

微生物生态制剂与反刍动物甲烷减排

刘凯珍 王继文 周美丽 王禄禄 王立志*

(四川农业大学动物营养研究所 四川省教育厅牛低碳养殖与安全生产重点实验室 四川 雅安 625014)

摘要: 反刍动物瘤胃中产甲烷菌可以利用氢气、甲醇和甲胺等物质生成甲烷, 不仅造成饲料能量的浪费, 同时甲烷作为一种主要的温室气体也对环境构成了严重的威胁。因此, 众多学者都在寻找降低反刍动物甲烷排放的方法, 其中有学者提出在饲料中添加适量可直接饲喂的微生物(Direct-fed microbes, DFM)是一种很有潜力的方法, 但目前还处于初步探索阶段。本文综述了几种重要的 DFM, 并介绍了其作用机制及应用效果。

关键词: 甲烷, 微生物生态制剂, 瘤胃, 生化通路

Direct-fed microbes and reduction of enteric methane emissions from ruminants

LIU Kai-Zhen WANG Ji-Wen ZHOU Mei-Li WANG Lu-Lu WANG Li-Zhi*

(Institute of Animal Nutrition, Sichuan Agricultural University, Key Laboratory of Low Carbon Culture and Safety Production in Cattle of Sichuan Education Department, Ya'an, Sichuan 625014, China)

Abstract: Rumen methanogens can generate CH₄ using hydrogen, methanol, methylamine and other substances. CH₄ emissions from ruminants not only cause the dietary gross energy loss, but also have a negative effect on environment. Therefore, many scholars are looking for methods to reduce methane emissions from ruminants. Among the strategies, the use of Direct-fed microbes (DFM) is one possible option to decrease rumen CH₄ emission, which remains in the phase of initial exploration. We review several vital DFMs and the mode of action that can be modulated by the use of DFM, and study on the use of DFM for mitigation of ruminant CH₄ emissions.

Keywords: Methane, Direct-fed Microbes, Rumen, Biochemical pathways

联合国政府间气候变化专门委员会(IPCC)的报告指出, 21 世纪全球温度将上升 1–6 °C, 导致全球变暖的“罪魁祸首”是二氧化碳和甲烷等温室气体的过量排放。其中, 排放量最大的是二氧化碳, 而甲

烷的温室潜能是二氧化碳的 25 倍^[1], 仅甲烷的过量排放就已导致过去 130 年间全球地表平均温度上升了约 0.85 °C^[2]。据估测, 目前全球人为活动排放的甲烷中, 反刍动物瘤胃发酵所占比例约为 25%^[3]。

Foundation item: The International Cooperation Project of Sichuan Provincial Department of Science and Technology (No. 2013HH0043)

*Corresponding author: E-mail: wanglizhi08@aliyun.com

Received: February 24, 2016; **Accepted:** May 26, 2016; **Published online** (www.cnki.net): May 31, 2016

基金项目: 四川省科技厅国际合作项目(No. 2013HH0043)

*通讯作者: E-mail: wanglizhi08@aliyun.com

收稿日期: 2016-02-24; 接受日期: 2016-05-26; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-05-31

为了减少温室气体排放、应对气候变化,国际上先后达成了《联合国气候变化框架公约》和《京都议定书》^[4]。目前,许多国家已认识到家畜在甲烷排放中的作用,并投入大量经费用于研究减排措施。

反刍动物瘤胃内存在大量的微生物,其中产甲烷菌能够利用氢气、甲醇和甲胺等物质生成甲烷。这不仅影响了环境,而且造成日粮总能 5%–9% 的损失。本课题组曾经研究了免疫产甲烷菌 EHAF (一种产甲烷菌的免疫候选蛋白)对山羊甲烷排放的影响^[5],结果显示,EHAF 免疫组的甲烷排放没有显著减少,但是瘤胃中主要产甲烷菌门厚壁菌门和普氏菌门的相对丰度有所改变。另外,改变日粮精粗比,添加不饱和脂肪酸,直接饲喂高脂日粮或添加化学抗生素等均在一定程度上降低了甲烷的生成量。但提高日粮精粗比容易造成动物瘤胃酸中毒,抗生素(如莫能菌素)和卤代化合物(如水合氯醛)的使用容易造成动物产品药物残留,使用不饱和脂肪酸或高脂日粮容易降低动物的采食量和生产性能^[6]。因此这些方法在实际生产中的应用有待于进一步研究。

可以直接饲喂的微生物,是运用微生态学原理研制的含有大量微生物的活菌制剂,可以作为饲料添加剂直接饲喂动物^[7]。目前,DFM 在反刍动物生产中主要用于提高动物生产力、预防瘤胃酸中毒、降低幼龄动物发病率等方面^[8-9]。在反刍动物生产上使用较早、较广泛的 DFM 是乳酸菌和酵母菌等,如由芽孢杆菌、乳酸菌和酵母菌复合而成的“益当宝”,由发酵酵母及其活性培养物复合而成的“溢乳康”等。近来,有学者提出,作为一种无公害的添加剂,DFM 在反刍动物甲烷减排上具有一定的潜能。本文综述了几种重要的 DFM,并介绍了其降低甲烷排放的作用机制及应用效果。

