

瘤胃细菌、原虫和真菌降解植物细胞壁相对贡献及其互作

高巍 孟庆翔

(中国农业大学 动物科技学院,北京 100094)

摘要 采用体外产气量法,以球磨与未球磨玉米秸细胞壁为底物,对瘤胃微生物不同区系降解植物细胞壁的相对贡献和发酵特征进行了研究。用化学试剂和抗生素来分离瘤胃细菌、原虫和真菌,并设计下列微生物区系:全瘤胃液(WRF)、细菌(B)、原虫(P)、真菌(F)、细菌+原虫(B+P)、细菌+真菌(B+F)、原虫+真菌(P+F)和负对照(CON)。结果表明,细胞壁经球磨后可以显著提高瘤胃微生物的产气量和降解率($P < 0.01$),但不改变发酵类型;不同微生物区系的产气量和降解率具有极显著的差异($P < 0.01$),WRF的产气量和降解率最高,其次是混合培养(B+P、P+F、B+F),而单培养(B、P、F)的最低($P < 0.01$)。结果说明植物细胞壁在瘤胃内的降解是在细菌、原虫和真菌的协同作用下完成的,对植物细胞壁的降解程度可能不是某一种或二种微生物所能及的。B+P的产气量和降解率仅次于WRF,表明瘤胃细菌和原虫在降解植物细胞壁过程中存在协同效应,对细胞壁降解的贡献率较大。另外,随着产气量和降解率的提高,发酵液的pH值降低、总VFA、氨态氮和甲烷气体的含量升高,进一步证明植物细胞壁的发酵程度提高了。

关键词 降解;细胞壁;细菌;原虫;真菌;产气量

中图分类号 S 852.6

文章编号 1007-4333(2003)05-0098-07

文献标识码 A

Degradation and fermentation characteristics of ruminal bacteria, protozoa, and fungi and their interactions

Gao Wei, Meng Qingxiang

(College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract Relative contributions of degradation and fermentation characteristics of various ruminal microbial fractions to milled or grounded corn stover cell wall were evaluated by the method of gas production in vitro. Various chemicals and antibiotics were used to differentiate bacteria, protozoa, and fungi in the rumen fluid, and the following ruminal microbial fractions were constructed: the positive system—whole rumen fluid (WRF), bacterial fraction (B), protozoal fraction (P), fungal fraction (F), bacterial plus protozoal fraction (B+P), bacterial plus fungal fraction (B+F), protozoal plus fungal fraction (P+F), and negative control fraction (CON). The gas production and degradation rate were significantly enhanced by the treatment of cell wall with ball mill ($P < 0.01$); but the pattern of fermentation did not change. There have significant differences of gas production and degradation rates among the various ruminal microbial fractions ($P < 0.01$). WRF fraction exhibited the greatest gas production and degradation rates to the cell wall of corn stover, followed by the co-culture (B+P, P+F, and B+F), whereas monoculture (bacteria, protozoa, and fungi) showed a very low gas production and degradation rates. These results strongly indicated that the digestion of plant cell wall in the rumen was conducted by the interactions among the ruminal bacteria, protozoa, and fungi, and the coactions of the three groups cannot be alternated by either of them or the combines. However, the bacteria and protozoa may make a significant contribution to the degradation of cell wall of corn stover in the rumen. The pH value, the concentrations of total volatile fatty acids, NH₃-N of culture supernatants, as well as the percentage of methane consistently increased with the gas production or degradation rates, which indicated that the fermentation extent rather than the fermentative pattern of plant cell wall was elevated by the ruminal microbial.

