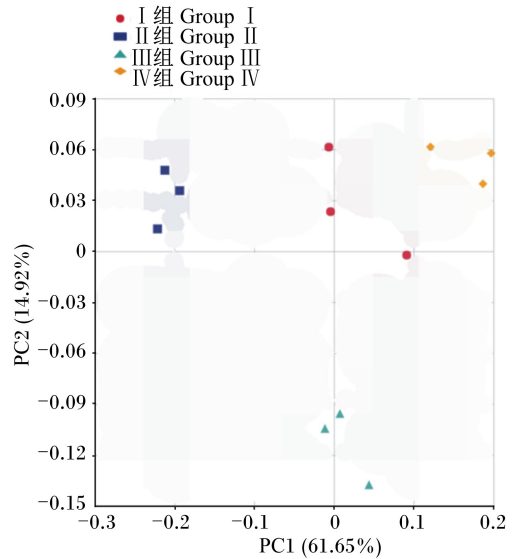


图 2 基于 Weighted Unifrac 距离的 PCoA

Fig.2 PCoA based on Weight Unifrac distance

### 2.3.2 饲料中全棉籽比例对对育肥荷斯坦公牛瘤胃中产甲烷古菌群落多样性的影响

由表 9 可知, ACE 指数、物种观测数、Shannon 指数 4 组之间均没有显著差异 ( $P>0.05$ ), 但随着饲料中全棉籽比例的增加均有下降的趋势。III、IV 组的 Chao1 指数比 I 组降低了 7.34% 和 8.76%, 差异显著 ( $P<0.05$ ), 说明随着饲料中全棉籽比例



的增加, 瘤胃中产甲烷古菌群落的丰富度 深度较高, 足够反映群落多样性和丰度。逐渐下降。各组的覆盖率均大于99%, 表明测序

表 8 瘤胃中产甲烷古菌在属水平上的相对丰度

Table 8 Relative abundances of methanogens in rumen at genus level

| 项目<br>Items                         | 组别 Groups               |                         |                          |                         | SEM  | P 值<br>P-value |
|-------------------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|------|----------------|
|                                     | I                       | II                      | III                      | IV                      |      |                |
| 甲烷短杆菌属 <i>Methanobrevibacter</i>    | 93.32±0.58 <sup>a</sup> | 89.98±3.00 <sup>a</sup> | 83.61±9.80 <sup>ab</sup> | 78.99±2.11 <sup>b</sup> | 4.29 | 0.042          |
| 甲烷球形菌属 <i>Methanosphaera</i>        | 0.10±0.02               | 0.09±0.02               | 0.07±0.01                | 0.07±0.01               | 0.01 | 0.217          |
| 甲烷微球菌属 <i>Methanimicrococcus</i>    | 0.08±0.01               | 0.07±0.01               | 0.06±0.01                | 0.07±0.00               | 0.01 | 0.358          |
| 甲烷丝状菌属 <i>Methanosaeta</i>          | 0.05±0.01 <sup>a</sup>  | 0.05±0.01 <sup>a</sup>  | 0.04±0.00 <sup>ab</sup>  | 0.03±0.00 <sup>b</sup>  | 0.01 | 0.038          |
| Absconditabacteria_unidentified_SR1 | 0.04±0.01 <sup>b</sup>  | 0.04±0.01 <sup>ab</sup> | 0.05±0.00 <sup>a</sup>   | 0.04±0.01 <sup>ab</sup> | 0.00 | 0.030          |
| 甲烷螺菌属 <i>Methanospirillum</i>       | 0.03±0.01               | 0.03±0.00               | 0.03±0.00                | 0.03±0.01               | 0.00 | 0.721          |

表 9 瘤胃中产甲烷古菌群落 α 多样性指数

Table 9 Alpha diversity indexes of methanogens community in rumen

| 项目<br>Items              | 组别 Groups                 |                           |                           |                           | SEM   | P 值<br>P-value |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-------|----------------|
|                          | I                         | II                        | III                       | IV                        |       |                |
| ACE 指数 ACE index         | 461.81±123.90             | 383.74±61.35              | 382.39±57.54              | 315.79±24.77              | 61.97 | 0.189          |
| 物种观测数 Observed_species   | 496.33±11.37              | 494.33±18.01              | 475.67±17.50              | 461.33±23.01              | 14.66 | 0.128          |
| Shannon 指数 Shannon index | 4.09±0.26                 | 4.01±0.29                 | 3.88±0.12                 | 3.70±0.10                 | 0.17  | 0.383          |
| Chao1 指数 Chao1 index     | 507.08±17.23 <sup>a</sup> | 488.05±6.43 <sup>ab</sup> | 469.86±19.24 <sup>b</sup> | 462.67±17.67 <sup>b</sup> | 13.04 | 0.037          |
| 覆盖率 Good's_coverage/%    | 99.80±0.10                | 99.90±0.00                | 99.87±0.06                | 99.90±0.00                | 0.05  | 0.065          |

