

李 托, 李陇平, 屈 雷. 饲料中添加高羊毛氨酸硒对陕北白绒山羊羯羊瘤胃古菌结构与组成的影响[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(2): 331-341.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2024.02.015

## 饲料中添加高羊毛氨酸硒对陕北白绒山羊羯羊瘤胃古菌结构与组成的影响

李 托<sup>1,2</sup>, 李陇平<sup>1</sup>, 屈 雷<sup>1</sup>

(1. 榆林学院陕西省陕北绒山羊工程技术研究中心, 陕西 榆林 719000; 2. 榆林学院生命科学学院, 陕西 榆林 719000)

**摘要:** 为明确不同剂量高羊毛氨酸硒(SeHLan)对陕北白绒山羊羯羊瘤胃古菌结构与组成的影响, 本研究选取发育一致的陕北白绒山羊羯羊 32 只, 均分为 4 组, 分别饲喂硒含量为 0.016 mg/kg (CK)、0.300 mg/kg、0.600 mg/kg 和 1.200 mg/kg 的饲料, 饲养 70 d 后, 采集羯羊瘤胃液, 提取 DNA 并利用古菌特异性引物进行 PCR 扩增, 对古菌 V4-V5 区进行高通量测序和羯羊瘤胃液古菌结构与组成分析。结果表明: 随着 SeHLan 添加量增加, 各处理瘤胃液古菌  $\alpha$  多样性指数呈现出先降低后增高的变化趋势, 但处理间瘤胃液古菌  $\alpha$  多样性指数差异均不显著。各处理瘤胃液, 在门水平上广古菌门(Euryarchaeota)古菌, 在科水平上甲烷短杆菌科(Methanobacteriaceae)古菌, 在属水平上甲烷短杆菌属(*Methanobrevibacter*)古菌的相对丰度均接近 80%, 且随着饲料中 SeHLan 添加量增加, 相对丰度呈现先降低后升高的变化趋势。0.600 mg/kg 硒含量饲料处理的羯羊瘤胃液在门水平上广古菌门(Euryarchaeota)古菌, 在科水平上甲烷杆菌科(Methanobacteriaceae)古菌, 在属水平上甲烷短杆菌属(*Methanobrevibacter*)古菌, 相对丰度显著低于其他 3 个处理。综上所述, 饲料中添加 SeHLan 显著影响陕北白绒山羊羯羊瘤胃液古菌组成及结构, 0.600 mg/kg 硒含量饲料处理的羯羊瘤胃产甲烷菌丰度显著低于其他处理。

**关键词:** 高羊毛氨酸硒; 陕北白绒山羊羯羊; 高通量测序; 瘤胃; 古菌

**中图分类号:** S827.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2024)02-0331-11

## Effects of dietary supplementation with selenohomolanthionine on the structure and composition of rumen archaea in Shaanbei white cashmere wether goats

LI Tuo<sup>1,2</sup>, LI Long-ping<sup>1</sup>, QU Lei<sup>1</sup>

(1. Shaanxi Province Engineering & Technology Research Center of Cashmere Goat, Yulin University, Yulin 719000, China; 2. College of Life Sciences, Yulin University, Yulin 719000, China)

**Abstract:** In order to clarify the effects of different doses of selenohomolanthionine (SeHLan) on the structure and composition of rumen archaea in Shaanbei white cashmere wether goats, thirty-two Shaanbei white cashmere wether goats

收稿日期: 2022-12-27

基金项目: 榆林市科技局产学研项目(CXY-2022-54); 陕西省自然科学基金基础研究计划项目(2022JQ-187)

作者简介: 李 托(1986-), 女, 陕西礼泉人, 硕士, 讲师, 主要从事动物营养与健康养殖技术研究。(E-mail) lituo0105@126.com

通讯作者: 李陇平, (Tel) 13289129682; (E-mail) llp\_315@163.com

with consistent development were selected and divided into four groups randomly. They were fed diets with selenium contents of 0.016 mg/kg (CK), 0.300 mg/kg, 0.600 mg/kg and 1.200 mg/kg, respectively. After the 70-day feeding experiment, the rumen fluid of all the experimental wether goats was collected, DNA was extracted, and PCR amplification was performed using archaeal-specific prim-

ers. The archaeal V4-V5 region was subjected to high-throughput sequencing analysis, and the structure and composition of archaea in the rumen fluid of wethers were analyzed. The results showed that with the increase of SeHLan addition, the  $\alpha$  diversity index of rumen fluid archaea showed a trend of decreasing first and then increasing, but the difference of  $\alpha$  diversity index of rumen fluid archaea between treatments was not significant. The relative abundance of Euryarchaeota archaea at the phylum level, Methanobacteriaceae archaea at the family level and *Methanobrevibacter* archaea at the genus level in rumen fluid of each treatment was close to 80%, and with the increase of dietary SeHLan addition, the relative abundance showed a trend of decreasing first and then increasing. The relative abundance of Euryarchaeota archaea at the phylum level, Methanobacteriaceae archaea at the family level and *Methanobrevibacter* archaea at the genus level in rumen fluid of wether goats treated with 0.600 mg/kg selenium content diet was significantly lower than that of the other three treatments. In summary, the addition of SeHLan to the diet significantly affected the composition and structure of rumen fluid archaea in Shanbei white cashmere goats. The abundance of rumen methanogens in wethers treated with 0.600 mg/kg selenium content diet was significantly lower than that in other treatments.

**Key words:** selenohomolanthionine; Shaanbei white cashmere wether goats; high-throughput sequencing technology; rumen; archaea

陕北白绒山羊是中国陕西榆林和延安地区主要养殖羊品种,具有产绒量高和肉品质好等特点,仅榆林地区饲养量就达 $8.00 \times 10^5$ 只。但陕北白绒山羊饲养区属于严重缺硒地区,陕北白绒山羊体内硒含量也低于国际上公认的硒含量最低阈值(0.5 mg/kg),因此,需要在饲料中补充硒元素<sup>[1]</sup>。微量元素硒具有预防疾病、促进动物生长的重要作用<sup>[2-3]</sup>,饲料中补充硒能够改善反刍动物机体及瘤胃微生物抗氧化能力<sup>[4-6]</sup>。Cui 等<sup>[7]</sup>报道在饲料中添加酵母硒能够显著提高藏羊瘤胃液铵态氮( $\text{NH}_4\text{-N}$ )、总挥发性脂肪酸(TVFA)、乙酸盐、丁酸盐和丙酸盐浓度,显著影响瘤胃液细菌菌群结构及功能,促进碳水化合物和氨基酸代谢相关基因功能和代谢途径的表达和富集。Zhang 等<sup>[8]</sup>研究结果表明,饲料中补充硒酸钠不仅能提高瘤胃球菌、纤维杆菌等淀粉分解菌的丰度,还能促进纤维二糖酶、羧甲基纤维素酶、木聚糖酶和蛋白酶的活性。在硒对反刍动物温室气体排放的影响研究方面,Miltko 等<sup>[9]</sup>研究发现,饲料中添加硒酸盐(无机硒)能降低绵羊瘤胃液 $\text{CH}_4$ 和 $\text{CO}_2$ 浓度,而饲料中添加酵母硒(有机硒)会增加 $\text{CH}_4$ 和 $\text{CO}_2$ 浓度。Pan 等<sup>[10]</sup>报道,饲料中添加6  $\mu\text{g/kg}$ 硒能显著降低绵羊的 $\text{CH}_4$ 排放量。这些研究结果说明,饲料中添加的硒源类型(有机硒或无机硒)和添加量均会影响到反刍动物瘤胃的 $\text{CH}_4$ 排放。在硒对陕北白绒山羊生长影响方面,熊忙利<sup>[1]</sup>分析了亚硒酸钠对陕北白绒山羊羔羊断奶成活率的影响;马雄等<sup>[11]</sup>讨论了酵母硒对绒山羊生长和组织抗氧化的影响;李托等明确了高羊毛氨酸硒对陕北

