

体外法添加苹果酸与饱和脂肪酸对瘤胃功能菌群数量的影响

李 旦^{1,2} 王加启^{1*} 卜登攀¹ 刘 亮¹ 刘开朗¹ 赵圣国^{1,2} 于 萍¹

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所动物营养学国家重点实验室 北京 100193)

(2. 甘肃农业大学 甘肃 兰州 730070)

摘 要: 本试验在添加饱和脂肪酸即硬脂酸(Stearic acid, SA)的基础上添加不同水平的苹果酸(Malic acid, MA), 采用体外法对瘤胃微生物进行培养, 通过实时定量(Real-time)PCR 方法检测在添加脂肪酸和苹果酸后, 对瘤胃功能微生物如纤毛虫、产甲烷菌, 纤维分解细菌、氢化细菌以及脂肪分解菌的数量的影响。实验结果表明, 添加硬脂酸后对脂解厌氧弧杆菌(*Anaerovibrio lipolytica*)和产琥珀酸丝状杆菌(*Fibrobacter succinogenes*)数量产生了显著影响, 脂解厌氧弧杆菌数量减少了95.8% ($P < 0.001$), 产琥珀酸丝状杆菌数量增加了52.5% ($P < 0.05$)。添加苹果酸后, 添加5 mmol/L MA处理组的脂解厌氧弧杆菌数量减少了91.2% ($P < 0.001$), 添加10 mmol/L MA处理组, 减少了94.8% ($P < 0.001$), 而MA10组比MA5组的该菌数量减少了41.3% ($P < 0.05$)。本研究结论是硬脂酸和苹果酸分别对瘤胃部分微生物产生了显著的影响。二者对瘤胃微生物的互作影响并不显著。

关键词: 硬脂酸, 苹果酸, Real-time PCR

The Effect of Supplementing with Malic Acid and Stearic Acid on Rumen Functional Microbe *in vitro*

LI Dan^{1,2} WANG Jia-Qi^{1*} BU Deng-Pan¹ LIU Liang¹
LIU Kai-Lang¹ ZHAO Sheng-Guo^{1,2} YU Ping¹

(1. State Key Laboratory of Animal Nutrition, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

(2. Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China)

Abstract: Using real-time PCR to detect the effect of supplementing with Malic acid and stearic acid on rumen main functional microbe, including ciliate protozoa, methanogen, cellulolytic bacteria, hydrogenated bacteria and lipolysis bacteria *in vitro*. The result showed there were significant effect on the quantities of *Anaerovibrio lipolytica*, which decreased 95.8% ($P < 0.001$), and *Fibrobacter succinogenes*, which increased 52.5% ($P < 0.05$) after supplemented with Stearic Acid. The quantities of *Anaerovibrio lipolytica* were decreased by 91.2% ($P < 0.001$) on 5 mmol/L MA group and 94.8% ($P < 0.001$) on 10 mmol/L MA group, and the latter were decreased 41.3% ($P < 0.05$) than the former. The conclusion was stearic acid and malic acid were

significantly effected on part of rumen microbe respectively, however, both of them were not obviously effected on them.

Keywords: Stearic acid, Malic acid, Real-time PCR

动物营养学者认为在反刍动物日粮中, 添加一部分脂类, 可以节省部分谷物能量饲料, 有利于提高动物生产性能^[1-4]。脂类在瘤胃中的代谢一般分为两种, 一种是脂类水解, 即在瘤胃微生物分泌的脂酶作用下被广泛水解, 目前参与脂类水解的瘤胃微生物只有脂解厌氧弧杆菌(*Anaerovibrio lipolytica*); 而另一种是不饱和和游离脂肪酸在瘤胃内容物中在很短的时间即被微生物氢化, 生成饱和的终产物。瘤胃微生物的这一功能有助于在某种程度上保护微生物免受不饱和脂肪酸的损害作用。但是, 脂类的添加亦会影响瘤胃发酵, 其中以脂类的“覆膜”理论和脂类的直接抗微生物作用最受关注, 另外还包括脂类影响瘤胃菌群的组成及数量等^[5-7]。覆膜理论认为脂肪酸在颗粒状物质表面形成脂层, 阻碍了微生物对纤维素的消化。脂肪酸添加到纯培养的瘤胃细菌中, 抑制微生物的生长和代谢, 表明存在脂类的直接抗微生物作用。