Key words degradation; cell wall; bacteria; protozoa; fungi; gas production

植物细胞壁在瘤胃内的降解是在复杂多样的微生物群体的共同作用下实现的。瘤胃细菌、原虫和

收稿日期: 2003-06-16

基金项目: 国家杰出青年基金资助项目(30125033)

作者简介: 高巍, 博士研究生; 孟庆翔, 教授, 博士生导师, 联系作者, 主要从事反刍动物营养研究, E-mail: qxmeng@cau.edu.cn,

Tel: 010-62891156

真菌均可产生纤维素酶和半纤维素酶^[1~3],但它们降解植物细胞壁的相对贡献率及其互作关系还知之甚少^[4],而对此问题的研究有助于深入研究和理解瘤胃微生物降解植物细胞壁的生物学机制。长期以来,由于瘤胃细菌在数量上的绝对优势及其代谢途径的多样性,被认为在植物细胞壁降解过程中发挥着主要作用,且白色瘤胃球菌(*Ruminococcus albus*)、生黄瘤胃球菌(*Ruminococcus flavefaciens*)和产琥珀酸丝状杆菌(*Fibrobacter succinogenes*)是公认的瘤胃纤维分解菌中的优势菌^[5,6]。然而另有试验证明原虫对植物细胞壁的降解率随日粮不同在 5%~21%之间变化^[7],且纤维素酶活性可占到瘤胃纤维素酶(羧甲基纤维素酶)总活性的 62%以上^[8,9]。瘤胃真菌发现以来^[10],由于真菌能够分泌多种纤维素酶和半纤维素酶,菌丝可以穿透植物组织并在其内部生长繁殖并裂解植物组织^[11],推测真菌有可能在瘤胃纤维降解过程中起重要作用。但由于真菌生物量的不确定性和瘤胃生态系统的复杂性,对于真菌在植物细胞壁降解过程中的作用仍需作进一步研究。

植物细胞壁颗粒大小是影响瘤胃微生物降解率的一个重要因素。限制纤维素消化的主要因素是植物细胞壁上的作用位点,而不是微生物的纤维分解活性^[11]。为此,本研究以球磨和未球磨的玉米秸为底物,采用活体外产气量法对瘤胃细菌、原虫、真菌对植物细胞壁降解的相对贡献及其互作关系进行了研究。

1 材料与方法

1.1 植物细胞壁的制备

玉米秸经粉碎并过筛(1 mm)后,每 2.5 g 玉米秸加入 1% 十二烷基硫酸钠(SDS) 100 mL 煮沸 1 h。用 4 层纱布过滤并用自来水反复洗涤以除去细胞内容物和洗涤剂。50 ℃ 烘干后,一部分作为未球磨细胞壁样品,另一部分用球磨机磨 48 h。

1.2 试验动物

4 头安装有永久性瘤胃瘘管的荷斯坦阉公牛作为采集瘤胃液的供体动物。日粮组成为:精料(玉米,57.2%;豆粕,24%;大豆皮,15%;石粉,1.2%;磷酸氢钙,1%;食盐,1.5%;维生素和矿物质预混料,0.1%),3 kg;苜蓿干草,3 kg,每天饲喂 2 次;玉米秸自由采食;自由饮水;饲喂 1 个月后开始试验。

1.3 体外产气量试验

试验所用的仪器设备、溶液配制、样品称量及操

作按 Menke 和 Steingass^[12]进行。将 30 mL 混合培养液加入到 39 ℃ 预热的盛有 200 mg 细胞壁的玻璃注射器(100 mL,德国产)中 39 ℃ 培养。

1.4 瘤胃细菌、原虫和真菌的分离

按 Lee 等^[13]的化学处理法来分离细菌、原虫和真菌。将抗菌剂(每 mL 混合培养液含硫酸链霉素、青霉素 G 和氯霉素各 0.1 mg)、抗原虫剂(含硫酸铜,0.15 mg;硫酸月桂酸钠,0.01 mg;二辛酯磺基琥珀酸钠,0.2 mg)和抗真菌剂(含放线菌酮,0.05 mg;制霉菌素,200 U)按每 mL 混合培养液 0.1 mL 的量加入到玻璃注射器内以达到所需浓度。未作任何处理的混合培养液(即全瘤胃液)作为阳性对照;3 种制剂均加的处理作为负对照。试验处理见表 1。

表 1 应用抗微生物制剂分离瘤胃微生物区系
Table 1 Ruminant microbial fractions and their combinations

