

研究报告

牦牛瘤胃碳水化合物降解酶与微生物宏基因组对饲料添加混合异位酸的响应

胡志斌¹, 姜菲¹, 高彦华^{*1}, 张康林², 吴建平², 马秀莲¹, 彭忠利¹

1 西南民族大学畜牧兽医学院 青藏高原动物遗传资源保护与利用教育部重点实验室 动物科学国家民委重点实验室, 四川 成都 610041

2 四川省甘孜藏族自治州畜牧业科学研究所, 四川 康定 626000

胡志斌, 姜菲, 高彦华, 张康林, 吴建平, 马秀莲, 彭忠利. 牦牛瘤胃碳水化合物降解酶与微生物宏基因组对饲料添加混合异位酸的响应[J]. 微生物学通报, 2024, 51(7): 2630-2646.

HU Zhibin, JIANG Fei, GAO Yanhua, ZHANG Kanglin, WU Jianping, MA Xiulian, PENG Zhongli. Responses of ruminal carbohydrate-degrading enzymes and microbial metagenome in yaks to dietary supplementation with mixed isoacids[J]. Microbiology China, 2024, 51(7): 2630-2646.

摘要: 【背景】异位酸属于支链挥发性脂肪酸, 具有为瘤胃微生物提供营养物质、促进瘤胃纤维降解菌生长的作用。【目的】研究饲料添加混合异位酸(mixed isoacids, MI)对牦牛瘤胃碳水化合物降解酶活性、物种组成及功能基因的影响, 并分析瘤胃碳水化合物活性与瘤胃微生物及功能基因相对丰度的相关性, 为合理利用 MI 以改善牦牛瘤胃发酵性能提供参考。【方法】采用单因素试验设计, 选取 16 头 200 kg 左右的健康麦洼公牦牛, 随机分为 4 组, 每组 4 个重复, 每个重复 1 头牛。对照组(CON 组)饲喂不添加 MI 的基础饲料, 试验组 MI 添加量分别为基础饲料的 0.1% (T1 组)、0.2% (T2 组)和 0.3% (T3 组)。试验预饲期 10 d, 正饲期 85 d, 试验结束时采集瘤胃液, 通过宏基因组测序分析瘤胃微生物菌群及紫外分光光度法分析瘤胃碳水化合物降解酶活性。【结果】与对照组相比, 饲料添加 MI 能显著提高牦牛瘤胃羧甲基纤维素酶和淀粉酶的活性。物种 α 多样性指数分析结果表明, 添加 0.3% MI 显著降低了瘤胃物种丰富度, 提高了组内物种组成相似度和功能基因组成相似度; 物种与功能差异分析表明, 厚壁菌(*Firmicutes*)、丹毒丝菌(*Erysipelotrichia*)、糖细菌(*Saccharibacteria*)及气单胞菌科(*Aeromonadaceae*)等差异细菌在 T2 组显著富集; 磷转移酶(2.7.1.68)、泛素水解酶(3.4.19.12)、氨基酰转移酶(2.3.2.27)和蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶(2.7.11.11)等

资助项目: 四川省科技计划(2023NSFSC1148); 国家现代农业产业技术体系四川肉牛创新团队建设项目(sccxt-d-2020-13); 西南民族大学双一流项目(XM2023010); 甘孜州科技计划(23Kjjh00017)

This work supported by the Science and Technology Program of Sichuan Province (2023NSFSC1148), the National Modern Agricultural Industry Technology System Sichuan Beef Cattle Innovation Team Construction Project (sccxt-d-2020-13), the Southwest Minzu University Double First-class Project (XM2023010), and the Ganzi Prefecture Science and Technology Program Project (23Kjjh00017).

*Corresponding author. E-mail: gaoyanhua@swun.edu.cn

Received: 2023-09-05; Accepted: 2023-12-11; Published online: 2024-03-15

KEGG 酶差异基因在 T1 组显著富集。瘤胃酶活性与瘤胃宏基因组相关分析结果显示, 瘤胃淀粉酶活性与丙酸菌(*Profundibacterium*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)、糖细菌(*Saccharibacteria*)和气单胞菌科(*Aeromonadaceae*)显著正相关, 与 GH13_20 家族、GH77 家族和 CBM72 家族基因显著正相关; 瘤胃羧甲基纤维素酶活性与 GT90 家族基因显著正相关。【结论】在牦牛饲粮中添加 MI 能显著提高牦牛瘤胃淀粉酶和羧甲基纤维素酶活性, 提高瘤胃微生物物种和功能基因的相似度, 提高瘤胃细菌及功能基因的相对丰度, 且瘤胃细菌及其功能基因与瘤胃酶活性存在一定相关性, 表明添加 MI 能一定程度改善牦牛瘤胃发酵特性。

关键词: 混合异位酸; 牦牛; 碳水化合物降解酶; 宏基因组学

Responses of ruminal carbohydrate-degrading enzymes and microbial metagenome in yaks to dietary supplementation with mixed isoacids

HU Zhibin¹, JIANG Fei¹, GAO Yanhua^{*1}, ZHANG Kanglin², WU Jianping², MA Xiulian¹, PENG Zhongli¹

¹ Key Laboratory of Animal Science of National Ethnic Affairs Commission of China, Key Laboratory of Qinghai-Tibetan Plateau Animal Genetic Resource Conservation and Utilization of Ministry of Education, College of Animal and Veterinary Sciences, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, Sichuan, China

² Institute of Animal Husbandry of Ganzi Tibetan Autonomous Prefecture of Sichuan Province, Kangding 626000, Sichuan, China

Abstract: [Background] Isoacids are branched-chain volatile fatty acids, providing nutrients to the microorganisms and promoting the growth of fiber-degrading bacteria in the rumen. **[Objective]** This study aimed to investigate the effects of dietary supplementation with mixed isoacids (MI) on the activities of carbohydrate-degrading enzymes, microbiota composition, and functional genes in the yak rumen. In addition, the correlations of the enzyme activities with the relative abundance of rumen microorganisms and functional genes were analyzed. The results are expected to provide a reference for the rational use of MI to improve the fermentation performance in the yak rumen. **[Methods]** A single factorial experimental design was used and 16 male yaks weighing approximately 200 kg were randomized into four groups with four replicates per group and one yak per replicate. Yaks in the control group were fed with a basal diet, while those in the other groups were fed a basal diet supplemented with 0.1% (T1 group), 0.2% (T2 group), and 0.3% (T3 group) of MI, respectively. The pre-experiment lasted for 10 days, and the formal feeding lasted for 85 days. At the end of the experiment, rumen fluid samples were collected and the rumen microbiome was analyzed by metagenomic sequencing. Activities of carbohydrate-degrading enzymes were measured by and UV spectrophotometry. **[Results]** Compared with the control group, dietary MI supplementation significantly increased the activities of carboxymethyl cellulase and amylase in the yak rumen. Supplementation with

0.3% MI reduced the microbial richness and increased the similarity of microbiota composition and functional gene composition in the yak rumen. The differential bacteria such as *Firmicutes*, *Erysipelotrichia*, *Saccharibacteria*, and *Aeromonadaceae* had high relative abundance in the T2 group. The KEGG pathway enrichment analysis showed that the differentially expressed genes encoding phosphotransferase (2.7.1.68), ubiquitin hydrolase (3.4.19.12), aminoacyltransferase (2.3.2.27), and protein serine/threonine kinases (2.7.11.11) had high relative abundance in the T1 group. Rumen amylase activity was positively correlated with *Profundibacterium*, *Aeromonas*, *Saccharibacteria*, and *Aeromonadaceae*, as well as members of the GH13_20, GH77, and CBM72 gene families. The carboxymethyl cellulase activity in the rumen was positively correlated with members of the GT90 gene family. **[Conclusion]** Supplementation of MI in yak diets increased the activities of amylase and carboxymethyl cellulase, improved the similarity of rumen microbiota composition and functional gene composition, and increased the relative abundance of bacteria and functional genes in the yak rumen. In addition, rumen microbiome and their functional genes were correlated with the activities of rumen enzymes. The results suggest that MI can improve the rumen fermentation in yaks to a certain extent.