另外, 有研究表明, 有机酸(包括苹果酸、延胡索酸和天门冬氨酸)能够作为饲料中抗生素添加剂的替代品促进动物的生长。同时, 天门冬氨酸、延胡索酸和苹果酸等二羧酸物质能够接受瘤胃内的氢(H), 日粮添加苹果酸能够使瘤胃内形成甲烷的氢减少 44%, 降低了甲烷产量^[8,9]。大量的文献指出, 体外培养试验中添加苹果酸能够改变瘤胃的发酵模式, 使发酵液pH值增加, 降低CH₄释放, 使乙酸、丙酸产量增加^[10,11]。

苹果酸和脂肪酸联合添加对于瘤胃中微生物组成, 尤其对瘤胃功能菌群, 既与甲烷生成相关的纤毛虫(*Ciliate protozoa*)、甲酸甲烷杆菌(*Methanobacterium formicicum*), 与纤维分解相关细菌如黄色瘤胃细菌(*Ruminococcus flavefaciens*)、白色瘤胃细菌(*Ruminococcus albus*), 产琥珀酸丝状杆菌(*Fibrobacter succinogenes*), 与脂肪分解相关细菌如脂解厌氧弧杆菌(*Anaerovibrio lipolytica*), 与氢化细菌如溶纤维丁酸弧杆菌(*Butyrivibrio fibrisolvens*)的影响鲜有报道。本文采用体外法, 并应用实时定量 PCR 方法研究苹果酸与硬脂酸对瘤胃中主要功能菌群的互作影响。

1 材料与方法

1.1 体外法试验设计

1.1.1 体外法材料: 试验所用苹果酸(DL-苹果酸, 纯度>99.5%), 饱和脂肪酸(硬脂酸, 纯度>99.8%)购自 Sigma 公司; 试验日粮原料由中国农业科学院北京畜牧兽医研究所中畜阳光牧业有限公司提供; 其他所用试剂均为分析纯, 购自北京化工厂。本试验采用中国农业大学生物学院动物营养与生理生化试验室的全自动实时产气记录装置进行。

1.1.2 试验处理: 本试验选择 C18:0-SA 基础上添加 3 种水平的苹果酸(0 mmol/L、5 mmol/L MA5、10 mmol/L MA10), 不添加苹果酸和硬脂酸(SA)的空白培养瓶作为对照组。试验周期为 36 h。试验在 3 周内重复进行 2 次。

1.1.3 发酵底物以及添加剂的准备: 本试验所用发酵底物组成为 50%的玉米粉(DM)、50%的苜蓿草粉(DM)。65°C 烘干, 粉碎, 过 40 目筛, 混合均匀后称取 0.5 g 装入试验用的培养瓶。

试验前一天准确称取 40 μg 和 80 μg 试验用苹果酸分别加到相应的培养瓶中。在全自动实时产气记录装置的培养箱中 39°C 过夜。试验前一天准确称取硬脂酸(固体)15 mg 加入对应的培养瓶中。

1.1.4 体外产气装置培养液接种: 试验当天晨饲后 2 h 采集供体奶牛瘤胃液 1000 mL, 置于保温瓶中密封保存, 迅速带回实验室。将供体奶牛瘤胃液混合后四层纱布过滤(在 39°C 温水浴中进行, 一边过滤一边通入CO₂)。取过滤后的瘤胃液 600 mL 与缓冲溶液按体积比 1:2 混合均匀。用注射器取 60 mL 混合后的培养液, 加入培养瓶, 并向相应的培养瓶中加入 0.5 mL 准备好的溶有脂肪酸的乙醇溶液, 最后向每个培养瓶中持续通入CO₂ 2 min 保持厌氧, 迅速盖上橡胶塞, 旋紧聚乙烯盖。将接种好的培养瓶放入全自动实时产气记录装置的培养箱中, 温度设定为 39°C。

