

酶菌混合处理稻草和苜蓿干草对滩羊生长性能、血清生化指标、瘤胃细菌多样性及KEGG通路的影响

姜碧薇^{1,2} 周玉香^{1*} 王甜¹ 李斐¹

(1.宁夏大学农学院,银川 750021;2.宁夏职业技术学院,银川 750021)

摘要: 本试验旨在研究酶菌混合处理稻草和苜蓿干草对滩羊生长性能、血清生化指标、瘤胃细菌多样性及KEGG通路的影响。选择体重相近、健康状况良好的3月龄宁夏滩羊20只,随机分为2组,每组10只。设定试验饲料的精粗比为30:70,其中粗饲料由稻草与苜蓿干草(二者的比例为60:40)组成,对照组饲料中稻草和苜蓿干草未经处理,试验组饲料中稻草和苜蓿干草经纤维素酶(活性 $\geq 10\ 000$ U/g,添加量为0.1%)与复合益生菌(主要成分为酵母菌、枯草芽孢杆菌和乳酸菌,添加量为2 kg/t)混合处理。预试期15 d,正试期60 d。分别于正试期第1天、第30天和第60天空腹静脉采血用于血清生化指标测定。饲养试验结束当天,空腹口腔采集瘤胃液并提取DNA用于瘤胃细菌多样性和宏基因组分析。结果显示:1)试验组滩羊的总增重、平均日增重极显著高于对照组($P<0.01$),料重比极显著低于对照组($P<0.01$)。2)试验组滩羊血清总蛋白和球蛋白含量显著高于对照组($P<0.05$),血清尿素含量极显著低于对照组($P<0.01$)。3)试验组的操作分类单元(OTU)数量和Shannon指数极显著高于对照组($P<0.01$);试验组与对照组的差异菌门有8个,它们是变形菌门、Patescibacteria、拟杆菌门、Kiritimatiellaeota、浮霉菌门、蓝藻门、螺旋体门和互养菌门。4)在KEGG通路中,试验组的嘧啶代谢、氨基糖与核苷酸糖代谢、二羧酸代谢这3条通路的基因数量极显著高于对照组($P<0.01$)。综上所述,酶菌混合处理稻草和苜蓿干草可以提高滩羊的增重和养殖的经济效益,同时,该处理方式提高了滩羊血清总蛋白和球蛋白含量,降低了血清尿素含量,改变了滩羊瘤胃细菌多样性和部分功能基因的数量。在本试验条件下,用酶菌混合处理的稻草和苜蓿干草饲喂滩羊的效果较优,有益于滩羊的健康养殖,可在生产中推广使用。

关键词: 纤维素酶;复合益生菌;稻草;滩羊;生长性能;瘤胃细菌;KEGG通路

中图分类号:S816

文献标识码:A

文章编号:1006-267X(2021)03-1482-11

苜蓿干草粗蛋白质含量高,适口性好,是反刍动物优质的粗饲料来源和重要的饲草作物^[1]。但我国优质苜蓿干草缺乏,若以苜蓿干草作为单一粗饲料,不能满足养殖业的需要。我国是农业大国,秸秆产量每年约为9.0亿t^[2],但利用率较低且大规模的焚烧造成了环境污染。如何有效利用秸

秆,降解其纤维素含量并与苜蓿干草配合使用,使其成为反刍动物的优质粗饲料,一直是动物营养研究的热点。通过饲用酶制剂的添加降解植物细胞壁的纤维素和半纤维素已是生物技术在动物营养和饲料工业中应用最成功的例子^[3],在粗饲料的发酵中已运用纯熟。益生菌发酵粗饲料能够提

收稿日期:2020-08-14

基金项目:农业部公益性行业(农业)(201503134)

作者简介:姜碧薇(1989—),女,宁夏银川人,讲师,博士研究生,动物生产系统与工程专业。E-mail: 642548386@qq.com

*通信作者:周玉香,教授,博士生导师,E-mail: zhyxzhww@163.com

高其营养价值,促进动物生长,提高生产性能^[4-8]。稻草和苜蓿干草均为肉羊养殖中的常见粗饲料,目前,通过酶菌混合处理稻草和苜蓿干草尚未见报道。鉴于此,本试验采用纤维素酶与复合益生菌(主要成分为乳酸菌、酵母菌和枯草芽孢杆菌等)混合处理宁夏地区常见的2种粗饲料稻草和苜蓿干草,参考课题组成员王萌^[9]的试验结果,将饲料精粗比设为30:70,并将稻草与苜蓿干草以60:40组合作为粗饲料,研究酶菌混合处理稻草和苜蓿干草饲喂滩羊对其生长性能、血清生化指标、瘤胃细菌多样性及KEGG通路的影响,以期为粗饲料资源的开发及其在滩羊生产实践中的科学应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 酶菌混合处理稻草和苜蓿干草的制备

准备适量的稻草和苜蓿干草,用粉碎机粉碎至3~5 cm备用。参照文献^[10]确定纤维素酶与复合益生菌的添加量,按照配制比例准确称取纤维素酶[活性 $\geq 10\ 000$ U/g;添加量为0.1%]、复

合益生菌[主要成分为酵母菌(活菌数 $\geq 1.0 \times 10^8$ CFU/g)、乳酸菌(活菌数 $\geq 1.0 \times 10^7$ CFU/g)和枯草芽孢杆菌(活菌数 $\geq 5.0 \times 10^7$ CFU/g),添加量为2 kg/t]和麦麸(按照待处理粗饲料的1%称取)后,加入适量的水,充分搅拌,混合均匀后采取喷淋的方式,边喷洒边搅拌,使水溶液与待处理粗饲料充分混合并将含水量调至70%左右,最后利用青贮裹包机直接进行打捆包膜后,密封保存30 d。稻草和苜蓿干草处理前后分别测定其营养物质含量,其中干物质含量参照《饲料水分的测定方法》(GB/T 6435—2006)测定,粗蛋白质(CP)含量参照《饲料中粗蛋白测定方法》(GB/T 6435—2006)测定,中性洗涤纤维(NDF)和酸性洗涤纤维(ADF)含量参照Van Soest等^[11]的方法进行测定,粗灰分含量参照《饲料中粗灰分的测定方法》(GB/T 6435—2006)测定,钙(Ca)含量采用高锰酸钾法测定,磷(P)含量采用钼黄比色法(UV-1780紫外分光光度计,岛津,日本)测定。处理前后稻草和苜蓿干草营养成分含量见表1。

表1 处理前后稻草和苜蓿干草营养成分含量(干物质基础)

