

采用 Illumina MiSeq 测序技术分析葡萄籽原花青素对奶牛体外瘤胃发酵产甲烷菌区系的影响

童津津¹ 张 华¹ 孙铭维¹ 杨德莲¹ 张 婕¹ 熊本海^{2*} 蒋林树^{1*}

(1. 奶牛营养学北京市重点实验室, 北京农学院动物科技学院, 北京 102206;

2. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193)

摘要: 本研究旨在基于 Illumina MiSeq 测序技术分析葡萄籽原花青素对奶牛体外瘤胃发酵产甲烷菌区系的影响。试验分为 6 组, 以 500 g 精粗比为 40:60 的全混合日粮为发酵底物, 分别添加 0 (对照)、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 g/kg 的葡萄籽原花青素。体外发酵 24 h 后提取各发酵液总 DNA, 采用 Illumina MiSeq PE300 高通量测序平台进行测序。结果表明: 1) 与对照组相比, 添加 0.1、0.2 g/kg 葡萄籽原花青素降低了产甲烷菌的分类操作单元 (OTUs) 数量, 添加 0.3、0.4、0.5 g/kg 葡萄籽原花青素增加了产甲烷菌的 OTUs 数量, 但差异并不显著 ($P>0.05$); 葡萄籽原花青素添加量对 Chao1 指数和 Shannon 指数均无显著影响 ($P>0.05$), 即对产甲烷菌的多样性没有显著影响。2) 在门水平上, 与对照组相比, 添加 0.3、0.4、0.5 g/kg 葡萄籽原花青素显著降低了广古菌门的丰度 ($P<0.05$)。在科水平上, 与对照组相比, 甲烷杆菌科的丰度随着葡萄籽原花青素添加量的增加有降低的趋势, 且在添加量为 0.4 g/kg 时丰度显著降低 ($P<0.05$); Methanomassiliicoccaceae 的丰度随着葡萄籽原花青素添加量的增加而增加, 且当添加量为 0.3、0.4 g/kg 时显著增加 ($P<0.05$)。在属水平上, 与对照组相比, 甲烷短杆菌属的丰度随着葡萄籽原花青素添加量的增加而降低, 且当添加量为 0.4 g/kg 时显著降低 ($P<0.05$), 当添加量为 0.5 g/kg 时有回升的趋势, 但是仍低于对照组; 甲烷杆菌属的丰度随着葡萄籽原花青素添加量的增加而降低, 且当添加量为 0.4、0.5 g/kg 时显著降低了该属的丰度 ($P<0.05$); Candidatus_Methanoplasma 的丰度随着葡萄籽原花青素添加量的增加有上升趋势, 且当添加量为 0.3、0.4 g/kg 时显著增加了该属的丰度 ($P<0.05$); 甲烷球形菌属的丰度随着葡萄籽原花青素添加量的增加而降低, 且当添加量为 0.3、0.4、0.5 g/kg 时显著降低了该属的丰度 ($P<0.05$)。由此可知, 添加葡萄籽原花青素在门、科、属水平上均对奶牛体外瘤胃产甲烷菌区系有一定的影响。

关键词: 葡萄籽原花青素; 奶牛; 产甲烷菌; Illumina MiSeq 测序技术

中图分类号: S823

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2019)01-0314-10

甲烷的排放与全球气候变暖密切相关。有研究表明, 动物产生的甲烷、二氧化碳等占温室效应

气体的 18%, 其中反刍动物甲烷排放量占动物甲烷排放量的 30%, 而甲烷的温室效应是二氧化碳

收稿日期: 2018-06-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(31772629, 31702302); 2015 年大北农青年教师科研基金; 2016 年北京农学院青年教师科研基金; 2017 年北京市教委科技计划项目(SQKM201710020011); “十三五”国家重大科技专项(2016YFDO700201); 北京市农业局北京市现代农业产业技术体系奶牛创新团队

作者简介: 童津津(1985—), 女, 黑龙江哈尔滨人, 博士后, 研究方向为奶牛营养与免疫。E-mail: tongjinjin0451@163.com

* 通信作者: 熊本海, 教授, 博士生导师, E-mail: xiongbenhai@caas.cn; 蒋林树, 教授, 博士生导师, E-mail: kjsxnb@vip.sina.com

的 20~30 倍^[1]。因此,反刍动物的甲烷排放成为当今研究的热点及重点。反刍动物产生甲烷的主要途径是瘤胃发酵和肠道发酵,其中瘤胃发酵产生的甲烷占总产量的 90%^[2]。产甲烷菌属于古细菌,参与有机物的厌氧降解,生成甲烷。据报道,甲烷是重要的能量载体,反刍动物瘤胃内甲烷的生成损耗 2%~12% 的饲料能量,并且通过暖气排入大气^[3],其排放量的增加降低了饲料的利用率^[4],造成饲料的浪费。由此可见,降低甲烷排放量对畜牧业和饲料行业的发展具有重要的意义。

目前对于减少反刍动物甲烷排放的研究,主要通过营养措施如改变饲料粮结构^[5-6],添加丙酸增强剂、油脂、单宁、皂甙等提取物^[7-8]和驱原虫^[9]等方式。植物源性活性物质因具有无残留的特点,所以倍受国内外学者的青睐。研究表明在饲料中添加单宁能够显著降低反刍动物甲烷的产量^[10-11]。目前已有关于在反刍动物饲料中添加葡萄籽渣对反刍动物生长性能影响的报道^[12-14],但是对于葡萄籽原花青素在反刍动物中对瘤胃发酵产甲烷菌区系的研究报道较少。本试验通过在体外发酵试验中添加不同剂量的葡萄籽原花青素,研究其对奶牛瘤胃发酵产甲烷菌区系的影响,为其作为反刍动物饲料添加剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