1.2 样品采集

培养结束后, 采集发酵液, 用四层纱布过滤后取 10 mL, -80°C 冷冻保存待测。

1.3 样品总 DNA 提取

各取 500 μL 样品, 加 1 mL CTAB 抽提液与 0.5 g 玻璃珠, 采用反复冻融法^[12]与珠磨法^[13]相结合的方法, 对样品进行破碎, 具体操作: 在液氮中快速冷冻 3 min, 然后迅速放置 60 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 2 min, 反复冻融 2 次, 在珠磨仪上进行破碎, 48 m/s, 60 s, 取上清, 用酚:氯仿:异戊醇(25:24:1, V/V/V)抽提 2 次, 12000 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min, 取上清, 移入灭菌离心管。加 2 倍冷乙醇, 沉淀 1 h~2 h, 4 $^{\circ}\text{C}$, 16000 r/min 离心 10 min, 弃上清。用 70% 乙醇洗涤沉淀, 晾干, 加 200 μL TE 溶解, 并置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.4 应用 Real-time PCR 检测纤毛虫、甲烷菌及其它细菌数量

1.4.1 Real-time PCR 引物与合成: 试验中纤毛虫的引物选用 Tajima^[14], 溶纤维丁酸弧菌引物, 甲酸甲烷杆菌引物、探针选用参照赵玉华^[15], 白色瘤胃球菌和黄色瘤胃球菌引物选用参照杨舒黎^[16], 引物详见表 1。引物由上海生物工程公司合成。

1.4.2 Real-time PCR 标准品与标准曲线的制作: 目标菌的 PCR 产物纯化后与 TaKaRa 公司的 pMD18-T 载体连接, 转化至感受态细胞 DH5⁺, 进行克隆培养, 蓝白斑筛选, 随机挑选白斑菌落。同时用 TaKaRa 质粒 DNA 提取试剂盒提取重组质粒 DNA, PCR 鉴定阳性克隆。测定各种菌的阳性克隆质粒 DNA 的 OD 值, 算出质量浓度, 将各种菌的质粒

DNA 作为标准品。然后对标准品进行梯度稀释, 制作标准曲线。

1.4.3 Real-time PCR 反应体系与反应条件: 用 ABI 的 PE 7500 型荧光定量 PCR 仪。除甲酸甲烷杆菌, 其余菌用 SYBR Green I 荧光染料定量扩增。

反应体系为: 10 μL 10 \times Mastermix (包括 FastStart Taq DNA 聚合酶, reaction DNA, dNTPs, MgCl_2 和 SYBR Green I 染料), 10 $\mu\text{mol/L}$ 上、下游引物 0.5 μL , 50 ng DNA 模板, ddH₂O 20 μL ; 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min 预变性; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 33 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 40 个循环; 总体积 20 μL 。

荧光检测设在每个循环的最后一步。熔解曲线从 65 $^{\circ}\text{C}$ ~95 $^{\circ}\text{C}$, 每秒增加 0.1 $^{\circ}\text{C}$, 并收集荧光信号。

甲酸甲烷杆菌用 Taqman 探针检测: 反应体系为: 2 μL 10 \times 缓冲液, 0.5 μL 10 mmol/L 的 dNTPs, 0.5 μL 10 $\mu\text{mol/L}$ 上、下游引物, 0.2 μL 20 $\mu\text{mol/L}$ 的探针, 2 μL 25 mmol 的 MgCl_2 , 50 ng DNA 模板, 0.2 μL 5 U/ μL Taq DNA 聚合酶, ddH₂O 20 μL ; 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 40 个循环。