## 2.4 饲料中全棉籽比例对育肥荷斯坦公牛甲烷排放量的影响

由表 10 可以看出, 随着全棉籽比例的增加,

甲烷排放量逐渐降低, II、III 和 IV 组较 I 组分别降低了 8.76% ( $P > 0.05$ )、19.48% ( $P < 0.05$ ) 和 22.68% ( $P < 0.05$ )。

表 10 饲料中全棉籽比例对育肥荷斯坦公牛甲烷排放量的影响

Table 10 Effects of dietary whole cottonseed ratio on methane emission of fattening Holstein bulls

| 项目<br>Item             | 组别 Groups                 |                          |                           |                           | SEM   | P 值<br>P-value |
|------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|-------|----------------|
|                        | I                         | II                       | III                       | IV                        |       |                |
| 甲烷排放量 Methane emission | 237.56±11.79 <sup>a</sup> | 216.74±7.81 <sup>a</sup> | 191.28±14.77 <sup>b</sup> | 183.69±16.18 <sup>b</sup> | 10.65 | 0.036          |

## 2.5 甲烷排放量与育肥荷斯坦公牛平均日增重和瘤胃主要甲烷生成菌相对丰度的相关性分析

由表 11 可以看出, 育肥荷斯坦公牛的日增重与甲烷排放量呈显著负相关 ( $P < 0.05$ ), 甲烷短杆菌属、甲烷丝状菌属的相对丰度与甲烷排放量呈显著正相关 ( $P < 0.05$ ), 而琥珀酸弧菌科 UCG-002 的相对丰度与甲烷排放量呈极显著正相关 ( $P < 0.01$ )。

## 2.6 饲料中全棉籽比例对育肥荷斯坦公牛肝脏中碳代谢相关基因表达的影响

由表 12 可知, 与 I 组相比, 饲料中添加 15% 的全棉籽后甲基丙二酸单酰辅酶 A 变位酶 (*MUT*)、葡萄糖-6-磷酸酶 (*G6P*) 和磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (*PEPCK*) 的 mRNA 表达量均呈上调趋势, 其中 *MUT* 的 mRNA 表达量显著提高 ( $P < 0.01$ ), *PEPCK* 的 mRNA 表达量显著提高 ( $P < 0.05$ )。

表 11 甲烷排放量与育肥荷斯坦公牛平均日增重和瘤胃主要甲烷生成菌相对丰度的相关性

Table 11 Correlations between methane emission and ADG, relative abundance of major rumen methane-producing bacteria of fattening Holstein bulls

| 项目<br>Item                | 平均日增重<br>ADG | 相对丰度 Relative abundance             |                               |   |
|---------------------------|--------------|-------------------------------------|-------------------------------|---|
|                           |              | 甲烷短杆菌属<br><i>Methanobrevibacter</i> | 甲烷丝状菌属<br><i>Methanosaeta</i> | 琥珀酸弧菌科 UCG-002<br>Succinivibrionaceae_UCG-002 |
| 甲烷排放量<br>Methane emission | -0.592*      | 0.592*                              | 0.622*                        | 0.751**                                       |

\* 表示显著相关 ( $P < 0.05$ ); \*\* 表示极显著相关 ( $P < 0.01$ )。

\* represented significant correlation ( $P < 0.05$ ); \*\* represented extremely significant correlation ( $P < 0.01$ ).