葡萄籽原花青素购自天津市尖峰天然产物研究开发有限公司,含花青素单聚体 18.4%、二聚体 20.4%、三聚体 15.2%、四聚体 14.1%、低聚体(5~13 个单位)28.5%、酚醛类物质 4.3%。

1.2 瘤胃液收集

选用 4 头健康荷斯坦瘦管奶牛,饲喂精粗比为 40:60 的全混合日粮,收集晨饲前的瘤胃内容物,混合后在 39 °C 水浴环境下经 4 层纱布过滤,装于保温瓶迅速带回实验室,操作应在尽量短的时间内完成^[15]。

1.3 试验设计

试验采用单因素 6 水平试验设计,均以 500 mg 全混合日粮作为发酵底物,置于 150 mL 厌氧发酵瓶中,分别添加 0(对照,样品 A1、A2、A3),0.1(样品 B1、B2、B3),0.2(样品 C1、C2、C3),0.3(样品 D1、D2、D3),0.4(样品 E1、E2、E3),0.5 g/kg(样品 F1、F2、F3)的葡萄籽原花青素,每

组 3 个重复。接种时迅速在每瓶中加入预热的缓冲液 50 mL 和 4 层纱布过滤的新鲜瘤胃液 25 mL,并向瓶中持续通入 CO₂ 5 s 后,立即加上瓶塞,并将每个发酵瓶与产气装置的每个传感器相连接,于 39 °C 下连续培养 24 h,试验重复 3 次。

1.4 发酵液样品、产气量和甲烷产量的测定

待培养瓶在体外培养 24 h 后,将培养瓶取出放入冰水浴中停止发酵。将发酵液置于 50 mL 离心管中,立即测定发酵液的 pH。发酵液的挥发性脂肪酸(VFA)浓度、产气量和甲烷产量测定参照杨德莲等^[16]的方法。

1.5 基因组 DNA 提取

通过珠磨-十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法^[17]提取发酵液中总 DNA。提取的总 DNA 溶于无菌的 TE 缓冲液中,用微量紫外可见分光光度计测定总 DNA 浓度和纯度,-20 °C 贮存。

1.6 荧光定量 PCR 扩增与 Illumina MiSeq 测序

对微生物基因组 16S rDNA 古菌 V3~V4 区进行扩增,引物为 F344(5'-ACGGGGYGCAG-CAGGCGCGA-3')和 R806(5'-GGACTACVSGGGTATCTAAT-3')。每个样本的引物 5' 端加 bar-code 序列。PCR 扩增采用 Promega PCR mix 进行,PCR 反应体系:12.5 μL 2×Taq PCR Master-Mix,3 μL 牛血清白蛋白(BSA)(2 ng/μL),2 μL 引物(5 μmol/L),2 μL 模板 DNA 和 5.5 μL ddH₂O。反应参数:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 45 s,55 °C 退火 50 s,72 °C 延伸 45 s,32 个循环;72 °C 延伸 10 min。每个样品做 3 个平行 PCR 反应,并使用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒(AXY-GEN 公司)切胶回收 PCR 产物。PCR 产物纯化后送至奥维森公司进行 PCR 产物定量、DNA 序列修饰、文库构建及 Illumina MiSeq PE300 平台测序。

1.7 数据处理与生物信息学分析

通过 Illumina MiSeq 平台进行 Paired-end 测序,下机数据经过 QIIME(version 1.8.0)软件过滤、拼接、去除嵌合体,去除打分低于 20、碱基模糊、引物错配或测序长度小于 150 bp 的序列。对获得的序列(clean reads)进行拼接并去除引物,并计算菌群丰富度指数(Chao1 指数)、覆盖指数及多样性指数(Shannon 和 Simpson 指数)^[18]。根据 bar-codes 规类各组序列信息聚类为用于物种分类的操作分类单元(OUTs),OUTs 相似性设置为 97%。再利用 Mothur 软件(version 1.31.2)去掉长度较小

的 tags^[19]。OTUs 聚类分析和注释通过与 Ribosomal Data-base Project (RDP) 数据库中的古菌序列进行比对, 基于 Weighted Unifrac 距离, 使用 R (version 3.1.1) 软件包的 pheatmap 进行聚类分析。经过 UniFrac 算法利用系统进化的信息来比较样品间物种群落差异, 并进行 β 多样性 (β diversity) 分析。细菌聚类分析到门和属水平, 产甲烷菌分类到属水平, 丰度图采用 Excel 2010 软件制作。

1.8 统计分析

所有数据均采用 SAS 8.02 软件的 GLM 程序进行单因素方差分析, 多重比较采用 Duncan 氏法, $P < 0.05$ 为差异显著性判定标准。

2 结果

2.1 添加葡萄籽原花青素对瘤胃体外发酵液的产气量、甲烷产量及挥发性脂肪酸浓度的影响

如表 1 所示, 与对照组相比, 添加葡萄籽原花青素可显著升高发酵液的 pH ($P < 0.05$); 当葡萄籽原花青素添加量为 0.2 g/kg 时, 24 h 甲烷产量显著降低 ($P < 0.05$); 当葡萄籽原花青素添加量为

0.3 g/kg 时, 24 h 总产气量显著降低 ($P < 0.05$); 添加葡萄籽原花青素对发酵液的总挥发性脂肪酸、乙酸、丙酸、戊酸浓度和乙酸/丙酸均无显著影响 ($P > 0.05$); 当葡萄籽原花青素添加量为 0.4 和 0.5 g/kg 时, 发酵液的丁酸和异戊酸浓度显著降低 ($P < 0.05$); 当葡萄籽原花青素添加量为 0.2 g/kg 时, 发酵液的异丁酸浓度显著提高 ($P < 0.05$)。

