

# QIIME 2 整合分析发酵饲料对不同动物肠道微生物群落的影响

钟小忠<sup>1#\*</sup>, 张昊霖<sup>1#</sup>, 胡明茜<sup>1</sup>, 许涛<sup>2,3</sup>, 刘晓彤<sup>3,4</sup>, 胡莞浩<sup>1</sup>, 张馨予<sup>1</sup>, 周瑞<sup>1</sup>, 雷舒涵<sup>1</sup>

1 四川农业大学 生命科学学院, 四川 雅安

2 重庆大学 生物工程学院, 重庆

3 泸州老窖股份有限公司, 四川 泸州

4 国家固态酿造工程技术研究中心, 四川 泸州

钟小忠, 张昊霖, 胡明茜, 许涛, 刘晓彤, 胡莞浩, 张馨予, 周瑞, 雷舒涵. QIIME 2 整合分析发酵饲料对不同动物肠道微生物群落的影响[J]. 微生物学报, 2025, 65(9): 3921-3934.

ZHONG Xiaozhong, ZHANG Haolin, HU Mingxi, XU Tao, LIU Xiaotong, HU Wanhao, ZHANG Xinyu, ZHOU Rui, LEI Shuhan. QIIME 2-based integrative analysis of the effect of fermented feed on the gut microbiota of different animals[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(9): 3921-3934.

**摘要:** 肠道微生物群落是调控动物健康的关键因素, 其结构和功能可被发酵饲料显著影响。然而, 目前缺乏跨物种比较研究, 限制了对发酵饲料共性调控机制的理解。【目的】整合多物种数据, 解析发酵饲料对肠道菌群的跨物种调控规律, 揭示功能优化的普遍性与宿主特异性机制。【方法】整合猪、牛、鸡、鹅的 464 个肠道微生物组数据, 分别采用  $\alpha/\beta$  多样性、线性判别效应分析(linear discriminant analysis effect size, LefSe)、BugBase 及网络分析, 评估发酵饲料组和对照组间的肠道微生物多样性、差异菌属、潜在致病性和互作关系。【结果】发酵饲料显著降低了单胃动物(猪、鸡、鹅)肠道微生物的  $\alpha$  多样性; 不同动物肠道微生物群落的  $\beta$  多样性无显著变化, 但发酵饲料组显著富集益生菌[如乳杆菌属(*Lactobacillus*)和粪杆菌属(*Faecalibacterium*)], 抑制了致病菌[如弯曲杆菌属(*Campylobacter*)、短螺菌属(*Brachyspira*)], 潜在致病性降低。网络分析显示发酵饲料组的连接度、网络密度提高, 模块化降低, 群落协同性增强。物种特异性分析表明, 猪、牛、鸡分别富集了乳杆菌属(*Lactobacillus*)、阿克曼氏菌属(*Akkermansia*)、解黄酮菌属(*Flavonifractor*)等不同的益生菌, 体现了宿主特异性响应。【结论】发酵饲料通过共性响应优化结合物种特异性响应模式调控肠道菌群, 选择性富集关键菌群以增强特定功能、降低致病性, 为发

资助项目: 国家固态酿造工程技术研究中心资助项目(2024NB04); 四川省大学生创新训练计划(S202410626059)

This work was supported by the National Engineering Research Center of Solid-state Brewing Funding Project (2024NB04) and the Sichuan Provincial College Student Innovation Training Program (S202410626059).

#These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author. E-mail: xiaozhong@sicau.edu.cn

Received: 2025-02-05; Accepted: 2025-06-27; Published online: 2025-07-03

酵饲料共性技术的开发提供理论依据。

关键词：发酵饲料；养殖动物；肠道微生物；微生物群落；潜在致病性；共现性网络

## QIIME 2-based integrative analysis of the effect of fermented feed on the gut microbiota of different animals

ZHONG Xiaozhong<sup>1#\*</sup>, ZHANG Haolin<sup>1#</sup>, HU Mingxi<sup>1</sup>, XU Tao<sup>2,3</sup>, LIU Xiaotong<sup>3,4</sup>, HU Wanhao<sup>1</sup>, ZHANG Xinyu<sup>1</sup>, ZHOU Rui<sup>1</sup>, LEI Shuhan<sup>1</sup>

1 College of Life Sciences, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan, China

2 College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing, China

3 Luzhou Laojiao Co., Ltd., Luzhou, Sichuan, China

4 National Engineering Research Center of Solid-state Brewing, Luzhou, Sichuan, China

**Abstract:** The gut microbiota plays a pivotal role in regulating animal health, and its structure and function can be significantly modulated by fermented feed. However, the lack of cross-species comparative studies has hindered a comprehensive understanding of the universal mechanisms underlying fermented feed-mediated microbial regulation. **[Objective]** To integrate multi-species data for deciphering cross-species regulatory patterns of fermented feed on gut microbiota and elucidating universal functional optimization and host-specific mechanisms. **[Methods]** We aggregated 464 gut microbiome datasets from pigs, cattle, chickens, and geese. The alpha/beta diversity analyses, linear discriminant analysis effect size (LEfSe), BugBase, and network analyses were employed to assess the diversity, differentially enriched genera, pathogenicity, and interactions of the gut microbiota. **[Results]** Fermented feed markedly reduced the alpha diversity of gut microbiota in monogastric animals (pigs, chickens, and geese) but not in ruminants (cattle). Although the beta diversity of gut microbiota remained statistically stable in different animals, fermented feed enriched probiotics (e.g., *Lactobacillus* and *Faecalibacterium*) while suppressing pathogens (e.g., *Campylobacter* and *Brachyspira*) to significantly diminish the pathogenic potential. Network analysis revealed enhanced connectivity, increased network density, reduced modularity, and improved community synergy in fermented feed groups. Host-specific responses were identified: *Lactobacillus* dominated in pigs, *Akkermansia* in cattle, and *Flavonifractor* in chickens. **[Conclusion]** Fermented feed modulates gut microbiota through a pattern coupling consistent response optimization with host-specific responses, selectively enriching keystone taxa to improve the specific function and reduce the pathogenicity. This study provides theoretical foundations for developing host-tailored fermented feed strategies.

**Keywords:** fermented feed; farmed animals; gut microbiota; microbial communities; potential pathogenicity; co-occurrence network

动物肠道微生物群落在维持宿主健康中发挥重要作用, 主要通过营养代谢、免疫调节及屏障保护等途径影响动物生理状态<sup>[1-3]</sup>。近年来, 发酵饲料因能通过微生物代谢生成有机酸、抗菌肽等功能性产物, 显著调控肠道菌群组成, 已成为动物营养领域的研究热点<sup>[4]</sup>。现有研究表明, 发酵饲料对肠道微生物的影响存在显著物种差异<sup>[5]</sup>。例如, 发酵饲料可显著提升仔鸡肠道乳杆菌属(*Lactobacillus*)的丰度并抑制脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)<sup>[6]</sup>, 同时降低仔猪肠道梭菌纲(*Clostridia*)的比例并富集拟杆菌纲(*Bacteroidia*)<sup>[7]</sup>。以上研究表明, 发酵饲料的调控效应高度依赖宿主物种特性。

不同动物肠道微生物对发酵饲料的响应模式可能存在共性。已有研究表明, 发酵饲料使育肥猪中假单胞菌门(*Pseudomonadota*)的致病菌减少, 而芽孢杆菌门(*Bacillota*)等有益菌增加<sup>[8]</sup>; 类似地, 肉鸡饲喂发酵饲料后, 芽孢杆菌门和拟杆菌门(*Bacteroidota*)的微生物比例增加, 而包含多种致病菌的假单胞菌门的比例下降<sup>[9]</sup>, 提示发酵饲料可能对肠道菌群产生跨物种的共性优化效应。尽管发酵饲料的原料、菌种及工艺差异导致微生物组成的物种特异性响应, 但其可能通过共性机制驱动益生菌富集和致病菌抑制的跨物种调控。

本研究整合猪、牛、鸡、鹅多物种肠道微生物数据, 系统解析发酵饲料的调控规律, 揭示跨物种肠道微生物对发酵饲料的共性响应模式, 以及发酵饲料对肠道微生物的宿主特异性调控机制, 以为发酵饲料共性技术的开发提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 数据收集与预处理

