

DOI: 10.11686/cyxb2024294

http://cyxb.magtech.com.cn

韩航琪, 王梓凡, 丁赫, 等. 燕麦干草与燕麦草块对绵羊瘤胃发酵及微生物组成影响的比较分析. 草业学报, 2025, 34(5): 212-222.

HAN Hang-qi, WANG Zi-fan, DING He, *et al.* Comparative analysis of effects of oat hay and oat cubes on rumen fermentation and microbial composition in sheep. *Acta Prataculturae Sinica*, 2025, 34(5): 212-222.

燕麦干草与燕麦草块对绵羊瘤胃发酵及微生物组成影响的比较分析

韩航琪^{1,2}, 王梓凡¹, 丁赫^{1,2}, 陈玉荣³, 王琦³, 张晓庆^{1,2*}

(1. 中国农业科学院草原研究所, 内蒙古呼和浩特 010010; 2. 北方农牧业技术创新中心, 内蒙古呼和浩特 010010; 3. 内蒙古兴安盟农牧科学研究所, 内蒙古乌兰浩特 137400)

摘要: 本试验旨在研究燕麦草块对绵羊瘤胃发酵及微生物组成的影响。选用12只1岁左右、体重相近的公羔羊, 随机分为2个处理组。其中一组饲喂不经过任何加工的燕麦干草(OH组), 另一组饲喂燕麦草块(OC组)。两组饲喂质量和数量均相同的商业羊用精饲料补充料。试验期60 d, 其中预试期10 d, 正试期50 d。结果表明: 1) OC组干物质、粗蛋白质、中性和酸性洗涤纤维采食量均显著高于OH组($P \leq 0.05$)。2) 与OH组相比, OC组瘤胃pH、总挥发性脂肪酸、乙酸和丙酸含量、乙酸/丙酸以及氨态氮浓度没有显著变化($P > 0.05$)。3) 两处理组瘤胃细菌OTU数目和Chao1指数无显著差异($P > 0.05$), 但OC组瘤胃细菌Shannon指数和Simpson指数显著高于OH组($P \leq 0.05$)。4) 在门水平瘤胃细菌组成上, 两处理组均以拟杆菌门和厚壁菌门为优势菌门, 但OC组的未命名细菌门、疣微菌门、浮霉菌门、圣诞岛盐菌门、酸杆菌门、绿弯菌门、黏胶球形菌门和放线菌门相对丰度均显著高于OH组($P \leq 0.05$), 拟杆菌门相对丰度有显著增加的趋势($P = 0.075$)而其丝状杆菌门相对丰度有显著降低的趋势($P = 0.096$); 在属水平上, OC组的瘤胃未命名细菌属相对丰度显著高于OH组($P \leq 0.05$), 未命名黏胶球形菌属相对丰度有显著增加的趋势($P = 0.071$), 而其丝状杆菌属相对丰度有显著降低的趋势($P = 0.069$); 在种水平上, OC组瘤胃普雷沃氏菌_{sp.} lc2012相对丰度有显著高于OH组的趋势($P = 0.065$)。5) 总挥发性脂肪酸与未命名细菌属($r = 0.660, P = 0.027$)和细菌_P3($r = 0.638, P = 0.035$)相对丰度呈显著正相关; 乙酸与未命名普雷沃氏菌科($r = 0.627, P = 0.039$)和Prevotellaceae_bacterium_MN60($r = 0.752, P = 0.008$)相对丰度呈显著或极显著正相关, 而与细菌_P3($r = -0.642, P = 0.033$)相对丰度呈显著负相关; 丙酸与细菌_P3($r = 0.647, P = 0.031$)相对丰度呈显著正相关; 乙酸/丙酸与Prevotellaceae_bacterium_MN60($r = 0.699, P = 0.017$)相对丰度呈显著正相关; 氨态氮与另枝菌属($r = -0.752, P = 0.008$)相对丰度呈极显著负相关。综上所述, 饲喂燕麦草块对绵羊瘤胃发酵没有不良影响, 并且可以提高瘤胃菌群多样性和有益菌相对丰度, 优化瘤胃微生物组成, 适合在牛羊等反刍动物养殖中应用。

关键词: 燕麦; 干草; 草块; 绵羊; 发酵参数; 瘤胃微生物

Comparative analysis of effects of oat hay and oat cubes on rumen fermentation and microbial composition in sheep

HAN Hang-qi^{1,2}, WANG Zi-fan¹, DING He^{1,2}, CHEN Yu-rong³, WANG Qi³, ZHANG Xiao-qing^{1,2*}

1. Institute of Grassland Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Hohhot 010010, China; 2. Northern Agriculture and Livestock Husbandry Technology Innovation Center, Hohhot 010010, China; 3. Xing'an League Agricultural and Animal Husbandry Science Research Institute, Ulanhot 137400, China

收稿日期: 2024-07-23; 改回日期: 2024-09-12

基金项目: 呼和浩特市科技创新领域人才项目(2023RC-产研院-7), “科技兴安”行动重点专项(NMKJXM202401-05)和兴安盟定向科技合作项目资助。

作者简介: 韩航琪(2001-), 男, 山西吕梁人, 在读硕士。E-mail: 996760663@qq.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: zhangxiaqing@caas.cn