Keywords: mixed isoacids; yak; carbohydrate-degrading enzymes; metagenomics

牦牛是青藏高原地区一种适应高海拔(平均海拔 4 000 m)、缺氧、寒冷环境的大型反刍家畜,为当地居民提供奶、肉、毛、燃料(粪便)和劳动力^[1],被誉为“高原之舟”。与其他反刍动物相同,牦牛主要依靠瘤胃微生物分解饲料为自身提供营养物质。碳水化合物(如淀粉和纤维素)是反刍动物饲料中主要的能量来源,而淀粉和纤维素的消化主要是由瘤胃微生物和消化酶来完成^[2]。瘤胃微生物包括细菌、古细菌、真菌和原虫^[3],它们能分泌水解酶降解饲料中的淀粉、纤维素和木质素等碳水化合物^[4],而瘤胃微生物的定殖和生长受多种因素影响,如饲料类型、饲喂方式、季节变化及一些营养型添加剂^[5]。

异位酸是含有 4–5 个碳原子的短链挥发性脂肪酸,包括异丁酸(isobutyrate)、异戊酸(isovalerate)、戊酸(valerate)和 2-甲基丁酸(2-methylbutyrate)^[6–7],是缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和脯氨酸的微生物代谢产物^[8]。前人研究发现,异位酸是瘤胃球菌、溶纤维丁酸弧菌

和产琥珀酸丝状杆菌等纤维降解菌的重要营养物质^[9–10],饲料中添加异位酸能提高这些菌的相对丰度^[11]。瘤胃微生物多样性的变化一定程度会引起其功能的变化,如消化酶活性的改变,刘永嘉等^[12]在荷斯坦奶牛中研究表明,在日粮中添加异丁酸显著提高了瘤胃中木聚糖酶、 β -葡萄糖苷酶、滤纸酶和羧甲基纤维素酶活性;李鹤琼等^[13]研究表明,2-甲基丁酸能提高断奶犊牛瘤胃羧甲基纤维素酶、 β -葡萄糖苷酶、滤纸酶、木聚糖酶和淀粉酶活性。而宏基因组学是一种在基因组水平上研究微生物群落及代谢功能的方法^[14],可以一定程度反映反刍动物瘤胃微生物群落组成、系统发生和代谢功能的变化^[15],但目前尚无相关报道牦牛饲料添加异位酸对瘤胃碳水化合物降解酶活性及宏基因组的影响。综上,本试验采用宏基因组测序方法分析牦牛瘤胃微生物多样性及功能的变化,进一步分析牦牛瘤胃碳水化合物降解酶活性与瘤胃微生物多样性及功能之间

的相关性,旨在为合理利用异位酸以提高牦牛瘤胃发酵特性提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

MI 由四川吉隆达生物科技集团有限公司提供,组成为:24% 2-甲基丁酸+36%戊酸+40%异丁酸,有效含量 50%,呈白色粉末状,吸附剂为白炭黑(二氧化硅),有刺激性气味。试验牦牛基础饲料参照中国《肉牛饲养标准》(NY/T 815—2004)^[16]进行配制,由精料和全株玉米青贮按干物质精粗比为 5:5 混合而成,其原料组成和营养水平见表 1。MI 的添加方式为先与精料均匀混合,再与粗料混合。

选取平均体重为(180.00±20.00) kg 的健康麦洼公牦牛 16 头(来自四川甘孜州色达县),随机分为 4 组,每组 4 个重复,每个重复 1 头牛。对照组(CON 组)饲喂不添加 MI 的基础饲料,试验组 MI 添加量分别为基础饲料的 0.1% (T1 组)、0.2% (T2 组)和 0.3% (T3 组) (干物质基础)。试验预饲期 10 d,正饲期 85 d。

1.2 主要试剂和仪器

FastDNA[®] Spin Kit for Soil, NEXTflex Rapid DNA-Seq Kit, MP Biomedicals 公司。超声波破碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司;NanoDrop 微量分光光度计,Thermo fisher scientific 公司;微型荧光计,Turner Biosystems 公司;NovaSeq 6000 基因测序仪,Illumina 公司。

1.3 样品采集

试验前对牛只进行统一称重、编号、注射疫苗及驱虫,并对牛场进行清洁消毒。每日 8:30 和 15:30 各饲喂 1 次,试验期间试验牛自由采食和饮水。试验最后一天晨饲前用口腔瘤胃导管和灌注器采集牦牛瘤胃液,为避免唾液污染,舍弃最初采集的 50 mL,然后再采集 20 mL,经四层纱布过滤去除饲料残渣后分装于 4 个 5 mL 灭菌

冻存管中,置于-180 °C液氮罐中保存,用于瘤胃碳水化合物酶活性和宏基因组测定。

1.4 瘤胃酶活测定

瘤胃液解冻后,取 5 mL 于 10 mL 离心管中,4 °C、408×g 离心 5 min (去除饲料颗粒),取 4 mL 上清液于 10 mL 离心管中进行超声破碎(超声探头直径 2 mm,功率 250 W,重复 9 次,每次超声 4 s,间隔 16 s),4 °C、17 000×g 离心

表 1 试验牦牛饲料组成及营养水平(干物质基础,%)
Table 1 The diet composition and nutritional level of yaks (DM, %)

项目 Item	含量 Content (%)
日粮组成 Dietary compositions	
玉米 Corn	31.00
豆粕 Soybean meal	13.00
尿素 Urea	0.15
硫酸钠 Na ₂ SO ₄	0.35
氯化钠 NaCl	0.35
预混料 Premix	1.90
包被赖氨酸 Rumen-protected lysine	0.15
包被蛋氨酸 Rumen-protected methionine	0.10
酵母培养物 Yeast culture	0.50
小肽 Small peptide	0.50
氢化棕榈油 Hydrogenated palm oil	0.20
玉米青贮 Corn silage	50.00
合计 Total	100.00
营养水平 Nutrient levels	
干物质 Dry matter	95.10
粗脂肪 Ether extract	3.15
粗蛋白 Crude protein	14.31
中性洗涤纤维 Neutral detergent fiber	30.46
酸性洗涤纤维 Acid detergent fiber	12.14
钙 Calcium	0.76
磷 Phosphorus	0.38

预混料为每千克饲料提供维生素 A 2 500 IU、维生素 D 550 IU、维生素 E 10 IU、铜 10 mg、铁 50 mg、锰 40 mg、锌 40 mg、碘 0.5 mg、硒 0.2 mg、钴 0.2 mg。营养水平均为实测值

The premix provided the following per kg of the diet. VA 2 500 IU, VD 550 IU, VE 10 IU, Cu 10 mg, Fe 50 mg, Mn 40 mg, Zn 40 mg, I 0.5 mg, Se 0.2 mg, and Co 0.2 mg. Nutrient levels were measured values.

10 min, 取上清液, 参照 Agarwal 等^[17]的方法测定瘤胃液中羧甲基纤维素酶、木聚糖酶、 β -葡萄糖苷酶、淀粉酶和果胶酶活性。

1.5 瘤胃液 DNA 的提取、宏基因组测序及生物信息学分析

采用 FastDNA® Spin Kit for Soil 抽提瘤胃液总 DNA, 抽提完成后分别使用 NanoDrop 2000 微量分光光度计、TBS-380 微型荧光计及 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度、浓度及完整性。检测合格的 DNA 样品用超声破碎仪打断成约 400 bp 的小片段。然后通过 NEXTflex Rapid DNA-Seq Kit 进行文库构建。

宏基因组测序: 通过 Illumina NovaSeq 6000 平台对瘤胃液总 DNA 进行宏基因组测序(上海美吉生物医药科技有限公司)。

数据质控: 使用 Fastp^[18]对 reads 的 3' 端和 5' 端的适配器序列进行质量修剪, 去除剪切后长度小于 50 bp、平均碱基质量值低于 20 以及含 N 碱基的 reads, 保留高质量的 pair-end reads 和 single-end reads; 使用软件 BWA^[19]将 reads 与宿主 DNA 序列比对, 并过滤掉比对相似性高的污染 reads。

拼接组装与基因预测: 首先, 使用 MEGAHIT^[20]软件对优化序列进行拼接和组装, 筛选出 ≥ 300 bp 的 contigs。然后, 使用 Prodigal^[21]对筛选出的 contigs 进行开放阅读框(open reading frame, ORF)预测。最后, 将核酸长度 ≥ 100 bp 的基因翻译为氨基酸序列。

非冗余基因集构建: 用 CD-HIT^[22]对所有样品预测出来的基因序列进行聚类(参数为: 90% identity、90% coverage), 每类取最长的基因作为代表序列, 构建非冗余基因集。

基因丰度计算: 利用 SOAPaligner^[23]软件对每个样品的高质量 reads 与非冗余基因集进行比对, 设定相似度为 95%, 以统计各基因在相应

样品中的丰度信息。

物种与功能注释: 利用 Diamond 软件^[24](v0.8.35)对非冗余基因集的氨基酸序列进行比对, 分别与 non-redundant protein sequence (NR) 数据库和 Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG)数据库进行 BLASTp 比对, 设置期望值 e -value 为 $1e-5$, 以获取基因对应的物种信息和 KEGG 功能注释; 同时, 利用 CAZy (carbohydrate-active enzymes)数据库的 hmmscan 工具对非冗余基因集的氨基酸序列进行比对, 设定期望值 e -value 为 $1e-5$, 以获取基因对应的碳水化合物活性酶的注释信息。

1.6 数据统计分析

1.6.1 瘤胃碳水化合物降解酶

试验数据整理后使用 SAS 9.4 软件 GLM 程序进行单因素方差分析(one-way analysis of variance, one-way ANOVA), 使用 Reg 和 Rsreg 程序对 MI 添加水平的线性和二次效应进行分析。多重比较采用最小显著差异法(least significant difference, LSD)。 $P > 0.05$ 表示差异不显著, $P \leq 0.05$ 表示差异显著。

1.6.2 瘤胃宏基因组测序数据

所有宏基因组测序数据分析均在美吉生物云平台上进行。物种 α 多样性分析采用 ANOVA 进行组间差异检验; 通过 R 语言进行主坐标分析(principal coordinate analysis, PCoA)并作 PCoA 图, 使用 R 语言 QIIME 软件进行组间相似性分析(analysis of similarities, ANOSIM); 物种与功能差异分析使用 LEfSe^[25]进行线性判别分析(linear discriminant analysis, LDA), LDA 阈值为 2。通过 Spearman 相关性分析方法将线性判别分析鉴别的差异物种和功能基因分别与瘤胃碳水化合物降解酶活性进行相互关联性分析。