整合来自美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)等公共数据库的 20 项已发表研究, 共收

集到 681 个涉及发酵饲料(fermented feed, FF)研究的动物肠道微生物 16S rRNA 基因扩增子测序样本, 涵盖猪(327 个样本)、牛(202 个样本)、鸡(116 个样本)和鹅(36 个样本)(表 1)。为确保数据可比性, 筛选时仅保留具有共同 V4 测序区段(250 bp)且提供原始 fastq 文件的研究。序列预处理采用 QIIME 2 (v2024.1)分析流程<sup>[29]</sup>: 首先利用 cutadapt 去除 V4 区上游引物 515F (5'-GTGC CAGCMGCCGCGGTAA-3'); 通过 DADA2 算法, 剔除最大预期错误率(max\_ee)>2.0、长度<200 bp 的序列, 设置前向截断长度为 250 bp (--p-trunc-len 250), 去除嵌合体, 并生成扩增子序列变体(amplicon sequence variants, ASVs), 保留的序列即为 V4 区的 250 bp 序列。为了确保分析可靠性, 进一步去除了序列数低于 10 000 的样本, 最终保留了 464 个(猪 258 个, 牛 109 个, 鸡 77 个, 鹅 20 个)高质量样本用于后续分析。

### 1.2 多样性分析与物种注释

样品微生物群落的  $\alpha$  多样性分析基于 R 语言 vegan 包(v2.6-4)计算 Chao1 指数、Shannon 指数、ACE 指数和 Simpson 指数。 $\beta$  多样性通过 Bray-Curtis 距离矩阵进行非度量多维尺度分析(non-metric multidimensional scaling, NMDS), 以应力值(stress<0.20)评估降维效果。物种注释通过 QIIME feature-classifier 与 SILVA 138.1 数据库(99% 相似度阈值)比对进行属水平分类<sup>[30]</sup>, 同时采用 Greengenes 13.8 数据库分类以支持 BugBase 表型预测<sup>[31]</sup>。功能预测通过 BugBase (v1.0)实现, 评估群落潜在致病性等表型特征<sup>[32]</sup>。

### 1.3 差异物种分析

差异菌属鉴定通过线性判别效应分析(linear discriminant analysis effect size, LEfSe)完成: 首先利用 Kruskal-Wallis 检验( $P<0.05$ )筛选组间差异菌属, 再以线性判别分析(linear discriminant analysis, LDA)效应量(LDA>2)确定显著性物种, 并采用 Benjamini-Hochberg 法校正多重检验假发现率(false discovery rate, FDR<0.05)<sup>[33]</sup>。

表1 本研究中分析的数据集信息

Table 1 The information of the data sets analyzed in this study

Project number	Primer region	Animals	Animals information	Sampling site	FF raw material	Sample size		References
						FF	Control	
PRJNA384694	V4	Pig	Finishing pigs	Feces	Feedstuffs	14	7	[10]
PRJNA1069293	V3-V4	Pig	Growing pigs	Feces	Flaxseed meal	24	8	[11]
PRJNA725094	V3-V4	Pig	Unknown	Gut content	Complete feed.	6	6	[8]
PRJNA891080	V3-V4	Pig	Piglets	Gut content	Unknown	10	10	[12]
PRJNA524989	V4-V5	Pig	Growing pigs	Gut content	Corn-soybean meal	15	12	[13]
PRJNA787021	V3-V4	Pig	Unknown	Feces	Complete feed	3	3	[14]
PRJNA648691	V3 - V4	Pig	Male piglets	Gut content	Soybean meal	57	12	[15]
PRJNA714150	V3 - V4	Pig	Weaned boars	Feces	Herbal mixture	36	18	[16]
PRJNA1091436	V3-V4	Pig	Weaned piglets	Feces	Purslane	8	8	[17]
PRJNA607631	V4-V5	Pig	Growing pigs	Gut content	Corn-soybean meal	12	10	[18]
PRJNA743130	V4-V5	Pig	Weaned piglet	Gut content	Cottonseed meal	12	12	[19]
PRJEB27667	V3-V4	Pig	Unknown	Gut content	Mao-tai lees	18	6	[20]
PRJNA1047959	V3-V4	Goose	Xianghai geese	Gut content	Maize stover	6	6	[21]
PRJNA492962	V3-V4	Goose	Yangzhou geese	Gut content	Unknown	18	6	[22]
PRJNA858635	V3-V4	Chicken	Broilers	Gut content	Grape seed meal	36	12	[23]
PRJNA1028111	V3-V4	Chicken	Chahua chickens	Gut content	Soybean hulls:rapeseed cake	15	5	[24]
PRJNA533918	V4	Chicken	Gray hens	Gut content	Unknown	36	12	[25]
PRJNA669464	V3-V4	Cattle	Holstein cows	Rumen content and feces	Corn gluten-wheat bran mixture	36	18	[26]
PRJNA472376	V4	Cattle	Unknown	Feces	Unknown	14	14	[27]
PRJNA450498	V4-V5	Cattle	Simmental cattle	Rumen content	Rice straw	60	60	[28]

## 1.4 微生物互作网络分析

微生物属水平互作网络分析基于分子生态网络分析(molecular ecological network analysis, MENA)平台完成<sup>[34]</sup>, 只保留在至少 50% 样品中均存在的菌属, 以 Pearson 相关性计算相似性矩阵, 计算网络拓扑参数(如连接度、网络密度、模块度等)。关键物种通过模块内连接度(within module connectivity,  $Z_i > 2.5$ )与模块间连接度(among-module connectivity,  $P_i > 0.6$ )识别, 网络可视化使用 Gephi 软件(v0.9.2)完成<sup>[35]</sup>。

## 1.5 统计分析

$\alpha$  多样性组间差异通过 Wilcoxon 秩和检验进行统计分析, 所有统计分析均在 R 语言环境中完成, 显著性水平设为  $P < 0.05$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 发酵饲料对不同动物肠道微生物群落 $\alpha$ 多样性的影响

发酵饲料组和对照组(control)的肠道微生物  $\alpha$  多样性比较分析结果表明, 发酵饲料显著降低了猪、鸡和鹅的肠道微生物  $\alpha$  多样性。在整体水平上, 发酵饲料组的 Chao1 指数(图 1A)、ACE 指数(图 1B)、Shannon 指数(图 1C)和 Simpson 指数(图 1D)均显著低于对照组( $P < 0.05$ )。

不同物种比较分析显示, 发酵饲料对肠道微生物  $\alpha$  多样性的影响具有动物特异性。在单胃动物中, 猪、鸡和鹅的发酵饲料组较对照组均表现出显著降低 Chao1 指数、ACE 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数( $P < 0.05$ )。然而, 在反刍动物牛中, 发酵饲料组与对照组的  $\alpha$  多