表 12 育肥荷斯坦公牛肝脏中碳代谢相关基因的 mRNA 表达量

Table 12 mRNA expression levels of genes related to carbon metabolism in liver of fattening Holstein bulls

| 项目 Items                   | I 组 Group I       | IV 组 Group IV          | SEM   | P 值 P-value |
|----------------------------|-------------------|------------------------|-------|-------------|
| 甲基丙二酸单酰辅酶 A 变位酶 <i>MUT</i> | 1.00 <sup>A</sup> | 1.47±0.11 <sup>B</sup> | 0.074 | 0.001       |
| 葡萄糖-6-磷酸酶 <i>G6P</i>       | 1.00              | 1.12±0.11              | 0.087 | 0.244       |
| 磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 <i>PEPCK</i>   | 1.00 <sup>a</sup> | 1.27±0.13 <sup>b</sup> | 0.095 | 0.034       |

### 3 讨论

#### 3.1 饲粮中全棉籽比例对育肥荷斯坦公牛瘤胃发酵的影响

pH 对瘤胃内环境的变化最敏感,其过高或过低都会影响瘤胃微生物的正常生长。当 pH 在 6~7 时,瘤胃发酵均可正常进行,而本试验的各组公牛瘤胃液 pH 在此范围之内,因此,添加全棉籽不会影响荷斯坦公牛瘤胃的正常发酵<sup>[36]</sup>。王平<sup>[18]</sup>在肉牛饲粮中添加 13% 和 25% 的全棉籽,结果显示对瘤胃液 pH 无显著影响,与本试验结果一致。瘤胃微生物需要的氮源中有 18%~100% 是由  $\text{NH}_3\text{-N}$  供给的<sup>[37]</sup>,而且蛋白质在瘤胃消化程度对  $\text{NH}_3\text{-N}$  的浓度影响很大。当  $\text{NH}_3\text{-N}$  浓度在 5~30 mg/dL 时,瘤胃微生物可以很好地生长,过高或者过低都不利于其正常生长<sup>[38]</sup>。本试验中各组公牛瘤胃液  $\text{NH}_3\text{-N}$  浓度在 9.35~12.28 mg/dL,属于正常范围,并随着饲粮中全棉籽比例的增加而增加,其可能是由于高比例的棉籽经过浸润逆呕,再到口腔充分咀嚼,使反刍时间增加,在瘤胃内滞留的时间延长,一部分氮源分解程度较高,产生的  $\text{NH}_3\text{-N}$  也较多,导致  $\text{NH}_3\text{-N}$  浓度升高,这与刘建雷等<sup>[20]</sup>的研究结果一致。MCP 是反刍动物最主要的氮源供应者,其浓度的大小可以反映微生物利用  $\text{NH}_3\text{-N}$  的能力<sup>[39]</sup>。本试验中添加 10% 和

15% 全棉籽组的瘤胃液 MCP 浓度显著高于对照组,说明添加全棉籽更有利于 MCP 的生成。

VFA 作为饲粮中碳水化合物发酵最终的产物,为反刍动物提供所需的能量<sup>[28]</sup>。瘤胃中乙酸、丙酸和丁酸这 3 种酸占总 VFA 的 95%<sup>[40]</sup>。本试验中,添加 15% 全棉籽组的荷斯坦公牛瘤胃液中乙酸和丙酸比例显著高于对照组。由于全棉籽含有较多的纤维,纤维分解菌的数量也随之增多,从而提高了乙酸比例;而丙酸比例之所以提高可能是由于添加全棉籽后增加了荷斯坦公牛的咀嚼时间,促进了淀粉的释放<sup>[41]</sup>。而丙酸增多了会减少瘤胃内氢气的量,从而降低瘤胃中甲烷的合成量<sup>[36]</sup>。一般乙酸/丙酸的适宜范围是 2.0~3.6<sup>[19]</sup>,本试验的乙酸/丙酸变化范围是 2.98~3.32,在适宜范围内,并且,随着饲粮中全棉籽比例的增加,乙酸/丙酸有下降的趋势。

#### 3.2 饲粮中全棉籽比例对育肥荷斯坦公牛瘤胃细菌群落结构的影响

$\alpha$  多样性用于分析微生物群落内多样性<sup>[42]</sup>,通过单样本的  $\alpha$  多样性分析,可以了解样本内的微生物群落的丰富度和多样性。菌群的丰度反映了其适应特定环境并竞争其中可用营养物质的能力,表明其对整个微生物组整体功能的重要性<sup>[43]</sup>。ACE 指数、Chao1 指数的高低可反映样品群落内菌群的丰富度,Shannon 指数的高低则可反映样品

群落内菌群的多样性 Shannon 指数越高, 菌群的多样性越高。本试验结果表明, 添加 15% 全棉籽组的物种观测数显著低于对照组, 可能是与全棉籽中含有大量的脂肪酸对菌群有一定的抑制作用有关。