Abstract: This research aimed to investigate the effects of oat (*Avena sativa*) cubes, compared to oat hay, on rumen fermentation and microbial composition in sheep. Twelve one year old ram lambs with similar body weight were randomly divided into two treatment groups. One group was fed unprocessed oat hay (OH), and the other group was fed oat cubes (OC). The two groups were fed the same quantity of the respective commercial feeds at the same quality. The duration the experiment was 60 days, comprising a feed adaptation period of 10 days and a formal experiment period of 50 days. The results were as follows: 1) The intakes of dry matter, crude protein, neutral and acidic detergent fibers in the OC group were significantly higher than the OH group ($P \leq 0.05$). 2) There were no significant differences in rumen pH, total volatile fatty acid, acetic acid and propionic acid contents; nor in the ratio of acetic acid to propionic acid and ammonia nitrogen concentration between the two groups ($P > 0.05$). 3) There was no significant difference in the OTU number and Chao1 index of rumen bacteria between the two groups ($P > 0.05$), but the Shannon index and Simpson index of rumen bacteria were significantly higher in the OC group than in the OH group ($P \leq 0.05$). 4) Bacteroidetes and Firmicutes were the dominant phyla of rumen bacteria in both treatment groups. However, the relative abundances of unidentified-bacteria, Verrucomicrobacteria, Planctomycetes, Kiritimaitiellaeota, Acidobacteria, Chloroflexi, Lentiphaerae, and Actinobacteria in the OC group were significantly higher than in the OH group ($P \leq 0.05$). The relative abundance of Bacteroidetes tended to be significantly increased ($P = 0.075$) and the relative abundance of Fibrobacteres tended to be significantly reduced in the OC group ($P = 0.096$). At the genus level for the OC group, there was a tendency to have significantly increased relative abundance ($P = 0.071$) of unidentified taxa from the phylum Lentiphaerae and to have significantly decreased *Fibrobacter* relative abundance ($P = 0.069$); at the species level, compared with the OH group, the relative abundance of *Prevotella*_sp._1c2012 in the OC group showed an significantly increasing trend ($P = 0.065$). 5) The total volatile fatty acids were significantly positively correlated with the relative abundance of the unidentified-bacteria species ($r = 0.660$, $P = 0.027$) and Bacterium_P3 ($r = 0.638$, $P = 0.035$). There was a significant positive correlation between acetic acid and the relative abundance of unnamed Prevotellaceae ($r = 0.627$, $P = 0.039$) and *Prevotellaceae*_bacterium_MN60 ($r = 0.752$, $P = 0.008$), but acetic acid was significantly negatively correlated with the relative abundance of Bacterium_P3 ($r = -0.642$, $P = 0.033$). Propionic acid was significantly positively correlated with the relative abundance of Bacterium_P3 ($r = 0.647$, $P = 0.031$), acetic acid: propionic acid was significantly positively correlated with the relative abundance of *Prevotellaceae*_bacterium_MN60 ($r = 0.699$, $P = 0.017$); and the concentration of ammonia nitrogen was significantly negatively correlated with the relative abundance of *Alistipes* ($r = -0.752$, $P = 0.008$). In summary, feeding oat cubes had no adverse effect on rumen fermentation of sheep, and increased the diversity of rumen microbiota and the relative abundance of beneficial bacteria, optimized rumen microbial composition. These results are applicable to both sheep and cattle rearing.

Key words: oat; hay; cube; sheep; fermentation parameter; rumen microorganism

燕麦(*Avena sativa*)是禾本科燕麦属一年生草本植物,是我国高寒地区重要的粮饲兼用作物,具有适应性强、适口性好和产草量高等特性^[1]。随着国家种植业结构调整和“粮改饲”“退耕还草”等相关政策实施,以及畜牧业快速发展对优质饲草的需求增加,燕麦草产业展现出巨大的发展潜力。据统计数据,我国燕麦种植面积持续增长,从2013年的19万 hm^2 增加到2020年的52.5万 hm^2 ,同时燕麦产量从23.5万t增加到62.5万t^[2]。但随着我国燕麦种植面积和产量迅速扩大,燕麦草的储藏、加工和利用等技术短板凸显。目前,我国燕麦以鲜草和田间晾晒制成青干草为主要利用方式饲喂家畜,不仅采食率低、浪费大,还存在加工方式粗犷、营养物质损失大、草产品品质差等问题^[3]。针对禾本科牧草,适当粉碎、制粒或压块不仅能有效提高动物采食率,还能减少储存空间、便于流通。但牧草的加工方式对家畜的采食量、瘤胃发酵和生产性能会产生影响。研究表明,与饲喂天然牧草干草相

比,饲喂草颗粒显著增加乌珠穆沁羔羊的采食量和日增重^[4]。将苜蓿(*Medicago sativa*)干草加工成苜蓿草颗粒可显著增加绵羊的采食量和瘤胃普雷沃氏菌相对丰度^[5]。西藏荨麻(*Urtica tibetica*)草块使绵羊瘤胃微生物多样性减少,但使瘤胃总挥发性脂肪酸含量增加^[6]。使用苜蓿草块替换苜蓿干草显著增加了奶牛的产奶净能,并提高了日均产奶量和乳脂率^[7]。本研究团队发现,燕麦干草加工成燕麦草块后使绵羊的采食时间显著减少而使其采食量和日增重显著增加,但对屠宰性能没有显著影响^[8]。然而,燕麦草块对绵羊瘤胃发酵及微生物组成有何影响,尚不清楚。为明确此问题,本试验以绵羔羊为研究对象,基于瘤胃微生物高通量测序,以燕麦干草为对照,解析燕麦草块对瘤胃发酵参数及微生物组成的影响,以期为高质量燕麦草产品推广应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验时间与地点

试验于2021年10—12月,在西藏自治区拉萨市林周县白朗村种草养畜农牧民专业合作社(29°53′05″N,91°06′10″E,海拔3920 m)进行。

1.2 试验设计与饲养管理

从同一羊场选购1岁左右、健康状况良好的公羔羊12只,按照组间平均体重一致的原则,随机分为2个处理组,每组6只羊,平均体重为(20.25±0.62) kg。一组饲喂燕麦干草(oat hay, OH),另外一组饲喂燕麦草块(oat cube, OC)。试验期为60 d,其中预试期为10 d,正试期为50 d。燕麦草块由燕麦干草经粉碎、压制而成,直径32 mm、密度830 kg·m⁻³。燕麦干草、燕麦草块和精饲料补充料的来源、营养成分、草块加工流程和试验羊饲养管理等信息,详见王梓凡等^[8]的研究。

1.3 瘤胃液采集与制备

正试期最后一天晨饲前,在执行屠宰试验过程中收集所有试验羊的瘤胃液样本。每只羊约收集50 mL,将其快速装入离心管。新鲜的瘤胃液经4层纱布过滤,测定pH,然后分装入2 mL冻存管,并放入液氮快速冷冻,转移至实验室-80 °C冰箱保存,用于瘤胃液发酵参数测定及瘤胃微生物宏基因组测序。

1.4 测定指标与方法

1.4.1 瘤胃发酵参数 瘤胃液pH,采用雷磁pHS-3H酸度计(上海仪电科学仪器股份有限公司)测定;瘤胃液氨态氮(ammonium nitrogen, NH₃-N)浓度,参照冯宗慈等^[9]的方法测定;瘤胃液总挥发性脂肪酸(total volatile fatty acid, TVFA)的含量采用GC-14B型岛津气相色谱仪(日本岛津公司)测定,测定时解冻的瘤胃液经10000 r·min⁻¹离心10 min,取上清液1 mL,加入20%含60 mmol·L⁻¹巴豆酸(内标物)的偏磷酸0.2 mL,混匀,高速离心取上清液2 μL,上机分析。色谱条件为CP-WAX毛细管柱(30.00 m×0.53 mm×1.00 μm),气化室和氢火焰离子检测器(FID,日本岛津公司)温度均为200 °C,初始柱温为100 °C,采用程序升温法升高至150 °C,升温速率为2 °C·min⁻¹。