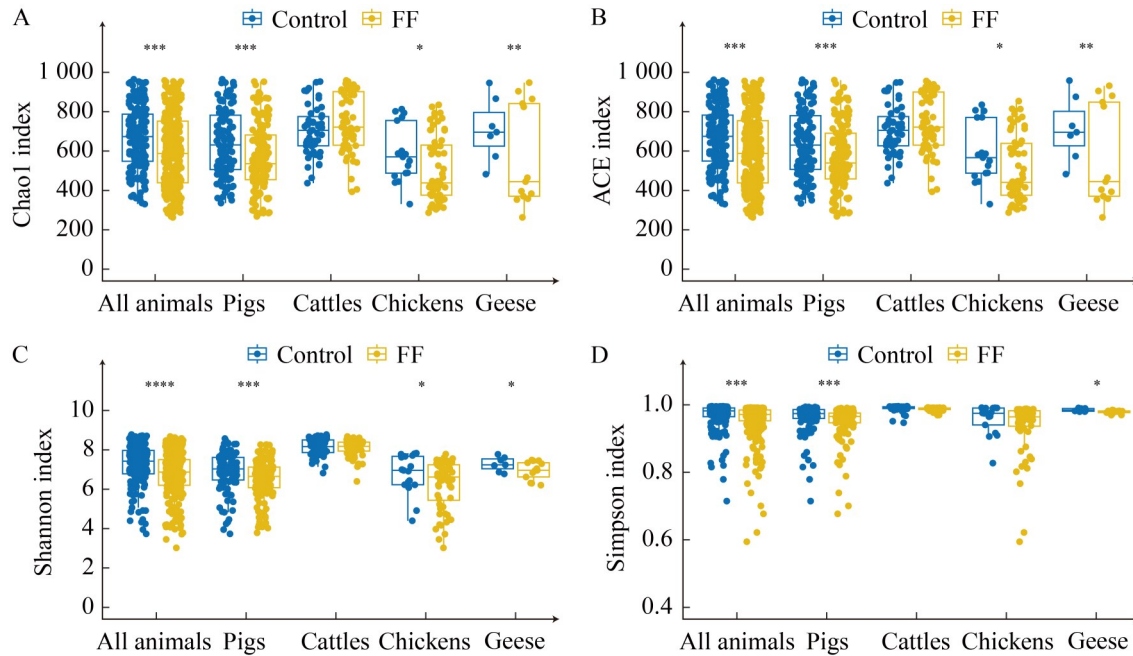


图1 不同动物肠道菌群 $\alpha$ 多样性指数分布。A: Chao1指数; B: ACE指数; C: Shannon指数; D: Simpson指数。

Figure 1 Distribution of alpha diversity indices of gut microbiota in different animals. A: Chao1 index; B: ACE index; C: Shannon index; D: Simpson index. \*\*\*\*:  $P<0.0001$ ; \*\*\*:  $P<0.001$ ; \*\*:  $P<0.01$ ; \*:  $P<0.05$ .

多样性指数并无显著差异( $P>0.05$ )。这一结果表明, 动物的消化系统特征可能是影响发酵饲料调节肠道微生物多样性的关键因素。

## 2.2 发酵饲料对不同动物肠道微生物群落 $\beta$ 多样性的影响

为评估发酵饲料对不同动物肠道微生物群落结构的整体影响, 采用NMDS对其 $\beta$ 多样性进行了分析。NMDS模型中的stress值均小于0.20, 说明拟合结果较可靠。如图2所示, 发酵饲料组和对照组的样本分布基本重叠, 不存在显著差异( $P>0.05$ ), 表明饲喂发酵饲料并未显著改变所有考察动物的肠道菌群整体结构。

## 2.3 不同动物肠道微生物群落组成和差异分析

微生物群落组成分析结果显示(图3), 不同动物肠道具有独特的优势菌群特征。在猪肠道菌群中, 排名前三的菌属为梭菌属(*Clostridium*\_

*sensu\_stricto\_1*, 9.21% FF/7.32% Control)、乳杆菌属(7.79% FF/5.31% Control)和普雷沃氏菌属(8.43% FF/4.43% Control); 牛肠道菌群中为普雷沃氏菌属(14.00% FF/12.04% Control)、理化所菌科RC9群(*Rikenellaceae\_RC9\_gut\_group*, 7.89% FF/7.15% Control)和UCG-005(5.48% FF/5.86% Control); 鸡肠道菌群中, 拟杆菌属(*Bacteroides*, 15.84% FF/16.52% Control)、理化所菌科RC9群(6.71% FF/4.34% Control)和粪杆菌属(5.90% FF/4.41% Control)丰度最高; 鹅肠道菌群中是拟杆菌属(21.60% FF/18.10% Control)、脱硫弧菌属(9.43% FF/8.13% Control)和粪杆菌属(3.64% FF/3.22% Control)。

为了评估发酵饲料对不同动物肠道微生物组成的具体影响, 本研究筛选了每个动物组中排名前50的优势菌属用于LEfSe分析, 以 $P<0.05$ 和LDA>2为阈值划分显著差异的物种(图4)。在门水平上, 所有考察动物(图4A)对照组

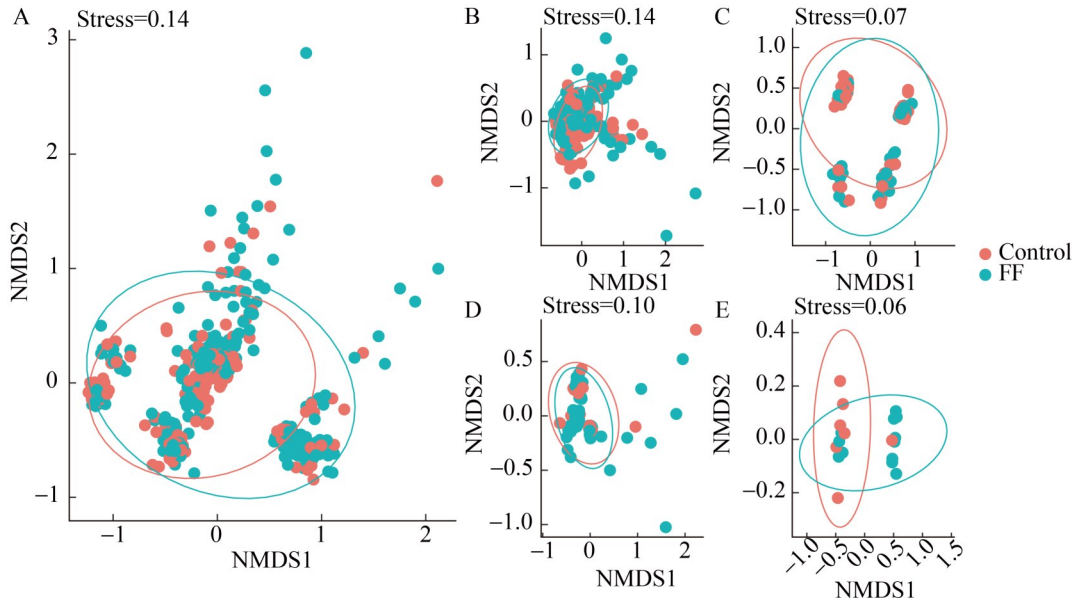


图2 不同动物肠道菌群NMDS分布。A: 所有考察动物; B: 猪; C: 牛; D: 鸡; E: 鹅。

Figure 2 NMDS distribution of gut microbiota in different animals. A: All animals; B: Pigs; C: Cattles; D: Chickens; E: Geese.