通过对荷斯坦公牛瘤胃细菌 16S rRNA 基因  $\beta$  多样性分析可知, 试验组与对照组呈现明显的聚类现象, 各组瘤胃微生物构成具有一定差异, 说明添加全棉籽对各组的物种结构组成是有影响的, 具体原因还需进一步研究。从属水平的相对丰度分析, 普雷沃氏菌属-1 为优势菌群, 是瘤胃中数量最多的一类细菌, 在牦牛<sup>[44]</sup>、肉牛<sup>[45]</sup>上均得到相似的结果。普雷沃氏菌属拥有高活性的半纤维素分解菌, 并对植物非纤维多糖和蛋白质的降解至关重要<sup>[46-47]</sup>。其中 IV 组的普雷沃氏菌属-1、密螺旋体属-2 的相对丰度极显著高于 I 组。普雷沃氏菌科中的普雷沃氏菌属是牛、羊等反刍动物瘤胃和肠道中数量最多的微生物, 重点在蛋白质、碳水化合物化合物的降解发酵及肽类物质的吸收中发挥效应, 可产生蛋白酶, 促进瘤胃内蛋白质的降解, 因此, 各试验组瘤胃液中 MCP 浓度比对照组都有所提高可能与普雷沃氏菌有关。而且, 普雷沃氏菌的发酵产物主要是乙酸、琥珀酸和丙酸, 其中琥珀酸在瘤胃中由微生物酶较快转化为丙酸, 降低甲烷排放量<sup>[48]</sup>。本试验中, 随着普雷沃氏菌相对丰度的提高, 瘤胃 VFA 中乙酸和丙酸的比例也增加。密螺旋体属是果胶利用菌, 这类瘤胃细菌优势菌群的存在是由于饲料中含有大量纤维素和碳水化合物。IV 组的琥珀酸弧菌相对丰度显著高于 I 组, 而琥珀酸弧菌属中的溶糊精琥珀酸弧菌可以发酵糊精, 其发酵后主要产生乙酸与琥珀酸, 可抑制甲烷的生成。

### 3.3 饲料中全棉籽比例对育肥荷斯坦公牛瘤胃中产甲烷古菌群落结构的影响

除嗜酸菌属 (*Picrophilus*) 外, 已知的瘤胃古菌均为产甲烷古菌, 隶属于广古菌门 (*Euryarchaeota*), 其中大部分为氢营养型, 利用细菌发酵产生的二氧化碳和氢气生成甲烷气体。有研究表明, 在瘤胃中, 甲烷短杆菌属和甲烷微菌属为最优势的菌群<sup>[49-51]</sup>。饲料类型决定了反刍动物瘤胃微生物优势菌群的类型和数量<sup>[52]</sup>, 可能的机制是改变了瘤胃的发酵类型和瘤胃液的 pH 等<sup>[53]</sup>, 进而改变了瘤胃微生物菌群的多样性及数量<sup>[54]</sup>。Hristov

等<sup>[55]</sup>研究表明, 饲喂月桂酸的奶牛瘤胃液中, 甲烷短杆菌属占总瘤胃古菌的 70%, 而当其饲喂肉蔻酸及硬脂酸时, 瘤胃液中此菌群的比例更是达到 92%。从本试验结果可以看出, 甲烷短杆菌的相对丰度最高可达 93.32%。随着饲料中全棉籽的增加, 甲烷短杆菌的相对丰度显著降低, 可能的原因一是由于全棉籽存在棉籽壳, 避免了瘤胃微生物对脂肪的氢化作用, 降低了瘤胃发酵, 提高了胃肠道消化吸收的比例; 二是随着饲料中全棉籽比例的增加, 棉酚含量也增加, 对微生物的直接毒害作用也可能有所提高。Wang 等<sup>[56]</sup>研究显示, 甲烷短杆菌的相对丰度与甲烷排放量呈正相关, 因此甲烷短杆菌的相对丰度降低, 甲烷排放量也会相应减少, 与本试验结果一致。本试验结果还得出, IV 组的 Chao1 指数显著低于 I 组, 说明全棉籽中的棉酚对菌群有一定的毒害作用, 降低了菌群的丰富度, 具体原因需进一步研究。

### 3.4 饲料中全棉籽比例对育肥荷斯坦公牛甲烷排放的影响

反刍动物排放的甲烷是重要温室气体之一, 对环境危害较大, 减少反刍动物甲烷排放既能减缓全球变暖趋势, 也能减少饲料能量的浪费。据前人研究表明, 降低瘤胃中甲烷的排放量主要有 2 个途径: 一是减少氢的产生量以及降低产甲烷菌的数量; 二是通过营养调控反刍动物瘤胃发酵, 使其产生更多的丙酸, 进而竞争甲烷合成的前体物质氢气和二氧化碳, 从而降低甲烷的生成<sup>[41]</sup>。