1.4.2 瘤胃微生物宏基因组测序及数据分析 采用Illumina试剂盒(Kapa Biosciences, Woburn, MA, 美国)对12个样本的瘤胃微生物宏基因组DNA进行paired end文库构建。采用超声波将宏基因组DNA片段化,DNA片段大小约350 bp,使用Fastp v 0.23.2对DNA片段3′和5′端质控,文库质检合格后,用NovaSeq 6000进行高通量测序,测序模式为PE150。将测序得到的原始数据用Cutadapt v 1.9进行去接头、Fqtrim v 0.94去低质量序列,得到clean reads序列,用Megahit v 1.2.9按照样本分别进行组装,将组装好的contigs用Metagenemark v 3.26进行CDS预测(序列长度≥100 bp),用Cd-hit v 4.6.1对预测结果进行聚类 and 去冗余(相似度≥0.90,覆盖度≥0.90);并用Bowtie2 v 2.2.0将每个样本的read比对到CDS库进行TPM丰度计算(相似度≥0.95);过滤低丰度表达后得到unigenes,将unigenes与NR_mate库进行比对,获得物种注释信息。运用Mothur v 1.30对样本进行Alpha多样性分析,运用QIIME v 1.8.0对样本进行Beta多样性分析,通过LEfSe分析($P < 0.05$, LDA > 2)对样本进行差异显著细菌筛选,运用Origin v. 2024对瘤胃发酵参数与排名前10%的瘤胃菌属进行Pearson相关性分析。

1.4.3 饲料营养成分 参照张丽英^[10]的方法测定饲料样中的干物质、粗蛋白质、中性和酸性洗涤纤维含量。

1.5 数据处理

采食量按照日投料量与剩料量之差计算,干物质、粗蛋白质、中性和酸性洗涤纤维采食量按照采食量与饲料营养成分的乘积计算。采用 SAS v. 9.2 软件独立样本 *t* 检验对采食量和瘤胃发酵参数进行分析,当 $P \leq 0.05$ 时认为差异显著,当 $0.05 < P < 0.10$ 时认为有差异趋势,差异显著时采用 Tukey's 法进行多重比较。统计结果用平均值(mean)和均值标准误(standard error of mean, SEM)表示。采用联川生物云平台(www.omicstudio.cn)和 Origin v. 2024 软件进行制图。

2 结果与分析

2.1 燕麦干草和燕麦草块对绵羊干物质采食量的影响

OC 组的干物质采食量、粗蛋白质采食量、中性和酸性洗涤纤维采食量均显著高于 OH 组($P \leq 0.05$, 表 1)。

2.2 燕麦干草和燕麦草块对绵羊瘤胃发酵参数的影响

OH 组和 OC 组的瘤胃 pH 接近,分别为 7.09 和 7.04;瘤胃总挥发性脂肪酸、乙酸、丙酸、乙酸/丙酸和 $\text{NH}_3\text{-N}$ 在两组间均无显著差异($P > 0.05$, 表 2)。

表 1 燕麦干草和燕麦草块对绵羊采食量的影响(干物质基础)

Table 1 Effects of oat hay and oat cube on feed intake of sheep (dry matter basis, $\text{kg} \cdot \text{d}^{-1}$)

采食量 Intake	处理组 Treatment		均值标准误 Standard error of mean (SEM)	P 值 P-value
	干草组 Oat hay (OH)	草块组 Oat cube (OC)		
干物质 Dry matter (DM)	0.95b	1.22a	0.01	0.001
粗蛋白质 Crude protein (CP)	0.08b	0.10a	0.01	0.001
中性洗涤纤维 Neutral detergent fiber (NDF)	0.50b	0.69a	0.01	0.001
酸性洗涤纤维 Acid detergent fiber (ADF)	0.30b	0.39a	0.01	0.001

同行不同小写字母表示差异显著($P \leq 0.05$)。下同。In the same line, the different lowercase letters indicate significant difference ($P \leq 0.05$). The same below.

表 2 燕麦干草和燕麦草块对瘤胃发酵参数的影响

Table 2 Effects of oat hay and oat cube on rumen fermentation parameters

项目 Item	处理组 Treatment		均值标准误 Standard error of mean (SEM)	P 值 P-value
	干草组 Oat hay (OH)	草块组 Oat cube (OC)		
pH	7.09a	7.04a	0.05	0.339
总挥发性脂肪酸 Total volatile fatty acid (TVFA, $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	23.44a	23.33a	4.50	0.981
乙酸 Acetic acid (%)	71.35a	71.20a	2.28	0.950
丙酸 Propionic acid (%)	18.70a	19.45a	2.10	0.728
乙酸/丙酸 Acetic acid/propionic acid	3.95a	3.80a	0.57	0.798
氨态氮 Ammonium nitrogen ($\text{NH}_3\text{-N}$, $\text{mg} \cdot \text{dL}^{-1}$)	6.15a	7.12a	0.97	0.344

2.3 燕麦干草和燕麦草块对绵羊瘤胃微生物多样性的影响

2.3.1 对 Alpha 多样性的影响 两组共 12 个瘤胃样本测序的覆盖率均大于 99.9%,能够真实反映瘤胃微生物组成(表 3)。两组的瘤胃细菌 OTU 数目和 Chao1 指数差异不显著($P > 0.05$),但 OC 组瘤胃细菌 Shannon 和 Simpson 指数显著高于 OH 组($P = 0.043$ 和 0.014)。

2.3.2 对 Beta 多样性的影响 对瘤胃细菌群落进行主成分分析(principal component analysis, PCoA),OH 和 OC 组分别沿主成分 1(PCoA1)和主成分 2(PCoA2)聚集,PCoA1 和 PCoA2 的贡献率分别为 32.05% 和 22.54% (图 1)。进一步进行的非度量多维尺度分析(non-metric multidimensional scaling, NMDS)中应力系数($\text{Stress} = 0.12$) < 0.20 (图 1),反映出两组瘤胃菌群结构存在明显差异。

表3 燕麦干草和燕麦草块对瘤胃细菌Alpha多样性的影响

Table 3 Effects of oat hay and oat cube on rumen bacterial Alpha diversity

项目 Item	处理组 Treatment		均值标准误 Standard error of mean (SEM)	P值 P-value
	干草组 Oat hay (OH)	草块组 Oat cube (OC)		
OTU数 OTU number	11037.17a	11184.33a	445.21	0.773
Chao1指数 Chao1 index	11414.80a	11419.42a	432.62	0.993
Shannon指数 Shannon index	5.85b	6.39a	0.23	0.043
Simpson指数 Simpson index	0.86b	0.91a	0.01	0.014
覆盖率 Coverage (%)	99.997	99.997	—	—

—: 无数据 No data.