白绒山羊生长和瘤胃细菌群落结构的影响<sup>[12-13]</sup>。目前,在硒对陕北白绒山羊瘤胃古菌群落结构和组成方面的研究还鲜见报道。由于瘤胃古菌群落结构不仅影响饲料利用率<sup>[14]</sup>,还对反刍动物的甲烷( $\text{CH}_4$ )排放有影响<sup>[15]</sup>,因此,有效调控瘤胃古菌结构对降低反刍动物甲烷排放、提高反刍动物饲料利用率具有重要意义。高羊毛氨酸硒(Selenohomolanthionine, SeHLan)是一种新型的水溶性有机硒<sup>[16]</sup>,在动物体内具有较高的生物利用率和沉积率<sup>[17-18]</sup>。本研究以6月龄陕北白绒山羊羯羊为对象,通过不同SeHLan添加水平的饲料对6月龄陕北白绒山羊羯羊瘤胃古菌群落组成和结构的影响分析,明确适宜的饲料硒添加水平,在提高羊肉硒含量的同时,减少白绒山羊瘤胃的甲烷排放,进而实现优质养殖和节能减排。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物

选取体质量相近的6月龄陕北白绒山羊羯羊32只,随机均分为4组。试验羊每天饲喂2次(08:00和17:00),自由饮水。

### 1.2 试验设计及样品采集

参照新版《肉羊营养需要量》(NY/T 816-2021)<sup>[19]</sup>中育肥山羊体质量25 kg、日增质量100 g营养需要配制基础饲料,加工为颗粒料。基础饲料的原料组成及营养水平如表1。基础饲料硒含量为0.016 mg/kg,在每1 kg基础饲料中分别添加71 mg、146 mg、296 mg的SeHLan[英联普美欣科技(江

西)有限公司产品,硒含量4 000 mg/kg,载体为麦芽糊精],得到硒含量分别为0.300 mg/kg、0.600 mg/kg和1.200 mg/kg的饲料。以不添加 SeHLan 的基础饲料(硒含量为0.016 mg/kg)为对照(CK),进行不同硒含量的饲料喂养试验,饲养70 d后,经过口腔采集所有试验羊瘤胃液<sup>[20]</sup>。

### 1.3 样品处理和高通量测序

采用CTAB法提取瘤胃液基因组,用Nano-Drop2000和1%琼脂糖凝胶电泳检测基因组DNA的纯度和浓度,使用古菌特异性引物Arch915F(5'-CAGCMGCCGCGGTAA-3')和Arch519R(5'-GT-GCTCCCCGCCAATTCCT-3'),PCR扩增古菌16S rRNA的V4-V5区。PCR扩增程序:95℃预变性3 min;95℃变性30 s、55℃退火30 s、72℃延伸30 s,30个循环;72℃延伸10 min。20.0 μl扩增体系:4.0 μl 5×Fast Pfu缓冲液,2.0 μl 2.5 mmol/L dNTPs,0.5 μl上游引物(5 μmol/L),0.5 μl下游引物(5 μmol/L),0.4 μl Fast Pfu聚合酶,1.0 ng DNA,11.6 μl H<sub>2</sub>O。扩增产物送北京诺禾致源生物科技有限公司用Illumina Novaseq 6000测序平台进行双端高通量测序。

### 1.4 测序数据分析

使用FLASH v1.2.7(<http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/>)<sup>[21]</sup>对测序后得到的初始数据进行拼接得到原始序列(Raw Tags);使用Fastp软件对Raw Tags进行过滤<sup>[22]</sup>,得到高质量序列(Clean Tags)。通过VSEARCH网站(<https://github.com/torognes/vsearch/>)<sup>[23]</sup>与物种注释数据库比对并去除嵌合体序列<sup>[24]</sup>,得到有效序列(Effective Tags),利用Uparse v7.0.1001软件(<http://www.drive5.com/uparse/>)<sup>[25]</sup>对有效序列进行聚类,以97%相似度聚类得到操作分类单元(Operational Taxonomic Unit, OTU),同时筛选OTU中出现频数最高的序列作为OTU的代表序列。设定阈值为0.8~1.0,使用Mothur方法与Silva132(<http://www.arb-silva.de/>)<sup>[26]</sup>的SSUrRNA古菌数据库<sup>[27]</sup>进行物种注释,统计各样本在门(Phylum)、科(Family)和属(Genus)分类水平上的群落组成。使用MUSCLE v3.8.31软件<sup>[28]</sup>(<http://www.drive5.com/muscle/>)进行多序列比对。利用Qiiime v1.9.1软件计算得到Observed-otus、Chao1、Shannon、Simpson、Ace、Goods-coverage和PD\_whole\_tree等α多样性指数。

利用R软件绘制稀释曲线、等级聚类曲线、物种累积曲线及物种丰度聚类图;利用最小显著差异法(LSD)和单因素方差分析(One-way ANOVA),进行不同处理α多样性指数的差异性分析;对于符合正态分布的物种丰度数据使用单因素方差分析(One-way ANOVA)及LSD法进行差异分析,对不符合正态分布的物种丰度数据使用Kruskal-Wallis检验进行差异分析。

表1 基础饲料组成及营养水平(以干物质计)

Table 1 Composition and nutrient levels of basal diet (dry matter)