1.5 数据统计分析

试验数据采用 Excel 进行整理, 然后采用 SAS8.2 统计软件 Mixed 模型进行单因素方差统计分析处理。

表 1 瘤胃功能菌引物
Table 1 Primer of rumen functional bacteria

目标菌 Target bacterium		引物与探针 Primer and probe	退火温度 T_m ($^{\circ}\text{C}$)
纤毛虫 <i>Ciliate Protozoa</i>	F	GCTTTCGWTGGTAGTGTATT	54
	R	CTTGCCCTCYAATCGTWCT	
甲酸甲烷杆菌 <i>Methanobacterium formicicum</i>	F	CACCCCGTTAAGAGTGGCAC	60
	R	GCAGCAGCGCGGAAAC	
	P	FAM-TGGGTTTCCCCGTCACCTT-TAMRA	
黄色瘤胃球菌 <i>Ruminococcus flavefaciens</i>	F	GATGCCGCGTGGAGGAAGAAG	60
	R	CATTTACCGCTACACCAGGAA	
白色瘤胃球菌 <i>Ruminococcus albus</i>	F	GTTTTAGGATTGTAAACCTCTGTCTT	62
	R	CCTAATATCTACGCATTTCACCGC	
脂解厌氧弧杆菌 <i>Anaerovibrio lipolytica</i>	F	AGACACGCCCCAACTCCTACG	60
	R	TCCTCCTTGACCCATTTCCTGA	
溶纤维丁酸弧菌 <i>Butyrivibrio fibrisolven</i>	F	TAACATGAGAGTTTGATCCTGGCTC	60
	R	CGTTACTCACCCGTCCGC	
产琥珀酸丝状杆菌 <i>Fibrobacter succinogenes</i>	F	GGCGGGATTGAATGTACCTTGAGA	60
	R	TCCGCCTGCCCCCTGAACTATC	

2 结果

2.1 日粮添加硬脂酸对瘤胃主要功能菌群数量的影响

从表 2 中可以看出, 添加 SA 后, 对于主要的瘤胃纤维分解细菌如黄色瘤胃球菌、白色瘤胃球菌和氢化细菌溶纤维丁酸弧菌的数量均没有显著影响($P>0.05$)。对于纤毛虫的数量也没有显著影响($P>0.05$)。但是对于脂肪分解菌脂解厌氧弧杆菌的数量有极显著影响($P<0.001$), 添加 SA 后, 该菌数量减少了 95.8%。对于纤维分解菌产琥珀酸丝状杆菌数量有显著影响($P<0.05$), 添加 SA 后, 该菌数量增加了 52.5%。

2.2 日粮添加苹果酸对瘤胃主要功能菌群数量的影响

从表 3 中可以看出, 添加不同水平的苹果酸, 对于主要的瘤胃纤维分解细菌如黄色瘤胃球菌、白色瘤胃球菌、产琥珀酸丝状杆菌的数量均没有显著影响($P>0.05$)。对于纤毛虫的数量也没有显著影响($P>0.05$)。但是对于脂肪分解菌脂解厌氧弧杆菌的数量有极显著影响($P<0.001$), 添加 5 mmol/L MA 处理组, 相对于对照组, 菌的数量减少了 91.27%, 差异极显著($P<0.001$), 添加 10 mmol/L MA 处理组, 相对于对照组, 菌的数量减少了 94.88%, 差异极显著($P<0.001$), 而 MA10 组比 MA5 组的菌数减少了 41.31%, 差异显著($P<0.05$)。

表 2 日粮添加硬脂酸对瘤胃纤毛虫、甲烷菌与其它菌群数量的影响				
Table 2 The effect of supplementation stearic acids on rumen <i>Ciliate protozoa</i> , <i>Methanobacterium</i> and other bacterium				
项目 Item	试验处理 Experiment treatment		SEM	P
	CK Log(Quantities)	SA Log(Quantities)		
纤毛虫 <i>Ciliate protozoa</i>	4.8130	5.4397	0.3576	0.26
甲酸甲烷杆菌 <i>Methanobacterium formicicum</i>	7.6037	7.2107	0.4212	0.53
黄色瘤胃球菌 <i>Ruminococcus flavefaciens</i>	6.0356	6.5685	0.3600	0.32
白色瘤胃球菌 <i>Ruminococcus albus</i>	8.7331	8.2470	0.2829	0.25
脂解厌氧弧杆菌 <i>Anaerovibrio lipolytica</i>	11.3447 ^a	9.9670 ^b	0.0400	<0.001
溶纤维丁酸弧菌 <i>Butyrivibrio fibrisolven</i>	9.8190	10.2181	0.2859	0.35
产琥珀酸丝状杆菌 <i>Fibrobacter succinogenes</i>	8.4594 ^a	8.7831 ^b	0.0478	<0.001

注: 同行数据肩标字母相同表示差异不显著($P>0.05$), 肩标不同表示差异显著($P<0.05$); 表中第 2、3 列分别为对照组与处理组中瘤胃微生物数量的对数值。

Note: In the same column, values with the same letters mean no significantly($P>0.05$), values without the same small letters superscripts mean significantly($P<0.05$); Values in line 2 and 3 mean logarithm of rumen microbe quantity in control group and treatment group.