目前国内外针对降低反刍动物甲烷排放的方法有很多, 例如通过改变饲料组成比例、植物提取物添加剂、脂类添加剂等。王平<sup>[18]</sup>研究表明, 饲喂全棉籽具有提高瘤胃丙酸浓度的趋势, 而且乙酸/丙酸显著降低。Grainger 等<sup>[17]</sup>研究表明, 给泌乳牛每日补饲 2.61 kg 的全棉籽, 饲养到 12 周时甲烷生成量减少了 23%。这与本试验采用荷斯坦公牛所得的结果一致, 其主要的原因可能就是由于全棉籽含有大量的脂肪酸以及在瘤胃内的氢化作用, 促进了丙酸的合成, 从而降低了甲烷生成量。

### 3.5 饲料中全棉籽比例对育肥荷斯坦公牛肝脏中碳代谢相关基因表达的影响

多数哺乳动物组织中发现有甲基丙二酰辅酶 A 变位酶存在, 并以反刍动物的肾脏和肝脏中最为丰富。甲基丙二酰辅酶 A 变位酶主要催化从三羧酸循环中间物生成丙酸的反应, 对丙酸流向、糖

异生代谢有着重要的意义。本试验结果表明,饲喂全棉籽极显著提高了 *MUT* mRNA 的表达量,有利于丙酸的合成,从而降低甲烷的排放。

PEPCK 和 G6P 是肝脏细胞内参加糖异生过程中起到很重要作用的酶<sup>[57]</sup>,其活性的上升和下降可引起糖异生的增加和减少,从而导致血糖水平升高和降低<sup>[58]</sup>。对于反刍动物来说,可以将摄入的纤维通过微生物发酵生成乙酸、丙酸、丁酸,其中丙酸经糖异生途径生成葡萄糖<sup>[59]</sup>。本试验研究表明,随着全棉籽比例的增加,其糖异生关键酶 *PEPCK* 和 *G6P* 的 mRNA 表达量增加,说明添加全棉籽可以促进糖异生的进行,提高丙酸的利用率,从而利用更多瘤胃内的氢气,甲烷菌可利用氢气减少导致甲烷生成量降低。

## 4 结 论

在本试验条件下,饲粮中添加 15% 的全棉籽可有效调控育肥荷斯坦公牛瘤胃发酵及微生物区系,显著降低甲烷排放量以及上调肝脏中碳代谢相关基因的表达。

## 参考文献:

- [1] 王均辉.福建省肉牛产业发展的思考[J].中国牛业科学,2015,41(6):73-74,80.
- [2] 岳宏.中国肉牛产业可持续发展研究[D].博士学位论文.长春:吉林农业大学,2011.
- [3] 闫祥林.营养水平对肉牛生产性能及牛肉品质的影响[D].硕士学位论文.南京:南京农业大学,2003.
- [4] FAO.Livestock's long shadow: environmental issues and options[R].Rome:FAO,2006.
- [5] 曲建升.中国欠发达地区温室气体排放特征与对策分析——基于甘肃省温室气体排放评估与情景分析的案例研究[D].博士学位论文.兰州:兰州大学,2008.
- [6] 程胜利,肖玉萍,杨保平,等.反刍动物甲烷排放现状及调控技术研究进展[J].中国草食动物科学,2013,33(5):56-59.
- [7] 游玉波,廖新俤.广东省反刍动物甲烷排放量的估算[J].家畜生态,2004,25(3):27-31.
- [8] 李春华,高艳霞,曹玉凤,等.影响反刍动物瘤胃甲烷产生的因素及调控措施[J].黑龙江畜牧兽医,2010(8):33-34.
- [9] 贺永惠,王清华,李杰.降低反刍动物甲烷排放的研究进展[J].黄牛杂志,2001,27(5):47-50.
- [10] 杨承剑.延胡索酸二钠对山羊瘤胃甲烷生成的调控

研究及相关瘤胃微生物菌群分析[D].博士学位论文.南京:南京农业大学,2011.