1 甲烷的生成途径及调控

1.1 甲烷的生成途径

反刍动物摄入的饲料首先进入瘤胃,在瘤胃微生物的作用下,纤维素、淀粉和蛋白质等被分解为

挥发性脂肪酸(VFA)、H₂ 和 CO₂ 等物质,然后不同的产甲烷菌利用各自的底物生成甲烷。根据前人的研究,瘤胃中甲烷的生成主要有 3 条生化通路^[10]:

(1) CO₂-H₂ 还原途径:瘤胃中的反刍兽甲烷杆菌和甲烷短杆菌以 CO₂ 和 H₂ 为底物,在一系列酶及辅酶的催化下发生还原反应生成甲烷;(2) VFA 的裂解途径:在反刍动物发酵后期,瘤胃中甲酸、乙酸、丁酸等分解产生甲烷,同时也会生成部分 CO₂ 和 H₂,其中甲酸是产甲烷最多的底物,仅次于 CO₂-H₂ 还原途径;(3) 甲醇和乙醇等甲基化合物分解途径:在反刍动物消化的后期,产甲烷菌利用甲醇和乙醇等甲基化合物生成甲烷。

1.2 甲烷生成的调控

瘤胃中甲烷减排的研究主要是通过调控产甲烷的生成途径来改变甲烷的生成量:(1) 改变日粮精粗比,添加不饱和脂肪酸和有机酸等是通过与产甲烷菌竞争底物来减少甲烷的生成^[11];(2) 莫能菌素和盐霉素等添加剂是通过影响产甲烷菌内部酶的活性来抑制产甲烷菌生成甲烷^[12];(3) 皂苷等植物提取物是通过抑制瘤胃原虫、纤维降解菌和产甲烷菌的毒性作用来降低甲烷的生成^[13];(4) 免疫调控则有针对性地给动物注射某种产甲烷菌的疫苗以达到甲烷减排的目的。DFM 也是通过以上几种机制来改变甲烷的产量,不同的 DFM 通过不同的方法来实现其功能。

2 DFM 在反刍动物甲烷减排上的应用

2.1 酵母菌

酵母菌是反刍动物生产中最常使用的一种 DFM,目前已有许多关于其对瘤胃发酵的影响和作用机制的研究^[14-15]。酵母菌的主要作用是促进有益微生物菌群的建立,进而稳定瘤胃 pH、增加纤维降解率、促进瘤胃发育^[15]。在研究中,有学者还发现活性酵母菌能够促进产乙酸菌的生长,从而消耗瘤胃微生物代谢产生的氢^[16],使产甲烷菌的生长由于缺乏底物氢而受到抑制,这预示着酵母菌具有降低瘤胃甲烷排放的潜能。

酵母菌对瘤胃甲烷减排的体外试验结果不尽一致, 大部分研究表明其能够显著降低甲烷排放。Mutsvangwa 等^[17]和 Lynch 等^[18]体外试验结果均显示酵母菌能够显著降低甲烷排放量。Carro 等^[19]和 Lila 等^[20]的研究结果也表明酵母菌降低了甲烷的排放量, 但均未达到显著水平, 也有少量报道表明酵母菌增加了甲烷的产量^[21]。而在体内试验中, 大多数研究表明酵母菌对甲烷产量没有影响, 如 Mathieu 等^[22]和 Bayat 等^[23]分别对绵羊和奶牛进行了试验, 研究结果均显示酵母菌不能显著降低瘤胃甲烷的产量。虽然也有研究表明酵母菌降低了甲烷产量, 但均未达到显著水平^[24-26]。只有少量动物试验表明酵母菌能够显著降低甲烷排放, 如班志彬等^[27]研究表明活性干酵母显著抑制了草原红牛的甲烷生成。

从理论上分析, 酵母菌是一种很有潜力的阻止甲烷生成的 DFM, 但目前还没有专门针对甲烷减排培育出的菌株, 并且酵母菌在体内试验的结果尚不稳定, 可能是由试验条件、酵母菌株、饲喂剂量、动物品种、动物饲料等不同造成的, 有待进一步研究。

2.2 硝酸盐/亚硝酸盐还原菌

瘤胃中硝酸盐可经过两步还原反应生成氨: 第一步, 硝酸盐还原菌将硝酸盐还原为亚硝酸盐; 第二步, 亚硝酸盐还原菌将亚硝酸盐还原为氨。从理论上讲, 此过程是耗氢过程, 因而促进该通路竞争性抑制产甲烷菌的生长, 从而减少瘤胃中甲烷的生成。但是此通路中硝酸盐还原成亚硝酸盐的速率是亚硝酸盐还原成氨的 2.5 倍, 这会导致瘤胃内亚硝酸盐的积累, 亚硝酸盐被瘤胃壁吸收进入血液时, 血液中的血红蛋白转化为高铁血红蛋白, 高铁血红蛋白浓度升高会引起高铁血红蛋白血症, 导致血液向机体组织运输氧的能力降低, 从而动物抑郁不振, 甚至致死^[28-30]。因此在研究硝酸盐降低瘤胃甲烷排放的同时, 也要防止动物亚硝酸盐中毒。