抗微生物制剂	WRF	B	P	F	B+P	B+F	P+F	CON
抗菌剂	—	—	+	+	—	—	+	+
抗原虫剂	—	+	—	+	—	+	—	+
抗真菌剂	—	+	+	—	+	—	—	+

注:WRF—全瘤胃液;B—细菌;P—原虫;F—真菌;CON—负对照

1.5 采样与分析

每处理 3 个重复。同时进行 2 个批次培养。连续 72 h 产气量测定和 48 h 消化率及体外发酵参数测定培养。在培养 48 h 后,测定培养液的 pH、酶活性(羧甲基纤维素酶和木聚糖酶)^[13,14]、氨态氮(NH₃-N)^[15]和挥发性脂肪酸(VFA)的含量及细胞壁降解率^[13]。

气相色谱法(GC7890II,上海天美牌)测定发酵 24 h 气体中 CO₂、CH₄ 和 H₂ 含量。气相色谱法测定 VFA 含量。取 1 mL 上清液加入 0.2 mL 25% 偏磷酸溶液(含 2-乙基丁酸 2 g L⁻¹作为内标)进行酸化处理,-20 ℃ 冷冻过夜。融化后 104 r·min⁻¹ 离心 15 min,取 0.6 μL 上清液作气相色谱分析(色谱条件:SUPELCO WAXTM-10 毛细管柱,30 m × 0.32 mm × 0.25 μm,柱温 145 ℃,载气为氦气,流速 20 cm s⁻¹,FID 检测器 280 ℃,分流比 100:1,进样口温度 280 ℃)。

1.6 数据处理

所有试验数据采用 SAS 的一般线性模型(GLM)的二因子方差分析及邓肯氏新复极差法进行统计分析^[16]。

2 结果

2.1 产气量

瘤胃微生物不同区系对球磨与未球磨玉米秸细胞壁的 72 h 体外动态产气量见图 1。由于 2 种底物的负对照产气量很低,分别为 4.48 和 1.53 mL,说明本试验采用的化学处理可以有效地抑制和分离瘤胃微生物。细胞壁经球磨与未球磨处理未明显改变瘤胃微生物不同区系的动态产气量模式,但是,后者极显著地提高了产气量 ($P < 0.01$)。其中 WRF、B + P 和 P 的产气量分别提高 25%、27% 和 88.5%,但 P + F 的产气量降低了 21%。

不同微生物区系间的产气量也存在极显著差异 ($P < 0.01$),并与底物存在极显著的互作 ($P < 0.01$)。WRF 的产气量最高,然后依次为 B + P、P + F、P 和 B + F。

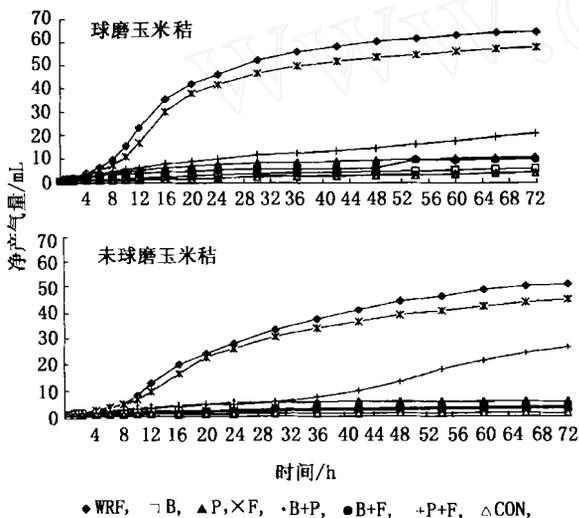


图 1 瘤胃不同微生物区系对球磨与未球磨玉米秸细胞壁的 72 h 体外动态产气量

Fig. 1 Gas production from milled sample and from grounded sample of corn stover cell wall by various ruminal microbial fractions

每个数据点为 200 mg(DM) 底物产气量的 3 个平行样的平均值(下同)

