

亮氨酸对早期断奶湖羊瘤胃发育及细菌菌群的影响

孙施杰, 王翀, 茅慧玲*

(浙江农林大学动物科技学院, 浙江临安 311300)

摘要: 本试验旨在研究日粮中添加亮氨酸对早期断奶湖羊瘤胃发育及瘤胃细菌菌群组成的影响。选用36只5日龄的湖羊羔羊, 依据体重相近原则随机分成对照组(C, 0 g/d)、亮氨酸低剂量添加组(L, 0.66 g/d)和高剂量添加组(H, 1.33 g/d), 每组4个重复, 每个重复3只羔羊。于30日龄断奶当天每组每个重复取1只羔羊屠宰以获得瘤胃组织及内容物样品(n=4)。结果表明: H组瘤胃乳头的长度较C组显著增加(线性, $P<0.01$); 添加亮氨酸可使瘤胃挥发性脂肪酸水平显著提高(二次, $P=0.05$), 但并未改变乙酸、丙酸和丁酸的摩尔比例($P>0.05$); 与C组相比, L与H组的瘤胃氨态氮浓度均显著降低(线性, $P<0.05$; 二次, $P>0.05$); L组羔羊瘤胃内容物中微生物蛋白含量显著高于C组(二次, $P=0.05$); 亮氨酸的添加并未改变瘤胃细菌物种丰富度和多样性指数, 但对菌群组成有一定影响; L组瘤胃内最多的是厚壁菌门(49.5%); H组拟杆菌门(51.4%)显著高于L和C组(二次, $P=0.05$); H组的普雷沃氏菌属最多(线性, $P>0.05$; 二次, $P>0.05$), 而L组的巨型球菌属最多(二次, $P<0.01$); 与C组相比, L组的双歧杆菌属(二次, $P<0.05$)和光茵菌属显著增加(二次, $P<0.05$)。由此可见, 添加亮氨酸可促进羔羊瘤胃发育, 改变瘤胃细菌菌群组成。

关键词: 亮氨酸; 早期断奶; 湖羊羔羊; 瘤胃发育; 瘤胃细菌

中图分类号: S827.5

文献标识码: A

DOI 编号: 10.19556/j.0258-7033.2019-03-066

早期断奶可促进羔羊瘤胃发育、满足补偿性生长以及提高母羊的繁殖率等^[1-2]。然而早期断奶时羔羊易出现“应激综合征”, 尤其是胃肠道的氧化应激会使羔羊出现“生长性休克”或负增长, 导致成活率和育成率降低。亮氨酸作为动物的必需氨基酸, 除参与哺乳动物蛋白质合成和骨骼肌蛋白质周转调节、肠道发育调节外^[3-5], 还是一种有效的抗氧化物质, 可以有效缓解氧化应激, 维持机体抗氧化系统的平衡^[6]。胡军等^[7]研究报道, 添加亮氨酸可以降低早期断奶仔猪肠道的活性氧水平。因此推测, 新生羔羊补饲亮氨酸可促进瘤胃的早期发育,

促进瘤胃微生物区系的建立, 减缓早期断奶应激引起的氧化损伤, 从而提高生产性能。本研究利用高通量测序技术探讨亮氨酸对早期断奶湖羊羔羊瘤胃细菌菌群组成以及瘤胃发酵的影响, 从瘤胃微生物角度研究亮氨酸对瘤胃发育影响的可能机制。

1 材料与方法

1.1 试验设计 选取出生5 d健康无疾病的湖羊羔羊36只, 根据体重、出生日期相同或相近的原则, 按照亮氨酸的添加量不同随机分为对照组(C, 0 g/d)、低剂量添加组(L, 0.66 g/d)和高剂量添加组(H, 1.33 g/d), 每组4个重复, 每个重复3只羔羊。羔羊饲喂代乳粉, 每天饲喂3次, 自由采食; 经5 d适应环境和代乳粉后, 于10日龄开始正式试验, 饲喂代乳粉的同时补喂开食料及羊草。代乳粉的饲喂量为每天780 mL/只(根据适应期代乳粉的采食量确定), 为促进开食料和羊草的采食, 代乳粉每天减少30 mL/只至210 mL/只时, 维持