瘤胃内普遍存在硝酸盐和亚硝酸盐还原菌, 主要的硝酸盐还原菌(产琥珀酸沃廉菌和反刍兽新月

形单胞菌)在瘤胃内浓度均为 10^6 cells/mL^[31]。硝酸盐和亚硝酸盐还原菌与产甲烷菌(10^9 cells/mL)竞争氢气, 当日粮中添加硝酸盐时, 它们的活力会增加^[32]。Iwamoto 等^[33]的体外试验研究表明, 日粮中添加硝酸盐会增加硝酸盐还原菌——产琥珀酸沃廉菌和小韦荣氏球菌的数量, 但增加量可能仍不足以同产甲烷菌竞争。因此, 我们猜测将硝酸盐和亚硝酸盐还原菌作为 DFM 一起使用, 是否可以在提升硝酸盐还原进程的同时预防亚硝酸盐中毒。

在体外试验中, 多数研究表明添加硝酸盐或亚硝酸盐还原菌能显著降低甲烷排放。Anderson 和 Rasmussen^[34]为体外培养的瘤胃内容物接种瘤胃硝酸盐还原菌 *Denitrobacterium detoxificans* NPOH1 菌株, 添加量为 10 mmol/L, 结果发现甲烷产量降低了 95%, 并且没有亚硝酸盐的积聚。但是在缺少 *Denitrobacterium detoxificans* 的情况下, 甲烷产量仅仅减少了 25%, 而且检测到了亚硝酸盐的积聚。在另一个体外试验中, 硝酸盐还原菌产琥珀酸沃廉菌、反刍兽新月形单胞菌或小韦荣氏球菌分别与产甲烷菌混合培养, 当添加 5 mmol/L 硝酸盐后, 甲烷的减排量高于 70%, 差异极显著。相比于添加其他两种硝酸盐还原菌组, 产琥珀酸沃廉菌组甲烷减排量最大, 且在培养底物中只有很少量亚硝酸盐积聚^[28]。体外和体内试验研究表明, 添加一定量的硝酸盐, 亚硝酸盐还原菌大肠埃希菌菌株均能减少甲烷的产生量^[35-36]。

除以上提到的菌种之外, 也有体外试验证明, 当有硝酸盐存在时其它一些菌也能够抑制甲烷的生成。Asanuma 等^[37]从狗的粪便中分离出一种嗜温高效产氢细菌, 带有很高的亚硝酸盐还原活性; Sakthivel 等^[38]从水牛瘤胃中分离出来一种细菌, 以上两种细菌都能缓和瘤胃酸中毒, 向从水牛瘤胃中分离出来的细菌中添加 10 mmol/L 硝酸盐及从水牛瘤胃中分离出来的细菌时, 能较好地抑制甲烷生成, 且对饲料消化率没有负面影响, 但单独添加硝酸盐时尽管甲烷产量降低了 69%, 饲料消化率却也降低了 14%。这两种细菌降低甲烷排放的效果还有

待更多的体内试验来验证。在体内试验研究中, Li 等^[39]用 3% 的硝酸钙替代 1.5% 的尿素, 结果显示降低了甲烷排放; 该研究还表明, 当供给低氮日粮时, 硝酸盐能够代替尿素作为瘤胃微生物蛋白合成的氮源。然而, 硝酸盐/亚硝酸盐还原菌的体内试验相对较少, 并且长期补给硝酸盐会对动物健康和环境产生负面影响, 因此该方法在实际生产上的应用还需进一步研究。

2.3 硫酸盐还原菌

在瘤胃的厌氧环境中, 产甲烷菌和硫酸还原菌 (Sulphate-reducing bacteria, SRB) 既有竞争关系又有互作关系。当瘤胃中富含硫酸盐时, SRB 与产甲烷菌竞争底物氢气、甲酸等。因此, 理论上, SRB 结合硫酸盐的使用能够降低瘤胃中甲烷生成。然而, 瘤胃中缺乏硫酸盐时, SRB 通过产生氢气与产甲烷菌形成互利共生关系, 体现了“种间氢转移”。所以, 降低瘤胃内硫酸盐可能使 SRB 成为氢气的生产者^[40]。

SRB 在瘤胃内的浓度很低 (10^5 – 10^6 cells/mL), 并且主要是脱硫弧菌属和脱硫肠状菌属^[41]。SRB 与产甲烷菌的竞争能力很大程度上取决于瘤胃内的硫酸盐浓度。在动物试验上, 给阉牛饲喂高硫酸盐饲料后没有观察到 SRB 的数量明显增加, 但是它们还原硫酸盐的能力得到了提升^[42]。因此, 在饲喂高硫酸盐饲料时加入适量的 SRB 有助于硫酸盐的还原。有关添加硫酸盐来减低甲烷减排的研究很少^[43], 主要原因是硫酸盐还原的终产物硫化氢具有毒性。然而, SRB 是多功能的微生物, 已有研究表明它们具有瘤胃甲烷减排的特性。体外研究中, 在高硫酸盐日粮中加入一种新鉴定的 SRB——梭杆菌属, 结果显示甲烷排放量降低了, 在 72 h 内每消化 1 g 干物质产生的甲烷从 2.66 mmol 降低到 1.64 mmol, 且没有硫化氢的积累, 同时纤维降解菌的数量也有所增加^[44], 在此研究中没有硫化物积聚的主要原因可能是硫化物迅速被如纤维降解菌等微生物快速利用, 合成了含硫氨基酸^[45]。目前梭杆菌属及其他 SRB 对甲烷生成的影响还需更多的体