项目	成分	含量
原料	苜蓿干草(%)	10.00
	玉米秸秆(%)	20.00
	燕麦草(%)	10.00
	花生秧(%)	10.00
	大豆秸秆(%)	10.00
	柠条(%)	10.00
	玉米(%)	6.00
	豆粕(%)	6.00
	棉籽粕(%)	11.00
	麸皮(%)	5.30
	食盐(%)	0.50
	磷酸氢钙(%)	0.20
	预混料 <sup>1)</sup> (%)	1.00
	合计(%)	100.00
营养成分 <sup>2)</sup>	代谢能(MJ/kg)	7.87
	粗蛋白质(%)	12.80
	粗脂肪(%)	1.74
	中性洗涤纤维(%)	49.90
	酸性洗涤纤维(%)	37.20
	钙(%)	1.15
	磷(%)	0.63
	硒(mg/kg)	0.016

<sup>1)</sup>预混料为每1 kg基础饲料提供:维生素A 1 800 IU,维生素D<sub>3</sub> 260 IU,维生素E 23.0 mg,锌(Zn) 30.0 mg,锰(Mn) 25.0 mg,铁(Fe) 50.0 mg,铜(Cu) 11.0 mg,钴(Co) 0.2 mg,碘(I) 1.0 mg。<sup>2)</sup>饲料代谢能是根据饲料原料组成以干物质为基础计算得到,为计算值。

## 2 结果与分析

### 2.1 测序数据处理和 OTU 分析

表2为各处理下不同样品测序数据。本试验共得到2 099 399条有效序列(Effective tags),平均每个样品含65 606条有效序列。4个处理共得到3 141个OTU,其中,4个处理的共享OTU数为1 036个,

0. 300 mg/kg 硒、0. 600 mg/kg 硒、1. 200 mg/kg 硒处理和 CK 独有的 OTU 数分别为 377 个、365 个、195 个和 280 个(图 1)。

2.2 不同处理对羊瘤胃液古菌多样性影响

2.2.1 α 多样性指数 表 3 为不同处理的羯羊瘤胃液古菌 α 多样性指数。从表中可以看出,随着饲料

中 SeHLan 添加量增加,羯羊瘤胃液古菌 Chao1、ACE、Observed\_otus、Shannon 和 Simpson 等多样性指数呈先增加后减少趋势,而 PD-whole-tree 指数呈现减少趋势,但不同处理间的多样性指数差异均不显著。

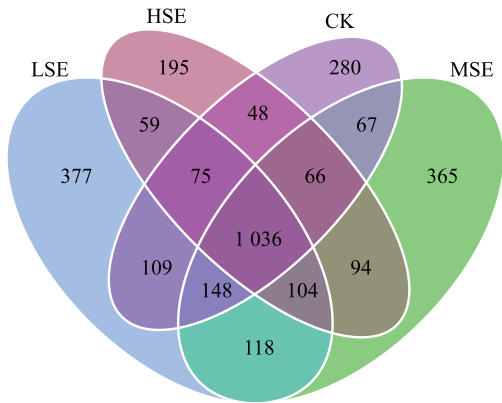
表 2 测序数据质量评估

Table 2 Sequencing data quality assessment

样品编号	初始序列 (条)	原始序列 (条)	高质量序列 (条)	有效序列 (条)	有效序列 碱基数 (nt)	有效序列 平均长度 (nt)	Q20 (%)	Q30 (%)	有效序列中 G+C 碱基 比例(%)	有效序列占 原始序列 比例(%)
LSE1	85 328	85 308	84 704	61 666	23 308 508	378	98.53	95.10	52.60	72.27
LSE2	88 950	88 657	87 633	68 869	26 469 904	384	98.22	94.36	52.30	77.42
LSE3	85 178	84 485	82 992	64 249	24 468 412	381	98.32	94.71	52.26	75.43
LSE4	85 606	84 339	83 733	61 264	23 320 305	381	98.42	94.89	52.79	71.57
LSE5	67 195	66 819	66 229	51 373	19 461 289	379	98.38	94.80	53.67	76.45
LSE6	86 635	86 094	85 032	62 016	23 743 492	383	98.34	94.67	52.41	71.58
LSE7	69 310	68 681	67 563	54 854	20 793 792	379	98.25	94.48	53.11	79.14
LSE8	85 333	84 906	84 069	62 032	23 539 790	379	98.34	94.69	52.78	72.69
MSE1	83 520	83 142	82 259	65 301	24 851 555	381	98.34	94.70	52.56	78.19
MSE2	86 676	86 633	85 755	79 109	30 277 375	383	98.13	94.10	52.52	91.27
MSE3	86 002	85 519	84 486	66 261	25 187 180	380	98.32	94.66	52.65	77.05
MSE4	88 468	88 442	87 801	81 853	31 135 435	380	98.37	94.75	52.72	92.52
MSE5	81 832	81 802	81 053	65 837	24 978 021	379	98.37	94.71	52.62	80.45
MSE6	87 930	87 261	86 018	66 853	25 404 941	380	98.33	94.68	53.90	76.03
MSE7	70 399	69 854	68 895	52 474	19 911 450	379	98.21	94.39	53.33	74.54
MSE8	78 392	78 316	77 822	59 562	22 567 655	379	98.31	94.62	53.92	75.98
HSE1	77 302	77 132	76 629	59 072	22 456 194	380	98.44	94.91	52.53	76.42
HSE2	84 614	83 976	82 452	62 283	23 839 440	383	98.06	93.96	52.06	73.61
HSE3	81 238	80 493	79 171	63 351	24 175 012	382	98.31	94.65	52.65	77.98
HSE4	93 887	93 151	91 716	85 105	32 568 333	383	98.21	94.38	52.89	90.65
HSE5	82 654	81 988	80 359	75 387	28 708 835	381	98.21	94.31	51.38	91.21
HSE6	95 345	95 269	94 318	80 260	30 473 912	380	98.42	94.89	52.78	84.18
HSE7	82 293	82 070	81 047	70 360	26 683 627	379	98.31	94.63	54.70	85.50
HSE8	90 930	90 862	89 993	83 821	31 999 650	382	98.26	94.43	52.69	92.18
CK1	78 030	77 285	75 877	61 950	23 748 148	383	98.28	94.61	52.72	79.39
CK2	84 512	83 931	82 844	64 663	24 716 159	382	98.14	94.16	52.04	76.51
CK3	84 819	84 512	83 863	67 421	25 686 450	381	98.38	94.82	52.55	79.49
CK4	66 909	66 211	65 190	49 883	18 983 068	381	98.31	94.65	52.65	74.55
CK5	83 602	83 145	82 100	62 468	23 791 601	381	98.40	94.83	52.28	74.72
CK6	85 081	84 644	83 652	62 573	23 864 656	381	98.29	94.54	53.31	73.55
CK7	82 064	81 552	80 673	62 326	23 595 930	379	98.42	94.97	53.91	75.95
CK8	88 835	88 070	86 933	64 903	24 699 537	381	98.34	94.74	52.64	73.06