表 3 日粮添加不同水平的苹果酸对瘤胃纤毛虫、甲烷菌及其它菌群的影响					
Table 3 The effect of supplementation of malic acids on rumen <i>Ciliate protozoa</i> , <i>Methanobacterium</i> and other bacterium					
项目 Item	试验处理 Experiment treatment			SEM	P
	CK Log(Quantities)	MA5 Log(Quantities)	MA10 Log(Quantities)		
纤毛虫 <i>Ciliate protozoa</i>	5.0068	4.8212	5.5512	0.4425	0.52
甲酸甲烷杆菌 <i>Methanobacterium formicicum</i>	7.3135	7.6289	7.2793	0.4779	0.85
黄色瘤胃球菌 <i>Ruminococcus flavefaciens</i>	6.2955	6.2531	6.3576	0.4431	0.98
白色瘤胃球菌 <i>Ruminococcus albus</i>	8.5730	8.6167	8.2806	0.3482	0.76
脂解厌氧弧杆菌 <i>Anaerovibrio lipolytica</i>	11.4393 ^a	10.3799 ^b	10.1484 ^c	0.0493	<0.001
溶纤维丁酸弧菌 <i>Butyrivibrio fibrisolven</i>	10.3918	9.8425	9.8214	0.3520	0.46
产琥珀酸丝状杆菌 <i>Fibrobacter succinogenes</i>	8.5833	8.6156	8.6647	0.0745	0.63

注: 同行数据肩标字母相同表示差异不显著($P>0.05$), 肩标不同表示差异显著($P<0.05$); 表 3 中第 2、3 列分别为对照组与处理组中瘤胃微生物数量的对数值。

Note: In the same column, values with the same letters mean no significantly($P>0.05$), values without the same small letters superscripts mean significantly($P<0.05$); Values in line 2 and 3 mean logarithm of rumen microbe quantity in control group and treatment group.

2.3 日粮添加脂肪酸和苹果酸对瘤胃主要功能菌群的影响

在添加硬脂酸的基础由再添加不同水平的苹果酸,从表 4 可以看出,硬脂酸与苹果酸同时添加对于纤毛虫、纤维分解菌白色瘤胃球菌、黄色瘤胃球菌和氢化细菌溶纤维丁酸弧菌的数量均没有显著影响($P>0.05$)。但是对于脂肪分解菌脂解厌氧弧杆菌的数量有极显著影响($P<0.001$),在硬脂酸的水平上添加 5 mmol/L MA,该菌的数量减少了 98.92%;添加 10 mmol/L MA,该菌数量减少了 99.44%,但是两种处理组之间菌的数量差异不显著。添加 10 mmol/L MA,对于纤维分解菌产琥珀酸丝状杆菌数量有显著影响($P<0.05$);相对于对照组,该菌数量增加了 54.54%,相对于 5 mmol/L MA 处理组,该菌数量增加了 37.62%;但是两个处理组间的菌的数量变化差异不显著。

3 讨论

从本研究结果来看,添加饱和脂酸对于大部分纤维分解菌的数量并未产生显著影响,排除了饱和脂肪酸对瘤胃中大部分细菌产生油包脂的影响,尤其对于微生物区系并未产生显著影响。对于瘤胃中古菌尤其对于甲烷菌和与甲烷菌有共生关系的纤毛虫亦没有显著影响,这与以前报道的日粮中添加脂肪酸对瘤胃微生物尤其是纤维分解菌与纤毛虫有明显的抑制作用的结果不一致,主要是在本试验中选择添加了饱和脂肪酸即硬脂酸,那说明相对不饱和