内试验来验证。

2.4 丙酸生成菌

反刍动物瘤胃内产生的挥发性脂肪酸主要有乙酸、丙酸和丁酸, 其比例主要取决于动物的日粮, 饲喂高精料比日粮产生的丙酸高于高粗料日粮, 而产生的乙酸则相反。丙酸能够消耗氢气, 而氢气是甲烷生产的主要前体物, 因此理论上丙酸产量的增加会降低甲烷的生成。在瘤胃内, 丙酸通过琥珀酸和丙烯酸两条途径生成: 以琥珀酸途径为主, 这条途径的中间产物有苹果酸、延胡索酸和琥珀酸等, 并且涉及到一些微生物, 乳酸生成菌 (如牛链球菌)、乳酸利用菌 (如反刍兽新月形单胞菌)、延胡索酸还原菌 (如产琥珀酸沃廉菌)、琥珀酸生产菌 (如产琥珀酸丝状杆菌) 和琥珀酸利用菌 (如反刍兽新月形单胞菌); 丙烯酸路径是另一条重要的产丙酸路径, 埃氏巨球形菌是此路径的主要乳酸利用菌^[46], 乳酸缺乏时, 埃氏巨球形菌利用葡萄糖产生乙酸和丁酸, 但不会产生丙酸^[47]。因此, 乳酸生成菌如牛链球菌在此路径起管制者的作用。瘤胃内利用乳酸的其他菌还有反刍兽新月形单胞菌、丙酸杆菌属等, 但体外^[48]和体内^[49]研究表明埃氏巨球形菌是此通路中的关键菌。有研究表明将埃氏巨球形菌作为 DFM 饲喂牛, 瘤胃发酵模式将转为丙酸生成型模式, 利于能量平衡和动物生产^[50-51]。Hino 等^[47]研究也表明乳酸产生菌和埃氏巨球形菌结合使用能增加丙酸生成。

以往研究 DFM 时, 研究者们通常把丙酸生成通路作为瘤胃内的主要生化通路来探索^[52], 并且认为丙酸杆菌属和乳酸杆菌属主要用来提高动物生产力^[8,53]; 在饲喂高精料饲料时, 埃氏巨球形菌、丙酸杆菌属和乳酸杆菌属用于预防瘤胃酸中毒^[9,51], 乳酸杆菌属还可以用于降低幼年动物的发病率, 但上述研究均未检测甲烷产量。最近有专利显示给奶牛日粮中添加詹氏丙酸菌和乳酸杆菌属混合的 DFM 能降低甲烷排放^[54], 该研究表明这是一种行之有效的降低甲烷排放的方法, 但尚需大量的体内试验来证实。

2.5 甲基营养菌

甲基营养菌是能够利用一碳有机物如甲醇、甲胺等作为碳源的一类微生物, 与产甲烷菌竞争底物。一些甲基营养菌是甲烷氧化菌, 能够通过利用甲烷来防止其排出。因此, 研究其相关代谢通路可能为瘤胃甲烷减排提供一种新的生物控制方法。

甲基营养菌在瘤胃菌群中的相对丰度较低(0.2%–0.5%)^[55], 一般很难被检测到, 因此其在瘤胃中的作用往往被忽略。在一个克隆文库中(以粘附在瘤胃上皮的细菌群落为样品构建的)鉴定出甲基营养菌的克隆基因, 它与亚硝化单胞菌属有密切的关系^[56]。亚硝化单胞菌属都是氨氧化菌, 可能在某些条件下氧化甲烷^[57-58]。因此, 瘤胃壁上的亚硝化单胞菌属可能与甲烷氧化有关, 但并不能检测到它在瘤胃上皮细胞上稳定存在, 这表明它们只是较小的一部分或只是偶然才出现^[59]。

在一些甲基营养菌的研究上, 有报道表明, 在几个瘤胃样本的克隆文库中大量存在疣微菌门菌^[60-61]。尽管它们在瘤胃内的作用尚不清楚, 但已经在非瘤胃环境中发现一些疣微菌门能够氧化甲烷, 并将甲烷作为唯一的碳源和能量来源^[62], 而关于疣微菌门能否在瘤胃内氧化甲烷还未见报道。Klieve 等^[63]对牛瘤胃内与甲烷氧化古菌相关的基因进行了鉴定, 结果表明, 虽然瘤胃内营养丰富、流速高, 但是并没有检测到甲烷氧化古菌的基因。

同样, 利用甲醇和甲胺的甲基营养菌也能减少甲烷生成, 甲醇和甲胺是瘤胃产甲烷菌的底物, 在某些情况下也是唯一的底物。例如, 甲烷球形菌属的产甲烷菌生长需要甲醇^[64], 而甲烷微球菌属生长需要甲醇或者甲胺^[65]。甲烷八叠球菌属利用甲醇和甲胺作为底物, 尽管甲醇和甲胺不是它们的必需物质^[66], 但甲醇也能被同型产乙酸菌利用, 从而减少甲烷产量^[67]。除了产乙酸菌, 还没有瘤胃内其他甲基营养菌能降低甲烷排放的报道。因此, 从甲基营养菌出发来研究甲烷减排有很大的潜能。