2.2 Illumina MiSeq 高通量测序结果与多样性分析结果

通过 Illumina MiSeq 高通量测序后, 本试验中 18 个样品共获得 1 279 993 条高质量产甲烷菌 16S rRNA 基因序列, 每个样品的平均序列数为 71 110。以 97% 序列相似性为阈值, 共归为 491 个 OUTs。样品覆盖指数表明试验所得 OUTs 代表了瘤胃中 98% 的产甲烷菌, 满足后续分析; 本试验样本的稀释曲线见图 1, 如图所示, 在试验测序深度下, 所有样品的稀释曲线最终均趋于平缓, 表明每个样本的测序量合理, 能较好地反映各组瘤胃液中菌群结构和种类的多样性。

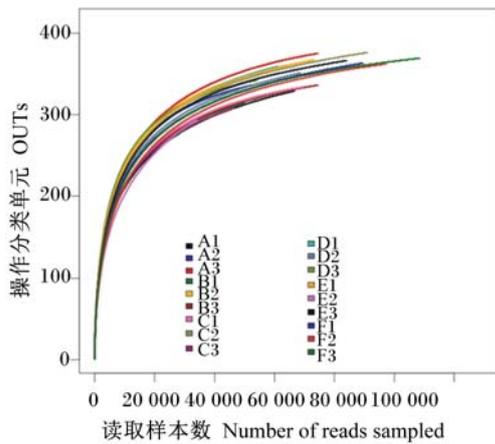
表 1 添加葡萄籽原花青素对瘤胃体外发酵液的产气量、甲烷产量及挥发性脂肪酸浓度的影响

Table 1 Effects of supplementation of grape seed procyanidine on gas production, methane production and volatile fatty acid concentrations of *in vitro* fermentation fluid in rumen

项目 Items	葡萄籽原花青素添加量 Grape seed procyanidine supplemental levels/(g/kg)						SEM	线性 Linear	P 值 P-value
	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5			
pH	6.22 ^b	6.28 ^a	6.29 ^a	6.31 ^a	6.29 ^a	6.28 ^a	0.01	0.00	<0.01
24 h 甲烷产量 24 h CH ₄ production/%	22.40 ^a	21.10 ^{ab}	19.00 ^b	20.70 ^{ab}	20.70 ^{ab}	21.3 ^{ab}	0.27	0.00	<0.01
24 h 产气量 24 h gas production/mL	78.10 ^a	77.10 ^{ab}	70.90 ^{ab}	64.66 ^b	73.47 ^{ab}	74.46 ^{ab}	2.51	0.00	<0.01
总挥发性脂肪酸 TVFA/(mmol/L)	94.10	101.60	104.30	98.00	103.70	92.00	5.27	0.54	0.50
乙酸 Acetic acid/%	60.80	61.80	61.70	61.90	61.90	62.50	0.42	0.09	0.18
丙酸 Propionic acid/%	19.40	21.70	19.80	19.80	19.80	20.18	0.79	0.87	0.40
乙酸/丙酸 A/P	3.12	2.92	3.11	3.11	3.12	3.09	0.08	0.39	0.49
丁酸 Butyric acid/%	18.70 ^a	18.40 ^{ab}	18.10 ^{ab}	18.10 ^{ab}	17.90 ^b	17.90 ^b	0.14	0.00	<0.01
异丁酸 Isobutyrate/%	1.03 ^b	1.09 ^{ab}	1.10 ^a	1.06 ^{ab}	1.04 ^{ab}	1.07 ^{ab}	0.01	0.14	<0.05
戊酸 Valerianic acid/%	1.90	1.97	1.85	1.76	1.74	1.83	0.07	0.15	0.34
异戊酸 Isovalerate/%	2.55 ^b	2.58 ^a	2.53 ^{abc}	2.51 ^{abc}	2.48 ^c	2.45 ^c	0.01	0.03	<0.01

同行数据肩标无字母或相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$), 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。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 ($P < 0.05$). The same as below.



A1~A3、B1~B3、C1~C3、D1~D3、E1~E3、F1~F3 分别为添加 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 g/kg 葡萄籽原花青素的样品。图 2 同。

A1 to A3, B1 to B3, C1 to C3, D1 to D3, E1 to E3, F1 to F3 were the samples supplemented with grape seed procyanidine at 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 g/kg. The same as Fig.2.

图 1 样品稀释曲线

Fig.1 Rarefaction curves of samples

表 2 添加葡萄籽原花青素对瘤胃体外发酵液中产甲烷菌 OUTs 和 α 多样性的影响

Table 2 Effects of supplementation of grape seed procyanidine on OUTs and α diversity of *Methanogens* of *in vitro* fermentation fluid in rumen

项目 Items	葡萄籽原花青素添加量 Grape seed procyanidine supplemental levels/(g/kg)						SEM	P 值 P-value
	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5		
操作分类单元 OTUs	292	277	278	292	295	299	2.99	0.910
PD_whole_tree 指数 PD_whole_tree index	10.34	12.26	12.59	12.84	13.58	12.68	3.48	0.056
覆盖指数 Coverage index	0.99	0.97	0.96	0.99	0.99	0.97	0.01	0.051
Shannon 指数 Shannon index	4.62	4.61	4.71	4.85	4.81	4.74	0.32	0.065
Chao1 指数 Chao1 index	304.70	296.90	309.00	309.40	311.30	298.40	2.65	0.128
物种观察指数 Species observation index	272.90	260.80	265.80	268.10	276.20	278.20	2.74	0.109

2.3 添加葡萄籽花青素对瘤胃体外发酵液中产甲烷菌区系的影响

研究葡萄籽原花青素对奶牛瘤胃发酵中产甲烷菌区系的影响,添加不同剂量的葡萄籽原花青素在门、科、属水平上对产甲烷菌的菌群组成如表 3 所示。在门水平上产甲烷菌都属于广古菌门 (*Euryarchaeota*),在科水平上大部分属于甲烷杆菌科 (*Methanobacteriaceae*),在属水平上则主要分布在甲烷短杆菌属 (*Methanobrevibacter*)、甲烷杆菌属 (*Methanobacterium*)、甲烷球形菌属