Table 1 Nutrient contents of straw and alfalfa hay before and after treatment (DM basis) %

项目 Items	干物质 DM	粗蛋白质 CP	钙 Ca	磷 P	中性洗涤纤维 NDF	酸性洗涤纤维 ADF
未处理稻草 Untreated straw	95.31	2.38	0.12	0.01	73.51	40.37
处理后稻草 Treated straw	79.72	3.93	0.97	0.01	20.93	23.69
未处理苜蓿干草 Untreated alfalfa hay	93.38	12.24	0.83	0.01	52.88	41.98
处理后苜蓿干草 Treated alfalfa hay	79.90	15.35	0.87	0.01	32.02	17.23

1.2 试验动物与试验设计

饲养试验于2019年7—9月在宁夏农垦宁羊农牧有限公司有机牧场进行。选择体重 $[(31.03 \pm 1.00)$ kg]相近、健康状况良好的3月龄断奶宁夏滩羊(公羊)20只,随机分为2组(对照组和试验组),每组10只。对照组饲喂以未经处理的稻草和苜蓿干草为粗饲料的试验饲粮,试验组饲喂以酶菌混合处理的稻草和苜蓿干草为粗饲料的试验饲粮。

1.3 试验饲粮与饲养管理

试验饲粮参照农业行业标准《肉羊饲养标准》(NY/T 816—2004)和生产实践配制,其组成及营养水平见表2。试验饲粮精粗比为30:70,粗饲料由稻草与苜蓿干草按照60:40的比例进行配制,对

照组饲粮中稻草与苜蓿干草未经处理,试验组饲粮中稻草与苜蓿干草经酶菌混合处理。参试羊在试验前进行驱虫等常规防疫,定期对圈舍进行消毒与清扫。预试期15 d,正试期60 d,每日早晚(06:30和18:00)分2次等量饲喂,自由饮水。

表2 试验饲粮组成及营养水平(干物质基础)

Table 2 Composition and nutrient levels of experimental diets (DM basis) %

项目 Items	对照组 Control group	试验组 Trial group
原料 Ingredients		
苜蓿干草 Alfalfa hay	28	28
稻草 Straw	42	42

续表 2

项目 Items	对照组 Control group	试验组 Trial group
玉米 Corn	15	15
豆粕 Soybean meal	10	10
麦麸 Wheat bran	1	1
胡麻饼 Jute cake	2	2
食盐 NaCl	1	1
预混料 Premix ¹⁾	1	1
合计 Total	100	100
营养水平 Nutrient levels ²⁾		
代谢能 ME/(MJ/kg)	8.76	8.98
粗蛋白质 CP	10.08	11.63
钙 Ca	0.56	0.79
磷 P	0.17	0.17

1) 每千克预混料中含有 Contained the following per kg of premix: VA 200 000~400 000 IU, VE 500~2 000 IU, VD₃ 30 000~80 000 IU, Cu 400~600 mg, Mn 800~1 600 mg, Zn 1 200~2 400 mg, I 6~80 mg, Co 5~40 mg, Se 10~25 mg, Ca 20~300 g, P 20~150 g。

2) 代谢能为计算值,其他均为实测值。ME was a calculated value, while the others were measured values.

1.4 样品收集与指标测定

1.4.1 生长性能测定

从正试期开始,每日准确记录羊只的给料量与剩料量,计算干物质采食量。分别在试验开始当天和试验结束当天早晨空腹称取 2 组参试羊的体重,分别作为初始体重和终末体重,计算每只羊的总增重、平均日增重(ADG)和料重比(F/G)。

1.4.2 血液样品采集与血清生化指标测定

血液样品采集:分别于正试期的第 1 天、第 30 天和第 60 天晨饲前对 2 组参试羊进行静脉采血,采集的血样在离心管内放置 40 min,之后用离心机于 3 800 r/min 离心 10 min,离心结束后吸取血清(每个样品取 1 mL 血清 2 份),置于-20 ℃保存。试验结束后,使用迈瑞 BS-180 全自动生化分析仪,利用试剂盒(购于深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司)测定血清总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、尿素(URE)、葡萄糖(GLU)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、球蛋白(GLB)含量,计算白蛋白/球蛋白(A/G)。

1.4.3 瘤胃液的采集与 DNA 提取及建库测序

饲养试验结束当天清晨空腹采集瘤胃液,每组选择 3 只参试羊,采用负压采集器,经导管通过

口腔食道,深入到瘤胃中部采集瘤胃液约 100 mL,每个瘤胃液样品经 4 层薄纱布过滤后液氮保存。将瘤胃液样品送至广州基迪奥生物科技有限公司进行 V3+V4 区扩增并进行 Illumina HiSeq 平台测序。通过原始控制程序过滤原始 Tags,以 97% 以上匹配度为标准,将有效的 Tags 分配到操作分类单元(OTU)。采用 MetaProdigal (V2.6.3) 预测宏基因组蛋白质编码基因,CH-HIT (V4.6.5) 构建非冗余集合预测基因模型。采用序列同源性搜索工具 DIAMOND (V0.8.24) 以及 BLASTX (V2.2.31+) 完成蛋白质功能的序列注释。

1.5 数据统计与分析

生长性能、血清生化指标及瘤胃细菌多样性等数据用 Excel 2007 记录并作简单处理后,采用 SAS 8.2 软件进行方差分析,并采用 LSD 法进行多重比较,以 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 分别作为差异显著和极显著的判断标准。宏基因组数据 Unigenes 通过 DIAMOND 软件(阈值 E 值 $\leq 1e-5$) 比对到 KEGG 数据库,集合基因丰度表格计算不同数据库比对结果的丰度信息,以进行系统丰富的组间功能差异分析和比较。

2 结果与分析

2.1 酶菌混合处理稻草和苜蓿干草对滩羊生长性能和经济效益的影响

2.1.1 对滩羊生长性能的影响

由表 3 可知,试验组与对照组的初始体重无显著差异($P > 0.05$),而试验组的终末体重较对照组有所增加,但差异不显著($P > 0.05$);试验组的干物质采食量比对照组降低了 1.63%,但差异不显著($P > 0.05$);试验组的总增重、平均日增重极显著高于对照组($P < 0.01$),料重比极显著低于对照组($P < 0.01$),其中试验组总增重比对照组提高了 44.36%,平均日增重比对照组提高了 44.37%,料重比比对照组降低了 31.89%。上述结果表明,用酶菌混合处理稻草和苜蓿干草饲喂滩羊,可以提高滩羊的增重,降低料重比。