脂肪酸而言^[5-7],饱和脂肪酸对瘤胃微生物和饲料颗粒包被作用不足以影响瘤胃微生物中主要的纤维分解菌对饲料的影响。而在本研究中硬脂酸对于瘤胃中脂肪降解菌即脂解厌氧弧杆菌(*Anaerobrio lipolytica*)和纤维分解菌产琥珀酸丝状杆菌(*Fibrobacter succinogenes*)数量产生了显著影响。添加硬脂酸后,脂解厌氧弧杆菌的数量显著减少,产琥珀酸丝状杆菌的数量显著增加。脂肪作为脂解厌氧弧杆菌分解的底物,本该在营养物质富集的情况下使该菌的数量增加,但在本实验中该菌的数量不增加反而减少,有可能是脂肪酸添加量过多,对该菌的生长与繁殖起到了过量抑制作用。而对于产琥珀酸丝状杆菌数量的增加,有可能是由于脂肪分解菌将长链脂肪酸分解为短链脂肪酸,而产琥珀酸丝状杆菌在富含短链脂肪酸的条件下迅速增长,这就导致该菌的数量显著增加,并不因为脂肪对微生物与饲料包裹负作用的显著影响。瘤胃中微生物种类繁多,许多微生物之间是共生关系,会由于营养物质的改变而引起瘤胃微生物之间数量的变化。

Mohammed等^[17]报道,添加 10 mmol/L苹果酸使发酵液原虫数量增加了 11.36%。然而在本试验中,添加两个水平的苹果酸后,发酵液pH值降低,纤毛类原虫数量却无变化趋势,pH值的变化与原虫数量间的关系仍需进一步研究。Garcia-Martinez^[18]和 Newbold等^[19]研究发现,日粮添加有机酸(苹果酸、延胡索酸和天门冬氨酸等)能够抑制瘤胃CH₄释放,而在本试验中甲酸甲烷菌的数量并未随着苹果酸的

表 4 日粮添加硬脂酸和不同水平的苹果酸对瘤胃纤毛虫、甲烷菌及其它细菌数量的影响
Table 4 The effect of supplementation stearic acids and different level of malic acids on rumen *Ciliate* protozoa, *Methanobacterium* and other bacterium

项目 Item	试验处理 Experiment treatment			SEM	P
	SA Log(Quantities)	SA+MA5 Log(Quantities)	SA+MA10 Log(Quantities)		
纤毛虫 <i>Ciliate</i> protozoa	5.4722	5.1470	5.7000	0.4656	0.89
甲酸甲烷杆菌 <i>Methanobacterium formicicum</i>	7.3174	7.4994	6.8153	0.6045	0.80
黄色瘤胃球菌 <i>Ruminococcus flavefaciens</i>	6.9626	6.5308	6.2120	0.5605	0.46
白色瘤胃球菌 <i>Ruminococcus albus</i>	8.4867	8.4333	7.8211	0.4405	0.74
脂解厌氧弧杆菌 <i>Anaerobrio lipolytica</i>	11.3746 ^a	9.4049 ^b	9.1217 ^b	0.0624	<0.001
溶纤维丁酸弧菌 <i>Butyrivibrio fibrisolven</i>	10.8067	9.8683	9.9793	0.4452	0.73
产琥珀酸丝状杆菌 <i>Fibrobacter succinogenes</i>	8.6231 ^a	8.7605 ^a	8.9655 ^b	0.0745	0.03

注: 同行数据肩标字母相同表示差异不显著($P>0.05$), 肩标不同表示差异显著($P<0.05$); 表 4 中第 2、3 列分别为对照组与处理组中瘤胃微生物数量的对数值。

Note: In the same column, values with the same letters mean no significantly($P>0.05$), values without the same small letters superscripts mean significantly ($P<0.05$); Values in line 2 and 3 mean logarithm of rumen microbe quantity in control group and treatment group.