(*Methanosphaera*)、*Candidatus_Methanoplasma*。在门水平上,与对照组相比,添加 0.3、0.4、0.5 g/kg 葡萄籽原花青素显著降低了广古菌门的丰度 ($P < 0.05$)。在科水平上,与对照组相比,甲烷杆菌科的丰度随着葡萄籽原花青素添加量的增加有降低的趋势,且在添加量为 0.4 g/kg 时丰度显著降低 ($P < 0.05$); *Methanomassiliicoccaceae* 的丰度随着葡萄籽花青素添加量的增加而有增加的趋势,添加量为 0.3、0.4 g/kg 时显著升高 ($P < 0.05$)。在属水平上,与对照组相比,甲烷短

α 多样性反映了单个样本内部物种的多样性,物种观察指数、Chao1 指数反映样品中群落的丰富度 (species richness); Shannon 指数以及 Simpson 指数反映群落的多样性。由表 2 可知,产甲烷菌平均 Shannon 指数为 4.72,平均 Chao1 指数为 304.9,各组间各指标无显著差异 ($P > 0.05$),但各添加葡萄籽原花青素组与对照组相比,物种观察指数和 Shannon 指数具有升高的趋势,说明葡萄籽原花青素影响了样品中的物种丰富度及多样性。

β 多样性的主成分分析结果展示菌群之间的相似度。各添加葡萄籽青素组和对照组样品 β 多样性的主成分分析见图 2。基于 UniFrac 的加权主成分分析其主成分 1 (PC1) 的贡献率为 23.93%,主成分 2 (PC2) 的贡献率为 18.09%,可以较好地将对照组与葡萄籽花青素组分开,而 0.3 和 0.5 g/kg 组的每个样品之间相似度更接近。

杆菌属的丰度随着葡萄籽花青素添加量的增加有降低的趋势,且当添加量为 0.4 g/kg 时显著降低 ($P < 0.05$), 当添加量为 0.5 g/kg 时有升高的趋势,但仍低于对照组;甲烷杆菌属的丰度随葡萄籽花青素添加量的增加有降低的趋势,且当添加量为 0.4、0.5 g/kg 时其丰度显著降低 ($P < 0.05$); *Candidatus_Methanoplasma* 的丰度随着葡萄籽花青素添加量的增加有升高的趋势,且当添加量为 0.3、0.4 g/kg 时丰度显著增加 ($P < 0.05$); 甲烷球形菌属的丰度随着葡萄籽花青素添加量的增加有降低的趋势,且当添加量为 0.3、0.4、0.5 g/kg 时丰度显著降低 ($P < 0.05$)。

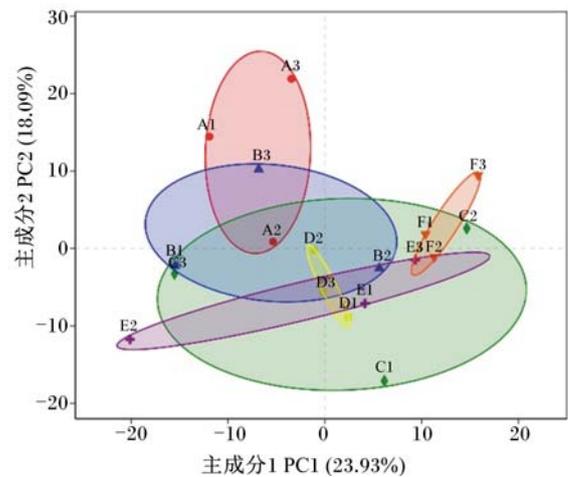


图 2 主成分分析结果

Fig.2 Results of principal component analysis

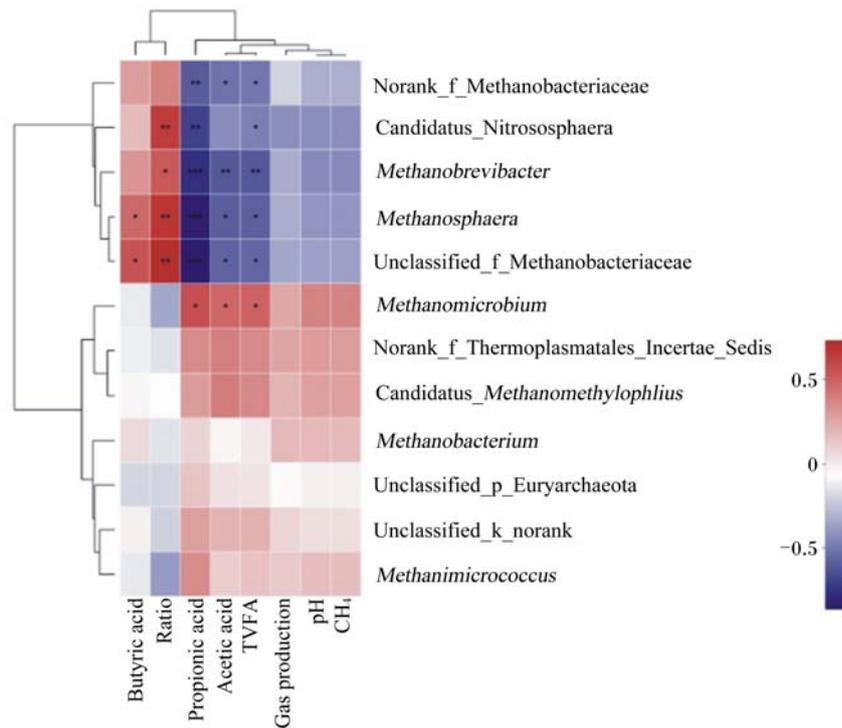
表 3 添加葡萄籽原花青素对瘤胃体外发酵液中产甲烷菌区系在门、科、属水平上的影响
Table 3 Effects of supplementation of grape seed procyanidine on phyla, family and genus levels of *Methanogens* of *in vitro* fermentation fluid in rumen