- [11] 刘红,张运涛,方德罗.反刍动物甲烷排放及其对全球变暖的影响[J].山东环境,1997(1):36-37.
- [12] 张春梅,苑志朋,郭嫣秋,等.植物油作为瘤胃甲烷抑制剂的效应及其作用机理[J].中国奶牛,2008(1):50-52.
- [13] 孙德成,赵智力,魏曼琳,等.脂肪酸添加剂对奶牛瘤胃挥发性脂肪酸和甲烷的影响[J].畜牧与兽医,2008,40(11):21-24.
- [14] MOSS A R, JOUANY J P, NEWBOLD J, et al. Methane production by ruminants: its contribution to global warming[J]. Annales de Zootechnie, 2000, 49(3): 231-253.
- [15] 刘亮.体外法研究苹果酸和十八碳脂肪酸对瘤胃脂肪酸代谢及甲烷产量的影响[D].硕士学位论文.北京:中国农业科学院,2008.
- [16] 张春梅.植物油及十八碳不饱和脂肪酸对瘤胃甲烷生成和微生态的影响[D].博士学位论文.杭州:浙江大学,2008.
- [17] GRAINGER C, WILLIAMS R, CLARKE T, et al. Supplementation with whole cottonseed causes long-term reduction of methane emissions from lactating dairy cows offered a forage and cereal grain diet[J]. Journal of Dairy Science, 2010, 93(6): 2612-2619.
- [18] 王平.日粮中不同棉籽水平对肉牛瘤胃机能及消化率的影响研究[D].硕士学位论文.杨凌:西北农林科技大学,2003.
- [19] 荆元强.不同日粮对肉牛瘤胃发酵、营养物质消化代谢和育肥的影响[D].硕士学位论文.泰安:山东农业大学,2012.
- [20] 刘建雷,赵金山,崔海净,等.日粮中添加不同水平棉籽对绵羊瘤胃发酵的影响[J].山东畜牧兽医,2009,30(4):11-12.
- [21] 王勇胜,曹玉凤,李秋凤,等.饲粮全棉籽比例对荷斯坦公牛育肥性能、血清生化指标和养分表观消化率的影响[J].动物营养学报,2018,30(5):1965-1972.
- [22] 冯志华.葵藜皂苷对奶牛瘤胃发酵、甲烷产量、抗氧化功能及免疫功能的影响[D].博士学位论文.保定:河北农业大学,2013.
- [23] 李春华.日粮中添加延胡索酸对奶牛生产性能及甲烷产量的影响[D].硕士学位论文.保定:河北农业大学,2010.
- [24] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会.GB/T 6433—2006 饲料中粗脂肪的测定[S].北京:中国标准出版社,2006.