添加而有明显变化,有可能是苹果酸对于产甲烷菌本身并未任何影响,而苹果酸作为氢的受体^[11],抑制了甲烷菌合成甲烷途径,因而添加苹果酸可以有效减少反刍动物产甲烷气体,同时不一定会影响瘤胃微生物古菌的部分区系。但是在试验结果中,苹果酸对脂肪分解菌却有着显著影响,而且随着苹果酸添加量的增加,该菌的数量明显减少,可能也是因为游离苹果酸的添加,降低了pH值,对该菌产生了显著的抑制作用。

而同时添加苹果酸与饱和脂肪酸,对于脂解厌氧弧杆菌的数量的显著影响的原因可能是苹果酸与脂肪酸共同作用,但是对于其明显的互作关系还有待进一步研究。对于产琥珀酸丝状杆菌的显著影响可能只是脂肪酸对其的单方面影响,而苹果酸对该菌并未产生显著影响,二者并未产生互作效应。

通过本研究结果表明苹果酸和饱和脂肪酸对瘤胃微生物的作用途径存在差异,可能导致二者对瘤胃微生物互作并未产生显著影响。

参 考 文 献

- [1] Chilliard Y. Dietary fat and adipose tissue metabolism in ruminants, pigs, and rodents: review. *J Dairy Sci*, 1993, **76**: 3897–3931.
- [2] Palmquist DL, Conrad HR. Effects of high fat rations for dairy cows on feed intake, milk and fat production, and plasma metabolites. *J Dairy Sci*, 1978, **61**: 890–901.
- [3] Schauff DJ, Clark JH. Effects of feeding diets containing calcium salts of long-chain fatty acids to lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 1992, **75**: 2990–3002.
- [4] Khorasani GR, Kennelly JJ. Effect of added dietary fat on performance, rumen characteristics, and plasma metabolites of midlactation dairy cows. *J Dairy Sci*, 1998, **81**: 2459–2468.
- [5] Kreuzer M, Kirchgeßner M. Investigations on the nutritive defaunation of the rumen of ruminants. *Archives of Animal Nutrition*, 1987, **37**: 489–503.
- [6] Henderson C. The effects of fatty acids on pure cultures of rumen bacteria. *Journal of Agricultural Science*, 1973, **81**: 107–112.
- [7] Machmuller A. Potential of various fatty feeds to reduce methane release from rumen fermentation *in vitro* (rusitec). *Animal Feed Science and Technology*, 1998, **71**: 117–130.
- [8] Newbold CJ, Wallace RJ, McIntosh FM. Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. *British Journal of Nutrition*, 1996, **76**: 249–261.
- [9] Newbold CJ, Lo'pez S, Nelson N, *et al.* Moss. Propionate precursors and other metabolic intermediates as possible alternative electron acceptors to methanogenesis in ruminal fermentation. *Br J Nutr*, 2005, **94**: 27–35.
- [10] Carro MD, Ranilla RJ. Effect of addition of malate on *in vitro* rumen fermentation of cereal grains. *Br J Nutr*, 2003, **89**: 181–188.
- [11] Martin SA. Effects of DL-malate on *in vitro* forage fiber digestion by mixed ruminal microorganisms. *Curr Microbiol*, 2004, **48**: 27–31.
- [12] Stahl DA, Flesher BA, Mansfield HR, *et al.* Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, **54**: 1079–1084.
- [13] Bürgmann H. A strategy for optimizing quality and quantity of DNA extracted from soil. *Journal Microbiological Methods*, 2001, **45**: 7–20.
- [14] Tajima K, Aminov RI, Nagamine T. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**: 2766–2774.
- [15] 赵玉华, 王加启. 利用实时定量 PCR 对瘤胃甲酸甲烷杆菌定量方法的建立与应用. 中国农业科学, 2006, **39**(1): 161–169.
- [16] 杨舒黎. 日粮添加豆油和胡麻油对奶牛瘤胃微生物及发酵参数的影响. 中国农业科学院博士学位论文, 2007.
- [17] Mohammed N, Lila ZA, Ajisaka N, *et al.* Inhibition of ruminal microbial methane production by b-cyclodextrin iodopropane, malate and their combination *in vitro*. *J Anim Physiol and Anim Nutr*, 2003, **88**: 188–195.
- [18] Garcia-Martinez R, Ranilla MJ, Tejido ML, *et al.* Effects of disodium fumarate on *in vitro* rumen microbial growth, methane production and fermentation of diets differing in their forage:concentrate ratio. *Bri J Nutr*, 2005, **94**: 71–77.
- [19] Newbold CJ, Lo'pez S, Nelson N, *et al.* Propionate precursors and other metabolic intermediates as possible alternative electron acceptors to methanogenesis in ruminal fermentation. *Br J Nutr*, 2005, **94**: 27–35.