微生物种 Microbial species	葡萄籽原花青素添加量 Grape seed procyanidine supplemental levels/(g/kg)						SEM	P 值 P-value
	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5		
门水平 Phyla level								
广古菌门 Euryarchaeota	89.95 ^a	89.99 ^{ab}	75.32 ^{abc}	71.82 ^c	68.10 ^c	73.35 ^{bc}	2.38	<0.01
科水平 Family level								
甲烷杆菌科 Methanobacteriaceae	0.830 ^a	0.796 ^{ab}	0.656 ^{abc}	0.580 ^{bc}	0.550 ^c	0.623 ^{abc}	0.260	<0.01
Methanomassiliococcaceae	0.070 ^b	0.080 ^{ab}	0.093 ^{ab}	0.136 ^a	0.130 ^a	0.110 ^{ab}	0.126	<0.01
属水平 Genus level								
甲烷短杆菌属 <i>Methanobrevibacter</i>	64.67 ^a	63.53 ^{ab}	52.66 ^{abc}	51.09 ^{bc}	46.62 ^c	55.08 ^{abc}	0.23	<0.01
甲烷杆菌属 <i>Methanobacterium</i>	0.75 ^a	0.65 ^{ab}	0.64 ^{ab}	0.69 ^{ab}	0.58 ^b	0.61 ^b	0.21	<0.01
<i>Candidatus_Methanoplasma</i>	6.71 ^b	8.09 ^b	9.47 ^{ab}	13.70 ^a	13.10 ^a	11.06 ^{ab}	1.28	<0.01
甲烷球形菌属 <i>Methanosphaera</i>	17.81 ^a	15.74 ^a	12.54 ^a	6.30 ^b	7.79 ^b	6.60 ^b	1.22	<0.01

2.4 添加葡萄籽花青素对瘤胃体外发酵指标、甲烷产量与产甲烷菌区系相关性的影响

应用皮尔森 (Pearson) 相关性分析方法,对瘤胃发酵指标甲烷产量与菌群结构的相关性进行研究 (图 3)。Heatmap 图表示的是微生物分类与环境变量比较,评估微生物分类与环境变量之间的相关性,基本输出是一个距离矩阵,表示群落中每个微生物与每个环境因子变量之间的相关系数。发酵液中乙酸、丙酸和总挥发性脂肪酸浓度与甲烷微菌属 (*Methanomicrobium*) 丰度呈显

著正相关 ($P < 0.05$); 而发酵液中 *Candidatus_Nitrososphaera*、甲烷短杆菌属、甲烷球形菌属和甲烷杆菌科丰度与乙酸、丙酸和总挥发性脂肪酸浓度呈显著负相关 ($P < 0.05$), 与丁酸浓度和乙酸/丙酸呈显著正相关 ($P < 0.05$); 然而 *Candidatus_Nitrososphaera* 丰度与乙酸浓度无显著相关性 ($P > 0.05$), *Candidatus_Nitrososphaera* 和甲烷短杆菌属丰度与丁酸浓度无显著相关性 ($P > 0.05$)。而添加葡萄籽花青素后,菌群结构与甲烷产量、产气量以及 pH 没有显著的相关性 ($P > 0.05$)。



Norank_f_Methanobacteriaceae: 未分类甲烷杆菌科; Candidatus_Nitrososphaera: 暂定种; *Methanobrevibacter*: 甲烷短杆菌属; *Methanosphaera*: 甲烷球形菌属; Unclassified_f_Methanobacteriaceae: 未分类甲烷杆菌科; *Methanomicrobium*: 甲烷微菌属; Norank_f_Thermoplasmatales_Incertae_Sedis: 未分类; Candidatus_Methanomethylophilus: 暂定种; *Methanobacterium*: 甲烷细菌属; Unclassified_p_Euryarchaeota: 未分类广古菌门; Unclassified_k_norank: 未分类; *Methanimicrococcus*: 甲烷微球菌属; Butyric acid: 丁酸; Ratio: 乙酸/丙酸; Propionic acid: 丙酸; Acetic acid: 乙酸; TVFA: 总挥发性脂肪酸; Gas production: 产气量; CH₄: 甲烷产气量。

R 值在图中以不同颜色展示, 右侧图例是不同 R 值的颜色区间; P 值若小于 0.05 则用 * 号标出, * : $0.01 < P \leq 0.05$, ** : $0.001 < P \leq 0.01$, *** : $P \leq 0.001$ 。

R -values were showed by different colors in the figure, and the right side of the legend was the color range of different R -values. If P -values were less than 0.05, followed by *, and * : $0.01 < P \leq 0.05$, ** : $0.001 < P \leq 0.01$, *** : $P \leq 0.001$.

图 3 瘤胃发酵参数、甲烷产量与菌群结构相关性分析结果

Fig.3 Correlation analyses of ruminal fermentation parameters, CH₄ production and microbial community structure

3 讨论

本研究表明, 添加葡萄籽原花青素能显著降低各水平的产甲烷菌丰度。葡萄籽原花青素对瘤胃发酵具有显著的影响, 还可显著降低甲烷产量^[16], 因此, 本研究从产甲烷菌的结构及丰度变化的角度, 进一步解释了葡萄籽原花青素通过影响微生物的区系及功能来调控甲烷生成的机制。邸凌峰等^[20]研究发现, 葡萄籽原花青素中的缩合单宁与产气量呈正相关。这与本研究结果一致, 当葡萄籽花青素添加量为 0.3 g/kg 时, 产气