收稿日期: 2018-08-16; 修回日期: 2018-09-25

资助项目: 浙江省公益性技术研究(2015C32031); 杨胜先生门生社群项目(C201642); 浙江农林大学学生科研训练项目(2013200008)

作者简介: 孙施杰(1997-), 男, 浙江湖州人, 本科生, 从事反刍动物营养研究, E-mail: 1176460572@qq.com

*通讯作者: 茅慧玲, 助理研究员, E-mail: hlmao1983@163.com

此饲喂量不变直至30日龄断奶。亮氨酸溶解在70 mL代乳粉中,于每天晨饲时通过灌喂的方式添加1次。

羔羊在30日龄断奶当天,根据平均体重和平均日采食量每个重复取1只羔羊进行屠宰。在瘤胃倾腹囊的中心采集1 m³左右的瘤胃组织样品,保存在30%的福尔马林溶液中。瘤胃内容物部分保存于-20℃,用于测定瘤胃发酵参数,另一部分保存于-80℃,用于提取DNA,测定瘤胃细菌的多样性。

表1 代乳粉、开食料及羊草营养成分^① %

项目	代乳粉	开食料 ^②	羊草
干物质	93.2	91.4	92.9
粗蛋白质	23.9	17.4	8.49
粗脂肪	13.1	6.7	31.8
粗灰分	6.07	7.30	5.99
钙	0.85	1.21	0.24
磷	0.61	0.59	0.10

注:①开食料及羊草的营养成分均为实测值;②开食料的组成:玉米、小麦次粉、豆粕、棉籽粕、碳酸氢钙、石粉、食盐、硫酸铜、硫酸亚铁、硫酸锌、硫酸锰、赖氨酸、蛋氨酸、酶制剂、维生素A/维生素E、维生素D₃。

1.2 试验日粮 试验日粮由代乳粉、开食料(杭州思我特农业科技有限公司)和羊草组成,其营养成分见表1。

1.3 测定指标及方法

1.3.1 瘤胃组织形态 瘤胃组织样品采用酒精脱水(50%、70%、80%、95%、100%酒精脱水30 min,100%酒精脱水15 min),脱水后组织转移至二甲苯透明2 h后石蜡包埋,切成5 μm厚的切片,进行苏木精-伊红染色法。光学显微镜(Leica,美国)下的每张切片随机选10个典型视野,使用Motic Image Plus 2.0软件(厦门,中国)测定瘤胃乳头长度和宽度。

1.3.2 瘤胃发酵参数 挥发性脂肪酸(VFA):采用气相色谱法测定瘤胃内容物VFA浓度。取约2 g瘤胃内容物置于10 mL无菌PBS中震荡悬浮洗涤,13 000×g 4℃离心15 min,取上清液,每1 mL VFA样品中加入20 μL 85%~90%正磷酸,按照上述方法再次离心,取上清液,采用气相色谱(GC-8A;岛津公司,京都,日本)测定乙酸、丙酸和丁酸的浓度,进样量为2 μL,注射器/检测器的温度为260℃,柱温为220℃,载气为高纯氮^[8]。

氨态氮(NH₃-N)浓度:取约2 g瘤胃内容物置于10 mL无菌PBS中震荡悬浮洗涤,取5 mL于3 500~4 000 r/min离心10 min,取上清,采用冯宗慈等^[9]方法,使用氯化铵作为标准品,用酶标仪测定700 nm波长条

件下上清中NH₃-N浓度。

微生物蛋白:取约2 g瘤胃内容物置于10 mL无菌PBS中震荡悬浮洗涤,取8 mL,4℃ 20 000×g离心20 min,去上清。采用嘌呤法,以酵母RNA作为标准品,使用紫外分光光度计(Beckman,DU 640)测定在260 nm波长条件下微生物蛋白含量。