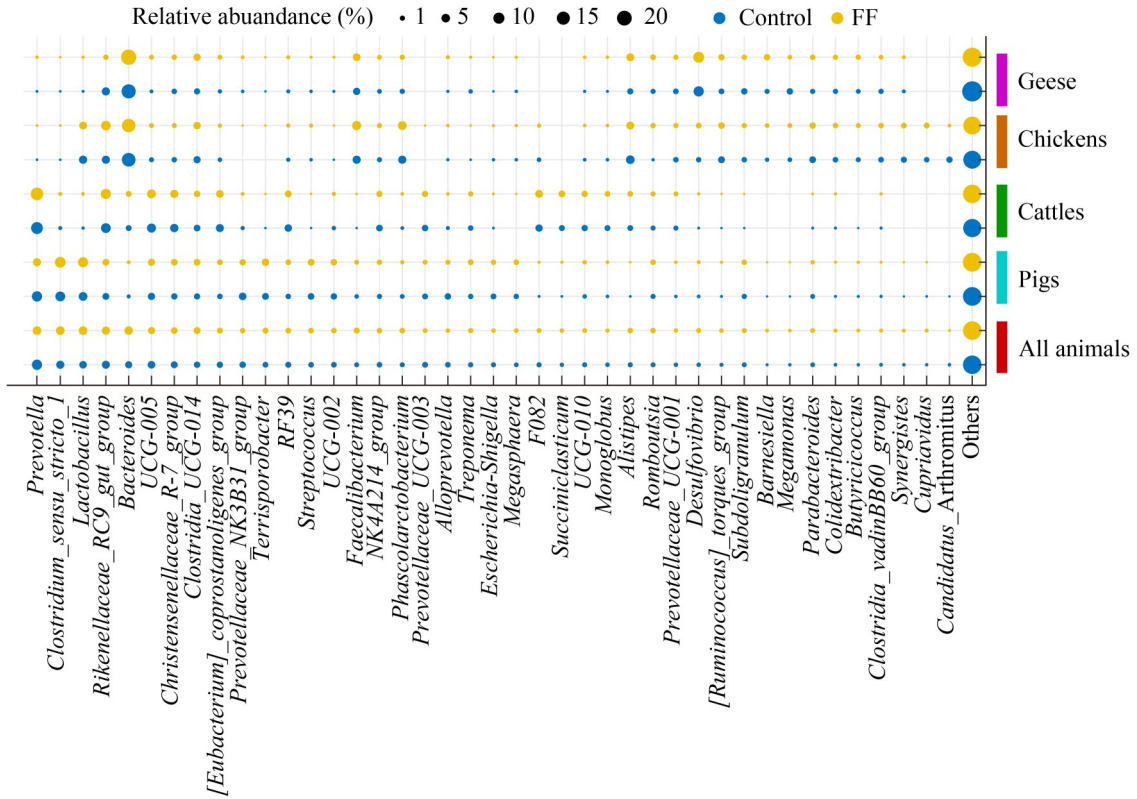


图3 不同动物肠道菌群的优势菌属分布

Figure 3 Distribution of abundant genera in different animals.

肠道菌群中螺旋体门(*Spirochaetota*)和拟杆菌门(*Bacteroidota*)显著富集, 发酵饲料组中放线菌门(*Actinobacteriota*)、脱硫杆菌门(*Desulfobacterota*)和芽孢杆菌门显著富集; 猪(图 4B)对照组中弯曲杆菌门(*Campylobacterota*)和拟杆菌门显著富集, 发酵饲料组中芽孢杆菌门显著富集; 牛(图 4C)发酵饲料组中疣微菌门(*Verrucomicrobiota*)、髌骨菌门(*Patescibacteria*)和假单胞菌门显著富集; 鸡和鹅在门水平上无显著差异。

在属水平上, 所有考察动物(图 4A)对照组肠道菌群中显著富集的优势菌属包括螺旋体属(*Treponema*)、厌氧弧菌属(*Anaerovibrio*)、罗斯拜瑞氏菌属(*Roseburia*)、拟杆菌目 RF16 群(*Bacteroidales\_RF16\_group*)、异普雷沃菌属(*Alloprevotella*)、普雷沃菌科 UCG-003 群(*Prevotellaceae\_UCG-003*)、普雷沃菌科 NK3B31 群(*Prevotellaceae\_NK3B31\_group*)和普雷沃菌属, 发酵饲料组显著富集的优势属包括欧尔森氏菌属(*Olsenella*)、脱硫弧菌属、*Colidextribacter*、瘤胃球菌属(*[Ruminococcus]\_torques\_group*)、梭菌纲 UCG-014 群(*Clostridia\_UCG-014*)、粪杆菌属和乳杆菌属; 猪(图 4B)对照组显著富集的优势属包括考拉杆菌属(*Phascolarctobacterium*)、弯曲杆菌属、厌氧弧菌属、罗斯拜瑞氏菌属、拟杆菌目 RF16 群(*Bacteroidales\_RF16\_group*)、普雷沃菌科 UCG-003 群、异普雷沃菌属和普雷沃菌属, 发酵饲料组显著富集的优势属包括梭菌纲 UCG-014 群(*Clostridia\_UCG-014*)和乳杆菌属; 牛(图 4C)对照组显著富集的优势属为琥珀酸弧菌科 UCG-001 群(*Succinivibrionaceae\_UCG-001*), 发酵饲料组显著富集的优势属包括阿克曼菌属、琥珀酸弧菌科 UCG-002 群(*Succinivibrionaceae\_UCG-002*)和假丁酸弧菌属(*Pseudobutyrvibrio*); 鸡(图 4D)对照组显著富集的优势属包括克里斯滕森氏菌科 R-7 群(*Christensenellaceae\_R-7\_group*)、乳杆菌属和 *Candidatus\_Arthromitus*, 发酵饲料组显著富集的优势属包括解黄酮菌属、苏黎世杆菌属

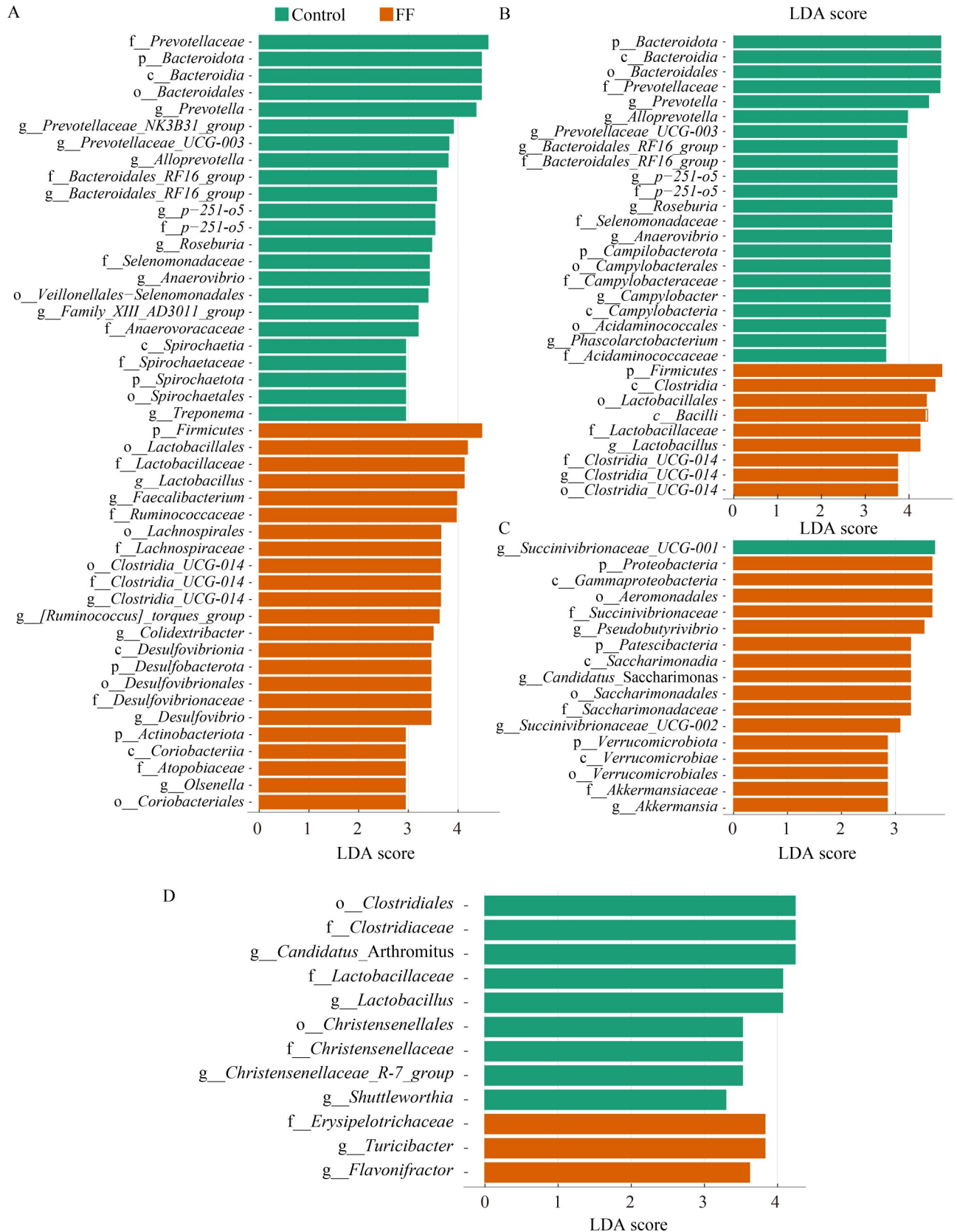
(*Turicibacter*); 鹅(图 4E)对照组显著富集的优势属包括短螺菌属、红斑丹 *Erysipelatoclostridium*、消化球菌属(*Peptococcus*)、罕见小球菌属(*Subdoligranulum*)和理化所菌科 RC9 群, 发酵饲料组显著富集的优势属包括 *Gastranaerophilales* 和 UCG-005。