2 结果与分析

2.1 混合异位酸对牦牛瘤胃碳水化合物降解酶的影响

由表 2 可知,与对照组相比,T3 组牦牛瘤胃羧甲基纤维素酶活性显著升高($P \leq 0.05$),T2 组牦牛瘤胃淀粉酶活性显著升高($P \leq 0.05$)。随异位酸添加量升高,羧甲基纤维素酶和木聚糖酶活性呈线性升高($P \leq 0.05$);淀粉酶呈先升高后降低的二次变化趋势($P \leq 0.05$),T2 组活性最高。

2.2 添加混合异位酸对牦牛瘤胃微生物宏基因组的影响

2.2.1 宏基因组测序信息

将 16 个牦牛瘤胃液样本进行 Illumina

NovaSeq 6000 测序,下机后共得到 771 877 472 条原始序列,平均每个样本 48 242 342 条序列。原始序列经拆分、质量剪切及去除污染等处理后得到优化序列,再将优化序列进行组装拼接,共得到 9 631 319 个连续序列(contigs),平均每个样本 601 957.44 个,13 021 074 个 ORF,经去冗余后得到完整基因数为 5 294 135 个。

2.2.2 物种 α 多样性分析

物种 α 多样性指数分析(属水平)结果显示(表 3),T3 组 Chao1 指数显著低于其他 3 组($P \leq 0.05$),混合异位酸对各组瘤胃微生物物种 Simpson 指数和 Shannon 指数无显著影响($P > 0.05$)。表明在牦牛饲料中添加 0.3% MI 会降低瘤胃物种的丰富度,对物种多样性无显著影响。

表 2 混合异位酸对牦牛瘤胃碳水化合物降解酶的影响

Table 2 Effects of mixed isoacids supplementation on the carbohydrate-degrading enzymes activity in the rumen of yaks

Enzyme	酶活 Enzyme activity ($\mu\text{mol glucose}/(\text{min} \cdot \text{mL})$)				标准误差 SEM	P 值 P-value	线性 Linear	二次 Quadratic
	CON	T1	T2	T3				
羧甲基纤维素酶 Carboxymethyl-cellulase (CMCase)	1.78b	2.46ab	2.31ab	3.20a	0.193	0.050	0.011	0.750
纤维二糖酶 Cellobiase	0.15	0.23	0.16	0.27	0.026	0.342	0.237	0.805
果胶酶 Pectinase	3.20	3.32	3.50	3.88	0.164	0.527	0.135	0.691
木聚糖酶 Xylanase	4.92	6.80	6.39	8.29	0.495	0.103	0.023	0.996
淀粉酶 Amylase	0.50b	1.05ab	1.60a	0.80b	0.026	0.007	0.234	0.004

同行不同小写字母表示差异显著($P \leq 0.05$)。下同

Different lowercase letters in the same rows indicate significant differences ($P \leq 0.05$). The same below.

表 3 混合异位酸对牦牛瘤胃物种 α 多样性的影响

Table 3 Effects of mixed isoacids supplementation on alpha diversity of microbiota in yak rumen

项目 Item	组别 Groups				标准误差 SEM	P 值 P-value
	CON	T1	T2	T3		
Shannon 指数 Shannon index	4.194	4.043	4.053	3.877	0.064	0.417
Simpson 指数 Simpson index	0.048	0.057	0.051	0.059	0.002	0.327
Chao1 指数 Chao1 index	4 444.250a	4 451.250a	4 481.250a	4 202.000b	40.683	0.032

2.2.3 物种组成分析

比对 NR 数据库进行物种注释共得到 235 个门 461 个纲 956 个目 1 934 个科 5 456 个属及 28 440 个种。

通过群落柱形图展示各组门水平和属水平的物种组成。门水平上(图 1A), CON 组优势菌为厚壁菌门(*Firmicutes*, 39.33%), 相对丰度最

高, 其次分别为拟杆菌门(*Bacteroidetes*, 33.53%)、纤毛虫门(*Ciliophora*, 2.71%)、广古菌门(*Euryarchaeota*, 3.11%)、螺旋体门(*Spirochaetes*, 1.68%)、变形菌门(*Proteobacteria*, 2.00%)及放线菌门(*Actinobacteria*, 1.53%); T1 组的优势菌为厚壁菌门(*Firmicutes*, 39.48%), 其次分别为拟杆菌门(*Bacteroidetes*, 37.29%)、纤毛

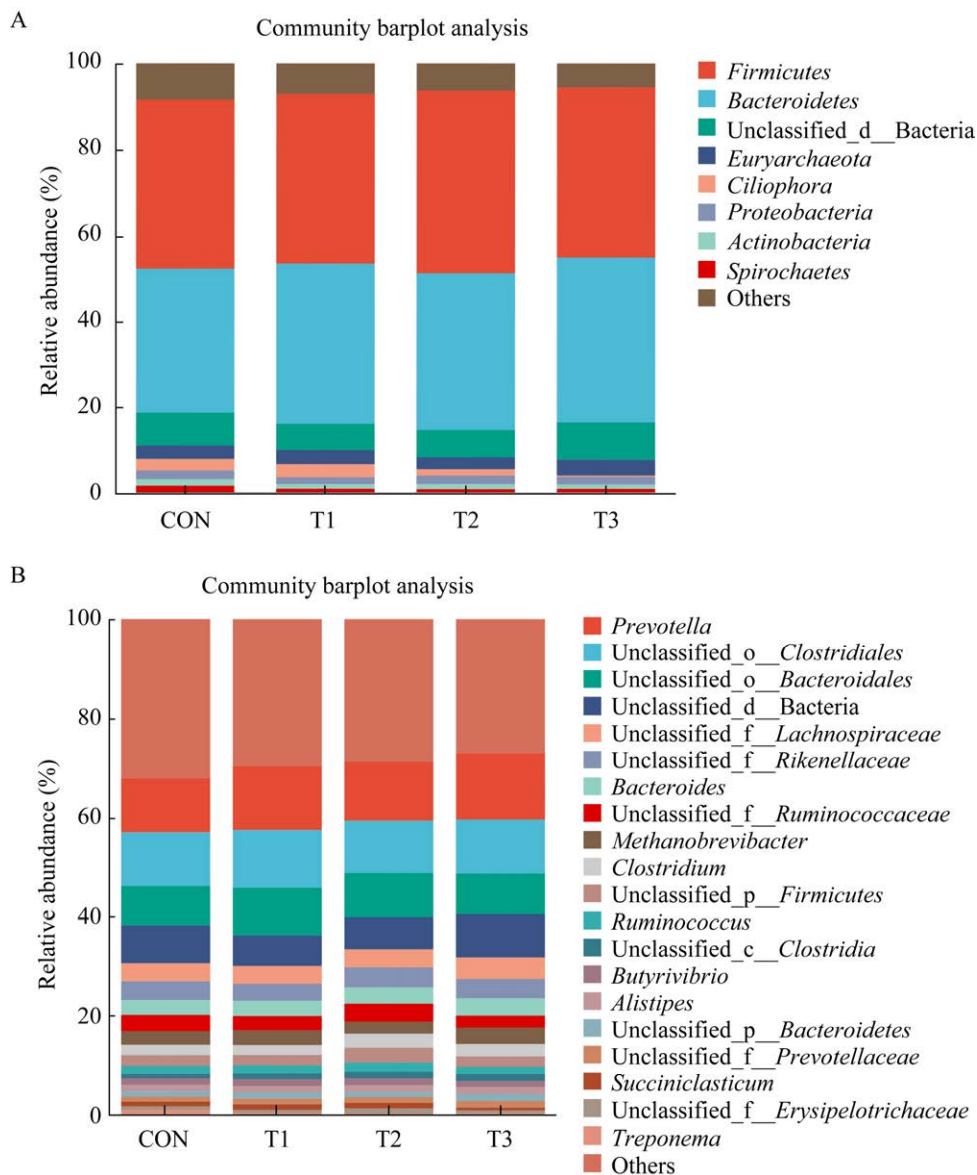


图 1 各组门水平(A)和属水平(B)物种组成

Figure 1 Species composition at the phylum (A) and genus levels (B) in each group.