1.3.3 瘤胃细菌多样性

1.3.3.1 DNA提取 参照Gagen等^[10]的珠磨法提取DNA。所有DNA样品用Qubit2.0(Invitrogen)测定浓度。1.3.3.2 细菌16S rRNA基因序列扩增 16S rRNA基因序列扩增采用341F/806R通用引物^[11]:上游为5'-ACTCCTACGGGRSGCAGCAG-3';下游为5'-GGACTACVVGTTA TCTAATC-3'。为区分每个不同的样本,在通用引物的上游序列中随机添加8个核苷酸碱基的序列标签,即Barcoded-tag,形成Barcoded融合引物。PCR反应条件:95℃预变性5 min;95℃变性40 s,55℃退火40 s,72℃延伸1 min,共30循环;72℃延伸7 min。

1.3.3.3 Illumina HiSeq 测序及下机数据分析 Illumina-HiSeq测序及数据分析委托上海锐翌生物科技有限公司完成。测序后首先对原始数据拼接(PANDAseq软件)和质控(去除平均质量低于20的reads,去除reads含N碱基数超过3个的reads)得到Clean reads;采用Usearch软件在97%相似度下进行聚类以及嵌合体过滤从而得到OTU;对每个样品的Reads进行随机抽平处理,并提取对应的OTU序列;采用Qiime软件做Alpha多样性指数的稀释曲线,根据稀释曲线选择合理的抽平参数;从Qiime软件分析抽平后的OTU中分别提取1条Read作为代表序列,使用RDP方法,将该代表序列与16S数据库比对,对每个OTU进行物种分类;归类后,根据每个OTU中序列的条数,得到OTU丰度表,最后根据该OTU丰度表进行后续分析。微生物各门属和OTU需在每个处理组的至少3只羔羊中出现。1.4 统计分析 用SAS 8.0统计软件对数据进行单因素方差分析,正交多项式比较不同水平亮氨酸的作用(线性或二次),差异显著时用Duncan's作多重比较。以P≤0.01表示为差异极显著,P≤0.05表示为差异显著,以0.05<P≤0.10表示差异有趋势。

2 结果与分析

2.1 添加亮氨酸对羔羊瘤胃组织形态的影响 由图1可

见，日粮添加亮氨酸可以增加羔羊瘤胃乳头的长度。由表 2 可见，瘤胃乳头长度随着亮氨酸添加量的增加而增加，且在 C 组与 H 组达显著水平（线性， $P < 0.01$ ）；添加亮氨酸可使瘤胃乳头宽度有增加趋势，但 3 组间无显著差异（线性， $P > 0.05$ ）。

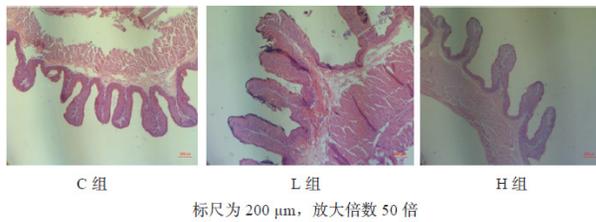


图 1 瘤胃组织切片

2.2 添加亮氨酸对羔羊瘤胃发酵参数的影响 由表 2 可见，亮氨酸可使瘤胃总挥发性脂肪酸（TVFA）水平显著提高（二次， $P = 0.05$ ），但未改变乙酸、丙酸和丁酸的摩尔比例（ $P > 0.05$ ）。与 C 组相比，L 与 H 组的瘤胃 $\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度均显著降低（线性， $P < 0.05$ ；二次， $P > 0.05$ ），分别降低 43.0% 和 36.7%，且 L 组羔羊瘤胃内容物中微生物蛋白浓度显著高于 C 组（二次， $P = 0.05$ ）。