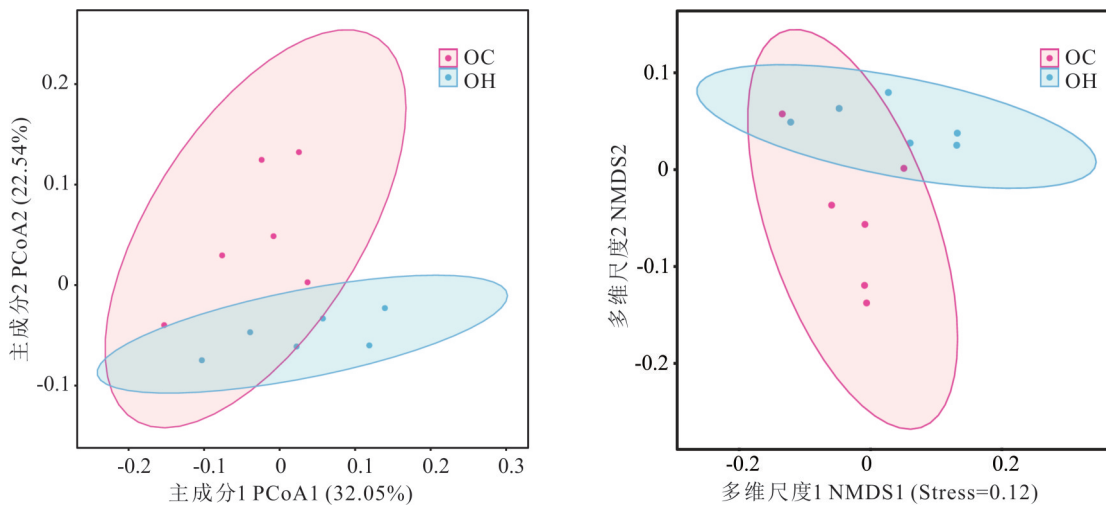


图1 瘤胃细菌构成的主成分分析和非度量多维尺度分析

Fig. 1 Principal component analysis and non-metric multidimensional scaling (NDMS) of rumen bacteria composition

OH: 干草组 Oat hay group; OC: 草块组 Oat cube group; Stress: 应力系数.

2.4 燕麦干草和燕麦草块对绵羊瘤胃微生物组成的影响

本试验共鉴定出141个细菌门、2668个细菌属、13299个细菌种,选取相对丰度前20%的细菌进行统计分析,其余归为其他。在门水平上(表4),除了未分类细菌门(*bacteria_unclassified*),两组均以拟杆菌门(*Bacteroidetes*)和厚壁菌门(*Firmicutes*)为第一和第二大优势菌门,它们的相对丰度分别为18.16%、21.23%和4.46%、6.28%,其中OC组的拟杆菌门相对丰度有显著高于OH组的趋势($P=0.075$)。OC组的未命名细菌门(*bacteria_noname*)、疣微菌门(*Verrucomicrobia*)、浮霉菌门(*Planctomycetes*)、圣诞岛盐菌门(*Kiritimatiellaota*)、酸杆菌门(*Acidobacteria*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)、黏胶球形菌门(*Lentisphaerae*)和放线菌门(*Actinobacteria*)相对丰度显著高于OH组($P\leq 0.05$),而其丝状杆菌门(*Fibrobacteres*)相对丰度有显著低于OH组的趋势($P=0.096$)。

在属水平上(表5),除了未分类细菌属(*bacteria_unclassified*)外,两组均以普雷沃氏菌属(*Prevotella*)和拟杆菌属(*Bacteroides*)为第一和第二大优势菌属,它们的相对丰度分别为28.92%、31.03%和6.22%、6.06%。与OH组相比较,OC组的未命名细菌属(*bacteria_noname*)相对丰度显著增加($P=0.031$),未命名黏胶球形菌属(*Lentisphaerae_noname*)相对丰度有显著升高的趋势($P=0.071$),而其丝状杆菌属(*Fibrobacter*)相对丰度有显著降低的趋势($P=0.069$)。其余菌属在两组间差异不显著($P>0.05$)。

在种水平上(表6),除了未分类细菌(*Unclassified_Bacteria*)外,两组均以栖瘤胃普雷沃氏菌(*Prevotella_ruminicola*)和未分类普雷沃氏菌(*Prevotella_unclassified*)为优势菌种,其相对丰度分别为7.71%、7.36%和3.96%、4.25%。OC组的普雷沃氏菌_sp._lc2012(*Prevotella_sp._lc2012*)相对丰度有显著高于OH组的趋势($P=0.065$)。

表 4 燕麦干草和燕麦草块对瘤胃菌群门水平相对丰度的影响

Table 4 Effects of oat hay and oat cube on the relative abundance of rumen microflora at phylum level (%)

项目 Item	处理组 Treatment		均值标准误 Standard error of mean (SEM)	P 值 P-value
	干草组 Oat hay (OH)	草块组 Oat cube (OC)		
未分类细菌门 Bacteria_unclassified	71.78a	66.26b	2.32	0.038
拟杆菌门 Bacteroidetes	18.16a	21.23a	1.55	0.075
厚壁菌门 Firmicutes	4.46a	6.28a	1.18	0.152
变形菌门 Proteobacteria	1.38a	1.47a	0.22	0.676
未命名细菌门 Bacteria_noname	0.95b	1.53a	0.16	0.004
丝状杆菌门 Fibrobacteres	1.53a	0.53a	0.54	0.096
黏胶球形菌门 Lentisphaerae	0.35b	0.67a	0.14	0.050
疣微菌门 Verrucomicrobia	0.24b	0.41a	0.05	0.010
放线菌门 Actinobacteria	0.17b	0.22a	0.02	0.050
螺旋体门 Spirochaetes	0.15a	0.20a	0.03	0.165
浮霉菌门 Planctomycetes	0.13b	0.22a	0.03	0.018
柔壁菌门 Tenericutes	0.09a	0.19a	0.06	0.122
Candidatus Melainabacteria	0.10a	0.07a	0.03	0.379
Candidatus Saccharibacteria	0.06a	0.07a	0.03	0.652
圣诞岛盐菌门 Kiritimatiellaota	0.04b	0.08a	0.01	0.019
梭杆菌门 Fusobacteria	0.05a	0.05a	0.02	0.919
酸杆菌门 Acidobacteria	0.04b	0.06a	0.01	0.030
绿弯菌门 Chloroflexi	0.04b	0.06a	0.01	0.031
衣原体门 Chlamydiae	0.03a	0.04a	0.01	0.485
蓝藻 Cyanobacteria	0.03a	0.03a	0.01	0.360
其他 Others	0.22a	0.33a	0.05	0.057