2.1.2 对滩羊经济效益的影响

由表 4 可知,试验组与对照组滩羊每日饲料成本差异不大,但试验组 1 只羊的日平均纯利润为 3.39 元,比对照组提高了 1.33 元。该结果表明,用酶菌混合处理稻草和苜蓿干草饲喂滩羊,能够提高滩羊养殖的经济效益。

表 3 酶菌混合处理稻草和苜蓿干草
对滩羊生长性能的影响

Table 3 Effects of straw and alfalfa hay treated by
enzyme and bacteria on growth performance of *Tan* sheep

项目 Items	对照组 Control group	试验组 Trial group
初始体重 IBW/kg	30.84±2.15	31.21±1.62
终末体重 FBW/kg	36.25±3.32	39.02±1.39
总增重 Total gain/kg	5.41±2.25 ^B	7.81±1.12 ^A
平均日增重 ADG/(g/d)	90.17±0.04 ^B	130.17±0.02 ^A
干物质采食量 DMI/(g/d)	662.08	651.28
料重比 F/G	7.34±1.56 ^A	5.00±1.66 ^B

同行数据肩标相同字母或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 ($P<0.01$)。下表同。

In the same row, values with no letter or the same 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 significant difference ($P<0.01$). The same as below.

表 4 经济效益分析

Table 4 Economic benefit analysis

项目 Items	对照组 Control group	试验组 Trial group
耗料量 Feed consumption/[kg/(只·d)]	0.62	0.65
饲料成本 Feed cost/[元/(只·d)]	1.24	1.30
人工成本 Labor cost/[元/(只·d)]	0.30	0.30
复合益生菌成本 Compound probiotics cost/ [元/(只·d)]	—	0.20
纤维素酶成本 Cellulase cost/[元/(只·d)]	—	0.01
增重收入 Weight gain income/[元/(只·d)]	3.60	5.20
纯利润 Net profit/[元/(只·d)]	2.06	3.39

滩羊活重价格以当前市场价 40 元/kg 计算, 复合益生菌价格为 100 元/kg, 纤维素酶价格为 84 元/kg。

The live weight price of *Tan* sheep was calculated based on the current market price of 40 RMB/kg, the price of compound probiotics was 100 RMB/kg, and the price of cellulase was 84 RMB/kg.

2.2 酶菌混合处理稻草和苜蓿干草对滩羊血清生化指标的影响

由表 5 可知, 第 1 天时, 试验组与对照组相比, 各项血清生化指标均无显著差异 ($P>0.05$)。第 30 天时, 试验组血清尿素含量显著低于对照组 ($P<0.05$), 其他各项指标无显著差异 ($P>0.05$)。第 60 天时, 试验组血清总蛋白、球蛋白含量显著高于对照组 ($P<0.05$), 血清尿素含量极显著低于对照组 ($P<0.01$)。该结果表明, 用酶菌混合处理稻草和苜蓿干草饲喂滩羊, 可以显著提高滩羊血清总蛋白、球蛋白含量, 极显著降低滩羊血清尿素含量。

表 5 酶菌混合处理稻草和苜蓿干草对
滩羊血清生化指标的影响

Table 5 Effects of straw and alfalfa hay treated by
enzyme and bacteria on serum biochemical
indexes of *Tan* sheep

项目 Items	对照组 Control group	试验组 Trial group
第 1 天 Day 1		
总蛋白 TP/(g/L)	55.42±7.06	52.22±10.73
白蛋白 ALB/(g/L)	25.82±4.17	26.30±5.08
尿素 URE/(mmol/L)	5.84±1.46	6.77±1.86
葡萄糖 GLU/(mmol/L)	2.95±0.56	3.00±0.48
总胆固醇 TC/(mmol/L)	1.21±0.31	1.33±0.27
甘油三酯 TG/(mmol/L)	0.24±0.08	0.25±0.09
球蛋白 GLB/(g/L)	24.32±7.81	25.92±5.73
白蛋白/球蛋白 A/G	1.12±0.20	1.04±0.05
第 30 天 Day 30		
总蛋白 TP/(g/L)	56.02±3.60	55.50±14.36
白蛋白 ALB/(g/L)	18.42±1.33	16.02±4.33
尿素 URE/(mmol/L)	8.92±1.16 ^a	7.09±1.62 ^b
葡萄糖 GLU/(mmol/L)	3.00±0.43	2.53±0.64
总胆固醇 TC/(mmol/L)	1.32±0.14	1.47±0.44
甘油三酯 TG/(mmol/L)	0.24±0.06	0.25±0.04
球蛋白 GLB/(g/L)	37.60±3.39	34.48±10.04
白蛋白/球蛋白 A/G	0.50±0.07	0.48±0.04
第 60 天 Day 60		
总蛋白 TP/(g/L)	56.68±2.67 ^b	64.40±2.27 ^a
白蛋白 ALB/(g/L)	20.04±0.73	20.94±0.96
尿素 URE/(mmol/L)	7.41±1.48 ^A	5.71±1.14 ^B
葡萄糖 GLU/(mmol/L)	3.26±0.43	2.98±0.38
总胆固醇 TC/(mmol/L)	1.42±0.24	1.58±0.26
甘油三酯 TG/(mmol/L)	0.30±0.08	0.41±0.10
球蛋白 GLB/(g/L)	35.74±1.87 ^b	39.36±1.99 ^a
白蛋白/球蛋白 A/G	0.50±0.00	0.48±0.04

2.3 酶菌混合处理稻草和苜蓿干草对滩羊瘤胃细菌多样性的影响

2.3.1 对滩羊瘤胃细菌 OTU 数量的影响

经测定,对照组共获得 reads 113 515 252 个,试验组共获得 reads 126 324 584 个。由表 6 可知,对照组与试验组的覆盖度均大于 0.98,说明测序量和测序深度合理,能够准确反映滩羊瘤胃内的细菌组成情况;试验组的 OTU 数量极显著高于对照组 ($P<0.01$),说明用酶菌混合处理稻草和苜蓿干草饲喂滩羊,提高了其瘤胃细菌的 OTU 数量。

表 6 各组瘤胃细菌 OTU 数量

Table 6 Number of OTU of rumen bacteria in each group

项目 Items	对照组 Control group	试验组 Trial group
覆盖度 Coverage	0.987±0.00	0.987±0.00
OTU 数量 OTU number	1 724.67±20.60 ^B	1 959.33±84.51 ^A