2.3 添加亮氨酸对羔羊瘤胃微生物多样性的影响

表 2 添加亮氨酸对羔羊瘤胃组织发育及发酵参数的影响

项目	处理			标准误	P 值	
	C 组	L 组	H 组		线性	二次
瘤胃乳头长度, μm	534 ^b	733 ^{ab}	968 ^a	66.7	0.009	0.857
瘤胃乳头宽度, μm	249	346	371	25.1	0.064	0.422
TVFA, mmol/L	4.71 ^b	11.0 ^a	8.04 ^{ab}	1.16	0.110	0.050
乙酸, %	50.8	56.6	58.6	3.00	0.182	0.675
丙酸, %	47.7	41.8	39.7	2.91	0.165	0.663
丁酸, %	1.55	1.63	1.68	0.168	0.663	0.940
$\text{NH}_3\text{-N}$, mg/L	8.58 ^a	4.89 ^b	5.43 ^b	0.730	0.047	0.091
微生物蛋白, mg/mL	17.4 ^b	23.4 ^a	18.0 ^b	0.79	0.458	0.011

注：同行数据肩标不同字母表示差异显著（ $P < 0.05$ ），相同字母或无字母表示差异不显著（ $P > 0.05$ ）。下表同

2.3.1 微生物多样性分析 下机序列经拼接、优化、质控后共得到 566 213 条优质序列，平均每个样品 47 184 条（ $\pm 4 391$ 条）。共获得 343 个 OTU，平均每个样品 148 个（ ± 22 个）。样品稀释曲线如图 2 所示，Good's coverage 在 0.99 以上，因此，本试验测序深度能够准确反映湖羊瘤胃微生物组成。