- [25] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.GB/T 6436—2002 饲料中钙的测定[S].北京:中国标准出版社,2002.
- [26] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.GB/T 6437—2002 饲料中总磷的测定 分光光度法[S].北京:中国标准出版社,2002.
- [27] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会.GB/T 20806—2006 饲料中中性洗涤纤维(NDF)的测定[S].北京:中国标准出版社,2007.
- [28] 中华人民共和国农业部.NY/T 1459—2007 饲料中酸性洗涤纤维的测定[S].北京:农业出版社,2008.
- [29] 国家技术监督局.GB/T 6432—1994 饲料中粗蛋白测定方法[S].北京:中国标准出版社,1994.
- [30] 冯宗慈,高民.通过比色测定瘤胃液氨氮含量方法的改进[J].畜牧与饲料科学,2010,31(6/7):37.
- [31] COTTA M A, RUSSELL J B. Effect of peptides and amino acids on efficiency of rumen bacterial protein synthesis in continuous culture [J]. *Journal of Dairy Science*, 1982, 65(2): 226-234.
- [32] KHORASANI G R, OKINE E K, KENNELLY J J. Forage source alters nutrient supply to the intestine without influencing milk yield [J]. *Journal of Dairy Science*, 1996, 79(5): 862-872.
- [33] BOKULICH N A, SUBRAMANIAN S, FAITH J J, et al. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing [J]. *Nature Methods*, 2013, 10(1): 57-59.
- [34] EDGAR R C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads [J]. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 996-998.
- [35] LAGUNA J G, CARDOSO M S, LIMA J A, et al. Expression of hepatic genes related to energy metabolism during the transition period of Holstein and F1 Holstein-Gir cows [J]. *Journal of Dairy Science*, 2017, 100(12): 9861-9870.
- [36] 王加启,冯仰廉.不同粗饲料日粮发酵规律及合成瘤胃微生物蛋白质效率研究[J].黄牛杂志,1994,20(S1):82-85.
- [37] 崔安.不同精粗比日粮对舍饲秦川肉牛甲烷产量和瘤胃发酵的影响[D].硕士学位论文.杨凌:西北农林科技大学,2016.
- [38] 王加启.反刍动物营养学研究方法[M].北京:现代教育出版社,2011:127-139.
- [39] 陈小连,贾亚红,赵国琦.影响反刍动物瘤胃微生物蛋白合成因素的研究综述[J].饲料广角,2003(19):31-33.
- [40] 李旺.瘤胃挥发性脂肪酸的作用及影响因素[J].中国畜牧杂志,2012,48(7):63-66.
- [41] 吕永艳,刘建雷,胡昌军,等.全棉籽对瘤胃内环境及纤维素酶活性的影响[J].饲料研究,2011(6):9-12.
- [42] LI B, ZHANG X X, GUO F, et al. Characterization of tetracycline resistant bacterial community in saline activated sludge using batch stress incubation with high-throughput sequencing analysis [J]. *Water Research*, 2013, 47(13): 4207-4216.
- [43] STIVERSON J, MORRISON M, YU Z T. Populations of select cultured and uncultured bacteria in the rumen of sheep and the effect of diets and ruminal fractions [J]. *International Journal of Microbiology*, 2011, 2011: 750613.
- [44] GUO W, LI Y, WANG L Z, et al. Evaluation of composition and individual variability of rumen microbiota in yaks by 16S rRNA high-throughput sequencing technology [J]. *Anaerobe*, 2015, 34: 74-79.
- [45] PITTA D W, PINCHAK W E, DOWD S E, et al. Rumen bacterial diversity dynamics associated with changing from bermudagrass hay to grazed winter wheat diets [J]. *Microbial Ecology*, 2010, 59(3): 511-522.
- [46] MATSUI H, OGATA K, TAJIMA K, et al. Phenotypic characterization of polysaccharidases produced by four *Prevotella* type strains [J]. *Current Microbiology*, 2000, 41(1): 45-49.
- [47] TAJIMA K, AMINOV R I, NAGAMINE T, et al. Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, 29(2): 159-169.
- [48] POPE P B, SMITH W, DENMAN S E, et al. Isolation of succinivibrionaceae implicated in low methane emissions from Tammar wallabies [J]. *Science*, 2011, 333(6042): 646-648.
- [49] JANSSEN P H, KIRS M. Structure of the archaeal community of the rumen [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(12): 3619-3625.
- [50] YANAGITA K, KAMAGATA Y, KAWAHARASAKI M, et al. Phylogenetic analysis of methanogens in sheep rumen ecosystem and detection of *Methanomicrobium mobile* by fluorescence *in situ* hybridization. [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2000, 64(8): 1737-1742.
- [51] WRIGHT A D G, WILLIAMS A J, WINDER B, et al. Molecular diversity of rumen methanogens from sheep in Western Australia [J]. *Applied and Environmental*

- Microbiology, 2004, 70(3):1263–1270.
- [52] 裴彩霞,毛胜勇,朱伟云.山羊瘤胃产甲烷古菌多样性及与其他动物瘤胃的比较[J].畜牧兽医学报, 2012, 43(6):909–914.
- [53] LANA R P, RUSSELL J B, VAN AMBURGH M E. The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production [J]. Journal of Animal Science, 1998, 76(8):2190–2196.
- [54] KOCHERGINSKAYA S A, AMINOV R I, WHITE B A. Analysis of the rumen bacterial diversity under two different diet conditions using denaturing gradient gel electrophoresis, random sequencing, and statistical ecology approaches [J]. Anaerobe, 2001, 7(3):119–134.
- [55] HRISTOV A N, CALLAWAY T R, LEE C, et al. Rumen bacterial, archaeal, and fungal diversity of dairy cows in response to ingestion of lauric or myristic acid [J]. Journal of Animal Science, 2012, 90(12):4449–4457.
- [56] WANG J K, LIU M, WU Y L, et al. Medicinal herbs as a potential strategy to decrease methane production by rumen microbiota: a systematic evaluation with a focus on *Perilla frutescens* seed extract [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(22):9757–9771.
- [57] IWASA M, KOBAYASHI Y, MIFUJI-MOROKA R, et al. Branched-chain amino acid supplementation reduces oxidative stress and prolongs survival in rats with advanced liver cirrhosis [J]. PLoS One, 2013, 8(7):e70309.
- [58] LOCHHEAD P A, SALT I P, WALKER K S, et al. 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PEPCK and glucose-6-phosphatase [J]. Diabetes, 2000, 49(6):896–903.
- [59] 郭冬生,彭小兰,黄春红,等.反刍动物葡萄糖代谢与营养调控[J].中国奶牛,2011(4):16–19.