2.3.2 对滩羊瘤胃细菌 Alpha 多样性的影响

由表 7 可知,试验组 Chao 指数、ACE 指数和 Simpson 指数与对照组差异不显著 ($P>0.05$), Shannon 指数极显著高于对照组 ($P<0.01$)。上述结果说明用酶菌混合处理后的稻草和苜蓿干草饲喂滩羊,提高了其瘤胃细菌的 Shannon 指数。

表 7 16S rDNA 检测 Alpha 多样性

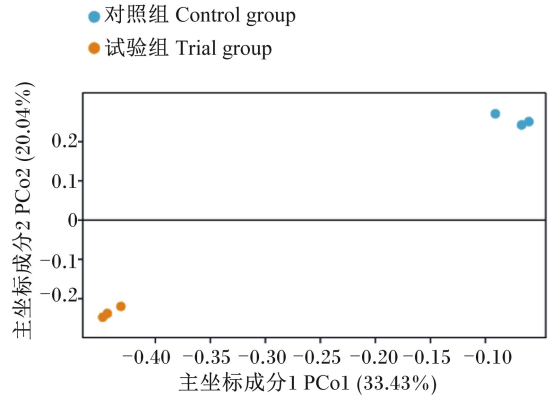
Table 7 Alpha diversity detected by 16S rDNA

项目 Items	对照组 Control group	试验组 Trial group
Chao 指数 Chao index	2 666.26±87.24	2 628.61±104.65
Ace 指数 Ace index	2 841.56±111.17	2 761.28±85.93
Shannon 指数 Shannon index	6.02±0.12 ^B	6.71±0.34 ^A
Simpson 指数 Simpson index	0.94±0.02	0.94±0.01

2.3.3 对滩羊瘤胃细菌 Beta 多样性的影响

图 1 为基于瘤胃细菌 OTU 的主坐标分析 (PCoA)。由图 1 可知,主坐标成分 1 (PCo1) 和主坐标成分 2 (PCo2) 对样本间变异的贡献度分别为 33.43% 和 20.04%,能够充分解释样本间的变异;且 PCoA 显示,同组内样本距离较近,说明同组内物种多样性差异较小,对照组与试验组之间样本

距离较远,说明对照组与试验组之间细菌多样性存在差异。该结果表明,用酶菌混合处理后的稻草和苜蓿干草饲喂滩羊,影响了其瘤胃细菌的多样性。



蓝色圆点为对照组的 3 个平行样本,橙色圆点为试验组的 3 个平行样本。图 2 同。

Blue dots were the three parallel samples of control group, and orange dots were the three parallel samples of trial group.

图 1 基于瘤胃细菌 OTU 的主坐标分析

Fig.1 Principal coordinate analysis of rumen bacteria based on OTU

2.3.4 对滩羊瘤胃细菌优势菌门及门水平差异物种的影响

由表 8 可知,对照组与试验组的优势菌门均为变形菌门、厚壁菌门和拟杆菌门,三者总量占总菌门的 90% 以上。其中,试验组变形菌门的丰度极显著低于对照组 ($P<0.01$),拟杆菌门的丰度极显著高于对照组 ($P<0.01$),厚壁菌门的丰度较对照组提高了 4.58%,但差异不显著 ($P>0.05$)。由图 2 可知,试验组与对照组存在显著差异的菌门分别为变形菌门、Patescibacteria、拟杆菌门、Kiritimatiellaota、浮霉菌门、蓝藻门、螺旋体门和互养菌门,其中试验组变形菌门、Patescibacteria 的比例显著高于对照组 ($P<0.05$),拟杆菌门、Kiritimatiellaota、浮霉菌门、蓝藻门、螺旋体门、互养菌门的比例显著低于对照组 ($P<0.05$)。上述结果说明用酶菌混合处理稻草和苜蓿干草饲喂滩羊,其瘤胃内的差异菌门多达 8 个,影响了其瘤胃内环境。

2.4 酶菌混合处理稻草和苜蓿干草对滩羊瘤胃细菌 KEGG 通路的影响

本试验中,对照组共获得基因 5 121 024 个,试验组共获得基因 6 461 155 个。与 KEGG 数据

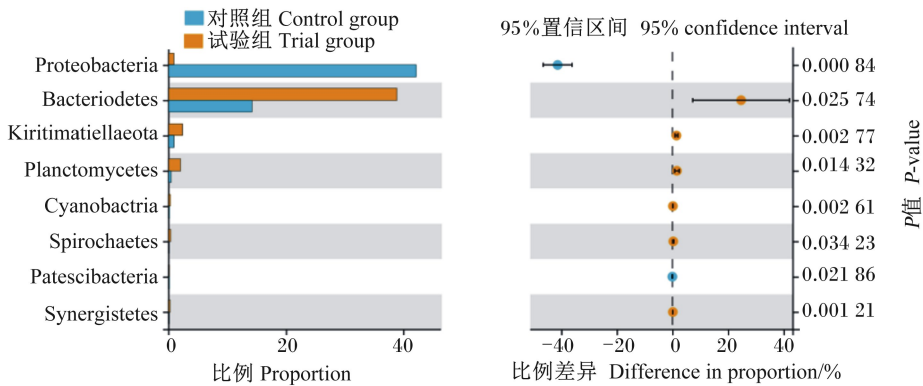
库对比可得各样品 KEGG 注释图(图 3)。由图 3 可知,在 A 层级中,富集到新陈代谢(metabolism)层级的基因数量最多,其次是遗传信息处理(genetic information processing)、环境信息处理(environmental information processing)、细胞过程(cellular processing)以及人类疾病(human disease)层级。该结果表明,以酶菌混合处理稻草和苜蓿干草作为粗饲料饲喂滩羊,其瘤胃内主要功能酶是参与新陈代谢、遗传信息处理和环境信息处理。

表 8 全样本优势菌门丰度

Table 8 Abundances of dominant bacteria at phylum level in whole sample

%

项目 Items	对照组 Control group	试验组 Trial group
变形菌门 Proteobacteria	32.18±2.11 ^A	2.34±0.11 ^B
厚壁菌门 Firmicutes	51.09±2.59	53.43±6.82
拟杆菌门 Bacteroidetes	14.17±0.41 ^B	38.87±7.04 ^A



Proteobacteria: 变形菌门; Bacteroidetes: 拟杆菌门; Planctomycetes: 浮霉菌门; Cyanobacteria: 蓝藻门; Spirochaetes: 螺旋体门; Synergistetes: 互养菌门。

图 2 门水平 Welch's *t* 检验差异物种Fig.2 Difference species in Welch's *t* test at phylum level