## 2.4 发酵饲料对不同动物肠道微生物群落潜在致病性的影响

通过 BugBase 表型预测分析了不同动物肠道菌群的潜在致病性(图 5A), 结果表明发酵饲料组显著降低了所有考察动物、猪、牛和鹅肠道菌群的潜在致病性。具体而言, 所有考察动物对照组和发酵饲料组的潜在致病性分别为  $0.54 \pm 0.14$  和  $0.44 \pm 0.15$ ; 猪对照组和发酵饲料组分别为  $0.51 \pm 0.14$  和  $0.47 \pm 0.13$ ; 牛对照组和发酵饲料组分别为  $0.59 \pm 0.14$  和  $0.54 \pm 0.13$ ; 鹅对照组和发酵饲料组分别为  $0.50 \pm 0.08$  和  $0.41 \pm 0.09$ ; 而鸡对照组和发酵饲料组的潜在致病性分别为  $0.49 \pm 0.12$  和  $0.44 \pm 0.14$ 。进一步对所有考察动物肠道菌群  $\alpha$  多样性和潜在致病性指数进行线性回归分析发现, Chao1 指数( $R^2=0.21$ ,  $P<0.001$ , 图 5B)和 Shannon 指数( $R^2=0.16$ ,  $P<0.001$ , 图 5C)均与潜在致病性呈显著正相关。这一结果表明, 肠道微生物群落多样性的降低可能导致了肠道菌群潜在致病性降低。

## 2.5 发酵饲料对动物肠道微生物群落分子生态网络的影响

对所有考察动物的对照组(图 6A)和发酵饲料组(图 6B)进行微生物网络分析(表 2)表明, 发酵饲料组(68 个节点)较对照组(78 个节点)具有更少的节点数, 但表现出更多的连接数(278 vs. 206)和更高的平均连接度(8.17 vs. 5.28)。发酵饲料组的网络密度(0.12 vs. 0.07)也高于对照组, 表明发酵饲料组菌群间的相互作用更为紧密。在关键节点方面, 对照组中仅有 5 个菌属的连接度大于 10, 分别为 F082、*Defluviitaleaceae\_UCG-011*、别样杆菌属(*Alistipes*)、毛螺菌科



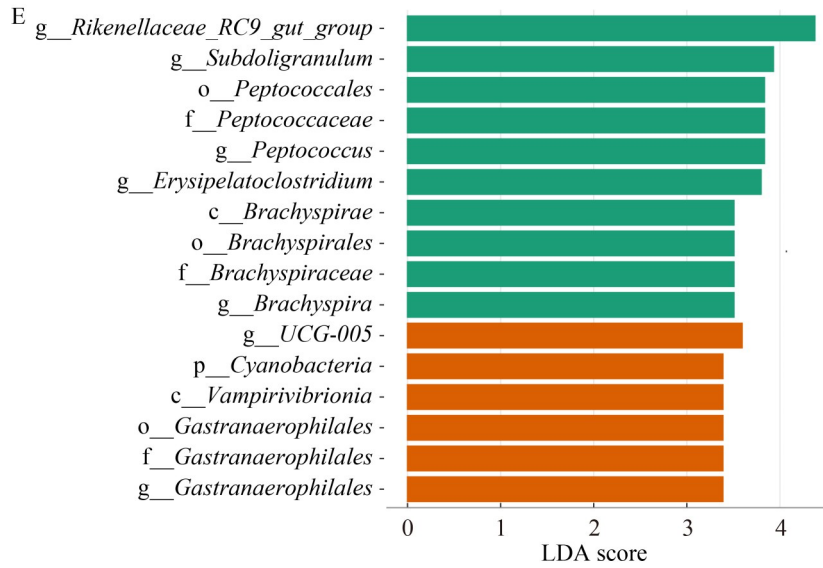


图4 不同动物肠道菌群优势菌属中具有显著差异(LDA>2)的菌属。A: 所有考察动物; B: 猪; C: 牛; D: 鸡; E: 鹅。

Figure 4 Dominant genera in the gut microbiota of different animals that show significant differences (LDA>2). A: All animals; B: Pigs; C: Cattles; D: Chickens; E: Geese.

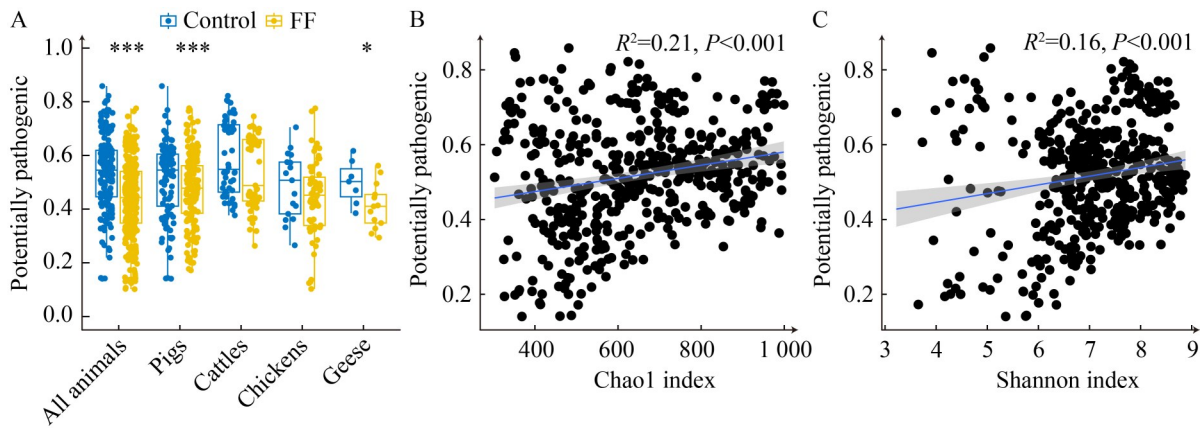


图5 动物肠道菌群潜在致病性及其与α多样性指数的关系。A: 不同动物的潜在致病性指数; B: 所有考察动物中Chao1指数和潜在致病性的线性回归模型; C: 所有考察动物中Shannon指数和潜在致病性的线性回归模型。

Figure 5 Potential pathogenicity of animal gut microbiota and its association with alpha diversity indices. A: Potential pathogenicity indices across different animals; B: Linear regression model between Chao1 index and potential pathogenicity in all animals; C: Linear regression model between Shannon index and potential pathogenicity in all animals. \*\*\*:  $P<0.001$ ; \*\*:  $P<0.01$ ; \*:  $P<0.05$ ; ns: Not significant.

UCG-010 群 (*Lachnospiraceae\_UCG-010*) 和丁酸球菌属 (*Butyricicoccus*), 而发酵饲料组中有 15 个菌属的连接度超过 10, 其中别样杆菌属、副萨

特氏菌属 (*Parasutterella*) 和 F082 为连接度最高的 3 个属, 表明发酵饲料组中具有更多的互作菌群。模块化分析显示, 对照组和发酵饲料组