2.6 纤维降解菌

瘤胃纤维降解菌的主要作用是降解纤维, 其中主要有产琥珀酸丝状杆菌, 产生的琥珀酸可以增加丙酸的生成, 与产甲烷菌竞争氢; 而瘤胃球菌属主要产生乙酸, 增加了氢气的产量。把产氢量少的菌当作 DFM 使用可以减少甲烷的生成, 并且不会影响纤维降解能力, 尤其是以粗料为主的动物。有研究报道, 给无菌饲养的羔羊接种产琥珀酸丝状杆菌, 使其作为唯一的纤维降解菌, 与接种瘤胃球菌属相比, 产氢量更少。同样, 给羔羊接种产琥珀酸丝状杆菌后, 取其瘤胃内容物进行体外试验, 其甲烷产量也减少了^[68]。然而纤维降解微生物如产琥珀酸丝状杆菌已经在瘤胃内大量存在, 因此把纤维降解菌作为 DFM 使用不会提升纤维消化力^[69]。

2.7 产抑菌物质的细菌

有研究表明, 一些微生物能够抑制产甲烷菌的活性。例如, 产乳酸菌产生的细菌素^[70-72]。乳酸链球菌产生的乳酸链球菌肽可以控制致病细菌的生长, 已被广泛用于食品产业中。体外试验研究显示, 乳酸链球菌肽的甲烷减排量多达 20%, 且对 VFA 生成没有负面影响^[73-74]。然而乳酸链球菌肽易受瘤胃蛋白酶的影响, 这也限制了其在体内的使用^[75]。在体外试验中, 植物乳杆菌的培养液减少了 18% 的甲烷产量^[70], 而 Asa 等^[72]报道, 另外一个植物乳杆菌菌株产生的混合物能够减少 90% 的甲烷生成, 且该植物乳杆菌产生的物质具有抗蛋白酶特性, 理论上能够在体内发挥功效。Bovicin HC5 是牛链球菌 HC5 产生的一种细菌素, 在体外试验中降低了 53% 的甲烷产量^[71], 然而体内试验效果的相关报道却很少。Nollet 等^[70]测试了植物乳杆菌培养液同产乙酸菌 DFM 在绵羊上的效果, 结果发现只在短期内有效果(处理后 3 d 减少了 80%)。尽管细菌素有可能当作添加剂来减少甲烷的生成, 但能产生细菌素的 DFM 在体内的使用也许不可行, 因为如果用高密度种群来诱导细菌素的产生会引起生理不适, 且成本较高。

3 小结

目前大量 DFM 的菌株都被分离和培养, 很多都具有降低甲烷排放的潜能, 但仅有少部分的抗产甲烷能力得到了测试。另外, 由于许多细菌都不止一种功能, 因此不同种群的细菌联合使用可能会增强 DFM 抗甲烷生成的效果, 而这需要更多的体外和体内试验来验证。

在倡导低碳经济和绿色发展的今天, 作为一种安全无公害的添加剂, 与其它甲烷减排制品相比, 应用 DFM 不仅可以避免对动物机体产生的不良反应, 同时也不会造成动物产品中的药物残留, 应用前景十分广阔。但目前, 所有在反刍动物产品中作为 DFM 使用的微生物都是兼性厌氧菌, 在生产上 DFM 的质量和包装还难以严格控制。因此, 作为一种有潜力的甲烷减排添加剂, DFM 在动物生产上的应用还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Solomon S. Climate Change 2007-The Physical Science Basis: Working Group I Contribution to the Fourth Assessment Report of the IPCC[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2007: 99
- [2] The United Nations Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). The IPCC fifth Assessment Report[R]. 2013: 10-27 (in Chinese)
联合国政府间气候变化专门委员会(IPCC). IPCC 第5次评估报告[R]. 2013: 10-27
- [3] Thorpe A. Enteric fermentation and ruminant eructation: the role (and control?) of methane in the climate change debate[J]. Climatic Change, 2009, 93(3/4): 407-431
- [4] Han L. Comparative study on the legislation of international greenhouse gas emission reduction[J]. Comparative Law Study, 2010(4): 97-109
韩良. 国际温室气体减排立法比较研究[J]. 比较法研究, 2010(4): 97-109
- [5] Zhang LT, Huang XF, Xue B, et al. Immunization against rumen methanogenesis by vaccination with a new recombinant protein[J]. PLoS One, 2015, 10(10): e0140086
- [6] Kumar S, Choudhury PK, Carro MD, et al. New aspects and strategies for methane mitigation from ruminants[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(1): 31-44
- [7] Wang L. Effects of probiotics on nitrogen emission in dairy cows[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia Agricultural University, 2015 (in Chinese)
王丽. 微生态制剂对奶牛氮排放的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2015
- [8] Elghandour MMY, Salem AZM, Castañeda JSM, et al. Direct-fed microbes: a tool for improving the utilization of low quality roughages in ruminants[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2015, 14(3): 526-533
- [9] Lettat A, Nozière P, Silberberg M, et al. Rumen microbial and fermentation characteristics are affected differently by bacterial probiotic supplementation during induced lactic and subacute acidosis in sheep[J]. BMC Microbiology, 2012, 12: 142
- [10] Li EK, Yang ZB. Recent development in the methane production, measurement and emission control in ruminants[J]. China Plant-Eating Animal Science, 2014, 34(5): 64-68 (in Chinese)