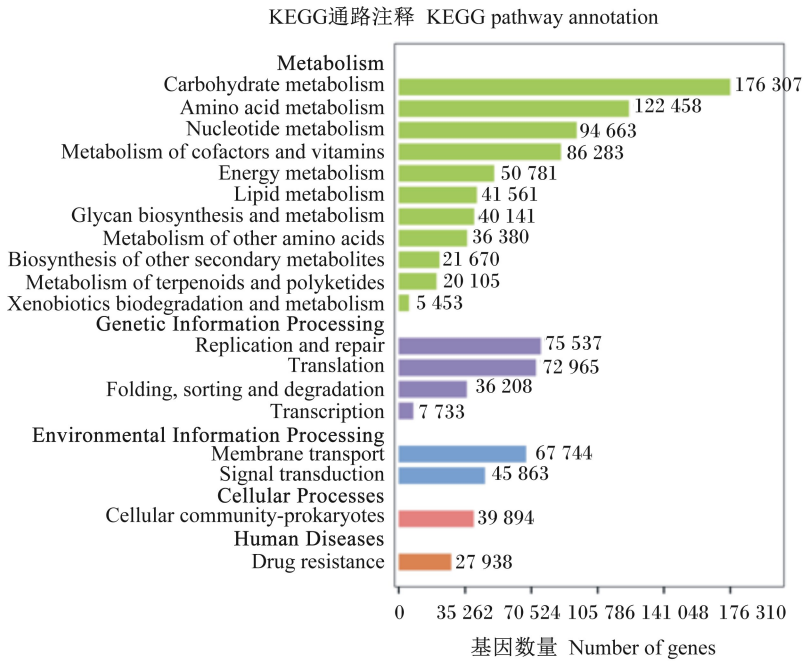
3 讨论

3.1 酶菌混合处理稻草和苜蓿干草对滩羊生长性能和经济效益的影响

反映反刍动物生长性能的主要指标有采食量、日增重、料重比等。有研究表明,适宜的苜蓿补饲可以提高稻草纤维物质的消化率^[12]。本试验选用稻草与苜蓿干草以 60:40 比例组合作为粗饲料,增重效果较为理想。研究表明,在畜禽养殖过程中添加一些维生素制剂、微量元素制剂、酶制剂、微生物制剂等可以提高畜禽的生长性能和肉

在 B 层级中,丰度排名前 25 的通路见表 9。由表 9 可知,试验组嘌呤代谢(purine metabolism)、双组分系统(two-component system)和 ABC 转运蛋白(ABC transporters)等 22 条通路的基因数量与对照组无显著差异($P>0.05$),而嘧啶代谢(pyrimidine metabolism)、氨基糖和核苷酸糖代谢(amino sugar and nucleotide sugar metabolism)、二羧酸代谢(glyoxylate and dicarboxylate metabolism)这 3 条通路的基因数量极显著高于对照组($P<0.01$)。

品质^[13]。邱玉朗等^[14]研究发现,用混合微生物发酵秸秆饲喂肉羊,其平均日增重提高 36%,料重比降低 28.68%。王平等^[15]研究表明,在育肥绵羊基础饲料中添加纤维素酶后,日增重可提高 43.98%。李军^[16]的研究结果显示,益生菌剂的添加可以提高肉羊的生长性能。申春红^[17]的研究结果显示,在基础饲料中添加 2.0% 复合微生物制剂可以提高肉牛的生长性能。本试验运用纤维素酶和复合益生菌混合处理稻草和苜蓿干草。以其作为粗饲料饲喂滩羊,显著提高了滩羊的总增重和平均日增重,并降低了料重比,说明该处理方式提高了滩羊的生长性能。



Metabolism: 新陈代谢; Carbohydrate metabolism: 碳水化合物代谢; Amino acid metabolism: 氨基酸代谢; Nucleotide metabolism: 核苷酸代谢; Metabolism of cofactors and vitamins: 辅助因子和维生素代谢; Energy metabolism: 能量代谢; Lipid metabolism: 脂质代谢; Glycan biosynthesis and metabolism: 聚糖生物合成代谢; Metabolism of other amino acids: 其他氨基酸代谢; Biosynthesis of other secondary metabolites: 其他次生代谢产物的生物合成; metabolism of terpenoids and polyketides: 萜类化合物和聚酮的代谢; Xenobiotics biodegradation and metabolism: 外源生物的生物降解与代谢; Genetic Information Processing: 遗传信息处理; Replication and repair: 复制和修复; Translation: 翻译; Folding, sorting and degradation: 折叠、排序和退化; Transcription: 誊写; Environmental Information Processing: 环境信息处理; Membrane transport: 膜运输; Signal transduction: 信号转导; Cellular Processes: 细胞过程; Cellular community-prokaryotes: 原核微生物的细胞通讯; Human Diseases: 人类疾病; Drug resistance: 抗药性。

图3 全样本 KEGG 通路注释图 (A 层级)

Fig.3 KEGG pathway annotation map of whole sample (level A)

表9 KEGG 通路较高丰度基因数量 (B 层级)

Table 9 Number of genes in high abundance in KEGG pathway (level B)

通路 Pathways	对照组 Control group	试验组 Trial group
嘌呤代谢 Purine metabolism	17 529.60±487.69	18 021.24±305.90
嘧啶代谢 Pyrimidine metabolism	15 621.34±283.69 ^B	16 062.68±200.23 ^A
双组分系统 Two-component system	13 135.88±317.71	13 713.52±198.68
ABC 转运蛋白 ABC transporters	14 072.51±1 017.94	14 366.62±379.99
核糖体 Ribosome	12 867.43±387.26	13 475.87±261.75
群体感应 Quorum sensing	11 520.68±734.74	11 685.50±341.79
淀粉与蔗糖代谢 Starch and sucrose metabolism	10 533.06±161.89	10 622.43±84.22
氨基糖和核苷酸糖代谢 Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	10 132.05±162.33 ^B	10 499.95±103.77 ^A
位置基因重组 Homodogous recombination	9 082.56±143.34	9 173.52±175.16
氨酰 tRNA 生物合成 Aminoacyl-tRNA biosynthesis	8 931.62±247.27	9 218.08±277.69
糖酵解/葡萄糖异生作用 Glycolysis/ gluconeogenesis	8 070.83±195.17	8 185.42±157.11
丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢 Alanine, aspartate and glutamate metabolism	7 381.57±78.697	7 692.79±51.92