种水平相对丰度排名前 10% 的差异显著菌种中(图 2), OH 组的未分类丝状杆菌属(*Fibrobacter unclassified*)、丝状杆菌属_sp._UWB7(*Fibrobacter_sp._UWB7*)、丝状杆菌属_sp._UWB16(*Fibrobacter_sp._UWB16*)、丝状杆菌属_sp._UWB3(*Fibrobacter_sp._UWB3*)、固氮螺菌属_sp._CAG:260(*Azospirillum_sp._CAG:260*)、普雷沃氏菌属_sp._P3-120(*Prevotella_sp._P3-120*)和蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*)显著高于 OC 组($P \leq 0.05$); OC 组的 *Oribacterium_sp._C9*、*Armatimonadetes_bacterium_C...G2_30_66_41*、*Uncultured_bacterium_fosmid_pJB102C1*、亮黄黑肠球菌(*E. luteus*)、瘤胃杆菌属_sp._RM87(*Ruminobacter_sp._RM87*)、*Pseudoclostridium_thermosuccinogenes*、梭状芽胞杆菌属_sp._CAG:524(*Clostridium_sp._CAG:524*)、梭状芽胞杆菌属_sp._CAG:1000 (*Clostridium_sp._CAG:1000*)、*Armatimonadetes_bacterium_C...G2_30_59_28*、*A. axanthum*、*Firmicutes_bacterium_CAG:460*、*uncultured_bacterium_fosmid_pJB16B1* 和淡红地深线状菌(*G. rubicundum*)显著高于 OH 组($P \leq 0.05$)。

2.5 瘤胃发酵参数与种和属水平相对丰度排名前 10 细菌的相关关系

总挥发性脂肪酸与未命名细菌属($r=0.660, P=0.027$)和细菌_P3($r=0.638, P=0.035$)相对丰度呈显著正相关,乙酸与未命名普雷沃氏菌科($r=0.627, P=0.039$)和 *Prevotellaceae_bacterium_MN60*($r=0.752, P=0.008$)相对丰度呈显著或极显著正相关而与细菌_P3($r=-0.642, P=0.033$)相对丰度呈显著负相关,丙酸与细菌_P3($r=0.647, P=0.031$)相对丰度呈显著正相关,乙酸/丙酸与 *Prevotellaceae_bacterium_MN60*($r=0.699, P=0.017$)相对丰度呈显著正相关,氨态氮与另枝菌属($r=-0.752, P=0.008$)相对丰度呈极显著负相关(图 3)。

表5 燕麦干草和燕麦草块对瘤胃菌群属水平相对丰度的影响

Table 5 Effects of oat hay and oat cube on the relative abundance of rumen microflora at genus level (%)

项目 Item	处理组 Treatment		均值标准误 Standard error of mean (SEM)	P值 P-value
	干草组 Oat hay (OH)	草块组 Oat cube (OC)		
未分类细菌属 <i>Unclassified_Bacteria</i>	36.15a	28.93b	2.58	0.019
普雷沃氏菌属 <i>Prevotella</i>	28.92a	31.03a	2.82	0.472
拟杆菌属 <i>Bacteroides</i>	6.22a	6.06a	0.45	0.733
未命名细菌属 <i>Bacteria_noname</i>	2.95b	4.85a	0.76	0.031
未命名拟杆菌目 <i>Bacteroidales_noname</i>	2.42a	2.43a	0.77	0.988
未命名普雷沃氏菌科 <i>Prevotellaceae_noname</i>	1.75a	2.01a	0.25	0.315
丝状杆菌属 <i>Fibrobacter</i>	2.05a	0.75a	0.64	0.069
另枝菌属 <i>Alistipes</i>	1.44a	1.28a	0.22	0.461
未命名拟杆菌属 <i>Bacteroidetes_noname</i>	1.06a	0.76a	0.48	0.538
未命名黏胶球形菌属 <i>Lentisphaerae_noname</i>	0.64a	1.08a	0.21	0.071
未命名厚壁菌属 <i>Firmicutes_noname</i>	0.60a	0.97a	0.29	0.227
梭状芽孢杆菌属 <i>Clostridium</i>	0.62a	0.85a	0.15	0.172
副普雷沃氏菌属 <i>Paraprevotella</i>	0.66a	0.67a	0.21	0.963
副拟杆菌属 <i>Parabacteroides</i>	0.61a	0.65a	0.23	0.108
异普雷沃氏菌属 <i>Alloprevotella</i>	0.50a	0.65a	0.14	0.310
未命名毛螺菌科 <i>Lachnospiraceae_noname</i>	0.40a	0.60a	0.12	0.134
瘤胃球菌属 <i>Ruminococcus</i>	0.40a	0.51a	0.13	0.461
解琥珀酸菌属 <i>Succiniclasticum</i>	0.40a	0.48a	0.17	0.668
琥珀酸弧菌属 <i>Succinivibrio</i>	0.44a	0.42a	0.16	0.900
未命名瘤胃菌科 <i>Ruminococcaceae_noname</i>	0.32a	0.52a	0.16	0.208
其他 Others	11.44a	14.50a	0.16	0.078

3 讨论

3.1 燕麦干草加工对绵羊瘤胃发酵参数的影响

反刍动物的瘤胃发酵参数是衡量瘤胃消化功能、健康状况以及内环境稳定性的重要指标。其中pH可以直观反映瘤胃的健康状况,通常瘤胃pH为5.0~7.5。饲料的物理结构影响瘤胃pH。已有研究表明,颗粒型全混合日粮(Total mixed ration, TMR)饲料显著降低绵羊瘤胃pH^[11],但当TMR中粗饲料长度在4~8 cm时不影响奶牛的瘤胃pH^[12]。本试验OH组和OC组绵羊瘤胃pH接近(分别为7.09和7.04)且均在正常范围内。这一方面与草块加工时粉碎粒度(3~5 cm)^[8]较长有关,另一方面与采食草块后绵羊的反刍时间显著延长有关。作者团队在前期研究中,通过观测反刍行为时发现绵羊采食燕麦草块的反刍时间较采食燕麦干草增加了14.72%(506.67 vs. 581.25 min·d⁻¹)^[8]。因为反刍时间的有效增加促进了唾液分泌,增强了瘤胃的缓冲能力,进而稳定了瘤胃pH。

瘤胃VFA是反刍动物瘤胃的主要发酵产物。沈振峰等^[13]研究表明,苜蓿干草粉碎粒度(2.36~12.50 mm)对羔羊体外发酵参数没有影响。同样地,本试验OH和OC两组绵羊瘤胃总挥发性脂肪酸及其各组分含量无显著差异。瘤胃NH₃-N浓度在一定程度上反映瘤胃对氮的消化能力,瘤胃微生物生长需要的最适NH₃-N浓度为6.3~27.5 mg·dL⁻¹^[14]。本试验两个处理组的NH₃-N浓度均在正常范围内。有研究表明,瘤胃NH₃-N浓度与饲料粒度呈正相关^[15]。王梓凡等^[8]的研究表明,OC组与OH组燕麦干草的粉碎粒度不同,分别平均为3.55和36.24 cm,本研究中两个处理组产生的NH₃-N浓度却没有显著差异(7.12 vs. 6.15 mg·dL⁻¹),究其原因可能是OC组绵羊通过采食摄入的粗蛋白质数量显著高于OH组。

表 6 燕麦干草和燕麦草块对瘤胃菌群种水平相对丰度的影响

Table 6 Effects of oat hay and oat cube on the relative abundance of rumen microflora at species level (%)