LSE1~LSE8 为硒含量 0. 300 mg/kg 处理的样本 1~样本 8; MSE1~MSE8 为硒含量 0. 600 mg/kg 处理的样本 1~样本 8; HSE1~HSE8 为硒含量 1. 200 mg/kg 处理的样本 1~样本 8; CK1~CK8 为对照的样本 1~样本 8。





CK:对照;LSE:0.300 mg/kg硒;MSE:0.600 mg/kg硒;HSE:1.200 mg/kg硒。

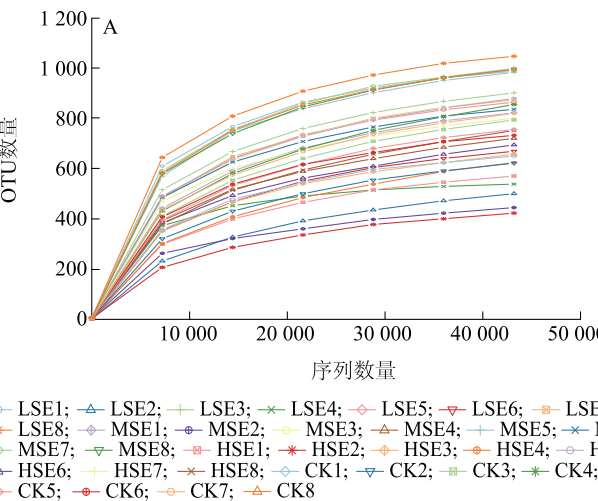
图1 不同处理下操作分类单元(OTU)维恩图

Fig.1 Venn diagram of operational taxonomic unit (OTU) under different treatments

表3 各处理的羊瘤胃液古菌α多样性指数

Table 3 The α diversity indices of archaea in rumen fluid of sheep under different treatments

指数	处理				标准 误差	P 值
	CK	0.300 mg/kg硒	0.600 mg/kg硒	1.200 mg/kg硒		
Chao1	928.160	936.950	875.780	818.390	35.410 0	0.665
ACE	916.490	964.500	890.940	831.170	31.460 0	0.513
PD_whole_tree	78.740	77.590	74.570	48.380	4.230 0	0.156
Observed_otus	776.130	832.880	795.880	673.880	29.750 0	0.308
Shannon	5.120	5.970	5.640	4.890	0.180 0	0.158
Simpson	0.888	0.941	0.883	0.885	0.015 0	0.505
Goods_coverage	0.996	0.997	0.996	0.996	0.000 2	0.276

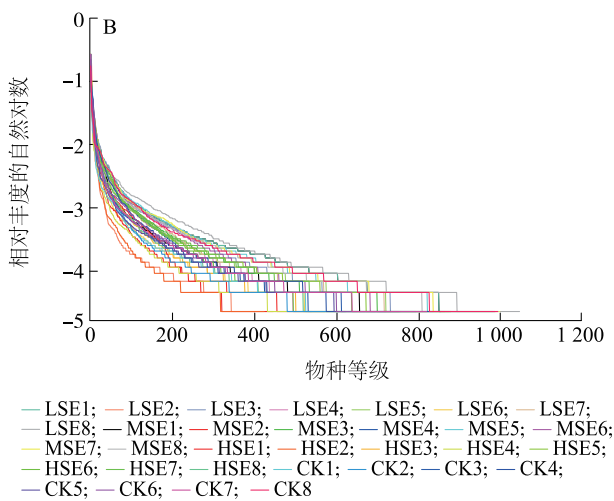


2.2.2 物种多样性曲线 随着测序数量的增加,各样品 OUT 的数量变化如图 2A 所示。从图中可以看出,在0~10 000个测序数量范围内,OUT 数增加迅速。当测序序列达到30 000后,稀释曲线逐渐平坦,说明此时测序数据已经涵盖绝大多数物种。各样本等级聚类曲线水平方向上宽度较大,垂直方向上曲线平滑,表明本研究各样本的物种丰富度和均匀度均较好(图 2B)。

2.2.3 物种累积箱形图 随测序样本量的增加,新物种出现的速率如图 3 所示。从图中可以看出,当测序样本量为1~25 个时,物种数增加较为快速。当测序样本量从 25 个增加到 32 个,测序所能得到的物种数量逐渐变得平缓,亦即随着样本量的不断增加,箱形图上升幅度越来越平缓,说明本研究抽样充分,用于分析的数据可靠性较高。

### 2.3 不同水平瘤胃液古菌物种组成

2.3.1 门水平 门水平上,瘤胃液的优势古菌主要是广古菌门(Euryarchaeota)古菌,不同处理其相对丰度平均值为79.390%。此外,泉古菌门(Crenarchaeota)古菌、奇古菌门(Thaumarchaeota)古菌和未分类菌门(Unidentified\_Archaea)古菌的相对丰度分别为0.069%、0.055%、0.064%。子囊菌门(Asgardaeota)古菌和纳米古菌门(Nanoarchaeaeota)古菌等的相对丰度均在0.010%以下(图 4A)。



A: 稀释曲线;B: 等级聚类曲线。LSE1~LSE8、MSE1~MSE8、HSE1~HSE8、CK1~CK8 见表 2 注。

图2 物种多样性曲线

Fig.2 Species diversity curve

2.3.2 科水平 科水平上瘤胃液主要的古菌为甲烷短杆菌科(Methanobacteriaceae)古菌,不同处理相对丰度均值达 80.980%。Nitrosopumilaceae、Methanomethylophilaceae、Unidentified\_Bathyarchaeia、P\_unidentified\_Archaea + F\_Methanobacteriaceae、Nitrososphaeraceae 等科古菌的平均相对丰度为 0.031%、0.033%、0.016%、0.018% 和 0.025% (图 4B)。而 Methanothermobacteraceae、Methanomassiliicoccaceae、P\_Euryarchaeota + F\_Methanomethylophilaceae 和 Unidentified\_Methanofastidiosales 等科古菌的平均相对丰度均低于 0.010%。