量达到最低。但是, 本研究中, 随着葡萄籽原花青素添加量的升高, 并没有呈剂量依赖性的变化。据李晓鹏^[21]在研究缩合单宁对体外发酵的影响中得出, 单宁破坏了瘤胃中部分细菌的膜, 使细菌不能正常繁殖, 同时阻止了酶与底物的结合, 导致产气量降低。因此, 本研究中葡萄籽原花青素影响了产甲烷菌的生长环境, 抑制了产甲烷菌的生长; 其次, 添加葡萄籽原花青素降低了产甲烷菌对其生长代谢原料的利用能力, 因此降低了各个水平的产甲烷菌的丰度。王慧玲等^[22]和 Anantasook^[23]研究发现, 甲烷的产生是产甲烷

菌直接作用的结果,因此降低产甲烷菌对于甲烷减排具有重要作用。由此可见,葡萄籽原花青素对瘤胃发酵及产气调控具有直接的作用。

本试验通过高通量测序分析结果表明,甲烷短杆菌属为优势产甲烷菌,与大量研究结果相一致^[24-26],进一步说明甲烷短杆菌属在反刍动物前肠甲烷形成中起重要作用。而且,在属水平上甲烷短杆菌属所占的比例最大,其他3个所占比例从高排到低依次是甲烷球形菌属、*Candidatus_Methanoplasma*、甲烷杆菌属。这与Tajima等^[27]研究结果一致,在黑白花奶牛中的产甲烷菌的主要分布在甲烷短杆菌属、甲烷球形菌属、甲烷杆菌属和甲烷八叠球菌属。据报道,*Candidatus_Methanoplasma*主要以甲胺类化合物或甲醇为底物生成甲烷,但不能利用二氧化碳,该菌可作为调控甲烷产量的目标菌群^[28-29]。由此可见,产甲烷菌的共性与差异性决定了产甲烷菌的丰度变化,解释了不同物种瘤胃甲烷产量差异的机制。众所周知,甲烷的产生主要通过产甲烷菌利用二氧化碳作为碳源,氢离子作为主要的电子供体发酵形成。反刍动物在产生甲烷的过程中会消耗电子,减少瘤胃内的氢分压,促进产氢菌的代谢和代谢产物的生成,利于有机质的降解利用^[30]。因此,了解产甲烷菌区系对瘤胃发酵及调控甲烷生成具有重要的意义。然而,瘤胃甲烷的产量又与细菌的菌群结构^[31]、瘤胃体积大小^[32]、品种差异^[33]、饲料的组成成分^[34-35]等密切相关,因此,瘤胃甲烷调控需要多方面考虑。

据报道,产甲烷菌在瘤胃内主要参与有机物厌氧降解的最后一步,并利用发酵产生的氢生产甲烷^[23,36]。产甲烷菌主要分为5个目,目前的研究表明主要集中在4个目上,分别是甲烷杆菌目、甲烷球形菌目、甲烷八叠球菌目、甲烷微菌目^[37]。据报道,水牛瘤胃内90%的产甲烷菌为甲烷短杆菌属,其次为甲烷球形菌属和热原体属,总体上与其他反刍动物瘤胃产甲烷菌区系组成相似^[38];本研究中,瘤胃甲烷球形菌属所占比例在15%左右,该结果与Franzolin等^[39]的报道一致。反刍动物瘤胃内的瘤胃球菌主要由黄色瘤胃球菌和白色瘤胃球菌在纤维素分解中起主要作用。我们的前期研究结果表明,添加葡萄籽花青素对发酵液黄色葡萄球菌和白色葡萄球菌丰度没有显著的影响,这可能由于体内复杂的瘤

胃内环境与体外试验条件所致^[16]。葡萄籽原花青素对改善奶牛泌乳性能及提高生产效益具有显著影响^[13,40]。据报道,葡萄籽原花青素对饲料转化效率^[41]、氮表观消化率和留存率^[42]、粗蛋白质和能量的表观消化率效果尤为显著^[43]。

而本研究中,添加葡萄籽原花青素后对瘤胃产甲烷菌区系并无显著变化,不同添加量组中甲烷短杆菌属所占比例均在90%以上,并未显著影响甲烷短杆菌属在瘤胃内的主导地位。然而,在产甲烷菌群结构与甲烷产量的相关性分析中,并没有发现具有显著的相关性。因此,葡萄籽原花青素抑制甲烷的产生机制,有待进一步的探讨。随着每年全球反刍动物排放大量的甲烷,减少瘤胃内甲烷的生成对提高饲料能量利用率和改善环境具有重要意义。减少家畜体内甲烷的生成不仅可以提高动物的生长性能,而且对控制温室效应有一定作用。因此,饲料中选择添加葡萄籽花青素对瘤胃产甲烷菌以及瘤胃内甲烷生成的调控具有显著影响,而在生产实践中具有广阔的应用前景。

4 结 论

饲料中添加葡萄原花青素对产甲烷菌多样性指数没有显著影响,在门、科、属水平上的对产甲烷菌丰度均存在一定影响。

参考文献:

- [1] GILL M, SMITH P, WILKINSON J M. Mitigating climate change: the role of domestic livestock [J]. *Animal: An International Journal of Animal Bioscience*, 2010, 4(3): 323-333.
- [2] 周怿,刁其玉.反刍动物瘤胃甲烷气体生成的调控[J].*草食家畜*, 2008(4): 21-24.
- [3] MOSS A R, JOUANY J P, NEWBOLD J. Methane production by ruminants: its contribution to global warming [J]. *Animal de Zootechnie*, 2000, 49(3): 231-253.
- [4] 游玉波.肉牛甲烷排放测定与估算模型的研究[D].博士学位论文.北京:中国农业科学院,2008.
- [5] 娜仁花,董红敏.营养因素对反刍动物甲烷排放影响的研究现状[J].*安徽农业科学*, 2009, 37(6): 2534-2536, 2735.
- [6] CAO Y, TAKAHASHI T, HORIGUCHI K I, et al. Methane emissions from sheep fed fermented or non-