续表 9

通路 Pathways	对照组 Control group	试验组 Trial group
错配修复 Mismatch repair	7 450.39±116.14	7 389.15±126.02
半乳糖代谢 Galactose metabolism	7 019.39±166.40	7 140.79±85.82
DNA 复制 DNA replication	6 983.21±81.21	6 727.74±116.81
半胱氨酸和蛋氨酸代谢 Cysteine and methionine metabolism	6 900.86±188.46	6 872.82±112.98
肽聚糖类生物合成 Peptidoglycan biosynthesis	6 553.50±219.81	7 031.20±120.82
丙酮酸代谢 Pyruvate metabolism	5 992.15±238.94	6 218.89±180.47
甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢 Glycine, serine and threonine metabolism	5 784.30±82.58	6 081.66±69.13
果糖和甘露糖代谢 Fructose and mannose metabolism	5 405.37±21.14	5 447.33±90.28
氧化磷酸化作用 Oxidative phosphorylation	5 262.32±44.57	5 368.43±37.51
苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成 Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	5 127.29±160.87	5 318.04±43.51
磷酸戊糖途径 Pentose phosphate pathway	5 020.90±125.12	5 176.13±69.83
二羧酸代谢 Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	4 705.13±64.82 ^B	4 854.40±43.49 ^A
甲烷代谢 Methane metabolism	4 299.57±102.03	4 587.22±117.95

有研究表明,饲料中添加酶制剂能够显著提高养殖户的经济效益。蔺国文^[18]在枯黄玉米秸秆中添加不同比例的复合酶制剂饲喂肉牛,结果表明,0.10%的酶制剂效果最佳,日增重达到1.192 kg,比对照组提高了23.49%,经济效益显著增加。本试验用酶菌混合处理稻草和苜蓿干草饲喂滩羊,1只羊的日平均纯利润提高了1.3元,说明该处理方式的经济效益较为理想。

3.2 酶菌混合处理稻草和苜蓿干草对滩羊血清生化指标的影响

血清生化指标反映了机体新陈代谢的变化情况^[19]。其中,血清总蛋白不但承载了运输营养物质、调节运输物质等重要生理功能,还与组织蛋白质合成有密切联系,其含量能够反映机体的营养状况和蛋白质消化率^[20]。血清球蛋白又称为免疫球蛋白,能够反映机体的抗病能力。良好的营养状况可使血清总蛋白和球蛋白含量维持在一个较高水平,二者含量的升高表明机体代谢活动增强^[21]。血清尿素是机体蛋白质分解代谢的重要产物之一,体现了蛋白质的代谢情况。机体血清尿素含量降低,说明机体对氮的利用效率升高^[22]。康怀艳^[23]研究了益生菌发酵饲料对奶山羊血清生化指标和产奶性能的影响,结果表明,益生菌发酵饲料能够提高奶山羊血清总蛋白和球蛋白含量,降低血清尿素氮含量。余森等^[24]用芽孢杆菌、乳酸菌和酵母菌发酵饲料饲喂肉牛,结果显示,肉牛的血清总蛋白、白蛋白、免疫球蛋白G、免疫球蛋白A和免疫球蛋白M含量显著提高。这与本试

验结果一致。本试验结果表明,用酶菌混合处理稻草和苜蓿干草饲喂滩羊,可以提高滩羊血清总蛋白、球蛋白含量,降低血清尿素含量,有益于滩羊的健康养殖。

3.3 酶菌混合处理稻草和苜蓿干草对滩羊瘤胃细菌多样性的影响

目前随着宏基因组学的兴起,学者们针对瘤胃生态环境的研究越来越趋向于微观的分子。在瘤胃微生态系统当中,微生物区系的结构十分复杂,瘤胃微生物种群的数量以及区系组成受多种因素的影响。近年来,有关饲用纤维素酶或益生菌作为饲料添加剂对反刍动物瘤胃消化代谢影响的研究较多。有研究表明,在饲料中添加分解纤维素酶制剂可以显著提高奶牛瘤胃微生物数量^[25]。黄庆生等^[26]研究表明,酵母培养物能够显著提高瘤胃总细菌数量,而对其他指标没有显著影响。Kong等^[27]研究了饲喂不同粗饲料对奶牛瘤胃细菌多样性及结构的影响,结果显示,在门水平上,厚壁菌门和拟杆菌门占整个瘤胃细菌的比例较大,这与本试验研究结果一致。

3.4 酶菌混合处理稻草和苜蓿干草对滩羊瘤胃KEGG通路的影响

KEGG能够从分子水平上系统研究差异基因的功能,因此是代谢通路研究的核心^[28]。它涵盖了基因组、疾病和信号通路等数据库,整合了相关蛋白质、基因、代谢等多种信息,通过比对已知通路,按照不同功能分级。褚毅^[29]通过在猪的基础饲料中添加脂肪和糖研究代谢通路的差异,结果

发现功能基因进行 KEGG 富集时集中在代谢通路上,进一步研究注释在代谢通路上的差异功能基因,发现添加脂肪和糖造成的差异主要表现在脂肪酸代谢方面。多项研究表明,二羧酸代谢与脂肪酸代谢有关。有研究表明,尿嘧啶参与了某些 B 族维生素的合成,其含量变化可能会引起 B 族维生素的变化^[30]。本试验中,试验组嘧啶代谢、氨基糖和核苷酸糖代谢、二羧酸代谢 3 条通路的基因数量极显著高于对照组,说明用酶菌混合处理稻草和苜蓿干草饲喂滩羊,提高了滩羊嘧啶代谢、氨基糖和核苷酸糖代谢、二羧酸代谢的基因数量,有可能会增强 B 族维生素的合成和脂肪酸的代谢功能。

4 结 论

酶菌混合处理稻草和苜蓿干草可以提高滩羊的增重和养殖的经济效益,同时,该处理方式提高了滩羊血清总蛋白、血清球蛋白含量,降低了血清尿素含量,改变了滩羊瘤胃细菌多样性和部分功能基因的数量。在本试验条件下,用酶菌混合处理的稻草和苜蓿干草饲喂滩羊的效果较优,有益于滩羊的健康养殖,可在生产中推广使用。

参考文献:

- [1] 孙娟娟,阿拉木斯,赵金梅,等.6 个紫花苜蓿品种氨基酸组成分析及营养价值评价[J].中国农业科学,2019,52(13):2359-2367.
SUN J J,ALAMUS,ZHAO J M,et al.Amino acid composition analysis and nutritional value evaluation of six alfalfa varieties[J].Chinese Journal of Agricultural Sciences,2019,52(13):2359-2367.(in Chinese)
- [2] 柴如山,王擎运,叶新新,等.我国主要粮食作物秸秆还田替代化学氮肥潜力[J].农业环境科学学报,2019,38(11):2583-2593.
CHAI R S,WANG Q Y,YE X X,et al.The potential of straw returning as a substitute for chemical nitrogen fertilizer in China[J].Journal of Agricultural Environmental Sciences,2019,38(11):2583-2593.(in Chinese)
- [3] 杨永明.外源纤维复合酶在绵羊饲养中的作用效果及其作用机制的研究[D].硕士学位论文.呼和浩特:内蒙古农业大学,2002.
YANG Y M.Study on the effect and mechanism of exogenous fiber complex enzyme in sheep feeding [D].Master's Thesis.Hohhot:Inner Mongolia Agricultural University,2002.(in Chinese)
- [4] 岑加福,韦其荣,朱国胜.微生态发酵饲料及其发展现状[J].当代畜牧,2014(18):39-43.
CEN J F,WEI Q R,ZHU G S.Microecological fermented feed and its development status[J].Contemporary Animal Husbandry,2014(18):39-43.(in Chinese)
- [5] 彭忠利,郭春华,柏雪,等.微生物发酵饲料对乐至黑山羊生产性能、养分消化率与血液生化指标的影响[J].中国农业科技导报,2013,15(5):106-113.
PENG Z L,GUO C H,BAI X,et al.Effects of microbial fermented feed on production performance,nutrient digestibility and blood biochemical indexes of *Lezhi* black goat [J].China Agricultural Science and Technology Guide,2013,15(5):106-113.(in Chinese)
- [6] 肖怡.三种益生菌对肉羊甲烷排放、物质代谢和瘤胃发酵的影响[D].硕士学位论文.塔里木:塔里木大学,2016.
XIAO Y.Effects of three probiotics on methane emission,material metabolism and rumen fermentation of mutton sheep[D].Master's Thesis.Tarim:Tarim University,2016.(in Chinese)
- [7] 袁园,葛莹,钟佳祎,等.酵母菌在动物饲料营养学中的研究进展[J].饲料博览,2018(4):19-22.
YUAN Y,GE Y,ZHONG J Y,et al.Research progress of yeast in animal feed nutrition[J].Feed Review,2018(4):19-22.(in Chinese)
- [8] 邹春悦.酵母菌在食品中的作用研究进展[J].当代化工研究,2018(3):96-97.
ZOU C Y.Research progress of yeast in food [J].Contemporary Chemical Research,2018(3):96-97.(in Chinese)
- [9] 王萌.秸秆日粮添加过瘤胃蛋氨酸对滩羊生产性能的影响[D].硕士学位论文.银川:宁夏大学,2017.
WANG M.Effects of rumen fed methionine supplementation on performance of *Tan* sheep[D].Master's Thesis.Yinchuan:Ningxia University,2017.(in Chinese)
- [10] 刘辉,田亚红,刘子艳,等.酶菌协同发酵玉米秸秆生产蛋白饲料的研究[J].河南农业科学,2016,45(12):161-164.
LIU H,TIAN Y H,LIU Z Y,et al.Study on the production of protein feed from corn straw by enzyme bacteria synergistic fermentation[J].Henan Agricultural Science,2016,45(12):161-164.(in Chinese)
- [11] VAN SOEST P J,ROBERTSON J B,LEWIS B A.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.
- [12] 欧阳克蕙,易中华,瞿明仁,等.稻草饲料资源开发利用新技术[J].饲料研究,2010(4):72-74.
OU Y K,YI Z Hi,QU M R,et al.Development and utilization of straw feed resources[J].Feed research,2010(4):72-74.(in Chinese)
- [13] 周振勇,张杨,蔺宏凯,等.不同饲料添加剂对肉牛生长发育与产肉性能影响的研究[J].中国畜牧兽医,2012,39(8):95-100.