李恩凯, 杨在宾. 反刍动物甲烷的产生、测定及减排调控的研究[J]. 中国草食动物科学, 2014, 34(5): 64-68
- [11] Kumar S, Dagar SS, Puniya AK, et al. Changes in methane emission, rumen fermentation in response to diet and microbial interactions[J]. Research in Veterinary Science, 2013, 94(2): 263-268
- [12] Duan CY, Zhang YG, Xin HS, et al. Effects of dietary Hainanmycin on rumen fermentation and methane production in dairy cows[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2012, 24(1): 152-159 (in Chinese)
段春宇, 张永根, 辛杭书, 等. 饲料中添加海南霉素对奶牛瘤胃发酵及甲烷产量的影响[J]. 动物营养学报, 2012, 24(1): 152-159
- [13] Jayanegara A, Goel G, Makkar HPS, et al. Divergence between purified hydrolysable and condensed tannin effects on methane emission, rumen fermentation and microbial population *in vitro*[J]. Animal Feed Science and Technology, 2015, 209: 60-68
- [14] Miltko R, Kowalik B, Majewska M, et al. The influence of supplementing heifer diets with *Saccharomyces cerevisiae* yeast on the activity of polysaccharidases in the rumen[J]. Journal of Animal and Feed Sciences, 2015, 24(3): 260-264
- [15] Patra AK. The use of live yeast products as microbial feed additives in ruminant nutrition[J]. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances, 2012, 7(5): 366-375
- [16] Ding GZ, Chang Y, Zhou ZM, et al. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* on rumen fermentation characteristics, nutrient degradation and cellulase activity of steers fed diets with different concentrate to forage ratios[J]. World Journal of Agricultural Research, 2014, 2(6): 303-308
- [17] Mutsaers T, Edwards IE, Topps JH, et al. The effect of dietary inclusion of yeast culture (Yea-Sacc) on patterns of rumen fermentation, food intake and growth of intensively fed bulls[J]. Animal Production, 1992, 55(1): 35-40
- [18] Lynch HA, Martin SA. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* culture and *Saccharomyces cerevisiae* live cells on *in vitro* mixed ruminal microorganism fermentation[J]. Journal of Dairy Science, 2002, 85(10): 2603-2608
- [19] Carro MD, Lebzién P, Rohr K. Influence of yeast culture on the *in vitro* fermentation (Rusitec) of diets containing variable portions of concentrates[J]. Animal Feed Science and Technology, 1992, 37(3/4): 209-220
- [20] Lila ZA, Mohammed N, Yasui T, et al. Effects of a twin strain of *Saccharomyces cerevisiae* live cells on mixed ruminal microorganism fermentation *in vitro*[J]. Journal of Animal Science, 2004, 82(6): 1847-1854
- [21] Sullivan HM, Martin SA. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on *in vitro* mixed ruminal microorganism fermentation[J]. Journal of Dairy Science, 1999, 82(9): 2011-2016
- [22] Mathieu F, Jouany JP, Sénaud J, et al. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* fermentations in the rumen of faunated and defaunated sheep; protozoal and probiotic interactions[J]. Reproduction Nutrition Development, 1996, 36(3): 271-287
- [23] Bayat AR, Kairenius P, Stefański T, et al. Effect of camelina oil or live yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*) on ruminal methane production, rumen fermentation, and milk fatty acid composition in lactating cows fed grass silage diets[J]. Journal of Dairy Science, 2015, 98(5): 3166-3181