虫 门 (*Cillophora*, 3.06%)、广古菌门 (*Euryarchaeota*, 3.23%)、变形菌门 (*Proteobacteria*, 1.58%)、螺旋体门(*Spirochaetes*, 1.02%)及放线菌门(*Actinobacteria*, 1.08%); T2 组的优势菌为厚壁菌门(*Firmicutes*, 42.52%), 其次分别为拟杆菌门(*Bacteroidetes*, 36.46%)、广古菌 门 (*Euryarchaeota*, 2.74%)、纤毛虫 门 (*Cillophora*, 1.51%)、变形菌门(*Proteobacteria*, 1.99%)及放线菌门(*Actinobacteria*, 1.15%); T3 组的优势菌为厚壁菌门(*Firmicutes*, 39.59%), 其次分别为拟杆菌门(*Bacteroidetes*, 38.34%)、广古菌 门 (*Euryarchaeota*, 3.70%)、变形菌 门 (*Proteobacteria*, 1.72%)、放 线 菌 门 (*Actinobacteria*, 1.05%)。各组厚壁菌门 (*Firmicutes*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*)的相对丰度最高, 占瘤胃细菌的 72.00%以上。

属水平上(图 1B), CON 组优势菌为 *Prevotella* (10.85%), 其次是 *unclassified_o__Clostridiales* (10.78%)、*unclassified_o__Bacteroidales* (7.87%)、*unclassified_d__Bacteria* (7.60%)、*unclassified_f__Rikenellaceae* (3.78%)、*unclassified_f__Lachnospiraceae* (3.62%); T1 组优势菌群为 *Prevotella* (12.87%), 其次是 *unclassified_o__Clostridiales* (11.63%)、*unclassified_o__Bacteroidales* (9.50%)、*unclassified_d__Bacteria* (6.14%)、*unclassified_f__Lachnospiraceae* (3.60%)、*unclassified_f__Rikenellaceae* (3.40%); T2 组优势菌群为 *Prevotella* (11.84%), 其次是 *unclassified_o__Clostridiales* (10.53%)、*unclassified_o__Bacteroidales* (8.9%)、*unclassified_d__Bacteria* (6.39%)、*unclassified_f__Rikenellaceae* (4.02%)、*unclassified_f__Lachnospiraceae* (3.60%); T3 组优势菌群为 *Prevotella* (13.47%), 其次是 *unclassified_o__Clostridiales* (10.86%)、

unclassified_d__Bacteria (8.68%)、*unclassified_o__Bacteroidales* (8.11%)、*unclassified_f__Lachnospiraceae* (4.36%)、*unclassified_f__Rikenellaceae* (3.86%)。

2.2.4 功能基因组成分析

通过比对 KEGG 数据库共注释到 103 种酶功能基因, 各组酶功能基因相对丰度较高的为酸酐水解酶(3.6.4.12)、核酸合成酶(2.7.7.7)、核糖苷酸激酶(2.7.11.1)、水解酶类(3.1.-.-)、纤维素酶(3.2.1.21)、金属蛋白酶类(3.4.24.-)、胱型肽酶(3.4.16.4)、核酸己糖转移酶(2.7.7.6)和 3-羟基硫基丙酸转乙酰转移酶(5.6.2.2)等(图 2A)。

比对 CAZy 数据库对碳水化合物活性酶基因注释 6 个类别, 其中包括 263 个糖苷水解酶 (HTs)家族、96 个糖基转移酶(GTs)家族、72 个多糖裂解酶(PLs)家族、66 个碳水化合物酶结构域(CBM)s家族、21 个辅助酶活性(AAs)家族和 16 个碳水化合物酯酶(CEs)家族。其中, 各组丰度较高的有 GT2_Glycos_transf_2 家族、GH2 家族、CE1 家族、GT4 家族、CE10 家族、GT41 家族、GH3 家族、GH97 家族、GH31 家族和 GH78 家族等(图 2B)。

2.2.5 物种组成与功能基因比较分析

运用 Bray-Curtis 距离算法, 对各组的物种组成及 KEGG 功能进行 PCoA 计算和 ANOSIM 相似性检验对瘤胃物种与功能组成进行分析。ANOSIM 结果显示, 各组间物种与功能均无显著差异, 但由图 3A、3B 可知, 对照组的置信圈大于 3 个处理组, 在处理组中, T1 组、T2 组及 T3 组置信圈逐渐缩小, 表明随着 MI 的添加, 组内物种组成和 CAZy 功能基因相似度均逐渐升高;KEGG 功能中碳水化合物代谢功能和酶功能相似度分析(图 3C、3D)显示 T3 组的组内 KEGG 功能组成相似度最高, 其次分别是 T2 组、对照组及 T1 组。

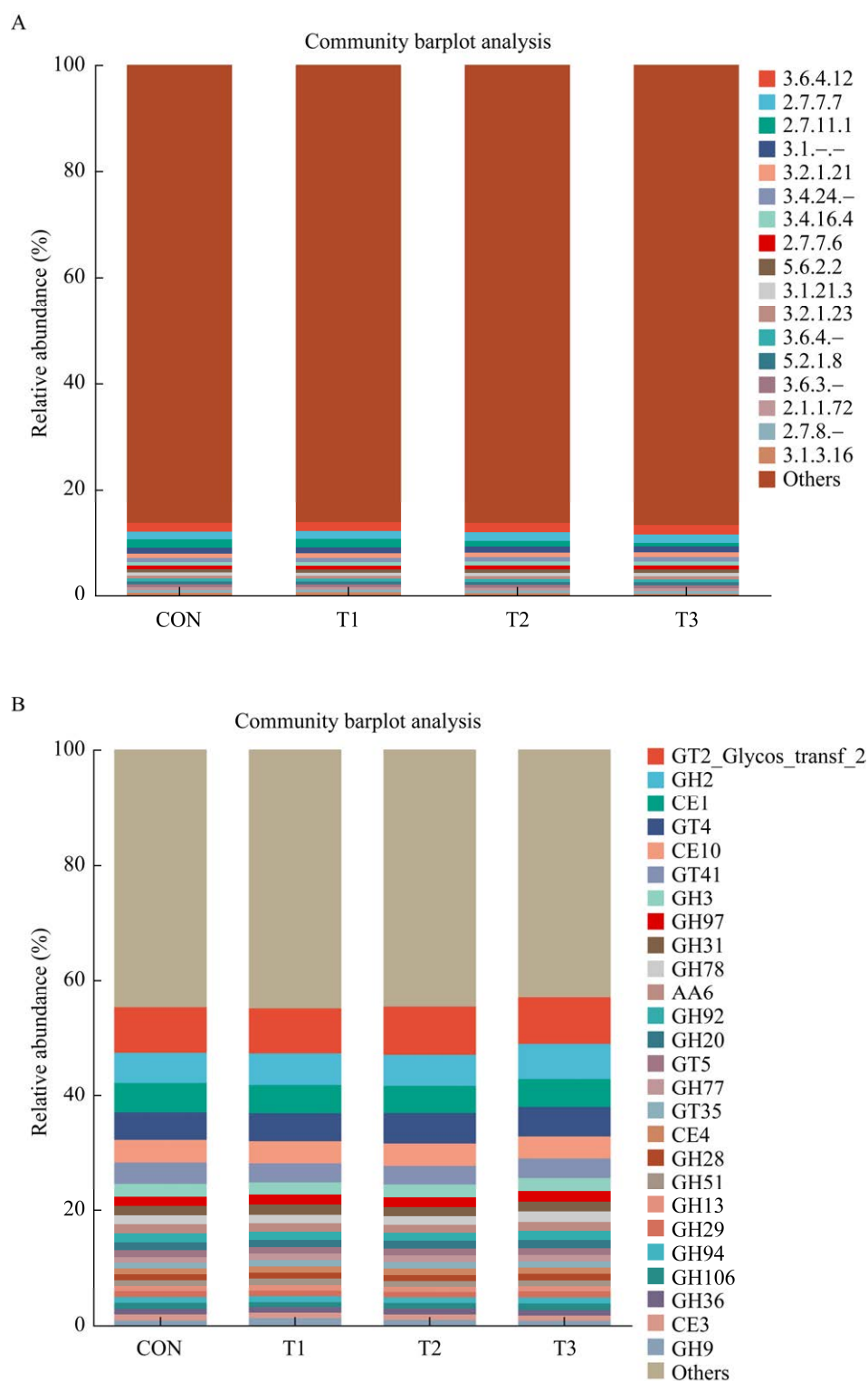


图 2 KEGG 酶功能基因相对丰度(A)和 CAZy 功能基因相对丰度(B)

Figure 2 Relative abundance of KEGG enzyme functional genes (A) and CAZy functional genes (B).