- ZHOU Z Y, ZHANG Y, LIN H K, et al. Effects of different feed additives on growth and meat production performance of beef cattle [J]. *Chinese Journal of animal husbandry and veterinary medicine*, 2012, 39(8): 95-100. (in Chinese)
- [14] 邱玉朗, 李林, 纪传来, 等. 秸秆玉米浆混合发酵对肉羊生长及血液指标的影响 [J]. *饲料研究*, 2019, 42(1): 12-14.
- QIU Y L, LI L, JI C L, et al. Effects of mixed fermentation of straw corn pulp on growth and blood indexes of mutton sheep [J]. *Feed research*, 2019, 42(1): 12-14. (in Chinese)
- [15] 王平, 李长存. 纤维素复合酶对育肥绵羊增重效果的影响 [J]. *现代农业科技*, 2008(20): 238.
- WANG P, LI C C. Effect of cellulose complex enzyme on weight gain of fattening sheep [J]. *Modern agricultural science and technology*, 2008(20): 238. (in Chinese)
- [16] 李军. 益生菌添加剂对肉羊生长性能的影响 [J]. *畜牧兽医科学*, 2020(8): 8-9.
- LI J. Effect of probiotic additives on growth performance of mutton sheep [J]. *Animal husbandry and veterinary science*, 2020(8): 8-9. (in Chinese)
- [17] 申春红. 饲料中添加复合微生物制剂对肉牛生长性能及肉品质的影响 [J]. *中国饲料*, 2018(17): 67-69.
- SHEN C H. Effects of compound microbial agents on growth performance and meat quality of beef cattle [J]. *Chinese Feed*, 2018(17): 67-69. (in Chinese)
- [18] 蔺国文. 枯黄玉米秸秆酶化处理育肥肉牛效果研究 [J]. *中国牛业科学*, 2012, 38(2): 28-30.
- LIN G W. Study on fattening effect of yellow corn stalk enzymatic treatment on beef cattle [J]. *Chinese Journal of Cattle Science*, 2012, 38(2): 28-30. (in Chinese)
- [19] 陈晓帅, 杨海明, 孟俊, 等. 益生菌对乳鸽生长性能、屠宰性能、免疫器官指数和血清生化指标的影响 [J]. *中国饲料*, 2017(9): 26-29, 34.
- CHEN X S, YANG H M, MENG J, et al. Effects of probiotics on growth performance, slaughter performance, immune organ index and serum biochemical indexes of pigeons [J]. *Chinese Feed*, 2017(9): 26-29, 34. (in Chinese)
- [20] 王杰, 艾萍萍, 刁其玉, 等. 复合益生菌和纤维寡糖对断奶仔猪生长性能、粪便微生物及血清指标的影响 [J]. *动物营养学报*, 2016, 28(3): 881-890.
- WANG J, AI P P, DIAO Q, et al. Effects of compound probiotics and fibrooligosaccharides on growth performance, fecal microorganisms and serum indexes of weaned piglets [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2016, 28(3): 881-890. (in Chinese)
- [21] DHANALAKSHMI S, DEVI R S, SRIKUMAR R, et al. Protective effect of *Triphala* on cold stress-induced behavioral and biochemical abnormalities in rats [J]. *Yakugaku Zasshi; Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 2007, 127(11): 1863-1867.
- [22] RECKTENWALD E B, ROSS D A, FESSENDEN S W. Urea-N recycling in lactating dairy cows fed diets with 2 different levels of dietary crude Protein and starch with or without monensin [J]. *Journal of Dairy Science*, 2014, 97(3): 1611-1622.
- [23] 康怀艳. 益生菌发酵饲料对奶山羊血清生化指标和产奶性能的影响 [D]. 硕士学位论文. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016.
- KANG H Y. Effects of probiotic fermented feed on serum biochemical indexes and milk production performance of dairy goats [D]. Master's Thesis. Yangling: Northwest Agricultural and Forestry University, 2016. (in Chinese)
- [24] 余森, 严锦绣, 彭忠利, 等. 微生物发酵饲料对肉牛免疫机能的影响 [J]. *中国畜牧兽医*, 2013, 40(4): 114-117.
- YU M, YAN J X, PENG Z L, et al. Effects of microbial fermented feed on immune function of beef cattle [J]. *Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2013, 40(4): 114-117. (in Chinese)
- [25] NSEREKO V L, BEAUCHEMIN K A, MORGAVI D P, et al. Effect of a fibrolytic enzyme preparation from *Trichoderma longibrachiatum* on the rumen microbial population of dairy cow [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2002, 48(1): 14-20.
- [26] 黄庆生, 王加启. 添加不同酵母培养物对瘤胃纤维分解菌群和纤维素酶活的影响 [J]. *畜牧兽医学报*, 2005, 36(2): 144-148.
- HUANG Q S, WANG J Q. Effects of adding different yeast cultures on rumen cellulolytic flora and cellulase activity [J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2005, 36(2): 144-148. (in Chinese)
- [27] KONG Y H, LEATHER R, FORSTER R. Composition, spatial distribution, and diversity of the bacterial communities in the rumen of cows fed different forages [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 74(3): 612-622.
- [28] 王成花, 孙诗晴, 徐巨龙, 等. 抗氟苯虫酰胺小菜蛾差异表达基因及其通路 [J]. *中国农业科学*, 2018, 51(11): 2106-2115.
- WANG C H, SUN S Q, XU J L, et al. Differential expression genes and their pathways of flubendazole resistance in *Plutella xylostella* [J]. *Chinese Journal of Agricultural Sciences*, 2018, 51(11): 2106-2115. (in Chinese)
- [29] 褚毅. 猪高糖高脂饲喂条件下肝脏转录组分析 [D]. 硕士学位论文. 南宁: 广西大学, 2016.
- CHU Y. Transcriptome analysis of pig liver under high

glucose and high fat diet [D]. Master's Thesis. Nanning: Guangxi University, 2016. (in Chinese)

[30] YU X Z, YANG G H, YAN C Y, et al. Dimeric struc-

ture of the uracil: proton symporter Ura A provides mechanistic insights into the SLC 4/23/26 transporter [J]. *Cell Research*, 2017, 27(8): 1020–1033.

Effects of Straw and Alfalfa Hay Treated by Enzyme and Bacteria on Growth Performance, Serum Biochemical Indexes, Rumen Bacterial Diversity and KEGG Pathway of *Tan* Sheep

JIANG Biwei^{1,2} ZHOU Yuxiang^{1*} WANG Tian¹ LI Fei¹

(1. College of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, China; 2. Ningxia Vocational and Technical College, Yinchuan 750021, China)

Abstract: This experiment was conducted to study the effects of straw and alfalfa hay treated by enzyme and bacteria on growth performance, serum biochemical indexes, rumen bacterial diversity and KEGG pathway of *Tan* sheep. Twenty 3-month-old *Ningxia Tan* sheep with similar weight and good health condition were randomly divided into 2 groups with 10 sheep in each group. The ratio of concentrate to roughage was 30:70, and the roughage was consisted of straw and alfalfa hay with the ratio of straw to alfalfa was 60:40. The straw and alfalfa hay in the control group was not treated, but those in the trial group was treated by compound probiotics (main components were yeast, *Bacillus subtilis* and lactic acid bacteria) and cellulase (activity $\geq 10\ 000$ U/g). The pre feeding period was 15 days and the normal feeding period was 60 days. Blood samples were collected from abdominal vein on days 1, 30 and 60 of the trial period for determination of serum biochemical indexes. At the end of feeding experiment, rumen fluid was collected on an empty stomach and DNA was extracted for rumen bacterial diversity and metagenome analysis. The results showed as follows: 1) the total gain and average daily gain of *Tan* sheep in the trial group were significantly higher than those in the control group ($P < 0.01$), and the feed/gain was significantly lower than that in the control group ($P < 0.01$). 2) The contents of serum total protein and globulin in the trial group were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$), and the serum urea content was significantly lower than that in the control group ($P < 0.01$). 3) The number of operational taxonomic unit (OTU) and Shannon index in the trial group were significantly higher than those in the control group ($P < 0.01$); there were 8 different bacteria phyla between the trial group and the control group, they were Proteobacteria, Patescibacteria, Bacterioidetes, Kiritimatiellaeota, Planctomycetes, Cyanobacteria, Spirochaetes and Synergistetes. 4) In KEGG pathway, the number of genes in pyrimidine metabolism, amino sugar and nucleotide sugar metabolism and glyoxylate and dicarboxylate metabolism in the trial group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.01$). It is concluded that, the enzyme and bacteria mixed treatment of straw and alfalfa hay can improve the weight gain and the economic benefits of *Tan* sheep, at the same time, the treatment method improves the serum total protein and globulin contents, decreases the serum urea content, the changes the diversity of rumen bacteria and the number of some functional genes of *Tan* sheep. Under this experiment condition, the feeding effect of *Tan* sheep with straw and alfalfa hay after enzyme and bacteria mixed treatment is better, which is beneficial to the healthy breeding of *Tan* sheep and can be popularized in production. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2021, 33(3): 1482-1492]

Key words: cellulase; compound probiotics, straw; *Tan* sheep; growth performance; rumen bacteria; KEGG pathway