2.2 细胞壁降解率

瘤胃微生物不同区系对球磨与未球磨玉米秸的 48 h 降解率结果见图 2。不同微生物区系及不同底物间的降解率存在极显著的差异 ($P < 0.01$),且微生物区系与底物之间存在极显著的互作关系 ($P < 0.01$)。瘤胃微生物各区系对球磨与未球磨玉米秸细胞壁的 48 h 降解率结果与产气量结果一致。WRF 对球磨与未球磨细胞壁的降解率最高,分别为

67.5% 和 58.0%。

单培养(B、P 和 F)对 2 种底物的降解率较低,均不超过 21%。而混合培养(B + P、B + F 和 P + F)的降解率明显高于单培养。其中 B + P 对 2 种底物的降解率最高,分别为 63.8% 和 56.4%,其次是 P + F(26.5% 和 25.9%) 和 B + F(21.5% 和 16.8%)。

综上所述,混合培养(B + P、B + F 和 P + F)的 72 h 产气量和 48 h 降解率显著高于单培养,特别是 B + P,表明细菌、原虫和真菌之间可能存在某种协同降解效应。

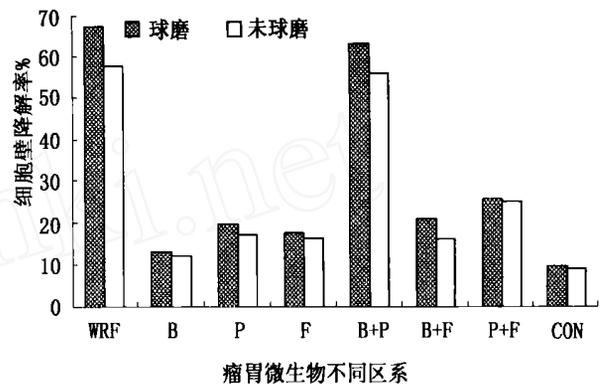


图 2 瘤胃微生物不同区系对球磨与未球磨玉米秸细胞壁的降解率

Fig. 2 Degradability of milled and grounded corn stalk cell wall by the various ruminal microbial fractions

2.3 体外发酵参数

为了解瘤胃微生物不同区系对球磨与未球磨玉米秸细胞壁的体外发酵状况,说明各区系的产气量和降解率变化规律,故对 24 h 发酵产气的气体成分(CO_2 、 CH_4 和 H_2)及 48 h 体外发酵液的 pH 值、纤维素酶和木聚糖酶活性、 $\text{NH}_3\text{-N}$ 和 VFA 的含量进行测定。

球磨细胞壁与未球磨的相比,气体成分发生了明显改变(表 2)。球磨处理使最大产气量提高了 26.4% ($P < 0.01$),其中 H_2 含量增加约 4.8 倍 ($P < 0.01$), CO_2 减少约 5% ($P < 0.05$), CH_4 无明显改变 ($P > 0.05$)。瘤胃微生物不同区系 3 种气体成分的含量存在极显著的差异 ($P < 0.01$)。在 B 和 B + F 区系积聚较多的 H_2 ($P < 0.01$),但在 F 区系却没有检测到,这说明 H_2 可能主要是由细菌产生的。WRF、P、B + P 和 P + F 区系的 CH_4 含量极显著地 ($P < 0.01$) 高于其他区系,而 CO_2 的变化趋势正好与 CH_4 相反。

表 2 瘤胃微生物不同区系 72 h 最大产气量及发酵 24 h 时气体成分分析
Table 2 Gas production and analysis of gas components of corn stalk NDF at 72 h fermentation *in vitro* by various fractions of rumen microorganisms