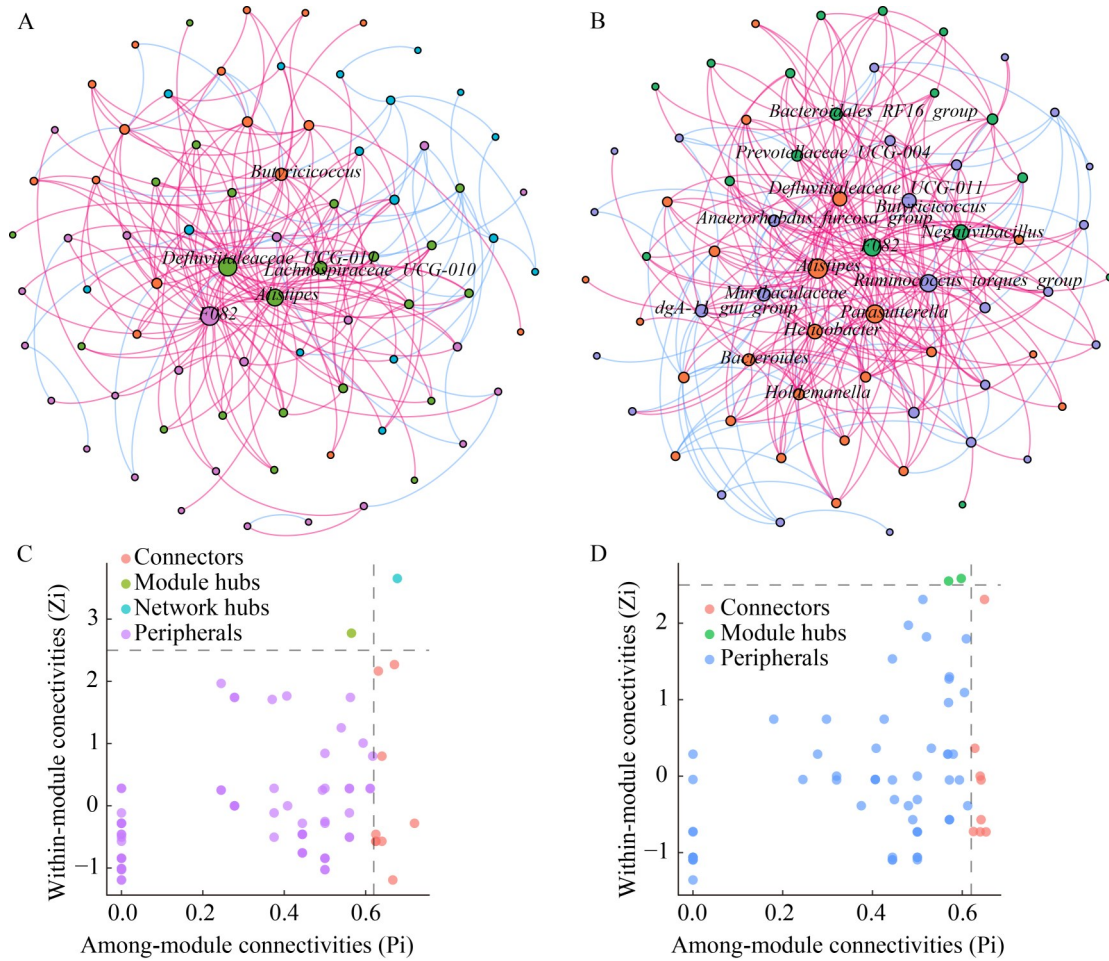


图6 所有考察动物整体水平的网络分析。网络中标注属名的为连接度大于10的菌属。A: 对照组网络; B: 发酵饲料组网络; C: 对照组网络关键物种分析; D: 发酵饲料组网络关键物种分析。

Figure 6 Network analysis of the gut microbiota at the overall level for all animals. Genera with degree>10 are marked in the network. A: Network of the control group; B: Network of the fermented feed group; C: Key species analysis of the control group network; D: Key species analysis of the FF group network.

分别形成 4 个和 3 个模块，对照组的模块度 (0.36)高于发酵饲料组(0.24)。

进一步通过  $Z_i$  (模块内连接)和  $P_i$  (模块间连接)值计算分析了网络中的关键物种。在对照组中(图 6C), 共鉴定出 11 个关键物种, 包括 1 个网络枢纽物种(network hubs, *F082*)、1 个模块枢纽物种别样杆菌属和 9 个连接物种, 分别为 *DeFluviitaleaceae\_UCG-011*、丁酸球菌属、*Prevotellaceae\_UCG-004*、*Candidatus\_Saccharimonas*、消化球菌属、粪杆菌属、厌氧杆形菌属

表2 肠道微生物群落分子生态网络拓扑参数

Table 2 Global properties of molecular ecological network of the gut microbiota

Network indexes	Control	FF
Total nodes	78	68
Total links	206	278
Modules	4	3
Modularity	0.36	0.24
$R^2$ of power-law	0.83	0.57
Average degree	5.28	8.17
Density	0.07	0.12

(*Anaerorhabdus\_furcosa\_group*)、聚乙酸菌属(*Acetitomaculum*)和弯曲杆菌属。在发酵饲料组中(图 6D), 共鉴定出 10 个关键物种, 包括 2 个模块枢纽物种(别样杆菌属和 F082)和 8 个连接物种, 分别为胃球菌属、*Prevotellaceae\_UCG-004*、聚乙酸菌属、*Lachnospiraceae\_XPBI014\_group*、摩里氏菌属(*Moryella*)、丝状杆菌属(*Fibrobacter*)、*WCHB1-41* 和 *Lachnospiraceae\_NK4A136\_group*。其中, 别样杆菌属、F082、*Prevotellaceae\_UCG-004* 和聚乙酸菌属在两组中均被识别为关键物种。

### 3 讨论

#### 3.1 发酵饲料对跨物种肠道菌群的共性优化

多样性是微生态系统稳定性的直观体现。在现有研究中, 发酵饲料对动物肠道微生物  $\alpha$  多样性的影响依然存在矛盾性。例如, 张孟阳等<sup>[6]</sup>、Liu 等<sup>[10]</sup>和 Li 等<sup>[15]</sup>分别在仔鸡、育肥猪和仔猪的肠道微生物研究中发现发酵饲料导致动物肠道微生物  $\alpha$  多样性显著降低; 而 Tang 等<sup>[14]</sup>和 Chen 等<sup>[24]</sup>的研究显示发酵饲料提高了动物肠道菌群的  $\alpha$  多样性; 另有部分研究表明发酵饲料对动物肠道微生物  $\alpha$  多样性无显著影响<sup>[21,25,30]</sup>。本研究通过 Meta 分析发现, 发酵饲料显著降低了猪、鸡、鹅肠道微生物的  $\alpha$  多样性, 进一步关联分析表明多样性的降低与动物肠道功能菌群的富集及致病菌的抑制密切相关。这说明  $\alpha$  多样性的降低并非意味着肠道微生态系统功能的退化, 相反其反映了肠道菌群的生态位优化, 促进了肠道菌群向宿主健康增益方向演变。 $\beta$  多样性分析结果表明, 发酵饲料并未导致研究动物肠道微生物群落整体结构的显著改变。这与 Gu 等<sup>[19]</sup>使用发酵棉籽粕喂食仔猪及 Nan 等<sup>[23]</sup>使用发酵葡萄籽粕调控肉鸡肠道菌群的研究结果一致。该结果表明, 发酵饲料对动物肠道菌群的生态位优化是在维持群落整体结

构的前提下实现的。这种温和的调控模式可能更有利于维持肠道微生态系统的稳定性和功能性, 避免了剧烈的群落结构改变可能带来的负面影响。

优势菌属组成反映了肠道菌群的生态功能特征。在发酵饲料组肠道菌群中, 瘤胃球菌属、乳杆菌属和粪杆菌属显著富集。已有研究表明, 乳杆菌可通过分泌乳酸降低肠道 pH 值, 抑制病原菌定殖并促进短链脂肪酸的合成<sup>[36]</sup>, 而粪杆菌作为核心产丁酸菌, 其丰度提升与肠道屏障功能增强及炎症缓解直接相关<sup>[37]</sup>。瘤胃球菌属是动物消化系统中关键的纤维降解菌属, 能够将纤维分解产物转化为乙酸和丁酸<sup>[38]</sup>。丁酸在动物生理和健康中发挥重要调控作用, 具有成为替代抗生素、提升动物健康与生产性能的关键靶点的潜力<sup>[39]</sup>。本研究发现发酵饲料在不同动物中均能促进产丁酸微生物的协同富集, 增强了代谢-免疫协同的肠道微生态网络。在对照组肠道菌群中, 弯曲杆菌属、短螺菌属等潜在致病菌丰度较高。弯曲杆菌属等病原菌可通过黏附肠上皮、释放细胞毒素引发腹泻和黏膜损伤<sup>[40]</sup>, 而短螺菌属与肠道螺旋体病等慢性炎症密切相关<sup>[41]</sup>。BugBase 预测进一步显示, 发酵饲料组潜在致病性评分显著降低, 提示菌群功能向有益方向转化。网络分析揭示了发酵饲料对微生物群落互作网络的优化作用, 高连接菌属的增加反映了功能核心的优化<sup>[42]</sup>。本研究发酵组中的瘤胃球菌属和 *Fibrobacter* 替代了对照组中的弯曲杆菌属等致病菌, 成为网络中的关键物种。瘤胃球菌属和 *Fibrobacter* 能通过调控短链脂肪酸代谢和胆汁酸转化维持网络稳定性<sup>[43]</sup>。这种网络特征的改变有助于增强微生物间的功能协同以及优化营养物质的利用效率。