- fermented total mixed ration containing whole-crop rice and rice bran [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2010, 157(1/2): 72-78.
- [7] 严淑红, 蒋林树. 茶皂素对反刍动物瘤胃发酵的影响研究进展 [J]. *中国农学通报*, 2015, 31(5): 20-24.
- [8] 胡伟莲. 皂甙对瘤胃发酵与甲烷产量及动物生产性能影响的研究 [D]. 博士学位论文. 杭州: 浙江大学, 2005.
- [9] ODONGO N E, BAGG R, VESSIE G, et al. Long-term effects of feeding monensin on methane production in lactating dairy cows [J]. *Journal of Dairy Science*, 2007, 90(4): 1781-1788.
- [10] WANG J K, YE J A, LIU J X. Effects of tea saponins on rumen microbiota, rumen fermentation, methane production and growth performance-a review [J]. *Tropical Animal Health and Production*, 2012, 44(4): 697-706.
- [11] GEMEDA B S, HASSEN A. Effect of tannin and species variation on *in vitro* digestibility, gas, and methane production of tropical browse plants [J]. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2015, 28(2): 188-199.
- [12] BAYATLI F, AKKUŞ D, KILIC E, et al. The protective effects of grape seed extract on MDA, AOPP, apoptosis and *eNOS* expression in testicular torsion; an experimental study [J]. *World Journal of Urology*, 2013, 31(3): 615-622.
- [13] GESSNER D K, WINKLER A, KOCH C, et al. Analysis of hepatic transcript profile and plasma lipid profile in early lactating dairy cows fed grape seed and grape marc meal extract [J]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 253.
- [14] 高巍, 卜登攀, 李永刚, 等. 葡萄籽粕对反刍动物营养价值的综合评定研究 [C] // 中国畜牧兽医学会动物营养学分会第七届中国饲料营养学术研讨会论文集. 郑州: 中国畜牧兽医学会动物营养学分会, 2014.
- [15] 周敏, 叶子弘, 蒋林树. 瘤胃氢化多不饱和脂肪酸的影响因素 [J]. *中国农学通报*, 2010, 26(8): 38-44.
- [16] 杨德莲, 童津津, 张婕, 等. 葡萄籽原花青素对奶牛瘤胃体外发酵参数及微生物区系的影响 [J]. *动物营养学报*, 2018, 30(2): 717-725.
- [17] BÜRGMANN H, PESARO M, WIDMER F, et al. A strategy for optimizing quality and quantity of DNA extracted from soil [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2001, 45(1): 7-20.
- [18] CAPORASO J G, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data [J]. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335-336.
- [19] DRAY S, DUFOUR A, LEEUW J D, et al. The ade4 package; implementing the duality diagram for ecologists [J]. *Journal of Statistical Software*, 2007, 22(4): 1-20.
- [20] 邸凌峰, 曹雪, 秦炜曠, 等. 两种含单宁饲草对反刍动物应用的价值研究 [J]. *饲料工业*, 2017, 38(7): 43-50.
- [21] 李晓鹏. 缩合单宁对体外发酵特性的影响 [D]. 硕士学位论文. 兰州: 甘肃农业大学, 2009.
- [22] 王慧玲, 王小平, 尕藏桑智, 等. 单宁酸对绵羊瘤胃体外发酵和甲烷产量的影响 [J]. *中国草食动物科学*, 2013, 33(6): 46-48.
- [23] ANANTASOOK N. 日粮添加含单宁和皂苷的雨树荚对奶牛瘤胃发酵和甲烷产量调控的影响 [J]. 王聪译. *中国畜牧兽医*, 2014, 41(2): 152.
- [24] HOOK S E, STEELE M A, NORTHWOOD K S, et al. Impact of high-concentrate feeding and low ruminal pH on methanogens and protozoa in the rumen of dairy cows [J]. *Microbial Ecology*, 2011, 62(1): 94-105.
- [25] 李志鹏, 刘晗璐, 司华哲, 等. 不同粗饲料条件下梅花鹿瘤胃甲烷菌结构的比较分析 [J]. *动物营养学报*, 2016, 28(9): 2911-2919.
- [26] CERSOSIMO L M, LACHANCE H, ST-PIERRE B, et al. Examination of the rumen bacteria and methanogenic archaea of wild impalas (*Aepyceros melampus melampus*) from Pongola, South Africa [J]. *Microbial Ecology*, 2015, 69(3): 577-585.
- [27] TAJIMA K, NAGAMINE T, MATSUI H, et al. Phylogenetic analysis of archaeal 16S rRNA libraries from the rumen suggests the existence of a novel group of archaea not associated with known methanogens [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 200(1): 67-72.
- [28] BORREL G, HARRIS H M B, TOTTEY W, et al. Genome sequence of "Candidatus *Methanomethylophilus alvus*" Mx1201, a methanogenic archaeon from the human gut belonging to a seventh order of methanogens [J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(24): 6944-6945.
- [29] POULSEN M, SCHWAB C, JENSEN B B, et al. Methylophilic methanogenic thermoplasmata impli-