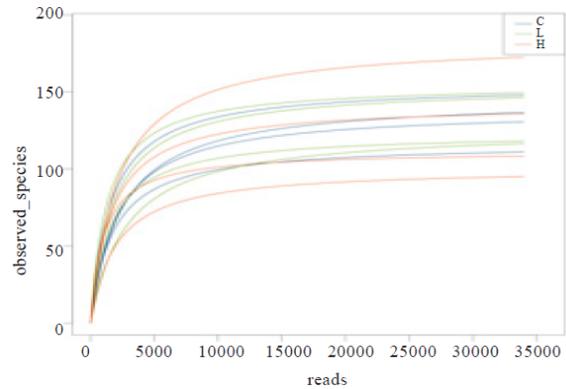


图 2 瘤胃内容物细菌 16SrRNA 基因序列的稀释曲线

由表 3 可见，3 组羔羊瘤胃内容物的 OTU 个数、Shannon 指数和 Simpson 指数均差异不显著（ $P > 0.05$ ）。

由图 3 可见，3 组 OTU 数共有 164 个，C、L 和 H 组特有的 OTU 数分别为 24、29、43 个。

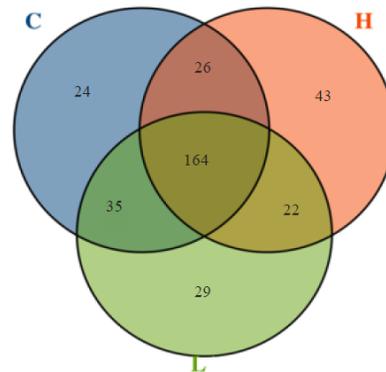


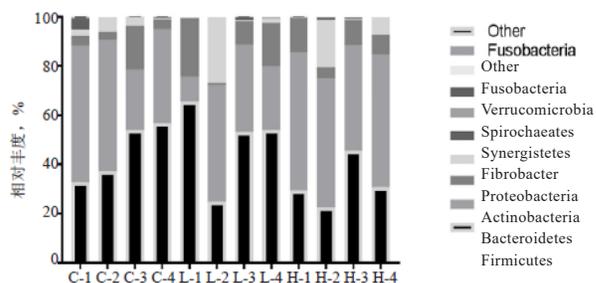
图 3 羔羊瘤胃细菌群落共享和独有的 OTU 的 Venn 分析

2.3.2 添加亮氨酸对羔羊瘤胃物种分类的影响 瘤胃细

表 3 97% 相似性水平下物种丰富度和多样性指数

项目	处理			标准误	P 值	
	C 组	L 组	H 组		线性	二次
OTU 数	149 \pm 15	150 \pm 19	144 \pm 36	12.7	0.809	0.828
Chao 1 指数	182 \pm 15	190 \pm 15	170 \pm 27	10.1	0.495	0.366
Shannon 指数	4.35 \pm 0.18	4.44 \pm 0.60	4.51 \pm 0.51	0.234	0.640	0.975
Simpson 指数	0.91 \pm 0.02	0.91 \pm 0.04	0.91 \pm 0.04	0.017	0.756	0.820

菌门分类图显示(图4), 瘤胃内细菌主要归于厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线菌门(Actinobacteria)和变形菌门(Proteobacteria)四大类。3个处理组瘤胃内微生物种类存在差异(表4), L组瘤胃内最多的是厚壁菌门(49.5%), H组拟杆菌门(51.4%)显著高于L、C组(二次, $P=0.05$)。



纤维杆菌门(Fibrobacter)、互养菌门(Synergistetes)、螺旋体门(Spirochaetes)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、梭杆菌门(Fusobacteria)、其他(Other)

图4 瘤胃内容物细菌门分类图

表4 羔羊瘤胃内容物中微生物门水平(>0.1%)相对丰度

项目	处理			标准误差	P 值	
	C 组	L 组	H 组		线性	二次
厚壁菌门	45.2	49.5	32.2	6.71	0.202	0.220
拟杆菌门	43.0 ^{ab}	29.8 ^b	51.4 ^a	6.44	0.381	0.050
放线菌门	7.13	12.80	9.09	3.74	0.721	0.329
变形菌门	3.92	0.95	2.65	1.21	0.544	0.221
纤维杆菌门	1.10	0.38	0.27	0.67	0.404	0.713
互养菌门	0.17	0.05	0.07	0.05	0.174	0.253

由表5可知, 各组均以普雷沃氏菌属、欧陆森氏菌属、小杆菌属和瘤胃球菌属为优势菌属, 且普雷沃氏菌占比比例最多。H组的普雷沃氏菌属最多, 达41.4%; 与C组相比, L组的双歧杆菌属(二次, $P<0.05$)、光岗菌属(二次, $P<0.05$)和巨型球菌属显著增加(二次, $P<0.01$); 梭菌属随着亮氨酸的添加而降低, 且在C组与H组达显著水平(线性, $P<0.05$)。各组间欧陆森氏菌属、拟杆菌属、纤维杆菌属、小杆菌属、瘤胃球菌属、琥珀酸菌属等相对含量无显著差异($P>0.05$)。

3 讨论

瘤胃上皮约有25万个瘤胃乳头, 可使黏膜表面积扩大6~7倍, 从而通过增加瘤胃上皮与瘤胃内容物的接触面积来增加瘤胃上皮对营养物质的吸收和离子转运^[12]。因此可通过瘤胃乳头的发育状况(长度和宽度)