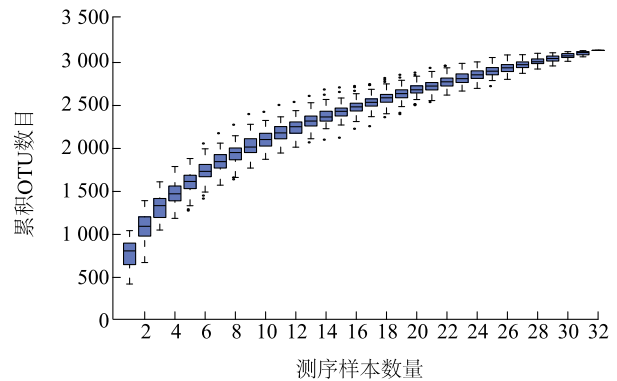
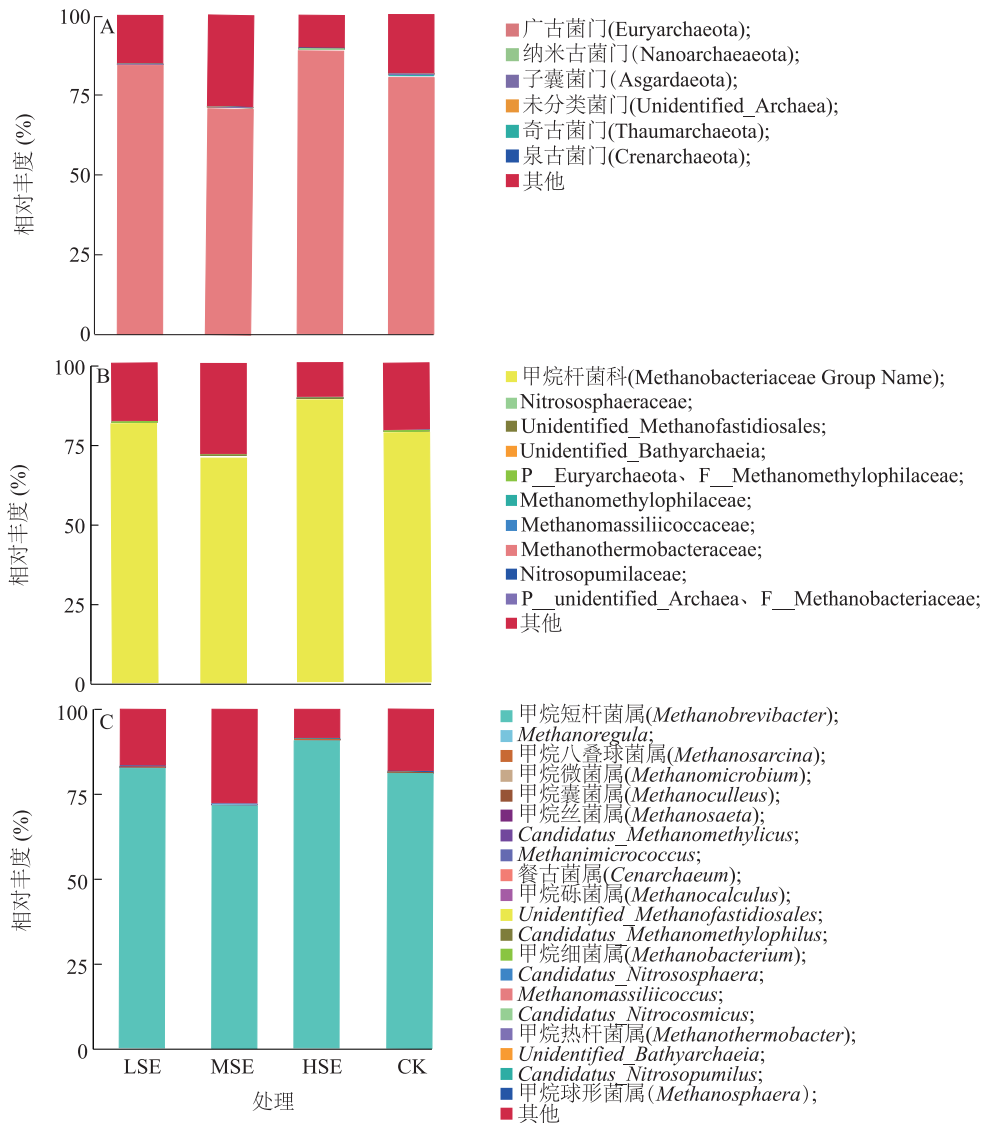


图3 物种累积箱形图

Fig.3 Species accumulation boxplot



A:门水平;B:科水平;C:属水平。CK、LSE、MSE、HSE 见图 1 注。

图4 不同硒含量饲料处理羯羊瘤胃液古菌在门、科和属水平上的组成

Fig.4 The composition of archaea in rumen fluid of wether goats treated with different selenium content feeds at phylum, family and genus levels

2.3.3 属水平 属水平上,不同处理甲烷短杆菌属 (*Methanobrevibacter*) 古菌的相对丰度最高,平均值为 81.79%。未注释其他古菌 (Others) 的相对丰度次之,均值为 17.43%。此外,甲烷球形菌属 (*Methanosphaera*) 和 *Candidatus\_Nitrosopumilus* 古菌的相对丰度均为 0.29%。而 *Unidentified\_Bathyarchaeia*、*Methanothermobacter*、*Candidatus\_Nitrocosmicus*、*Methanomassiliicoccus*、*Candidatus\_Nitrososphaera*、甲烷细菌属 (*Methanobacterium*)、*Candidatus\_Methanomethylophilus*、*unidentified\_Methanofastidiosales*、*Methanocalculus*、*Cenarchaeum*、*Methanimicrococcus*、*Candidatus\_Methanomethylicus*、*Methanosaeta*、*Methanoculleus*、*Methanomicrobium*、*Methanosarcina* 和 *Methanoregula* 等属古菌的平均相对丰度均低于 0.10% (图 4C)。

表 4 相对丰度存在显著差异的古菌

Table 4 Archaea with significant differences in relative abundance

分类等级	项目	相对丰度 (%)			
		CK	0.300 mg/kg 硒	0.600 mg/kg 硒	1.200 mg/kg 硒
门水平	广古菌门 (Euryarchaeota)	77.880 0a	79.430 0a	70.890 0b	89.410 0a
	泉古菌门 (Crenarchaeota)	0.040 0b	0.070 0b	0.140 0a	0.030 0b
	奇古菌门 (Thaumarchaeota)	0.010 0b	0.030 0b	0.150 0a	0.020 0b
	未分类古菌 (Unidentified_Archaea)	0.030 0b	0.160 0a	0.040 0b	0.020 0b
科水平	甲烷杆菌科 (Methanobacteriaceae)	79.980 0a	81.470 0a	70.930 0b	91.530 0a
	Nitrosopumilaceae	0.020 0a	0.010 0a	0.090 0a	0.000 9b
	P_unidentified_Archaea、F_Methanobacteriaceae	0.005 0b	0.060 0a	0.010 0a	0.000 3b
	Nitrososphaeraceae	0.002 0b	0.020 0a	0.060 0a	0.020 0a
	Methanothermobacteraceae	0.003 0b	0.020 0a	0.005 0b	0.002 0b
属水平	甲烷短杆菌属 ( <i>Methanobrevibacter</i> )	81.120 0a	82.510 0a	70.960 0b	92.590 0a
	<i>Candidatus_Nitrosopumilus</i>	0.020 0a	0.010 0a	0.090 0a	0.000 9b