项 目	处 理		瘤胃微生物区系											
	球磨	未球磨	SEM	P=	WRF	B	P	F	B+P	B+F	P+F	CON	SEM	P=
产气量/mL	22.8	18.0	0.4	0.001	58.6 a	4.8 e	8.6 d	4.3 e	52.3 b	7.2 d	24.4 c	3.0 e	0.7	0.001
CO ₂ / %	75.2	79.6	1.3	0.030	66.1 c	87.2 b	59.1 c	92.9/ab	66.8 c	87.0 b	64.2 c	96.1 a	2.7	0.001
CH ₄ / %	21.7	19.9	1.3	0.346	33.7 a	6.6 b	40.7 a	7.1 b	33.0 a	5.9 b	35.6 a	3.6 b	2.6	0.001
H ₂ / %	3.1	0.5	0.2	0.001	0.2 b	6.2 a	0.2 b	0.0 b	0.2 b	7.1 a	0.2 b	0.3 b	0.3	0.001

注：相同行具不同字母者差异极显著 ($P < 0.01$) 下同。

以羧甲基纤维素和木聚糖为底物,测定了 48 h 培养上清液的纤维素酶(CMCase)和木聚糖酶(xylanase)的活性(表 3)。结果表明,细胞壁颗粒大小及不同微生物区系对羧甲基纤维素酶活性没有显著影响 ($P > 0.1$);但 2 种底物的真菌培养液中木聚糖酶活性显著高于其他区系 ($P < 0.01$)。

细胞壁颗粒大小对发酵液的 pH 值和 NH₃-N 浓度没有显著影响 ($P > 0.05$),但瘤胃微生物不同区

系间的 pH 值和 NH₃-N 浓度存在极显著的差异 ($P < 0.01$;表 4)。WRF 和 B + P 的 pH 值极显著地低于其他区系 ($P < 0.01$)。在各区系中以 P 和 P + F 的 NH₃-N 浓度最高,其次是 WRF ($P < 0.01$)。此结果表明,细胞壁降解活性较高的微生物区系同时也伴随着较旺盛的氮代谢,特别是原虫,推测它在植物细胞壁降解过程中对氮的分解代谢作用较强。

表 3 瘤胃微生物不同区系 48 h 培养上清液的纤维素酶和木聚糖酶的活性 *
Table 3 CMCase and xylanase activities in the culture supernatants at 48 h of fermentation *in vitro* of corn stalk NDF by various fractions of ruminal microorganisms *

项 目	处 理		瘤胃微生物区系											
	球磨	未球磨	SEM	P=	WRF	B	P	F	B+P	B+F	P+F	CON	SEM	P=
CMCase	105.5	106.2	7.1	0.947	98.9	91.4	116.9	117.9	90.8	97.9	103.1	129.7	14.3	0.465
Xylanase	95.8	91.4	2.3	0.190	87.2 bc	89.3 bc	85.6 c	114.4 a	88.9 bc	88.5 bc	92.9 bc	102.0 ab	4.6	0.001

注：羧甲基纤维素酶活性定义为 55 条件下释放的葡萄糖 $\text{nmol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$ ；木聚糖酶活性单位定义为 55 条件下释放的木糖 $\text{nmol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$ ；

表 4 瘤胃微生物不同区系 48 h 培养上清液的 pH 值、NH₃-N 和 VFA 含量
Table 4 Microbial fermentation traits in the culture supernatants at 48 h of fermentation *in vitro* of corn stalk NDF by various fractions of ruminal microorganisms