#### 3.2 肠道菌群对发酵饲料的宿主特异性响应

在本研究中, 不同动物具有各自特征性的优势菌群结构, 这反映了宿主-微生物在长期进

化过程中形成的共适应关系。猪肠道微生物菌群以产短链脂肪酸菌(梭菌属、乳杆菌属、普雷沃菌属)为主,适应其以淀粉和蛋白质为主的营养需求;牛以纤维素降解菌(普雷沃菌属、理化所菌科 RC9 群)占优,匹配其植物纤维营养底物;禽类(鸡、鹅)则以拟杆菌属和粪杆菌属为主,反映其独特的消化道生理特征<sup>[39]</sup>。猪发酵饲料组中芽孢杆菌门的梭菌纲 UCG-014 群和乳杆菌显著富集,这些菌群通过产生乳酸、细菌素和丁酸,增强了肠道屏障功能并抑制了潜在致病菌的生长,如对照组中显著富集的弯曲杆菌属。牛发酵饲料组中疣微菌门的阿克曼氏菌属和假丁酸弧菌属的富集可以优化反刍动物的纤维素降解和营养代谢<sup>[44]</sup>。鸡发酵饲料中解黄酮菌属和苏黎世杆菌属的富集,则可以增强碳水化合物代谢和免疫调节功能<sup>[45]</sup>。

## 4 结论

本研究通过整合猪、牛、鸡、鹅的肠道微生物组数据,揭示了发酵饲料调控肠道菌群的跨物种共性规律与宿主特异性机制。在共性层面,发酵饲料通过富集核心功能菌群抑制致病菌,显著降低菌群潜在致病性。在特异性层面,不同动物基于其消化生理特征选择性富集了与宿主营养代谢及免疫调节功能适配的菌群。本研究为开发广谱功能菌株与宿主适配配方相结合的精准发酵饲料技术提供了理论基础。

## 作者贡献声明

钟小忠:提出概念、监督管理、稿件润色修改;张昊霖:初稿写作;胡明茜:收集和管理猪肠道微生物数据;许涛:收集和管理牛肠道微生物数据;刘晓彤:文献收集和整理;胡莞浩:收集和管理鸡肠道微生物数据;张馨予:收集和管理鹅肠道微生物数据;周瑞:数据分析;雷舒涵:数据可视化。

## 作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

## 参考文献

- [1] LEE WJ, HASE K. Gut microbiota-generated metabolites in animal health and disease[J]. *Nature Chemical Biology*, 2014, 10(6): 416-424.
- [2] 慕春龙,李轩,吴海琴,柳思强,余凯凡,朱伟云.微生物群系与动物消化道营养[J]. *中国科学:生命科学*, 2023, 53(5): 626-636.  
MU CL, LI X, WU HQ, LIU SQ, YU KF, ZHU WY. Gut microbiome and gastrointestinal nutrition in animals[J]. *Scientia Sinica (Vitae)*, 2023, 53(5): 626-636 (in Chinese).
- [3] UPADHYAY KG, DESAI DC, ASHAVID TF, DHERAI AJ. Microbiome and metabolome in inflammatory bowel disease[J]. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2023, 38(1): 34-43.
- [4] NIBA AT, BEAL JD, KUDI AC, BROOKS PH. Bacterial fermentation in the gastrointestinal tract of non-ruminants: influence of fermented feeds and fermentable carbohydrates[J]. *Tropical Animal Health and Production*, 2009, 41(7): 1393.
- [5] YANG LJ, ZENG XF, QIAO SY. Advances in research on solid-state fermented feed and its utilization: the pioneer of private customization for intestinal microorganisms[J]. *Animal Nutrition*, 2021, 7(4): 905-916.
- [6] 张孟阳,毕付提,李洁,郭宏,马鑫,王德培.发酵饲料对仔鸡肠道微生物群落多样性影响[J]. *中国家禽*, 2019, 41(13): 30-36.  
ZHANG MY, BI FT, LI J, GUO H, MA X, WANG DP. Diversity of intestinal microbial communities in chicken fed with fermented feed[J]. *China Poultry*, 2019, 41(13): 30-36 (in Chinese).
- [7] LIU S, XIAO H, XIONG YX, CHEN JP, WU QW, WEN XL, JIANG ZY, WANG L. Effects of fermented feed on the growth performance, intestinal function, and microbiota of piglets weaned at different age[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2022, 9: 841762.
- [8] TANG XP, LIU XG, ZHANG K. Effects of microbial fermented feed on serum biochemical profile, carcass traits, meat amino acid and fatty acid profile, and gut microbiome composition of finishing pigs[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2021, 8: 744630.
- [9] 许思妍,叶成智,宦海琳,闫俊书.日粮中添加生物发酵饲料对肉鸡肠道形态、挥发性脂肪酸及微生物菌群的影响[J/OL]. *南京农业大学学报*, 2024: 1-12. (2024-11-01). <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=NJNY20241031001&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ>.  
XU SY, YE CZ, HUAN HL, YAN JS. Effects of dietary bio-fermented feed on intestinal morphology, volatile fatty acids and microbiota of broilers[J/OL]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2024: 1-12. (2024-11-01).