项目 Item	处理组 Treatment		均值标准误 Standard error of mean (SEM)	P 值 P-value
	干草组 Oat hay (OH)	草块组 Oat cube (OC)		
未分类细菌 <i>Unclassified_Bacteria</i>	31.58a	24.56b	2.44	0.017
栖瘤胃普雷沃氏菌 <i>Prevotella_ruminicola</i>	7.71a	7.36a	1.89	0.858
未分类普雷沃氏菌 <i>Prevotella_unclassified</i>	3.96a	4.25a	0.34	0.422
普雷沃氏菌_sp._ne3005 <i>Prevotella_sp._ne3005</i>	2.10a	2.70a	0.63	0.359
普雷沃氏菌_sp._tc2-28 <i>Prevotella_sp._tc2-28</i>	2.05a	2.22a	0.36	0.639
细菌_P3 <i>Bacterium_P3</i>	1.34a	2.77a	0.86	0.124
普雷沃氏菌_sp._tf2-5 <i>Prevotella_sp._tf2-5</i>	1.35a	2.03a	0.48	0.191
<i>Bacteroidales_bacterium_WCE2004</i>	1.32a	1.21a	0.74	0.880
<i>Prevotellaceae_bacterium_MN60</i>	1.12a	1.15a	0.19	0.839
普雷沃氏菌_sp._MA2016 <i>Prevotella_sp._MA2016</i>	1.02a	1.00a	0.18	0.934
<i>Prevotellaceae_bacterium_HUN156</i>	0.89a	1.05a	0.12	0.218
未分类拟杆菌 <i>Bacteroides_unclassified</i>	0.96a	0.96a	0.09	0.958
普雷沃氏菌_brevis <i>Prevotella_brevis</i>	0.90a	1.01a	0.10	0.287
普雷沃氏菌_sp._BP1-148 <i>Prevotella_sp._BP1-148</i>	0.87a	0.82a	0.11	0.671
普雷沃氏菌_sp._P6B4 <i>Prevotella_sp._P6B4</i>	0.73a	0.82a	0.23	0.703
普雷沃氏菌_sp._P6B1 <i>Prevotella_sp._P6B1</i>	0.72a	0.73a	0.20	0.955
<i>Bacterium_P201</i>	0.66a	0.74a	0.11	0.464
普雷沃氏菌_sp._BP1-145 <i>Prevotella_sp._BP1-145</i>	0.74a	0.64a	0.10	0.314
<i>Bacteroidales_bacterium_WCE2008</i>	0.67a	0.64a	0.16	0.845
普雷沃氏菌_sp._lc2012 <i>Prevotella_sp._lc2012</i>	0.50a	0.74a	0.11	0.065
其他 Others	38.82a	42.59a	2.87	0.218

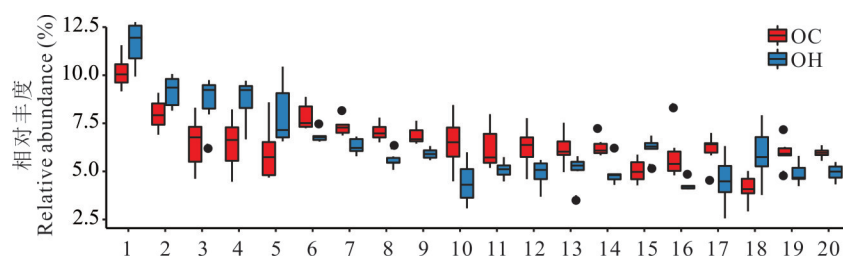


图 2 种水平相对丰度排名前 10% 的瘤胃细菌物种差异分析

Fig. 2 Differential analysis of top 10% highly abundance of rumen microflora at species level

1: 未分类丝状杆菌属 *Fibrobacter unclassified*; 2: 丝状杆菌属_sp._UWB7 *Fibrobacter_sp._UWB7*; 3: 丝状杆菌属_sp._UWB16 *Fibrobacter_sp._UWB16*; 4: 丝状杆菌属_sp._UWB3 *Fibrobacter_sp._UWB3*; 5: 固氮螺菌属_sp._CAG:260 *Azospirillum_sp._CAG:260*; 6: *Oribacterium_sp._C9*; 7: *Armatimonadetes_bacterium_C...G2_30_66_41*; 8: *Uncultured_bacterium_fosmid_pJB102C1*; 9: 亮黄黑肠球菌 *Ereborglobus luteus*; 10: 瘤胃杆菌属_sp._RM87 *Ruminobacter_sp._RM87*; 11: *Pseudoclostridium_thermosuccinogenes*; 12: 梭状芽胞杆菌属_sp._CAG:524 *Clostridium_sp._CAG:524*; 13: 梭状芽胞杆菌属_sp._CAG:1000 *Clostridium_sp._CAG:1000*; 14: *Armatimonadetes_bacterium_C...G2_30_59_28*; 15: 普雷沃氏菌属_sp._P3-120 *Prevotella_sp._P3-120*; 16: *Acholeplasma axanthum*; 17: *Firmicutes_bacterium_CAG:460*; 18: 蜡样芽孢杆菌 *Bacillus cereus*; 19: *Uncultured_bacterium_fosmid_pJB16B1*; 20: 淡红地深线状菌 *Geofilum rubicundum*.

3.2 燕麦干草加工对绵羊瘤胃微生物组成的影响

瘤胃微生物组成是影响瘤胃功能的重要因素。饲粮类型、加工方式和饲喂管理模式等都会影响瘤胃微生物多样性及其组成^[16]。粗饲料长度通过影响接触面积影响瘤胃微生物多样性,而且较低水平非纤维性碳水化合物/

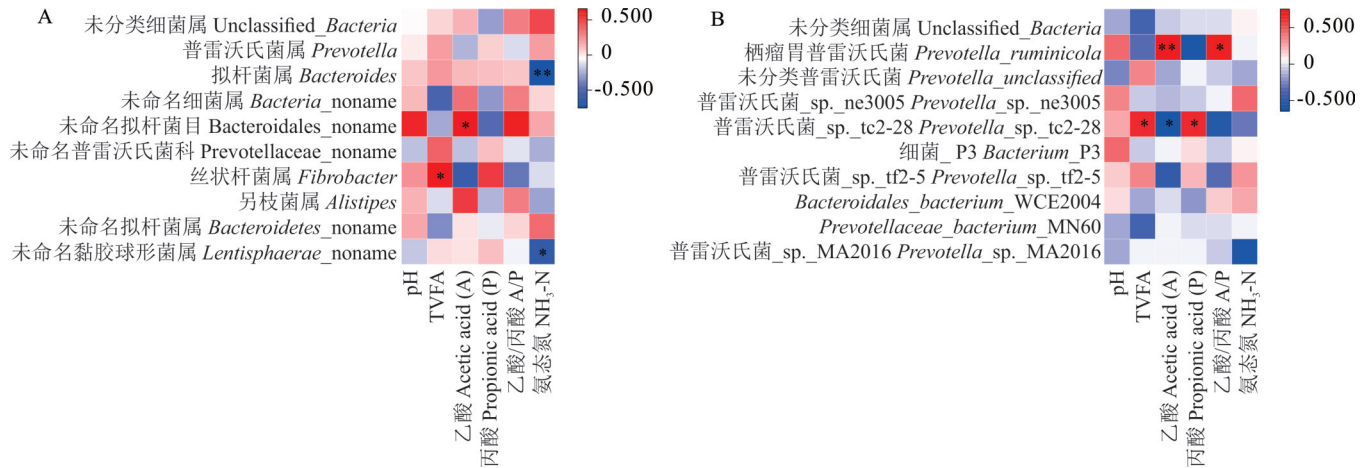


图3 瘤胃发酵参数与种和属水平相对丰度排名前10细菌的相关关系

Fig. 3 Correlation between rumen fermentation parameters and top 10 highly relative abundances of bacterial community at genus and species levels