表5 羔羊瘤胃内容物中微生物属水平(>0.1%)相对丰度

项目	处理			标准误差	P 值	
	C 组	L 组	H 组		线性	二次
放线菌门						
双歧杆菌属	0.04 ^b	2.33 ^a	1.51 ^{ab}	0.614	0.125	0.049
欧陆森氏菌属	6.76	9.76	7.20	3.122	0.923	0.485
拟杆菌门						
普雷沃氏菌属	24.5 ^{ab}	19.4 ^b	41.4 ^a	5.89	0.073	0.093
拟杆菌属	0.77	0.45	0.71	0.317	0.880	0.474
纤维杆菌门						
纤维杆菌属	1.10	0.38	0.27	0.326	0.106	0.457
厚壁菌门						
小杆菌属	7.87	4.40	7.21	2.998	0.879	0.414
瘤胃球菌属	2.50	4.31	3.97	3.455	0.770	0.803
光岗属	1.83 ^b	5.13 ^a	0.46 ^b	1.024	0.369	0.011
梭菌属	4.35 ^a	1.71 ^{ab}	0.004 ^b	1.232	0.034	0.764
琥珀酸菌属	1.87	1.77	1.02	1.492	0.697	0.864
巨型球菌属	1.24 ^b	2.33 ^a	0.70 ^b	0.219	0.113	0.0007
月形单胞菌属	0.96	2.25	0.61	0.627	0.702	0.090
氨基酸球菌属	0.88	0.76	0.70	0.301	0.683	0.941
氏菌属	0.16	0.05	0.99	0.479	0.252	0.393
真菌属	0.49	0.43	0.24	0.196	0.389	0.794
变形菌门						
琥珀酸弧菌属	0.55	0.33	0.05	0.260	0.207	0.921
互养菌门						
锥形杆菌属	0.15	0.04	0.07	0.044	0.268	0.238

来衡量瘤胃发育状况^[13], 而瘤胃微生物发酵固体饲料产生的VFA是刺激瘤胃乳头发育的主要原因^[14]。本研究显示, 添加亮氨酸虽然对乙酸、丙酸和丁酸的摩尔比没有影响, 但可显著增加TVFA浓度, 这部分结果与添加亮氨酸增加瘤胃乳头长度的结果较为一致。亮氨酸增加TVFA的主要原因与开食料采食量(123 g/d vs 131 g/d vs 95.2 g/d, 未发表数据)的变化有关。另一方面, L组羔羊消化道和瘤胃的重量与C组相比分别提高47.4%和38.6%(未发表数据), 表明添加适量亮氨酸可促进羔羊消化道和瘤胃的发育, 有利于营养吸收。

瘤胃液中的NH₃-N是瘤胃氮代谢过程中内源含氮物质和外源蛋白质降解的重要产物, 同时也是瘤胃微生物合成微生物蛋白的主要原料。一般情况下, 瘤胃NH₃-N水平呈现一个动态平衡状态, 但影响瘤胃NH₃-N浓度的因素较多, 主要包括饲料蛋白的降解程度、氮的摄入量、瘤胃对NH₃-N的吸收以及瘤胃微生物合成微生物蛋白的速度。本研究发现, 添加亮氨酸可以降低

瘤胃 NH₃-N 浓度, 增加瘤胃微生物蛋白含量。推测可能的原因是亮氨酸作为一种氨基酸可以促进瘤胃内蛋白分解菌的生长, 从而提高瘤胃细菌对含氮物质的降解, 提高菌体蛋白合成的底物水平, 最终增加瘤胃微生物蛋白的含量。后续可通过测定瘤胃蛋白分解菌的变化验证这一推论。

肠道菌群主要由厚壁菌门(35%~80%)和拟杆菌门(17%~60%)构成^[15]。本试验中厚壁菌门和拟杆菌门是各组羔羊瘤胃细菌丰度最高的菌群, 与前人的研究结果较为一致。普雷沃氏菌属是瘤胃内容物中丰度最高的菌属^[16], 该菌属是含有丰富高效的水解淀粉和蛋白质的菌种^[17]。双歧杆菌属是糖类分解菌^[18], 尤其在饲喂高淀粉日粮的瘤胃中大量存在。因此, 普雷沃氏菌属和双歧杆菌属相对丰度变化受采食量的影响较大, 然而L组普雷沃氏菌属丰度较H组显著降低, 这一结果与固体开食料采食量呈相反趋势, 说明在本试验中亮氨酸对普雷沃氏菌属丰度的影响并非取决于饲料的摄入量, 具体的作用机理有待进一步研究。巨型球菌属中的埃氏巨型球菌是瘤胃中提供支链VFA的重要来源^[19]。有研究发现, 在新生奶牛日粮中补饲埃氏巨型球菌NCIMB41125能够提高犊牛的生长性能, 增加瘤胃内丁酸浓度、瘤胃上皮乳头宽度和密度, 表明埃氏巨型球菌NCIMB41125能够通过促进瘤胃代谢、增加代谢产物的吸收来促进瘤胃的发育^[20]。因此, 瘤胃埃氏球菌属相对丰度的增加在瘤胃发育中可能起重要作用。光岗菌属具有很强的发酵碳水化合物化合物的能力^[21], 其终产物是乙酸和琥珀酸。添加低剂量的亮氨酸可以增加该菌属的丰度, 但是高剂量反而没有显著影响, 原因还有待进一步研究。