- [24] McGinn SM, Beauchemin KA, Coates T, et al. Methane emissions from beef cattle: effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid[J]. *Journal of Animal Science*, 2004, 82(11): 3346-3356
- [25] Mwenya B, Santoso B, Sar C, et al. Effects of including β 1-4 galacto-oligosaccharides, lactic acid bacteria or yeast culture on methanogenesis as well as energy and nitrogen metabolism in sheep[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2004, 115(3/4): 313-326
- [26] Chung YH, Walker ND, McGinn SM, et al. Differing effects of 2 active dried yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) strains on ruminal acidosis and methane production in nonlactating dairy cows[J]. *Journal of Dairy Science*, 2011, 94(5): 2431-2439
- [27] Ban ZB, Zhang GL, Yang HM, et al. Effect of active dry yeast and cellulose enzymes on the concentration of rumen VFA and emission of methane in Grassland Red cattle[J]. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2013, 40(2): 57-61 (in Chinese)
班志彬, 张国梁, 杨华明, 等. 活性干酵母和纤维素酶对草原红牛瘤胃挥发性脂肪酸浓度及甲烷排放的影响[J]. *中国畜牧兽医*, 2013, 40(2): 57-61
- [28] Iwamoto M, Asanuma N, Hino T. Effects of nitrate combined with fumarate on methanogenesis, fermentation, and cellulose digestion by mixed ruminal microbes *in vitro*[J]. *Animal Science Journal*, 1999, 70(6): 471-478
- [29] Massie CM. The effect of nitrate, live yeast culture or their interaction on methanemission and nitrate reduction *in vitro*[D]. Columns: Master's Thesis of the Ohio State University, 2015
- [30] Kamra DN, Agarwal N, Chaudhary LC. Nitrate/nitrite toxicity and possibilities of their use in ruminant diet[A]//*Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*[M]. India: Springer, 2015: 343-353
- [31] Yoshii T, Asanuma N, Hino T. Number of nitrate- and nitrite-reducing *Selenomonas ruminantium* in the rumen, and possible factors affecting its growth[J]. *Animal Science Journal*, 2003, 74(6): 483-491
- [32] Jeyanathan J, Kirs M, Ronimus RS, et al. Methanogen community structure in the rumens of farmed sheep, cattle and red deer fed different diets[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2011, 76(2): 311-326
- [33] Iwamoto M, Asanuma N, Hino T. Ability of *Selenomonas ruminantium*, *Veillonella parvula*, and *Wolinella succinogenes* to reduce nitrate and nitrite with special reference to the suppression of ruminal methanogenesis[J]. *Anaerobe*, 2002, 8(4): 209-215
- [34] Anderson RC, Rasmussen MA. Use of a novel nitrotoxin-metabolizing bacterium to reduce ruminal methane production[J]. *Bioresource Technology*, 1998, 64(2): 89-95
- [35] Sar C, Mwenya B, Santoso B, et al. Effect of *Escherichia coli* wild type or its derivative with high nitrite reductase activity on *in vitro* ruminal methanogenesis and nitrate/nitrite reduction[J]. *Journal of Animal Science*, 2005, 83(3): 644-652
- [36] Sar C, Mwenya B, Pen B, et al. Effect of ruminal administration of *Escherichia coli* wild type or a genetically modified strain with enhanced high nitrite reductase activity on methane emission and nitrate toxicity in nitrate-infused sheep[J]. *British Journal of Nutrition*, 2005, 94(5): 691-697
- [37] Asanuma N, Yoshii T, Hino T. Isolation of new nitrite-reducing bacteria, and augmentation of nitrite reduction in the rumen by introducing one of the isolated bacteria[J]. *Bulletin of the Faculty of Agriculture-Meiji University*, 2003, 137: 1-17
- [38] Sakthivel PC, Kamra DN, Agarwal N, et al. Effect of sodium nitrate and nitrate reducing bacteria on *in vitro* methane production and fermentation with buffalo rumen liquor[J]. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2012, 25(6): 812-817
- [39] Li L, Davis J, Nolan J, et al. An initial investigation on rumen fermentation pattern and methane emission of sheep offered diets containing urea or nitrate as the nitrogen source[J]. *Animal Production Science*, 2012, 52(7): 653-658
- [40] Bryant MP, Campbell LL, Reddy CA, et al. Growth of desulfovibrio in lactate or ethanol media low in sulfate in association with H_2 -utilizing methanogenic bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1977, 33(5): 1162-1169
- [41] Huisingh J, McNeill JJ, Matrone G. Sulfate reduction by a desulfovibrio species isolated from sheep rumen[J]. *Applied Microbiology*, 1974, 28(3): 489-497
- [42] Cummings BA, Caldwell DR, Gould DH, et al. Ruminal microbial alterations associated with sulfide generation in steers with dietary sulfate-induced polioencephalomalacia[J]. *American Journal of Veterinary Research*, 1995, 56(10): 1390-1395
- [43] Van Zijderveld SM, Gerrits WJJ, Apajalahti JA, et al. Nitrate and sulfate: effective alternative hydrogen sinks for mitigation of ruminal methane production in sheep[J]. *Journal of Dairy Science*, 2010, 93(12): 5856-5866
- [44] Paul SS, Deb SM, Singh D. Isolation and characterization of novel sulphate-reducing *Fusobacterium* sp. and their effects on *in vitro* methane emission and digestion of wheat straw by rumen fluid from Indian riverine buffaloes[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2011, 166/167: 132-140
- [45] Dröge S, Limper U, Emtiazi F, et al. *In vitro* and *in vivo* sulfate reduction in the gut contents of the termite *Mastotermes darwiniensis* and the rose chafer *Pachnoda marginata*[J]. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2005, 51(2): 57-64
- [46] Liu NN, Li ZJ, Jin CX, et al. The Effects of dietary carbohydrate balance index and fumarate on rumen microflora, influence and methane production in goat[A]//*Animal Nutrition Branch of China Animal Husbandry and Veterinary Institute. Proceedings of the Seventh China Feed Nutrition Society*[C]. Beijing: China Animal Husbandry and Veterinary Institute, 2014 (in Chinese)
刘南南, 李宗军, 靳纯焄, 等. 日粮碳水化合物平衡指数和延胡索酸对山羊瘤胃发酵、微生物区系和甲烷产生的影响[A]//*中国畜牧兽医学会动物营养学分会. 第七届中国饲料营养学术研讨会论文集*[C]. 北京: 中国畜牧兽医学会, 2014
- [47] Hino T, Shimada K, Maruyama T. Substrate preference in a strain of *Megasphaera elsdenii*, a ruminal bacterium, and its implications in propionate production and growth competition[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60(6): 1827-1831
- [48] Counotte GHM, Prins RA, Janssen RHAM, et al. Role of *Megasphaera elsdenii* in the fermentation of DL-[2-13C] lactate in the rumen of dairy cattle[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1981, 42(4): 649-655
- [49] Klieve AV, Hennessy D, Ouwkerk D, et al. Establishing populations of *Megasphaera elsdenii* YE 34 and *Butyrivibrio fibrisolvens* YE 44 in the rumen of cattle fed high grain diets[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, 95(3): 621-630
- [50] Henning PH, Horn CH, Leeuw KJ, et al. Effect of ruminal administration of the lactate-utilizing strain *Megasphaera elsdenii* (Me) NCIMB 41125 on abrupt or gradual transition from forage to concentrate diets[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2010, 157(1/2): 20-29
- [51] Aikman PC, Henning PH, Humphries DJ, et al. Rumen pH and fermentation characteristics in dairy cows supplemented with *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125 in early lactation[J]. *Journal of Dairy Science*, 2011, 94(6): 2840-2849
- [52] Seo JK, Kim SW, Kim MH, et al. Direct-fed microbials for ruminant animals[J]. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2010, 23(12): 1657-1667
- [53] Ghorbani GR, Morgavi DP, Beauchemin KA, et al. Effects of