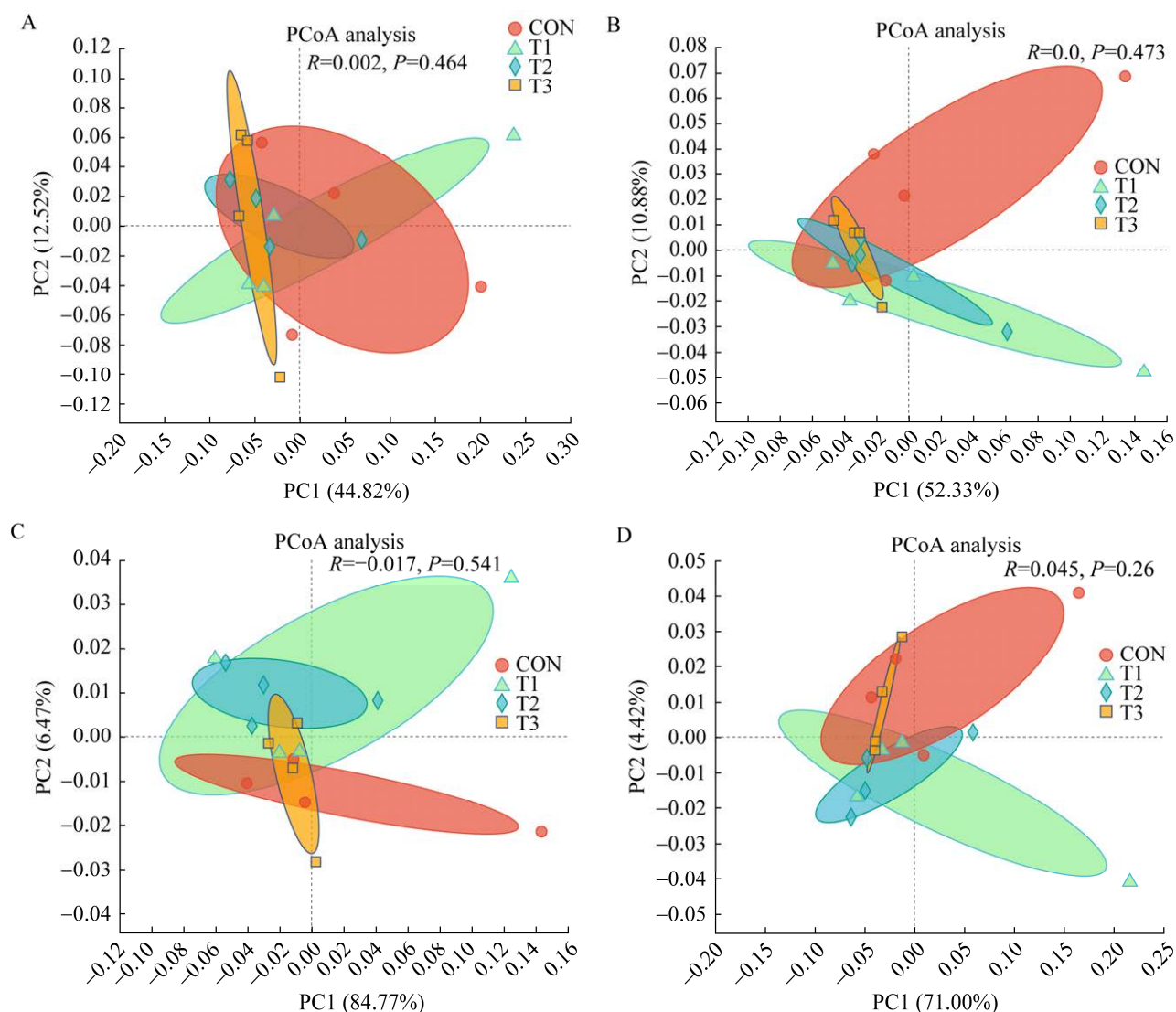


图3 物种与功能组成 PCoA 图 A: 细菌组成(属水平). B: CAZy 功能基因(科水平). C: KEGG 碳水化合物代谢基因. D: KEGG 酶功能基因

Figure 3 PCoA diagram of composition of species and functional. A: Species composition (genus level). B: CAZy function gene (family level). C: KEGG carbohydrate metabolism gene. D: KEGG enzyme function gene.

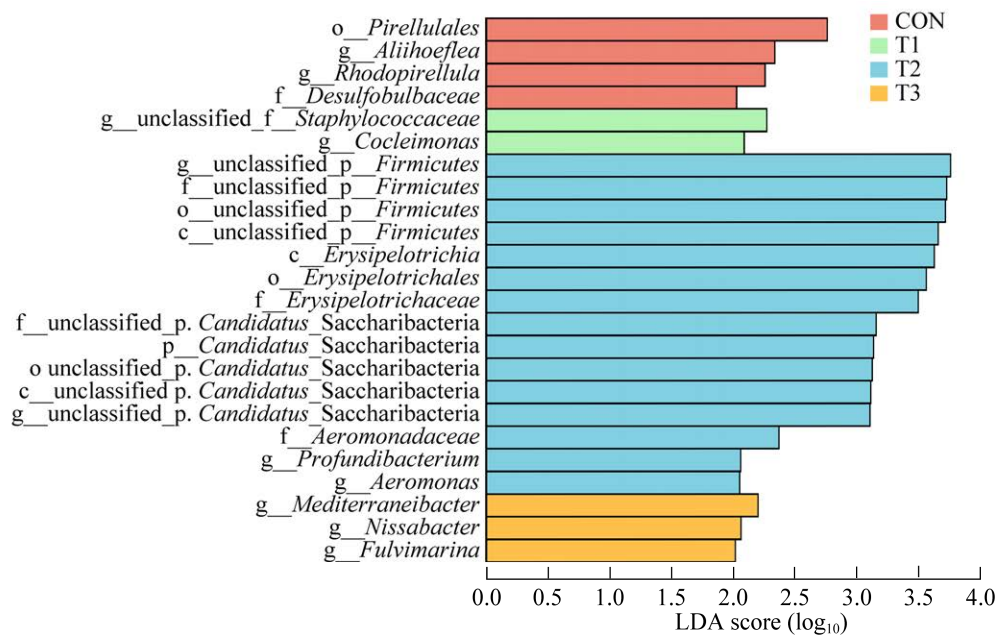
2.2.6 物种组成与功能基因差异分析

在门至属水平上, 比对 NR 数据库共获得 24 种差异细菌(图 4A), 比对 KEGG 中的酶功能数据库共获得 45 种差异酶基因(图 4B), 比对 CAZy 数据库共获得 19 种差异酶家族基因(图 4C, $LDA \geq 2$).

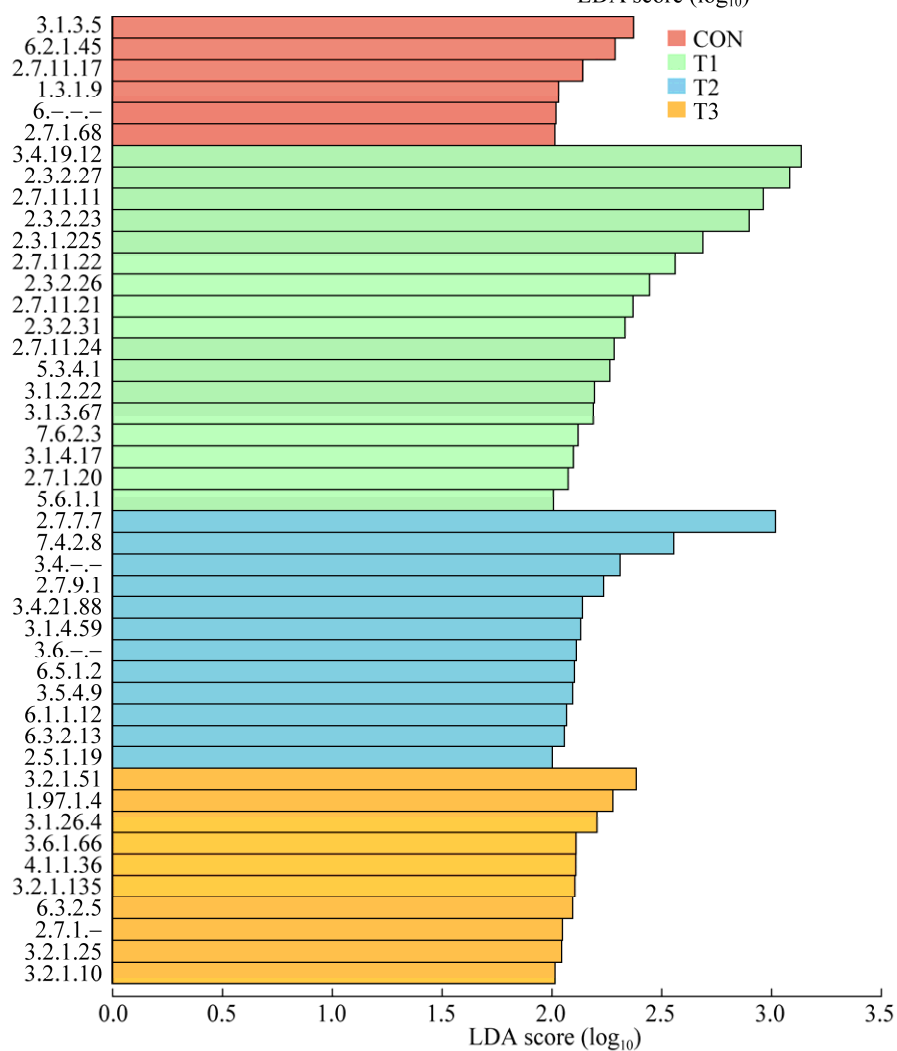
在差异物种中, *Firmicutes*、*Erysipelotrichia*、

Saccharibacteria 及 *Aeromonadaceae* 等在 T2 组显著富集($P < 0.05$); *Pirellulales*、*g_Aliihoeflea*、*g_Rhodopirellula* 和 *f_Desulfobulbaceae* 在对照组显著富集($P < 0.05$); *g_unclassified_f_Staphylococcaceae* 和 *g_Cocleimonas* 在 T1 组显著富集($P < 0.05$); *g_Mediterraneibacter*、*g_Nissabacter* 和 *g_Fulvimarina* 在 T3 组显著富集($P < 0.05$).