同行数据后不同小写字母表示差异显著。

相对丰度排名前 6 的门和前 20 的属聚类后的热图如图 5 和图 6 所示。门水平上,0.300 mg/kg 硒处理和 1.200 mg/kg 硒处理的羯羊瘤胃液分别聚集了更多的未分类古菌 (Unidentified\_Archaea) 和广古菌门 (Euryarchaeota) 古菌;0.600 mg/kg 硒处理,聚集了较多的泉古菌门 (Crenarchaeota) 古菌、奇古菌门 (Thaumarchaeota) 古菌、子囊菌门 (Asgardaeota) 古菌和纳米古菌门 (Nanoarchaeaeota) 古菌。由图 6 可知,属水平上,0.300 mg/kg 硒处理的陕北白绒山羊瘤胃液中聚集了较多的甲烷

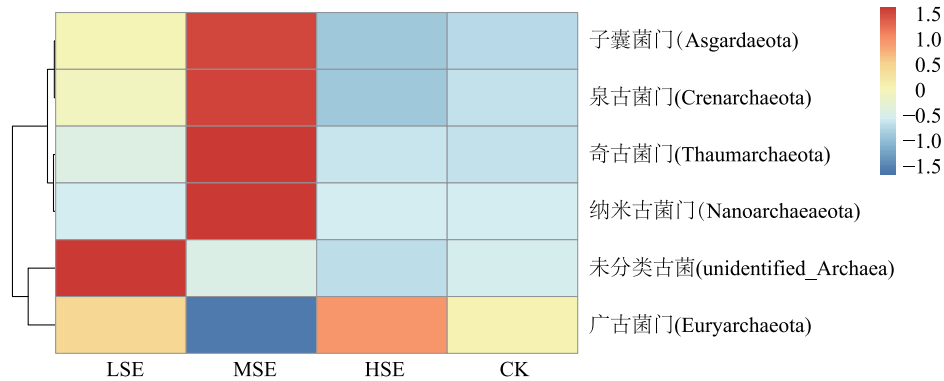
## 2.4 物种差异性分析

表 4 为不同分类水平上相对丰度存在显著差异的古菌。从表中可以看出,0.600 mg/kg 硒处理的广古菌门 (Euryarchaeota) 古菌、甲烷杆菌科 (Methanobacteriaceae) 和甲烷短杆菌属 (*Methanobrevibacter*) 古菌的相对丰度均显著低于其他 3 个处理;而泉古菌门 (Crenarchaeota) 古菌和奇古菌门 (Thaumarchaeota) 古菌的相对丰度均显著高于其他 3 个处理。0.300 mg/kg 硒处理的未分类古菌 (Unidentified\_Archaea) 和 Methanothermobacteraceae 科古菌的相对丰度显著高于其他 3 个处理;Nitrosopumilaceae 科古菌的相对丰度 1.200 mg/kg 硒处理显著低于其他 3 个处理;1.200 mg/kg 硒处理的 *Candidatus\_Nitrosopumilus* 属古菌的相对丰度显著低于其他 3 个处理。

砾菌属 (*Methanocalculus*)、甲烷热杆菌属 (*Methanothermobacter*)、*Methanimicrococcus*、甲烷囊菌属 (*Methanoculleus*)、甲烷细菌属 (*Methanobacterium*)、餐古菌属 (*Cenarchaeum*) 和 *Candidatus\_Methanomethylophilus* 等属古菌;0.600 mg/kg 硒处理,瘤胃液中聚集了较多 *Candidatus\_Nitrososphaera*、*Candidatus\_Nitrocosmicus*、*Unidentified\_Bathyarchaeia*、*Candidatus\_Nitrosopumilus*、*Unidentified\_Methanofastidiosales*、甲烷微菌属 (*Methanomicrobium*)、*Candidatus\_Methanomethylicus*、*Methanomassiliicoccus*、甲烷

八叠球菌属 (*Methanosarcina*) 和甲烷砾菌属 (*Methanocalculus*) 等属古菌; CK 聚集了较多的 *Methano-*

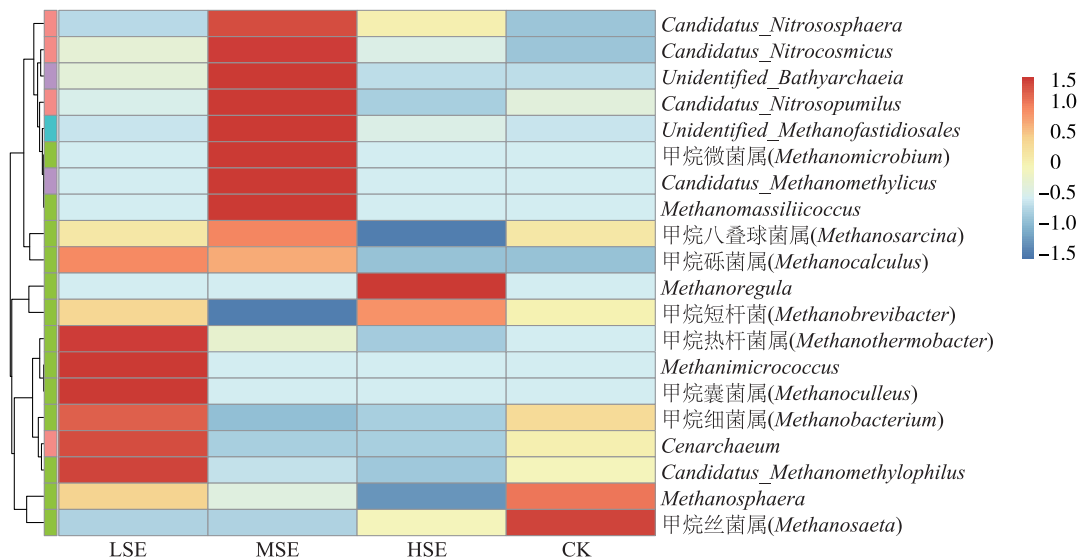
*sphaera* 和甲烷丝菌属 (*Methanosaeta*) 等属古菌。



CK、LSE、MSE、HSE 见图 1 注。

图 5 门水平物种丰度聚类图

Fig.5 Heatmap analysis of archaeal community at the phylum level



CK、LSE、MSE、HSE 见图 1 注。

图 6 属水平物种丰度聚类图

Fig.6 Heatmap analysis of archaeal community at the genus level

### 3 讨论

揭示瘤胃古菌群落结构是探寻反刍动物瘤胃甲烷减排方案的重要基础。以往关于反刍动物瘤胃古菌的研究主要利用核酸分子探针杂交技术<sup>[29-30]</sup>、16S rRNA 及基因克隆与序列分析技术<sup>[31-33]</sup>、限制性片段长度多态性 (RFLP) 分析技术<sup>[34-36]</sup>和变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 技术<sup>[37]</sup>等,