4 结论

本试验中, 灌喂亮氨酸对早期断奶羔羊的瘤胃细菌丰富度和多样性没有影响, 但可以改变细菌组成(如瘤胃埃氏球菌属和光岗菌属的相对丰度增加), 从而影响瘤胃发酵, 增加羔羊瘤胃TVFA含量, 降低NH₃-N浓度, 提高微生物蛋白浓度, 促进瘤胃的发育, 减少断奶应激, 且亮氨酸添加量以0.66 g/d效果更为显著。

参考文献:

[1] Abou Ward G A, Tawila M A, Sawsan M, et al. Effect of weaning age on lamb's performance[J]. World J Agr Sci,

2008, 4: 569-573.

[2] Arthington J D, Minton J E. Effect of early calf weaning on feed intake, growth and postpartum interval in thin, Brahllan-crossbred primiparous cows[J]. Professional Anim Sci, 2004, 20(1): 34-38.

[3] Karagounis L G, Hugues M, Rowlands D S. Leucine-Protein functional adaptation in the clinical setting[M]. In: Rajendram R, Preedy V, Patel V (eds). Branched Chain Amino Acids in Clinical Nutrition New York, NY: Human a Press, 2015, 217-227.

[4] Sun Y L, Wu Z L, Li W, et al. Dietary L-leucine supplementation enhances intestinal development in sucking piglets[J]. Amino Acids, 2015, 47(8): 1517-1525.

[5] Xu W, Bai K, He J, et al. Leucine improves growth performance of intrauterine growth retardation piglets by modifying gene and protein expression related to protein synthesis[J]. Nutrition, 2016, 32(1): 114-1121.

[6] Jin H J, Lee J H, Kim D H, et al. Antioxidative and nitric oxide scavenging activity of branched-chain amino acids[J]. Food Sci Biotechnol, 2015, 24(4): 1555-1558.

[7] 胡军, 聂杨帆, 陈柿枫, 等. 亮氨酸调节仔猪上皮细胞能量代谢的研究[A]. 中国畜牧兽医学动物营养学会第十二次动物营养学术研讨会论文集[D]. 北京: 中国农业大学出版社, 2016: 33.

[8] Hu W L, Liu J X, Ye J A, et al. Effect of tea saponin on rumen fermentation in vitro[J]. Anim Feed Sci Tech, 2005, 120: 333-339.

[9] 冯宗慈, 高民. 通过比色测定瘤胃液氨氮含量方法的改进[J]. 畜牧与饲料科学, 2010(4): 40-41.

[10] Gagen E J, Denman S E, PadmanabhaJ, et al. Functional gene analysis suggests different acetogen population in the bovine rumen and tammar wallaby forestomach[J]. Appl Environ Microb, 2010, 76: 7785-7795.

[11] Sun W, Qian X, Gu J, et al. Mechanism and effect of temperature on variations in antibiotic resistance genes during anaerobic digestion of dairy manure[J]. Sci Rep, 2016, 6: 30237.

[12] Baldwin R L. Use of isolated ruminal epithelial cells in the study of rumen development[J]. J Nutr, 1998, 128(2): 2935-2965.