A



B



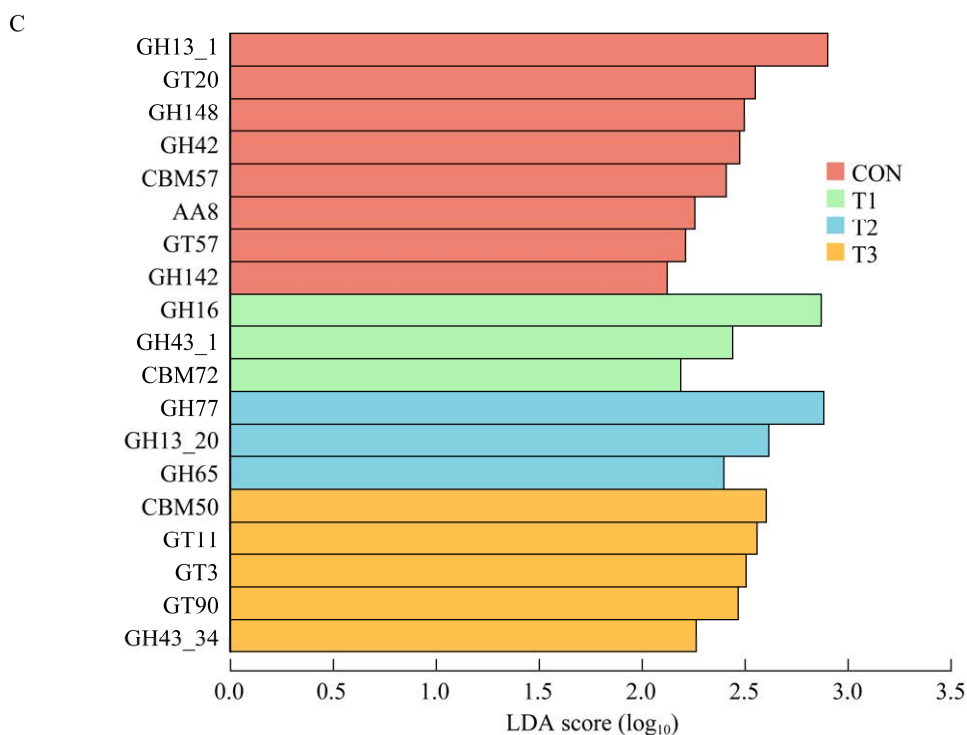


图4 LEfSe 差异物种和差异功能判别分析(LDA \geq 2) A: 细菌 LDA 判别柱形图(属水平). B: KEGG 酶基因 LDA 判别柱形图. C: CAZy 基因 LDA 判别柱形图(科水平).

Figure 4 LEfSe discriminant analysis of differential species and function(LDA \geq 2). A: Bar plot of bacteria LDA discriminant analysis (genus level). B: Bar plot of KEGG enzyme gene LDA discriminant analysis. C: Bar plot of CAZy gene LDA discriminant analysis (family level).

在差异酶中, 磷转移酶(2.7.1.68)、泛素水解酶(3.4.19.12)、氨基酰转移酶(2.3.2.27)和蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶(2.7.11.11)等($P<0.05$)在 T1 组显著富集, 核苷酸转移酶(2.7.7.7)、氨基酸连接酶(6.3.2.13)及磷酸二酯酶(2.7.9.1)等($P<0.05$)在 T2 组显著富集; 糖化酶(3.2.1.51)、核糖核酸酶(3.1.26.4)及脱羧酶(4.1.1.36)等在 T3 组显著富集($P<0.05$)。

鉴定出的 19 种差异 CAZy 碳水化合物酶活性基因包括 1 种辅助活性(AAs)基因、3 种碳水化合物活性(CBMs)基因、10 种糖苷水解酶(GHs)基因和 5 种糖基转移酶(GTs)基因。其中有 8 个家族在 CON 组显著富集, 3 个家族在 T1 组显著富集, 3 个家族在 T2 组显著富集, 5 个家族在

T3 组显著富集(图 4C)。

2.2.7 瘤胃碳水化合物降解酶与瘤胃宏基因组相关性分析

如图 5A 所示, 瘤胃淀粉酶活性与丙酸菌(*Profundibacterium*)和气单胞菌属(*Aeromonas*)相对丰度显著正相关($P<0.05$), 与糖细菌(*Saccharibacteria*)和气单胞菌科(*Aeromonadaceae*)相对丰度极显著正相关($P<0.01$), 与脱硫弧菌科(*Desulfobulbaceae*)和 *g__Nissabacter* 相对丰度显著负相关, 与 *g__Cocleimonas* 相对丰度极显著负相关($P<0.01$)。羧甲基纤维素酶和木聚糖酶活性与脱硫弧菌科(*Desulfobulbaceae*)相对丰度显著负相关($P<0.05$)。

瘤胃碳水化合物降解酶与 CAZy 差异基因相关性结果显示(图 5B), 共有 9 个 CAZy 家族基因与碳水化合物降解酶有显著的相关关系。其中瘤胃淀粉酶活性与 GH13_20 家族、GH77 家族和 CBM72 家族基因丰度显著正相关($P<0.05$), 与 GH148 家族基因丰度显著负相关($P<0.05$)。瘤胃羧甲基纤维素酶活性与 GT90 家族基因丰度显著正相关($P<0.05$), 与 AA8、GH13_1 和 GT57 家族基因丰度显著负相关($P<0.05$), 与

GH42 家族基因丰度极显著负相关($P<0.001$)。瘤胃木聚糖酶活性与 GH13_1 和 GT57 家族基因丰度显著负相关($P<0.05$), 与 GH42 家族基因丰度极显著负相关($P<0.01$)。

瘤胃碳水化合物降解酶活性与 KEGG 酶功能差异基因相关性结果显示(图 5C), 瘤胃羧甲基纤维素酶与连接酶类(6.-.-.)显著负相关($P<0.05$), 瘤胃木聚糖酶活性与氧化还原酶(1.3.1.9)显著负相关($P<0.05$)。

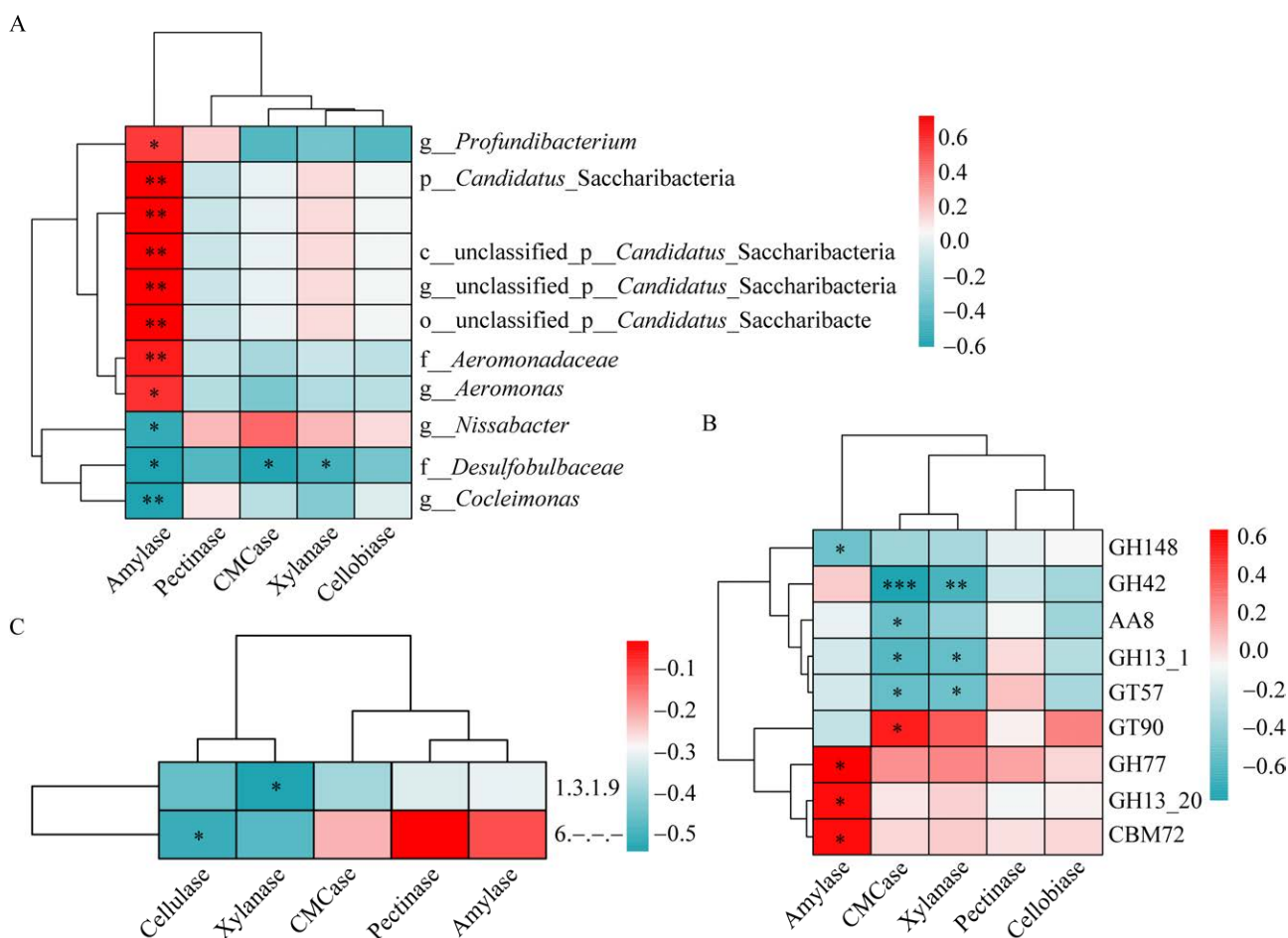


图 5 瘤胃纤维素酶与差异细菌(A)、CAZy 差异基因(B)和 KEGG 酶功能差异基因(C)相关性热图

Figure 5 Heat map of the correlation between rumen enzyme activity and differentially expressed bacteria (A), CAZy differentially expressed genes (B), and KEGG enzyme function differentially expressed genes (C).