这些研究方法不仅费时耗力,而且很难对未知古菌进行检测,较难全面、细致反映反刍动物瘤胃古菌种群的实际情况,在数据信息通量、覆盖度和精确度等方面均存在不足,在一定程度上限制人们对反刍动物瘤胃古菌多样性及结构的全面和正确认识。目前,随着测序成本降低,高通量测序技术以其数据通量大、覆盖度广、精确度高等优点,被广泛应用于反刍动物瘤胃微生物组成



及功能分析。目前,虽有一些关于饲料中添加硒对瘤胃细菌菌群结构和组成影响的研究报道<sup>[7-8, 15]</sup>,但在饲料中添加硒对瘤胃古菌群落结构的相关研究方面还未见报道。本研究通过利用古菌特异性引物对古菌 V4-V5 区进行 PCR 扩增及高通量测序,分析饲料中添加不同水平 SeHLan 对生长期陕北白绒山羊瘤胃古菌群落结构与组成的变化,研究结果不仅加深了人们对饲料中添加硒对瘤胃古菌多样性和群落组成的了解,同时也为反刍动物甲烷减排提供参考。

瘤胃古菌是反刍动物产生甲烷的主要菌群<sup>[38]</sup>,而甲烷短杆菌是反刍动物瘤胃中数量最多的产甲烷菌<sup>[35, 39-40]</sup>。Richard 等<sup>[41]</sup>研究结果表明奶牛瘤胃液中古菌占瘤胃微生物总量的 2.29%<sup>[41]</sup>,且大部分的产甲烷菌属于广古菌门<sup>[42]</sup>。

目前,反刍动物瘤胃古菌多样性特征已有较多研究。不但瘤胃的不同部位具有不同的古菌优势群落<sup>[43]</sup>,动物类型<sup>[35, 40]</sup>、年龄<sup>[44]</sup>、季节<sup>[37]</sup>、生态环境和饲喂饲料<sup>[34-35, 37, 45]</sup>也均会影响反刍动物瘤胃古菌的结构与组成。由于微量元素硒具有改善反刍动物机体抗氧化、促进瘤胃微生物生长和代谢等功能<sup>[8]</sup>,一些学者初步开展了饲料中添加硒对反刍动物瘤胃微生物多样性的影响研究。但现有研究一般仅针对瘤胃细菌组成和结构,而对瘤胃古菌多样性特征缺乏分析。本试验利用瘤胃古菌特异性引物和瘤胃古菌专用数据库,分析了不同 SeHLan 添加水平的饲料对陕北白绒山羊瘤胃古菌群落结构和组成的影响,结果表明陕北白绒山羊瘤胃中优势古菌在门水平上为广古菌门古菌,在科水平上为甲烷杆菌科古菌,在属水平上为甲烷短杆菌属古菌,不同硒水平处理的相对丰度均接近 80%,低于山羊瘤胃液优势古菌的相对丰度(99%)<sup>[46-47]</sup>。已有研究结果表明饲料中添加硒的类型(有机硒和无机硒)对反刍动物瘤胃甲烷的产生具有不同的影响<sup>[9]</sup>。Pan 等<sup>[10]</sup>研究结果表明,不同硒添加水平的饲料对绵羊甲烷排放有显著影响,添加中等剂量的酵母硒能减少绵羊 3.5%~9.7%甲烷的排放。本研究发现,随着饲料中 SeHLan 添加水平的增加,优势古菌的相对丰度呈现先降低后升高的变化趋势,且 0.600 mg/kg 硒含量的饲料处理的优势古菌的相对丰度显著低于其他 3 个处理。这与 Pan 等<sup>[10]</sup>的研究结果一致。

硒对反刍动物瘤胃古菌的影响,可能是适量的硒能促进反刍动物瘤胃产甲烷菌的生长<sup>[48]</sup>,但具体的机制还有待于进一步研究。

## 4 结 论

本研究利用古菌特异性引物对古菌 V4-V5 区进行 PCR 扩增和高通量测序,分析了不同 SeHLan 添加水平饲料对 6 月龄陕北白绒山羊瘤胃古菌群落结构与组成的影响。结果表明,不同处理间古菌  $\alpha$  多样性指数差异不显著;随着饲料中 SeHLan 添加量增加,陕北白绒山羊瘤胃优势古菌的相对丰度呈现出先降低后升高的变化趋势。0.600 mg/kg 硒含量的饲料处理,在门水平广古菌门(Euryarchaeota)古菌,在科水平甲烷杆菌科(Methanobacteriaceae)古菌,在属水平甲烷短杆菌属(Methanobrevibacter)古菌的相对丰度均显著低于其他 3 个处理,说明该处理不仅能提高陕北白绒山羊硒含量,还可能降低瘤胃甲烷排放。

## 参考文献:

- [1] 熊忙利. 补硒对陕北白绒山羊羔羊断奶成活率的影响[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2010.
- [2] 刘阿云. 微量元素硒在羊生产中的应用的研究进展[J]. 动物营养学报,2019,31(1):78-81.
- [3] 白雪,李飞,李发弟,等. 硒在反刍动物中的营养作用和生产应用[J]. 动物营养学报,2021,33(4):1880-1890.
- [4] HEMINGWAY R G. The influences of dietary intakes and supplementation with selenium and vitamin E on reproduction diseases and reproductive efficiency in cattle and sheep[J]. Veterinary Research Communications,2003,27(2):159-174.
- [5] SHI L, XUN W, YUE W, et al. Effect of elemental nano-selenium on feed digestibility, rumen fermentation, and purine derivatives in sheep[J]. Animal Feed Science and Technology,2011,163:136-142.
- [6] 郭元晟,张敏. 有机硒对蒙古羊生长性能、抗氧化性能及免疫机能的影响[J]. 饲料工业,2015,36(13):41-45.
- [7] CUI X, WANG Z, TAN Y, et al. Selenium yeast dietary supplement affects rumen bacterial population dynamics and fermentation parameters of tibetan sheep (*Ovis aries*) in alpine meadow[J]. Frontiers in Microbiology,2021,12:663945.
- [8] ZHANG Z D, WANG C, DU H S, et al. Effects of sodium selenite and coated sodium selenite on lactation performance, total tract nutrient digestion and rumen fermentation in Holstein dairy cows[J]. Animal,2020,14:2091-2099.