## Effects of Dietary Whole Cottonseed Ratio on Rumen Fermentation and Microflora, Methane Emission and Expression of Genes Related to Carbon Metabolism in Liver of Fattening Holstein Bulls

WANG Yongsheng<sup>1</sup> LI Yan<sup>2</sup> CAO Yufeng<sup>1\*</sup> LI Qiufeng<sup>1\*</sup>

BO Wenxi<sup>3</sup> GAO Yanxia<sup>1</sup> LI Jianguo<sup>1</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China; 2. College of Animal Medicine, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China; 3. Fucheng Wufeng Food Co., Ltd., Sanhe 065200, China)

**Abstract:** This experiment was aimed to study the effects of dietary whole cottonseed ratio on rumen fermentation and microflora, methane emission and expression of genes related to carbon metabolism in liver of fattening Holstein bulls. Forty-four fattening healthy Holstein bulls with similar body weight were randomly divided into 4 groups with 11 heads in each group. The difference of average body weight was not significant among groups ( $P>0.05$ ). The bulls in groups I (control), II, III, and IV were fed diets contained 0, 5%, 10%, and 15% whole cottonseed, respectively. The dietary energy and crude protein levels of each group were basically the same. The experimental period lasted for 90 d. The results showed as follows: 1) in the rumen fermentation parameters, compared with group I, the concentrations of ammonia nitrogen, microbial protein, and the percentages of acetic acid and propanoic acid in group IV were increased by 31.34%, 40.00%, 2.26% and 15.20%, respectively ( $P<0.05$ ), and the percentage of butyric acid was decreased by 4.46% ( $P<0.05$ ), but the acetic acid/propanoic acid and pH had no significant changes ( $P>0.05$ ). 2) From the analysis of the relative abundances of rumen bacteria at genus level, the relative abundances of *Prevotella\_1* and *Treponema\_2*

\* Corresponding authors: CAO Yufeng, professor, E-mail: cyf278@126.com; LI Qiufeng, professor, E-mail: lqf582@126.com

in group IV were extremely significantly higher than those in groups I, II and III ( $P < 0.01$ ); the relative abundance of Succinivibrionaceae\_UCG-002 in group IV was significantly higher than that in group I ( $P < 0.05$ ); there were no significant differences in the relative abundances of Rikenellaceae\_RC9\_gut\_group, Prevotellaceae\_UCG-003, *Ruminobacter*, Ruminococcaceae\_NK4A214\_group, *Fibrobacter*, Unidentified\_Chloroplast and Bacteroides ( $P > 0.05$ ). 3) From the analysis of the relative abundances of rumen methanogens at genus level, the relative abundances of *Methanobrevibacter* and *Methanosaeta* in group IV were the lowest in 4 groups, and significantly lower than that in group I ( $P < 0.05$ ); group III had the highest relative abundance of Absconditabacteria\_unidentified\_SR1, and significantly higher than that in group I ( $P < 0.05$ ); there were no significant differences in the relative abundances of *Methanosphaera*, *Methanimicrococcus* and *Methanospirillum* ( $P > 0.05$ ). 4) Dietary supplemented with different ratios of whole cottonseed all decreased the methane emission of fattening Holstein bulls, and methane emission in group IV was decreased by 22.68% compared with group I ( $P < 0.05$ ). 5) Correlation analysis found that the average daily weight had significant negative correlation with methane emission ( $P < 0.05$ ), and the relative abundances of *Methanobrevibacter*, *Methanosaeta* and Succinivibrionaceae\_UCG-002 had significant or extremely significant positive correlation with methane emission ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). 6) After adding 15% of whole cottonseed into the diet, the mRNA expression levels of methylmalonyl coenzyme amutase (*MUT*), phosphoenolpyruvate carboxykinase (*PEPCK*) and glucose-6-phosphatase (*G6P*) in liver had upward trend, and the *MUT* and *PEPCK* mRNA expression levels were significantly or extremely significant higher than those in group I ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). To sum up, under the conditions of this experiment, adding 15% whole cottonseed into the diet can effectively regulate the rumen fermentation and microflora of fattening Holstein bulls, significantly reduce the methane emission and up-regulate the expression of carbon metabolism related genes in the liver. [ *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2019, 31(6):2701-2715 ]

**Key words:** rumen fermentation; microflora; methane emission; carbon metabolism related genes; whole cottonseed; Holstein bulls