- bacterial direct-fed microbials on ruminal fermentation, blood variables, and the microbial populations of feedlot cattle[J]. Journal of Animal Science, 2002, 80(7): 1977-1985
- [54] Berger C, Lettat A, Martin C, et al. Method for reducing methane production in a ruminant animal: U.S. Patent Application 14/113, 927[P]. 2012-04-26
- [55] Kajikawa H, Valdes C, Hillman K, et al. Methane oxidation and its coupled Electron-sink reactions in ruminal fluid[J]. Letters in Applied Microbiology, 2003, 36(6): 354-357
- [56] Mitsumori M, Ajisaka N, Tajima K, et al. Detection of *Proteobacteria* from the rumen by PCR using methanotroph-specific primers[J]. Letters in Applied Microbiology, 2002, 35(3): 251-255
- [57] Hyman MR, Wood PM. Methane oxidation by *Nitrosomonas europaea*[J]. Biochemical Journal, 1983, 212(1): 31-37
- [58] Jiang QQ, Bakken LR. Nitrous oxide production and methane oxidation by different ammonia-oxidizing bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(6): 2679-2684
- [59] Li MJ, Zhou M, Adamowicz E, et al. Characterization of bovine ruminal epithelial bacterial communities using 16S rRNA sequencing, PCR-DGGE, and qRT-PCR analysis[J]. Veterinary Microbiology, 2012, 155(1): 72-80
- [60] Romero-Pérez GA, Ominski KH, McAllister TA, et al. Effect of environmental factors and influence of rumen and hindgut biogeography on bacterial communities in steers[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(1): 258-268
- [61] Godoy-Vitorino F, Goldfarb KC, Karaoz U, et al. Comparative analyses of foregut and hindgut bacterial communities in goats and cows[J]. The ISME Journal, 2011, 6(3): 531-541
- [62] Hou SB, Makarova KS, Saw JHW, et al. Complete genome sequence of the extremely acidophilic methanotroph isolate V4, *Methylophilum infernorum*, a representative of the bacterial phylum *Verrucomicrobia*[J]. Biology Direct, 2008, 3: 26
- [63] Klieve AV, Ouwerkerk D, Maguire AJ. Archaea in the foregut of macropod marsupials: PCR and amplicon sequence-based observations[J]. Journal of Applied Microbiology, 2012, 113(5): 1065-1075
- [64] Miller TL, Wolin MJ. *Methanosphaera stadtmaniae* gen. nov., sp. nov.: a species that forms methane by reducing methanol with hydrogen[J]. Archives of Microbiology, 1985, 141(2): 116-122
- [65] Sprenger WW, Van Belzen MC, Rosenberg J, et al. *Methanomicrococcus blatticola* gen. nov., sp. nov., a methanol- and methylamine-reducing methanogen from the hindgut of the cockroach *Periplaneta americana*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2000, 50(6): 1989-1999
- [66] Jarvis G N, Strömpl C, Burgess D M, et al. Isolation and identification of ruminal methanogens from grazing cattle[J]. Current Microbiology, 2000, 40(5): 327-332
- [67] Lopez S, McIntosh E, Wallace RJ, et al. Effect of adding acetogenic bacteria on methane production by mixed rumen microorganisms[J]. Animal Feed Science and Technology, 1999, 78(1/2): 1-9
- [68] Chaucheyras-Duryand F, Masséglia S, Fonty G, et al. Influence of the composition of the cellulolytic flora on the development of hydrogenotrophic microorganisms, hydrogen utilization, and methane production in the rumens of gnotobiotically reared lambs[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(24): 7931-7937
- [69] Krause DO, Bunch RJ, Conlan LL, et al. Repeated ruminal dosing of *Ruminococcus* spp. does not result in persistence, but changes in other microbial Populations occur that can be measured with quantitative 16S-rRNA-based probes[J]. Microbiology, 2001, 147(7): 1719-1729
- [70] Nollé L, Mbanzambi L, Demeyer D, et al. Effect of the addition of *Peptostreptococcus productus* ATCC 35244 on reductive acetogenesis in the ruminal ecosystem after inhibition of methanogenesis by cell-free supernatant of *Lactobacillus plantarum* 80[J]. Animal Feed Science and Technology, 1998, 71(1/2): 49-66
- [71] Lee SS, Hsu JT, Mantovani HC, et al. The effect of bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5, on ruminal methane production *in vitro*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 217(1): 51-55
- [72] Asa R, Tanaka A, Uehara A, et al. Effects of protease-resistant antimicrobial substances produced by lactic acid bacteria on rumen methanogenesis[J]. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2010, 23(6): 700-707
- [73] Callaway TR, Carneiro De Melo AMS, Russell JB. The effect of nisin and monensin on ruminal fermentations *in vitro*[J]. Current Microbiology, 1997, 35(2): 90-96
- [74] Sar C, Mwenya B, Pen B, et al. Effect of nisin on ruminal methane production and nitrate/nitrite reduction *in vitro*[J]. Australian Journal of Agricultural Research, 2005, 56(8): 803-810
- [75] Lee SS, Mantovani HC, Russell JB. The binding and degradation of nisin by mixed ruminal bacteria[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2002, 42(3): 339-345