3 讨论

3.1 混合异位酸对牦牛瘤胃碳水化合物降解酶的影响

瘤胃中栖息着大量的细菌、真菌、古菌和原生动物,它们共同构成了一个复杂的瘤胃微生态系统。这些微生物群在瘤胃中可以分泌各种消化酶,在消化过程中起着重要作用^[26]。本试验结果显示,与对照组相比,日粮添加 0.3% MI 能显著提高牦牛瘤胃羧甲基纤维素酶和木聚糖酶活性,添加 0.2% MI 能显著提高瘤胃淀粉酶活性,这与张贵花^[27]和刘永嘉等^[12]的研究结果相符。异位酸是瘤胃中一些氨基酸及氨基酸衍生物的微生物代谢产物,能为瘤胃纤维降解菌提供营养物质^[28-29], Bryant 等^[9]通过体外培养试验发现, 2-甲基丁酸、异丁酸和异戊酸能促进瘤胃厌氧产琥珀酸丝状杆菌(*Fibrobacter succinogenes*)的生长,而瘤胃纤维分解菌的数量和活力与纤维分解酶的活性高度相关^[30]。本试验在牦牛日粮中添加 MI 后,提高了瘤胃羧甲基纤维素酶、木聚糖酶和淀粉酶活性,可能是由于 MI 促进牦牛瘤胃纤维分解菌菌群的繁殖和生长,进而影响瘤胃碳水化合物降解酶活性。

3.2 混合异位酸对牦牛瘤胃微生物宏基因组的影响

本研究发现牦牛饲粮添加 0.3% MI 显著降低了瘤胃物种丰富度,可能与牦牛瘤胃微生物种类比肉牛、奶牛等其他反刍动物瘤胃微生物种类少^[31],易受外源营养因子影响有关,具体原因还需进一步探究。从物种与功能 PCoA 聚类分析结果可知,与对照组相比,随着 MI 添加剂量的升高,各处理组的置信圈逐渐缩小,表明随着 MI 添加剂量的升高,各组组内的微生物群落结构组成相似性越来越高;但 ANOSIM 检验结果并不显著,表明添加 MI 对瘤胃微生物组成无显

著影响。物种与功能回归分析发现 KEGG 酶功能相似性与物种组成相似性间显著相关,表明差异酶的丰度变化可能与差异菌的丰度变化有关。此外,在鉴别到的差异菌中,0.2%组显著富集了大量的厚壁菌,而研究报道厚壁菌包含了许多纤维分解菌^[32],同时 0.2%组显著富集的糖细菌(*Saccharibacteria*)在此前相关研究中发现其在玉米秸秆降解的过程中丰度逐渐升高^[33],同时,在奶牛和肉牛的研究中发现,饲粮添加异位酸具有提高纤维消化率的作用^[29,34-36],推测牦牛饲粮添加 MI 能一定程度提高瘤胃分解纤维的特性。

瘤胃酶活性与物种和功能基因相关性分析结果显示,瘤胃淀粉酶活性与 *Profundibacterium* 菌属、*Saccharibacteria* (TM7)菌属、气单胞菌科(*Aeromonadaceae*)和气单胞菌属(*Aeromonas*)相对丰度显著正相关,与 *Desulfobulbaceae* 菌科、*Cocleimonas* 菌属和 *Nissabacter* 菌属相对丰度显著负相关。有研究表明,*Saccharibacteria* (TM7)是生活在宿主细菌表面的微生物,能通过调节细菌的功能降低宿主细菌的致病性^[37],但其与瘤胃淀粉酶活性关系鲜见相关报道,其在牦牛瘤胃中的作用有待进一步验证。CAZymes 主要来源于瘤胃微生物,能分解纤维素为动物提供营养物质^[38]。它参与机体碳水化合物代谢、蛋白质糖基化等生物合成和降解过程^[39]。GHs 是一类存在于所有生物体中的酶,它可将各种含糖化合物(包括单糖、低聚糖、多糖、皂苷和糖蛋白)的糖苷键水解,产生单糖、低聚糖或糖复合体^[40]。本试验结果显示,GH13_20、GH77、GH65 和 GH43 在 T2 组和 T3 组显著富集,其中 GH13_20 属于 GH13 家族,主要编码 α -淀粉酶(3.2.1.1)和淀粉- α -1,6-葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.33)等与淀粉降解相关的酶,GH43 主要编码木聚糖酶(EC 3.2.1.8)、 β -1,3-木糖苷酶(EC 3.2.1.-)、 α -L-阿拉伯糖苷酶

(EC 3.2.1.55)等与木聚糖降解相关的酶,这与本试验瘤胃酶活结果相吻合。这些研究结果提示,MI可能是牦牛瘤胃微生物定殖生长所需的营养因子,通过影响瘤胃微生物组成进而影响相应代谢物及酶的合成,三者间具体的关联机制需要进一步深入研究。

4 结论

本研究结果表明,在牦牛饲料中添加混合异位酸能提高牦牛瘤胃淀粉酶和羧甲基纤维素酶的活性;提高瘤胃微生物物种组成相似度和功能基因组成相似度,提高瘤胃 *Firmicutes* 菌及 GH13 和 GH43 等家族功能基因的相对丰度,且瘤胃淀粉酶活性与瘤胃 *Saccharibacteria* 和 *Aeromonadaceae* 等细菌相对丰度显著正相关,与 GH13_20 家族和 GH77 家族功能基因显著正相关,表明牦牛饲料添加混合异位酸能一定程度改善牦牛瘤胃发酵特性。

REFERENCES

- [1] JIANG YH, DAI P, DAI QD, MA J, WANG ZS, HU R, ZOU HW, PENG QH, WANG LZ, XUE B. Effects of the higher concentrate ratio on the production performance, ruminal fermentation, and morphological structure in male cattle-yaks[J]. *Veterinary Medicine and Science*, 2022, 8(2): 771-780.
- [2] HUA DK, HENDRIKS WH, XIONG BH, PELLIKAAN WF. Starch and cellulose degradation in the rumen and applications of metagenomics on ruminal microorganisms[J]. *Animals: an Open Access Journal from MDPI*, 2022, 12(21): 3020.
- [3] SIROHI SK, SINGH N, DAGAR SS, PUNIYA AK. Molecular tools for deciphering the microbial community structure and diversity in rumen ecosystem[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 95(5): 1135-1154.
- [4] YUE ZB, LI WW, YU HQ. Application of rumen microorganisms for anaerobic bioconversion of lignocellulosic biomass[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 128: 738-744.
- [5] 刘旺景. 反刍动物瘤胃微生物菌群及其影响因素的研究进展[J]. *饲料工业*, 2022, 43(3): 50-56.
LIU WJ. Research advances of rumen microbiome flora and its influencing factors in ruminants[J]. *Feed Industry*, 2022, 43(3): 50-56 (in Chinese).
- [6] ROMAN-GARCIA Y, MITCHELL KE, DENTON BL, LEE C, SOCHA MT, WENNER BA, FIRKINS JL. Conditions stimulating neutral detergent fiber degradation by dosing branched-chain volatile fatty acids. II: relation with solid passage rate and pH on neutral detergent fiber degradation and microbial function in continuous culture[J]. *Journal of Dairy Science*, 2021, 104(9): 9853-9867.
- [7] 张振威, 朱明霞, 王长法. 异位酸影响反刍动物瘤胃代谢和生产性能的研究进展[J]. *动物营养学报*, 2022, 34(3): 1408-1415.
ZHANG ZW, ZHU MX, WANG CF. Effects of isoacids on ruminal metabolism and performance in ruminants: a review[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2022, 34(3): 1408-1415 (in Chinese).
- [8] APAJALAHTI J, VIENOLA K, RAATIKAINEN K, HOLDER V, MORAN CA. Conversion of branched-chain amino acids to corresponding isoacids - an *in vitro* tool for estimating ruminal protein degradability[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2019, 6: 311.
- [9] BRYANT MP, DOETSCH RN. Factors necessary for the growth of *Bacteroides succinogenes* in the volatile acid fraction of rumen fluid[J]. *Journal of Dairy Science*, 1955, 38(4): 340-350.
- [10] 焦金真, 王芑芑, 汤少勋, 周传社, 谭支良. 浏阳黑山羊胃肠道不同部位重要功能微生物的数量分布特征研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2013, 44(10): 1590-1599.
JIAO JZ, WANG PP, TANG SX, ZHOU CS, TAN ZL. Quantity and distribution characteristics of functional microorganisms in gastrointestinal tract of Liuyang black goats[J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2013, 44(10): 1590-1599 (in Chinese).
- [11] VAN GYLSWYK N. The effect of supplementing a low-protein hay on the cellulolytic bacteria in the rumen of sheep and on the digestibility of cellulose and hemicellulose[J]. *Journal of Agricultural Science*. 1970, 74(1): 169-180.
- [12] 刘永嘉, 王聪, 刘强, 郭刚, 霍文婕, 张静, 裴彩霞, 张延利. 日粮补充异丁酸对犏牛生长性能、瘤胃发酵和纤维分解菌菌群的影响[J]. *草业学报*, 2019, 28(7): 151-158.
LIU YJ, WANG C, LIU Q, GUO G, HUO WJ, ZHANG