- cated in reduced methane emissions from bovine rumen [J]. *Nature Communications*, 2013, 4: 1428.
- [30] 郭嫣秋, 胡伟莲, 刘建新. 瘤胃甲烷菌及甲烷生成的调控 [C] // 全国反刍动物营养生理生化第三次学术会议论文摘要汇编. 长春: 中国畜牧兽医学, 2004: 244-247.
- [31] MUSTAPHA N A, SAKAI K, SHIRAI Y, et al. Impact of different antibiotics on methane production using waste-activated sludge: mechanisms and microbial community dynamics [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(21): 9355-9364.
- [32] GOOPY J P, DONALDSON A, HEGARTY R, et al. Low-methane yield sheep have smaller rumens and shorter rumen retention time [J]. *British Journal of Nutrition*, 2014, 111(4): 578-585.
- [33] KING E E, SMITH R P, ST-PIERRE B, et al. Differences in the rumen methanogen populations of lactating jersey and Holstein dairy cows under the same diet regimen [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(16): 5682-5687.
- [34] CHANDRASEKHARAI A M, THULASI A, JOSE L. Effect of supplementation of different essential oils on *in-vitro* methanogenesis, fermentation and digestibility of finger millet straw based diet in rumen liquor of crossbred cattle [J]. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 2015, 6(2): 480-486.
- [35] DANIELSSON R, DICKSVED J, SUN L, et al. Methane production in dairy cows correlates with rumen methanogenic and bacterial community structure [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 226.
- [36] 陈亚迎, 刘壮, 吕朋安, 等. 溶菌酶对瘤胃体外发酵、甲烷生成及微生物菌群结构的影响 [J]. *微生物学报*, 2017, 57(5): 758-768.
- [37] ST-PIERRE B, WRIGHT A D. Diversity of gut methanogens in herbivorous animals [J]. *Animal*, 2013, 7(Suppl.1): 49-56.
- [38] 林波, 梁辛, 韦升菊, 等. 烟酸对水牛瘤胃发酵指标及微生物区系的影响 [J]. *动物营养学报*, 2015, 27(8): 2396-2404.
- [39] FRANZOLIN R, ST-PIERRE B, NORTHWOOD K, et al. Analysis of rumen methanogen diversity in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) under three different diets [J]. *Microbial Ecology*, 2012, 64(1): 131-139.
- [40] 吴建敏, 承尧兴, 徐俊, 等. 葡萄籽残渣饲喂奶牛的效果研究 [J]. *中国畜牧杂志*, 2007, 43(7): 62-63.
- [41] 孙占鹏, 王曦, 李会菊, 等. 日粮中添加不同剂量葡萄渣对成年羊增重效果的影响 [J]. *中国草食动物科学*, 2010, 30(1): 46-48.
- [42] 赵栋, 郑琛, 李发弟, 等. 葡萄渣单宁对绵羊养分代谢及瘤胃发酵的影响 [J]. *草业学报*, 2014, 23(4): 285-292.
- [43] 李会菊, 孙占鹏. 日粮中添加葡萄渣对小尾寒羊成年母羊体重的影响 [J]. *饲料工业*, 2010, 31(3): 33-36.

Effects of Grape Seed Procyanidine on *Methanogens* Flora of *in Vitro* Rumen Fermentation of Dairy Cows Using Illumina MiSeq Sequencing Technology

TONG Jinjin¹ ZHANG Hua¹ SUN Mingwei¹ YANG Delian¹ ZHANG Jie¹
XIONG Benhai^{2*} JIANG Linshu^{1*}

(1. Beijing Key Laboratory for Dairy Cow Nutrition, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China;

2. State Key Laboratory of Animal Nutrition, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: The present study was designed to explore effects of grape seed procyanidine on *Methanogens* flora of *in vitro* rumen fermentation of dairy cows using Illumina MiSeq sequencing technology. The trial was

* Corresponding authors: XIONG Benhai, professor, E-mail: xiongbenhai@caas.cn; JIANG Linshu, professor, E-mail: kxnb@vip.sina.com

divided into 6 groups. Total mixed ration with the concentrate to forage ratio at 40:60 was used as the fermentation substrate and added grape seed procyanidin at levels of 0 (control), 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5 g/kg, respectively. Total DNA was extracted from fermentation liquor after 24 h fermentation, and sequenced by Illumina MiSeq PE300 high-throughput sequencing platform. The results showed as follows: 1) compared with the control group, the supplementation of grape seed procyanidins at 0.1, 0.2 g/kg significantly decreased the operational taxonomic units (OTUs), while the supplementation of grape seed procyanidins at 0.3, 0.4 and 0.5 g/kg increased the OTUs, but did not have significant difference ($P>0.05$); the supplementation of grape seed procyanidins did not significantly affect Chao1 index and Shannon index ($P>0.05$), namely did not significantly affect the diversity of *Methanogens*. 2) At phyla level, compared with the control group, the supplementation of grape seed procyanidine at 0.3, 0.4 and 0.5 g/kg significantly decreased the abundance of Euryarchaeota ($P<0.05$). At family level, compared with the control group, the abundance of Methanobacteriaceae had a decreased trend with the supplementation of grape seed procyanidine increasing, and when the supplementation was at 0.4 g/kg, the abundance of it significantly decreased ($P<0.05$); the abundance of Methanomassiliicoccaceae increased with the supplementation of grape seed procyanidine increasing, and when the supplementation was 0.3 and 0.4 g/kg, the abundance of it significantly increased ($P<0.05$). At genus level, compared with the control group, the abundance of *Methanobrevibacter* decreased with the supplementation of grape seed procyanidine increasing, and when the supplementation was 0.4 g/kg, the abundance of it significantly decreased ($P<0.05$), when the supplementation was 0.5 g/kg, the abundance of it had an increasing trend, but was lower than that in control group; the abundance of *Methanobacterium* decreased with the supplementation of grape seed procyanidine increasing, and when the supplementation was 0.4 and 0.5 g/kg, the abundance of it significantly decreased ($P<0.05$); the abundance of *Candidatus_Methanoplasma* had an increasing trend with the supplementation of grape seed procyanidine increasing, and when supplementation was 0.3 and 0.4 g/kg, the abundance of it significantly increased ($P<0.05$); the abundance of *Methanosphaera* decreased with the supplementation of grape seed procyanidine increasing, and when the supplementation was 0.3, 0.4 and 0.5 g/kg, the abundance of it significantly decreased ($P<0.05$). Therefore, the supplementation of grape seed procyanidine has significant effects on *Methanogens* at phyla, family and genus levels. [Chinese Journal of Animal Nutrition, 2019, 31(1):314-323]

Key words: grape seed procyanidins; dairy cows; *Methanogens*; Illumina MiSeq sequencing technology