[13] Lesmeister K E, Heinrichs A J, Gabler M T. Effects of supplemental yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) culture on rumen development, growth characteristics, and blood parameters in Neonatal dairy calves[J]. J Dairy Sci, 2004, 87: 1832-1839.

[14] 杨斌. 早期补饲苜蓿调节幼龄湖羊生长和瘤胃发育的机制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2016

[15] Shoale S, Karlsson F, Mardinoglu A, et al. Understanding the interactions between bacteria in the human gut through metabolic modeling[J]. Sci Rep, 2013, 3: 2532.

[16] Jami E, Israel A, Kotser A, et al. Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood[J]. Isme J, 2013, 7(6): 1069.

[17] Wu S, Wang G, Angert E R., et al. Composition, diversity, and origin of the bacterial community in grass carp intestine[J]. PLoS One, 2012, 7(2): e30440.

- [18] Scardovi V. Genus bifidobacterium: taxonomy studies and gene expression analysis on folate pathway[D]. Italy: University of Bologna, 2014.
- [19] Wallace R J. Catabolism of amino acids by *Megasphaera elsdenii* LC1[J]. *Appl Environ Microb*, 1986, 51(5): 1141-1143.
- [20] Muya M C, Nherera F V, Miller K A, *et al*. Effect of *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125 dosing on rumen development, volatile fatty acid production and blood β -hydroxybutyrate in neonatal dairy calves[J]. *J Anim Physiol Anim Nutr*, 2015, 99(5): 913-918.
- [21] Lan L Q, Ho Y W, Abdullah N. *Mitsuokella jalaudinii* sp. nov., from the rumens of cattle in Malaysia[J]. *Int J Syst Evol Micr*, 2002, 52: 713-718.

Effects of Leucine Addition on Rumen Development and Rumen Bacterial Communities of Early Weaned Hu Lambs

SUN Shi-jie, WANG Chong, MAO Hui-ling*

(College of Animal Science and Technology, Zhejiang A & F University, Zhejiang Lin'an 311300, China)

Abstract: This study was conducted to investigate the effects of leucine addition on the rumen development and rumen bacterial communities of early weaned Hu lambs. Thirty-six healthy male Hu lambs at 5 d of age were assigned to three leucine addition treatments: control (C, 0 g/d), low addition level (L, 0.66 g/d), and high addition level (H, 1.33 g/d), with 4 replicates in each treatment. After weaned at 30d, one lamb was randomly selected from each replicate and slaughtered to collect samples of ruminal content and tissue (n=4). The results showed as follows: as compared to C group, lambs in H group had longer rumen papillae (linear, $P<0.01$). Addition of leucine increased volatile fatty acid concentrate (quadratic, $P=0.05$), but had no effect on the molar proportion of acetate, propionate or butyrate ($P>0.05$). Rumen $\text{NH}_3\text{-N}$ was decreased by leucine addition (linear, $P<0.05$; quadratic, $P>0.05$), while microbial protein was higher in L group than in C group (quadratic, $P=0.05$). Addition of leucine had no effect on rumen bacterial species richness or diversity index, but could affect the bacterial communities. At the phylum level, the abundance of Firmicutes was richer in L group (49.5%), while the abundance of Bacteroidetes in H group was higher (51.4%) than the other two groups (quadratic, $P=0.05$). At the genus level, *Prevotella* was richer in H group than in L group (linear, $P>0.05$; quadratic, $P>0.05$). As compared to the C group, *Bifidobacterium* (quadratic, $P<0.05$), *Megasphaera* (quadratic, $P<0.01$), and *Mitsuokella* (quadratic, $P<0.05$) were increased significantly in L group. These results indicate that addition of leucine could improve the rumen development and change the communities of rumen bacterial.

Keywords: Leucine; Early weaned; Hu lambs; Rumen development; Rumen bacterial

(责任编辑: 郑本艳)