- J, PEI CX, ZHANG YL. Effects of isobutyrate supplementation on growth performance, ruminal fermentation and cellulolytic bacterial abundance in calves[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2019, 28(7): 151-158 (in Chinese).
- [13] 李鹤琼, 刘强, 王聪, 张延利, 裴彩霞, 王永新, 郭刚, 霍文婕, 张拴林. 2-甲基丁酸对断奶前后犊牛瘤胃发酵, 酶活及纤维分解菌菌群的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2015, 46(12): 2218-2226.
- LI HQ, LIU Q, WANG C, ZHANG YL, PIE CX, WANG YX, GUO G, HUO WJ, ZHANG SL. Effects of 2-methylbutyrate supplementation on rumen fermentation, enzyme activities and cellulolytic bacteria in pre-and post-weaning dairy calves[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2015, 46(12): 2218-2226 (in Chinese).
- [14] SHEN J, ZHENG LX, CHEN XD, HAN XY, CAO YC, YAO JH. Metagenomic analyses of microbial and carbohydrate-active enzymes in the rumen of dairy goats fed different rumen degradable starch[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1003.
- [15] 吴鹏, 陈忠法, 王佳莹. 宏基因组学揭示瘤胃微生物多样性及功能[J]. *动物营养学报*, 2017, 29(5): 1506-1514.
- WU P, CHEN ZF, WANG JK. Metagenomics reveals rumen microbial diversity and functions[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2017, 29(5): 1506-1514 (in Chinese).
- [16] 中华人民共和国农业农村部. 肉牛饲养标准: NY/T 815-2004[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. Feeding Standard of Beef Cattle: NY/T 815-2004[S]. Beijing: Standards Press of China, 2004 (in Chinese).
- [17] AGARWAL N, KAMRA DN, CHAUDHARY LC, AGARWAL I, SAHOO A, PATHAK NN. Microbial status and rumen enzyme profile of crossbred calves fed on different microbial feed additives[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2002, 34(5): 329-336.
- [18] CHEN SF, ZHOU YQ, CHEN YR, GU J. Fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor[J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(17): i884-i890.
- [19] LI H, DURBIN R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(14): 1754-1760.
- [20] LI DH, LIU CM, LUO RB, SADAKANE K, LAM TW. MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph[J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(10): 1674-1676.
- [21] HYATT D, CHEN GL, LOCASCIO PF, LAND ML, LARIMER FW, HAUSER LJ. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification[J]. *BMC Bioinformatics*, 2010, 11: 119.
- [22] FU LM, NIU BF, ZHU ZW, WU ST, LI WZ. CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data[J]. *Bioinformatics*, 2012, 28(23): 3150-3152.
- [23] LI RQ, LI YR, KRISTIANSEN K, WANG J. SOAP: short oligonucleotide alignment program[J]. *Bioinformatics*, 2008, 24(5): 713-714.
- [24] BUCHFINK B, XIE C, HUSON DH. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND[J]. *Nature Methods*, 2015, 12: 59-60.
- [25] SEGATA N, IZARD J, WALDRON L, GEVERS D, MIROPOLSKY L, GARRETT WS, HUTTENHOWER C. Metagenomic biomarker discovery and explanation[J]. *Genome Biology*, 2011, 12(6): R60.
- [26] WANG LJ, ZHANG GN, LI Y, ZHANG YG. Effects of high forage/concentrate diet on volatile fatty acid production and the microorganisms involved in VFA production in cow rumen[J]. *Animals: an Open Access Journal from MDPI*, 2020, 10(2): 223.
- [27] 张贵花. 异戊酸对断奶前后犊牛瘤胃发育的影响[D]. 太谷: 山西农业大学硕士学位论文, 2015.
- ZHANG GH. Effects of isovalerate on rumen development in pre- and post-weaning dairy calves[D]. Taigu: Master's Thesis of Shanxi Agricultural University, 2015 (in Chinese).
- [28] ROMAN-GARCIA Y, DENTON BL, MITCHELL KE, LEE C, SOCHA MT, FIRKINS JL. Conditions stimulating neutral detergent fiber degradation by dosing branched-chain volatile fatty acids. I: comparison with branched-chain amino acids and forage source in ruminal batch cultures[J]. *Journal of Dairy Science*, 2021, 104(6): 6739-6755.
- [29] JIANG F, GAO YH, PENG ZL, MA XL, YOU YJ, HU ZB, HE AX, LIAO YP. Isoacids supplementation improves growth performance and feed fiber digestibility associated with ruminal bacterial community in yaks[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1175880.
- [30] 沈冰蕾, 苗树君, 邵广. 不同种类及水平的异位酸对奶牛日粮消化率及瘤胃纤维素酶活性的影响[J]. *中国畜牧杂志*, 2013, 49(5): 39-43.
- SHEN BL, MIAO SJ, SHAO G. Effects of different kinds and levels of heterotopic acids on dietary

- digestibility and rumen cellulase activity of dairy cows[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2013, 49(5): 39-43 (in Chinese).
- [31] AN DD, DONG XZ, DONG ZY. Prokaryote diversity in the rumen of yak (*Bos grunniens*) and Jinnan cattle (*Bos taurus*) estimated by 16S rDNA homology analyses[J]. Anaerobe, 2005, 11(4): 207-215.
- [32] CHEN XD, YAN F, LIU T, ZHANG YL, LI XY, WANG MY, ZHANG CG, XU XR, DENG L, YAO JH, WU SR. Ruminal microbiota determines the high-fiber utilization of ruminants: evidence from the ruminal microbiota transplant[J]. Microbiology Spectrum, 2022, 10(4): e0044622.
- [33] 王西亚, 吕继龙, 何萍, 范分良, 仇少君, 徐新朋, 赵士诚. 玉米秸秆分解过程中细菌群落组成演化特征[J]. 植物营养与肥料学报, 2021, 27(1): 45-53.
- WANG XY, LÜ JL, HE P, FAN FL, QIU SJ, XU XP, ZHAO SC. Succession in bacterial community during maize straw decomposition[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizers, 2021, 27(1): 45-53 (in Chinese).
- [34] WANG C, LIU Q, PEI CX, LI HY, WANG YX, WANG H, BAI YS, SHI ZG, LIU XN, LI P. Effects of 2-methylbutyrate on rumen fermentation, ruminal enzyme activities, urinary excretion of purine derivatives and feed digestibility in steers[J]. Livestock Science, 2012, 145(1/2/3): 160-166.
- [35] WANG C, LIU Q, GUO G, HUO WJ, PEI CX, ZHANG SL, YANG WZ. Effects of dietary protein levels and 2-methylbutyrate on ruminal fermentation, nutrient degradability, bacterial populations and urinary purine derivatives in Simmental steers[J]. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 2018, 102(3): 611-619.
- [36] LIU Q, WANG C, GUO G, HUO WJ, ZHANG YL, PEI CX, ZHANG SL, WANG H. Effects of branched-chain volatile fatty acids supplementation on growth performance, ruminal fermentation, nutrient digestibility, hepatic lipid content and gene expression of dairy calves[J]. Animal Feed Science and Technology, 2018, 237: 27-34.
- [37] QIAN L, CHEN BJ, DENG P, GUI FR, CAO Y, QIN Y, LIAO HJ. TM7 (*Saccharibacteria*) regulates the synthesis of linoleic acid and tricosanoic acid, and alters the key metabolites in diapause *Clanis bilineata tsingtauica*[J]. Frontiers in Physiology, 2023, 14: 1093713.
- [38] TIAN XZ, WANG X, LI JX, LUO QY, BAN C, LU Q. The effects of selenium on rumen fermentation parameters and microbial metagenome in goats[J]. Fermentation, 2022, 8(5): 240.
- [39] LIU C, LI XH, CHEN YX, CHENG ZH, DUAN QH, MENG QH, TAO XP, SHANG B, DONG HM. Age-related response of rumen microbiota to mineral salt and effects of their interactions on enteric methane emissions in cattle[J]. Microbial Ecology, 2017, 73(3): 590-601.
- [40] GENG AL, JIN M, LI NN, ZHU DC, XIE RR, WANG QQ, LIN HX, SUN JZ. New insights into the co-occurrences of glycoside hydrolase genes among prokaryotic genomes through network analysis[J]. Microorganisms, 2021, 9(2): 427.