- [9] MILTKO R, ROZBICKA-WIECZOREK J A, WIESZYK E, et al. The influence of different chemical forms of selenium added to the diet including carnosic acid, fish oil and rapeseed oil on the formation of volatile fatty acids and methane in the rumen, and fatty acid profiles in the rumen content and muscles of lambs[J]. *Acta Veterinaria-Beograd*, 2016, 3: 373-393.
- [10] PAN Y, WANG Y, LOU S, et al. Selenium supplementation improves nutrient intake and digestibility, and mitigates CH<sub>4</sub> emissions from sheep grazed on the mixed pasture of alfalfa and tall fescue[J]. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2021, 105: 611-620.
- [11] 马雄, 陈玉林. 日粮硒水平对4~6月龄绒山羊生长性能和组织抗氧化能力的影响[J]. *西北农业学报*, 2011, 20(2): 33-36.
- [12] 李托, 屈雷, 朱海鲸, 等. 高羊毛氨酸硒对陕北白绒山羊羯羊生长性能、血液指标、瘤胃发酵、营养物质表观消化率及氮代谢的影响[J]. *动物营养学报*, 2022, 34(12): 7909-7922.
- [13] LI L P, QU L, LI T. Supplemental dietary Selenohomolanthionine affects growth and rumen bacterial population of Shaanbei white cashmere wether goats[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 942848.
- [14] JOHNSON K A, JOHNSON D E. Methane emissions from cattle[J]. *Journal of Animal Science*, 1995, 73(8): 2483-2492.
- [15] MCGINN S M, FLESCH T K, HARPER L A, et al. An approach for measuring methane emissions from whole farms[J]. *Journal of Environmental Quality*, 2006, 35(1): 14-20.
- [16] 郑谋凤. 高羊毛氨酸硒对幼犬机体抗氧化功能和免疫应答的影响[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2021.
- [17] 张晋辉. 高羊毛氨酸硒提高鸡肉和鸡蛋中硒含量的研究[J]. *广东饲料*, 2016, 25(8): 29-30.
- [18] 张晋辉. 高羊毛氨酸硒提高猪肌肉中硒沉积[J]. *广东饲料*, 2016, 25(7): 52.
- [19] 刁其玉, 马涛, 邓凯东, 等. 肉羊营养需要量: NY/T 816-2021[S]. 北京: 中华人民共和国农业农村部, 2021.
- [20] SHEN J S, CHAI Z, SONG L J, et al. Insertion depth of oral stomach tubes may affect the fermentation parameters of ruminal fluid collected in dairy cows[J]. *Journal of Dairy Science*, 2012, 95: 5978-5984.
- [21] MAGOC T, SALZBERG S L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [22] 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.
- [23] ROGNES T, FLOURI T, NICHOLS B, et al. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics[J]. *PeerJ*, 2016, 4: e2584.
- [24] HAAS B J, GEVERS D, EARL A M, et al. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons[J]. *Genome Research*, 2011, 21(3): 494-504.
- [25] EDGAR R C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 996-998.
- [26] WANG Q, GARRITY G M, TIEDJE J M, et al. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(16): 5261-5267.
- [27] QUAST C, PRUESSE E, YILMAZ P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools[J]. *Nucl Acids Res*, 2013, 41: D590-D596.
- [28] EDGAR R C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput[J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(5): 1792-1797.
- [29] SOLIVA C R, HINDRICHSEN I K, MEILE L, et al. Effects of mixtures of lauric and myristic acid on rumen methanogens and methanogenesis *in vitro* [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2003, 37(1): 35-39.
- [30] SOLIVA C R, MEILE L, HINDRICHSEN I K, et al. Myristic acid supports the immediate inhibitory effect of lauric acid on ruminal methanogens and methane release[J]. *Anaerobe*, 2004, 10(5): 269-276.
- [31] 裴彩霞. 晋南牛和山羊瘤胃产甲烷菌多样性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2008.
- [32] 刘开朗, 王加启, 卜登攀, 等. 瘤胃古菌的多样性研究进展[J]. *中国农业大学学报*, 2010, 15(4): 65-70.
- [33] 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.
- [34] WRIGHT A D, TOOVEY A F, PIMM C L. Molecular identification of methanogenic archaea from sheep in Queensland, Australia reveal more uncultured novel archaea[J]. *Anaerobe*, 2006, 12(3): 134-139.
- [35] WRIGHT A D, AUCLAND C H, LYNN D H. Molecular diversity of methanogens in feedlot cattle from Ontario and Prince Edward island, Canada[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(13): 4206-4210.
- [36] 成艳芬, 毛胜勇, 裴彩霞, 等. 共存于厌氧真菌分离培养液中瘤胃甲烷菌的检测及其多样性分析[J]. *微生物学报*, 2006, 46(6): 879-883.
- [37] 谈瑞芳, 张海涛, 丁学智, 等. 藏系绵羊瘤胃古菌季节动态分析[J]. *甘肃农业大学学报*, 2012, 47(2): 12-16, 20.
- [38] KUMAR S, INDUGU N, VECCHIARELLI B, et al. Associative patterns among anaerobic fungi, methanogenic archaea, and bacterial communities in response to changes in diet and age in the rumen of dairy cows[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 781.

- [39] WHITFORD M F, TEATHER R M, FORSTER R J. Phylogenetic analysis of methanogens from the bovine rumen[J]. *BMC Microbiology*, 2001, 1: 5.
- [40] LI L P, PENG K L, XUE M Y, et al. An age effect of rumen microbiome in dairy buffaloes revealed by metagenomics[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(8): 1491.
- [41] RICHARD S, ZIEMER C J, STERN M D, et al. Taxon-specific associations between protozoal and methanogen populations in the rumen and a model rumen system[J]. *Fems Microbiology Ecology*, 1998, 26(1): 71-78.
- [42] WRIGHT A D, MA X, OBISPO N E. Methanobrevibacter phylotypes are the dominant methanogens in sheep from Venezuela[J]. *Microbial Ecology*, 2008, 56(2): 390-394.
- [43] SHIN E C, CHOI B R, LIM W J, et al. Phylogenetic analysis of archaea in three fractions of cow rumen based on the 16S rDNA sequence[J]. *Anaerobe*, 2004, 10(6): 313-319.
- [44] SKILLMAN L C, EVANS P N, NAYLOR G E, et al. 16S ribosomal DNA-directed PCR primers for ruminal methanogens and identification of methanogens colonising young lambs[J]. *Anaerobe*, 2004, 10(5): 277-285.
- [45] KIYOSHI T, TAKAFUMI N, HIROLI M, 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 Microbiol Lett*, 2001, 200(1): 67-72.
- [46] 王禄禄. 饲料 NDF 水平对山羊营养物质表观消化率及瘤胃细菌和古菌结构与组成的影响研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2017.
- [47] 张雪娇, 王立志, 王之盛, 等. 饲料 NDF 水平对山羊营养物质表观消化率及瘤胃古菌结构与组成的影响研究[J]. *四川农业大学学报*, 2018, 36(4): 542-548.
- [48] PELCHEN A, PETERS K J. Methane emissions from sheep[J]. *Small Ruminant Research*, 1998, 27(2): 137-150.

(责任编辑:石春林)