A: 属水平 At genus level; B: 种水平 At species level. TVFA: 总挥发性脂肪酸 Total volatile fatty acid. 每一对变量之间的相关强度用不同着色和*表示。红色表示正相关, 蓝色表示负相关。The correlation strength between each pair of variables was represented by color and *. The red color represented a positive correlation, and the blue color represented a negative correlation; *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

中性洗涤纤维 (non-fibrous carbohydrate/neutral detergent fiber, NFC/NDF) 可促进瘤胃有益菌定殖。Liu等^[17]和李蒋伟等^[18]研究发现, 与较高水平 NFC/NDF (1.36~2.20) 相比较, 低水平 NFC/NDF (0.52~0.92) 使藏羊瘤胃细菌多样性显著增加。由此可见, 本试验燕麦草块显著提高了绵羊的瘤胃微生物多样性, 一方面主要是因为草块粒度较小, 增大了与瘤胃微生物接触的相对表面积, 有利于微生物定殖; 另一方面是因为 OC 组绵羊摄入的 NFC/NDF 水平较 OH 组绵羊摄入的 NFC/NDF 降低 9.16%^[8]。

拟杆菌门和厚壁菌门是反刍动物瘤胃微生物中两大优势菌门。本试验中, 燕麦干草加工成草块后对绵羊瘤胃前两大优势菌门没有产生影响, OC 和 OH 组仍以拟杆菌门和厚壁菌门为绝对优势菌门, 但与 OH 组相比较, OC 组拟杆菌门普雷沃氏菌_sp._lc2012 和黏胶球形菌门未命名黏胶球形菌属相对丰度有显著升高的趋势, 疣微菌门相对丰度显著增加。已知, 拟杆菌门的主要菌属普雷沃氏菌属是反刍动物分解蛋白质和植物细胞壁多糖、产生短链脂肪的主要菌之一, 但不能降解纤维素^[19]; 黏胶球形菌和疣微菌均参与多糖的代谢^[20-21]。所以, 燕麦草块在加工过程中经过切割、粉碎处理使得植物细胞壁结构被破坏, 更易于拟杆菌、黏胶球形菌和疣微菌对碳水化合物进行降解和利用, 大量碳架底物的供给使三者快速增殖。马秀花等^[22]通过在荞麦 (*Fagopyrum esculentum*) 秸秆饲料中添加甘露寡糖使滩羊瘤胃拟杆菌门和黏胶球形菌门相对丰度增加; 王胜男等^[23]在基础饲料中添加岩藻多糖使羔羊瘤胃疣微菌门相对丰度显著提高。丝状杆菌门丝状杆菌属是反刍动物瘤胃降解木质纤维素的主要细菌^[24], 其菌群丰度与饲料纤维含量呈正相关^[25]。木质素含量高的饲草显著增加荷斯坦公牛瘤胃丝状杆菌相对丰度^[26]。本试验中, 燕麦草块在粉碎过程中干草的长纤维变成了短纤维, 同时高温压缩使木质素软化^[27], 易于家畜消化利用, 而造成 OC 组丝状杆菌门丝状杆菌属相对丰度有降低的趋势。放线菌对分解木质素和纤维素具有重要作用^[28]。较高水平纤维组分的摄入, 增加了 OC 组绵羊的瘤胃发酵底物, 促进了放线菌等纤维素分解菌群的活动和增殖, 所以 OC 组放线菌门相对丰度较 OH 组增加了 29.41%。

4 结论

在前期研究团队开展的燕麦干草和燕麦草块对绵羊采食行为和性能影响的基础上, 本试验继续分析了瘤胃发酵和微生物组成变化, 发现燕麦草块对反刍动物瘤胃发酵特性没有不良影响, 且能维持瘤胃内环境稳定, 显著增加了绵羊瘤胃微生物多样性, 并提高了瘤胃菌群中分解多糖的拟杆菌门、黏胶球形菌门、疣微菌门和未命

名黏胶球形菌属的相对丰度,而降低了分解纤维物质的丝状杆菌门和丝状杆菌属的相对丰度,优化瘤胃微生物组成。该结果进一步肯定了燕麦草块适合在牛羊等反刍动物养殖中的应用。

参考文献 References:

- [1] Yang H P. Species and retrieval of oats in China. Beijing: Agricultural Press, 1989.
杨海鹏. 我国燕麦属内的种及其检索. 北京: 农业出版社, 1989.
- [2] Jing F, Nan M, Liu Y M, *et al.* Effects of variety and planting density on yield, quality and disease of forage oat. *Acta Agrestia Sinica*, 2023, 31(10): 3174–3184.
景芳, 南铭, 刘彦明, 等. 品种和种植密度对燕麦饲草产量、品质和病害的影响. *草地学报*, 2023, 31(10): 3174–3184.
- [3] Zhou Q P, Hu X W, Wang H, *et al.* The important role of oat in reinforcing the foundation of food security. *Acta Prataculturae Sinica*, 2024, 33(10): 171–182.
周青平, 胡晓炜, 汪辉, 等. 燕麦在维护国家粮食安全中的重要作用. *草业学报*, 2024, 33(10): 171–182.
- [4] Zhou Y L, Du S, Liu H, *et al.* Effect of pellet feeding system on growth performance, carcass characteristics and meat quality in Wuzhumuqin lamb. *Chinese Journal of Grassland*, 2019, 41(3): 173–178.
周玉雷, 都帅, 刘昊, 等. 天然牧草干草和草颗粒对乌珠穆沁羔羊生产性能、屠宰性能和肉品质的影响. *中国草地学报*, 2019, 41(3): 173–178.
- [5] Ishaq S L, Lachman M M, Wenner B A, *et al.* Pelleted-hay alfalfa feed increases sheep wether weight gain and rumen bacterial richness over loose-hay alfalfa feed. *PLoS One*, 2019, 14(6): e0215797.
- [6] Zhang X Q, Jin Y M, Yin F X, *et al.* Effects of nettle cube diet on rumen bacterial community structure, fermentation parameters and growth performance of Tibetan sheep. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2022, 34(3): 1683–1693.
张晓庆, 金艳梅, 尹凤旭, 等. 荨麻草块饲料对藏系绵羊瘤胃细菌群落结构、发酵参数及生长性能的影响. *动物营养学报*, 2022, 34(3): 1683–1693.
- [7] Tang X L. Effectiveness of feeding alfalfa cubes to dairy cows. *China Dairy Cattle*, 2005(6): 30–31.
汤孝禄. 奶牛饲喂苜蓿草块的效果. *中国奶牛*, 2005(6): 30–31.
- [8] Wang Z F, Zhang X Q, Zhong Z M, *et al.* Effects of oat hay and oat cubes on feeding behavior and production performance of Pengbo semi-fine wool sheep. *Acta Prataculturae Sinica*, 2023, 32(5): 171–179.
王梓凡, 张晓庆, 钟志明, 等. 燕麦草捆和草块对彭波半细毛羊采食行为及生产性能的影响. *草业学报*, 2023, 32(5): 171–179.
- [9] Feng Z C, Gao M. Improvement of the method for determining ammonia nitrogen content in rumen fluid by colorimetry. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2010, 31(Z1): 37.
冯宗慈, 高民. 通过比色测定瘤胃液氨氮含量方法的改进. *畜牧与饲料科学*, 2010, 31(Z1): 37.
- [10] Zhang L Y. Feed analysis and quality inspection technology. Beijing: Beijing Kasetsart University Press, 2022.
张丽英. 饲料分析及饲料质量检测技术. 北京: 中国农业大学出版社, 2022.
- [11] Trabi E B, Seddik H, Xie F, *et al.* Comparison of the rumen bacterial community, rumen fermentation and growth performance of fattening lambs fed low-grain, pelleted or non-pelleted high grain total mixed ration. *Animal Feed Science and Technology*, 2019, 253(5): 1–12.
- [12] Zeng Y, He M, Cao Z J, *et al.* Effects of roughage particle size of TMR on chewing activity and rumen fermentation in dairy cows. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2010, 22(6): 1571–1578.
曾银, 贺鸣, 曹志军, 等. 全混合日粮中粗饲料长度对奶牛咀嚼行为和瘤胃发酵的影响. *动物营养学报*, 2010, 22(6): 1571–1578.
- [13] Shen Z F, Wang J, Xu J F, *et al.* Effects of different particle size alfalfa hay on *in vitro* fermentation characteristics and microbial population of lambs. *China Feed*, 2024, 21(9): 136–142.
沈振峰, 王静, 徐建风, 等. 不同苜蓿干草粒度饲料对羔羊体外发酵特征和微生物数量的影响. *中国饲料*, 2024, 21(9): 136–142.
- [14] Ortega M E, Stern M D, Satter L D. The effect of rumen ammonia concentration on dry matter disappearance *in situ*. *Journal of Dairy Science*, 1979, 62(1): 76.
- [15] Einarson M S, Plaizier J C, Wittenberg K M. Effects of barley silage chop length on productivity and rumen conditions of lactating dairy cows fed a total mixed ration. *Journal of Dairy Science*, 2004, 87(9): 2987–2996.

- [16] Newbold C J, Ramos-Morales E. Ruminal microbiome and microbial metabolome: effects of diet and ruminant host. *Animal*, 2020, 14(S1): 78–86.
- [17] Liu C, Wu H, Liu S, *et al.* Dynamic alterations in yak rumen bacteria community and metabolome characteristics in response to feed type. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10(5): 1116.
- [18] Li J W, Zhou L, Ma B Y, *et al.* Effects of dietary non fibrous carbohydrate/neutral detergent fiber on rumen fermentation parameters and flora structure of Tibetan sheep. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 2022, 40(2): 253–259, 275.
李蒋伟, 周力, 马博研, 等. 饲料非纤维性碳水化合物/中性洗涤纤维对藏羊瘤胃发酵参数及菌群结构的影响. *四川农业大学学报*, 2022, 40(2): 253–259, 275.
- [19] Feng Y L. Nutrition of ruminants. Beijing: Science Press, 2004: 5.
冯仰廉. 反刍动物营养学. 北京: 科学出版社, 2004: 5.
- [20] Cho J C, Vergin K L, Morris R M, *et al.* *Lentisphaera araneosa* gen. nov, sp. nov, a transparent exopolymer producing marine bacterium, and the description of a novel bacterial phylum, Lentisphaerae. *Environmental Microbiology*, 2004, 6(6): 611–621.
- [21] Martinez-Garcia M, Brazel D M, Swan B K, *et al.* Capturing single cell genomes of active polysaccharide degraders: an unexpected contribution of *Verrucomicrobia*. *PLoS One*, 2012, 7(4): e35314.
- [22] Ma X H, Gui R Q, Jiao N, *et al.* Effect of mannan oligosaccharides on rumen bacterial flora structure of *Tan* sheep under buckwheat straw diet condition. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2021, 33(4): 2365–2377.
马秀花, 桂瑞麒, 焦娜, 等. 荞麦秸秆饲料条件下甘露寡糖对滩羊瘤胃菌群结构的影响. *动物营养学报*, 2021, 33(4): 2365–2377.
- [23] Wang S N, Yang W G, Yin F Q. Effects of fucoidan on rumen microflora and metabolomics of weaned lambs. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2023, 35(3): 1827–1840.
王胜男, 杨伟光, 尹福泉. 岩藻多糖对断奶羔羊瘤胃微生物区系及代谢组学的影响. *动物营养学报*, 2023, 35(3): 1827–1840.
- [24] Ransom-Jones E, Jones D L, Edwards A, *et al.* Distribution and diversity of members of the bacterial phylum Fibrobacteres in environments where cellulose degradation occurs. *Systematic and Applied Microbiology*, 2014, 37(7): 502–509.
- [25] Prajapati V S, Purohit H J, Raje D V, *et al.* The effect of a high-roughage diet on the metabolism of aromatic compounds by rumen microbes: a metagenomic study using Mehsani buffalo (*Bubalus bubalis*). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(3): 1319–1331.
- [26] Gharechahi J, Vahidi M F, Ding X Z, *et al.* Temporal changes in microbial communities attached to forages with different lignocellulosic compositions in cattle rumen. *FEMS Microbiology Ecology*, 2020, 96(6): 6.
- [27] Bao H X, Sagues W J, Wang Y G, *et al.* Depolymerization of lignin into monophenolics by ferrous/persulfate reagent under mild conditions. *ChemSusChem*, 2020, 13(24): 6582–6593.
- [28] Wang C, Dong D, Wang H S, *et al.* Metagenomic analysis of microbial consortia enriched from compost: new insights into the role of Actinobacteria in lignocellulose decomposition. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9(1): 22.