- <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=NJNY20241031001&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ> (in Chinese).
- [10] LIU P, ZHAO JB, GUO PT, LU WQ, GENG ZY, LEVESQUE CL, JOHNSTON LJ, WANG CL, LIU L, ZHANG J, MA N, QIAO SY, MA X. Dietary corn bran fermented by *Bacillus subtilis* MA139 decreased gut cellulolytic bacteria and microbiota diversity in finishing pigs[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017, 7: 526.
- [11] XU L, WEI ZX, GUO Y, GUO BZ, CAI L, YAN JJ, MA LH, SUN WJ, LI YP, JIANG XR, LI XL, PI Y. Effects of dietary supplementation with fermented flaxseed meal on the growth performance, immune function, and intestinal microbiota of growing pigs[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2024, 316: 116079.
- [12] YANG YZ, YAN GH, MENG XH, WANG X, ZHAO ZQ, ZHOU SG, LI GD, ZHANG QL, WEI XY. Effects of *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus acidilactici* co-fermented feed on growth performance and gut microbiota of nursery pigs[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2022, 9: 1076906.
- [13] LU JF, ZHANG XY, LIU YH, CAO HG, HAN QC, XIE BC, FAN LJ, LI X, HU JH, YANG GS, SHI XE. Effect of fermented corn-soybean meal on serum immunity, the expression of genes related to gut immunity, gut microbiota, and bacterial metabolites in grower-finisher pigs[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2620.
- [14] TANG XP, ZHANG K, XIONG KN. Fecal microbial changes in response to finishing pigs directly fed with fermented feed[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2022, 9: 894909.
- [15] LI Y, HAN YS, ZHAO QY, TANG CH, ZHANG JM, QIN YC. Fermented soy and fish protein dietary sources shape ileal and colonic microbiota, improving nutrient digestibility and host health in a piglet model[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 911500.
- [16] LI Y, SUN TH, HONG YX, QIAO T, WANG YS, LI W, TANG S, YANG X, LI J, LI XW, ZHOU ZT, XIAO YC. Mixture of five fermented herbs (*Zhihuasi Tk*) alters the intestinal microbiota and promotes the growth performance in piglets[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 725196.
- [17] XU L, GAO G, ZHOU ZA, WEI ZX, SUN WJ, LI YP, JIANG XR, GU JG, LI XL, PI Y. Fermented purslane (*Portulaca oleracea* L.) supplementation enhances growth and immune function parallel to the regulation of gut microbial butyrate production in weaned piglets[J]. *Microorganisms*, 2024, 12(7): 1403.
- [18] LU JF, ZHU MQ, CAO HG, ZHANG X, WANG ZL, ZHANG XY, LI X, HU JH, YANG GS, SHI XE. Impact of fermented corn-soybean meal on gene expression of immunity in the blood, level of secretory immunoglobulin A, and mucosa-associated bacterial community in the intestine of grower-finisher pigs[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2020, 7: 246.
- [19] GU XL, LI ZQ, WANG J, CHEN JS, JIANG Q, LIU N, LIU X, ZHANG F, TAN B, LI H, MA XK. Fermented cottonseed meal as a partial replacement for soybean meal could improve the growth performance, immunity and antioxidant properties, and nutrient digestibility by altering the gut microbiota profile of weaned piglets[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 734389.
- [20] LI H, LI HW, XIE PF, LI ZH, YIN YL, BLACHIER F, KONG XF. Dietary supplementation with fermented Mao-Tai lees beneficially affects gut microbiota structure and function in pigs[J]. *AMB Express*, 2019, 9(1): 26.
- [21] NDOU SP, TUN HM, KIARIE E, WALSH MC, KHAFIPOUR E, NYACHOTI CM. Dietary supplementation with flaxseed meal and oat hulls modulates intestinal histomorphometric characteristics, digesta- and mucosa-associated microbiota in pigs[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 5880.
- [22] YAN JS, ZHOU B, XI YM, HUAN HL, LI MY, YU JN, ZHU HX, DAI ZC, YING SJ, ZHOU WR, SHI ZD. Fermented feed regulates growth performance and the cecal microbiota community in geese[J]. *Poultry Science*, 2019, 98(10): 4673-4684.
- [23] NAN SS, YAO M, ZHANG XY, WANG HL, LI JC, NIU JL, CHEN C, ZHANG WJ, NIE CX. Fermented grape seed meal promotes broiler growth and reduces abdominal fat deposition through intestinal microorganisms[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 994033.
- [24] CHEN SY, MEI HY, XU L, ZHAN LM, YANG YH, ZHAO DX, BAO GY, LI XY, CAO ZH. Impact of fermented feed of soybean hulls and rapeseed cake on immunity, antioxidant capacity, and gut microbiota in Chahua chicken[J]. *Poultry Science*, 2024, 103(3): 103451.
- [25] SHI HT, WANG BY, BIAN CZ, HAN YQ, QIAO HX. Fermented *Astragalus* in diet improved laying performance, egg quality, antioxidant and immunological status and intestinal microbiota in laying hens[J]. *AMB Express*, 2020, 10(1): 159.
- [26] JIANG X, XU HJ, MA GM, SUN YK, LI Y, ZHANG YG. Digestibility, lactation performance, plasma metabolites, ruminal fermentation, and bacterial communities in Holstein cows fed a fermented corn gluten-wheat bran mixture as a substitute for soybean meal[J]. *Journal of Dairy Science*, 2021, 104(3): 2866-2880.
- [27] HUEBNER KL, MARTIN JN, WEISSEND CJ, HOLZER KL, PARKER JK, LAKIN SM, DOSTER E, WEINROTH MD, ABDO Z, WOERNER DR, METCALF JL, GEORNARAS I, BRYANT TC, MORLEY PS, BELK KE. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on liver abscesses, fecal microbiome, and resistome in feedlot cattle raised without antibiotics[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 2559.
- [28] HU YQ, HE YY, GAO S, LIAO ZQ, LAI T, ZHOU HM, CHEN QL, LI LY, GAO HJ, LU W. The effect of a diet based on rice straw co-fermented with probiotics and enzymes versus a fresh corn Stover-based diet on the rumen bacterial community and metabolites of beef cattle[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 10721.
- [29] BOLYEN E, RIDEOUT JR, DILLON MR, BOKULICH NA, ABNET CC, AL-GHALITH GA, ALEXANDER H, ALM EJ, ARUMUGAM M, ASNICAR F, BAI Y,

- BISANZ JE, BITTINGER K, BREJNROD A, BRISLAWN CJ, BROWN CT, CALLAHAN BJ, CARABALLO-RODRÍGUEZ AM, CHASE J, COPE EK, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(8): 852-857.
- [30] CALLAHAN BJ, McMURDIE PJ, ROSEN MJ, HAN AW, JOHNSON AJA, HOLMES SP. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data[J]. *Nature Methods*, 2016, 13(7): 581-583.
- [31] QUAST C, PRUESSE E, YILMAZ P, GERKEN J, SCHWEER T, YARZA P, PEPLIES J, GLÖCKNER FO. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(D1): D590-D596.
- [32] McDONALD D, PRICE MN, GOODRICH J, NAWROCKI EP, DeSANTIS TZ, PROBST A, ANDERSEN GL, KNIGHT R, HUGENHOLTZ P. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea[J]. *The ISME Journal*, 2012, 6(3): 610-618.
- [33] WARD T, LARSON J, MEULEMANS J, HILLMANN B, LYNCH J, SIDIROPOULOS D, KNIGHTS D. BugBase predicts organism-level microbiome phenotypes[J]. *bioRxiv*, 2017: 133462.
- [34] 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.
- [35] DENG Y, JIANG YH, YANG YF, HE ZL, LUO F, ZHOU JZ. Molecular ecological network analyses[J]. *BMC Bioinformatics*, 2012, 13: 113.
- [36] GARCÍA-BAYONA L, COMSTOCK LE. Bacterial antagonism in host-associated microbial communities[J]. *Science*, 2018, 361(6408): eaat2456.
- [37] SOKOL H, PIGNEUR B, WATTERLOT L, LAKHDARI O, BERMÚDEZ-HUMARÁN LG, GRATADOUX JJ, BLUGEON S, BRIDONNEAU C, FURET JP, CORTHIER G, GRANGETTE C, VASQUEZ N, POCHART P, TRUGNAN G, THOMAS G, BLOTTIÈRE HM, DORÉ J, MARTEAU P, SEKSIK P, LANGELLA P. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(43): 16731-16736.
- [38] FORCINA G, PÉREZ-PARDAL L, CARVALHEIRA J, BEJA-PEREIRA A. Gut microbiome studies in livestock: achievements, challenges, and perspectives[J]. *Animals*, 2022, 12(23): 3375.
- [39] BEDFORD A, GONG J. Implications of butyrate and its derivatives for gut health and animal production[J]. *Animal Nutrition*, 2018, 4(2): 151-159.
- [40] SAHIN O, YAEGER M, WU ZW, ZHANG QJ. *Campylobacter*-associated diseases in animals[J]. *Annual Review of Animal Biosciences*, 2017, 5: 21-42.
- [41] HAMPSON DJ. The spirochete *Brachyspira pilosicoli*, enteric pathogen of animals and humans[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2017, 31(1): e00087-17.
- [42] FREILICH S, KREIMER A, MEILIJSON I, GOPHNA U, SHARAN R, RUPPIN E. The large-scale organization of the bacterial network of ecological co-occurrence interactions[J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(12): 3857-3868.
- [43] KOBAYASHI Y, KOIKE S, TAGUCHI H, ITABASHI H, KAM DK, HA JK. Recent advances in gut microbiology and their possible contribution to animal health and production-a review[J]. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2004, 17(6): 877-884.
- [44] HUWS SA, CREEVEY CJ, OYAMA LB, MIZRAHI I, DENMAN SE, POPOVA M, MUÑOZ-TAMAYO R, FORANO E, WATERS SM, HESS M, TAPIO I, SMIDT H, KRIZSAN SJ, YÁÑEZ-RUIZ DR, BELANCHE A, GUAN LL, GRUNINGER RJ, McALLISTER TA, NEWBOLD CJ, ROEHE R, et al. Addressing global ruminant agricultural challenges through understanding the rumen microbiome: past, present, and future[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2161.
- [45] GAO MK, LIAO CY, FU JY, NING ZH, LV ZP, GUO YM. Probiotic cocktails accelerate baicalin metabolism in the ileum to modulate intestinal health in broiler chickens[J]. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2024, 15(1): 25.