项 目	处 理		瘤胃微生物区系											
	球磨	未球磨	SEM	P=	WRF	B	P	F	B+P	B+F	P+F	CON	SEM	P=
pH	6.89	6.97	0.03	0.098	6.54 b	7.05 a	7.09 a	7.13 a	6.67 b	6.96 a	7.03 a	6.99 a	0.07	0.001
NH ₃ -N/ (mg dL^{-1})	7.2	6.9	0.1	0.060	7.9 b	6.4 c	8.8 a	6.0 c	6.3 c	6.1 c	9.0 a	5.9 c	0.28	0.001
总 VFA/ (mmol L^{-1})	31.7	31.5	0.6	0.843	48.3 a	24.0 c	29.9 b	24.1 c	47.0 a	24.0 c	30.9 b	24.3 c	1.2	0.001
VFA 摩尔比例														
乙酸/ %	66.4	66.7	0.4	0.606	66.9	65.6	65.7	65.9	67.3	66.0	67.6	67.2	0.8	0.465
丙酸/ %	15.9	15.1	0.2	0.001	19.2 a	14.4 bc	14.8 b	14.2 bc	19.5 a	14.6 bc	13.7 c	13.8 c	0.3	0.001
丁酸/ %	10.2	9.9	0.2	0.389	8.6 b	10.6 a	10.7 a	10.8 a	8.1 b	11.1 a	10.5 a	10.4 a	0.4	0.001
戊酸/ %	3.3	4.4	0.2	0.004	2.1 d	5.3 a	3.4 bcd	4.8 ab	2.4 cd	4.3 ab	3.8 abc	4.6 ab	0.5	0.001
异丁酸/ %	1.8	1.6	0.1	0.328	1.3 b	1.6 b	2.5 a	1.7 b	1.2 b	2.0 a	1.5 b	1.7 b	0.3	0.027
异戊酸/ %	2.4	2.3	0.1	0.162	2.0 cd	2.5 ab	2.9 a	2.5 ab	1.6 d	2.1 bcd	2.9 a	2.4 abc	0.2	0.001

注：异丁酸差异显著 ($P < 0.05$);其他差异极显著 ($P < 0.01$)。

玉米秸细胞壁颗粒大小对总 VFA 浓度没有显著 ($P > 0.2$) 影响,但使丙酸和戊酸的摩尔比例发生改变,即丙酸比例增加而戊酸比例减少 ($P < 0.05$)。瘤胃微生物区系间的总 VFA 和各种 VFA (乙酸除外)的摩尔比例有极显著的差异 ($P < 0.01$)。与产气量和降解率结果高度一致,即细胞壁降解活性高的区系其 VFA 总量也相应增高。WRF 和 B + P 区系的总 VFA 最高,其次是 P 和 P + F 区系。与负对照相比,乙酸的摩尔比例没有明显改变,但丙酸的摩尔比例增加,而丁酸和戊酸的摩尔比例相应降低了 ($P < 0.01$)。

3 讨论

1) 反刍动物瘤胃内的细菌、原虫和真菌形成一种复杂的共生系统,植物细胞壁结构性碳水化合物如纤维素在厌氧条件下被微生物降解,并最终为宿主提供所需的能量^[17]。瘤胃微生物发酵产生的气体量与饲料的降解率及能量价值高度相关^[18]。本试验也发现,以球磨或未球磨玉米秸细胞壁为底物,瘤胃微生物不同区系的产气量与降解率的结果相一致。但球磨细胞壁比未球磨的显著提高了产气量和降解率。在各种微生物区系中,全瘤胃液的产气量和降解率均最高,导致发酵液的 pH 值下降,总 VFA 浓度增加及各种 VFA 摩尔比例的改变等,此结果进一步说明植物细胞壁在瘤胃内的降解是在细菌、原虫和真菌的协同作用下完成的,而不是一两种微生物所能达到的。

在单培养(B、P和F)中,原虫的产气量和降解率相对较高,而细菌和真菌的产气量和降解率则很低。此结果与前人^[13]的研究结果不一致。由于细菌在数量上的绝对优势及其代谢途径的多样性,它被认为在植物细胞壁降解过程中发挥主要作用^[5]。此外,Hidayat等^[19]报道绵羊瘤胃内原虫的产气速率最快,其次是全瘤胃液,然后是去原虫的瘤胃液,提示绵羊瘤胃内的细菌和原虫均具有较高的纤维分解活性。另据报道,原虫对植物细胞壁的降解率随日粮而变化在5%~21%之间^[7],且其纤维素酶活性可占到瘤胃纤维素酶(羧甲基纤维素酶)总活性的62%以上^[8,9,20],可降解瘤胃内1/4到1/3的植物纤维^[21~24]。但另一种观点认为,真菌可以渗透到细菌不能到达的植物组织内部,推测真菌在纤维素消化过程中起重要作用^[1]。Lee等^[13]报道,瘤胃内大部分植物细胞壁降解是由真菌完成的,细菌的纤维

降解活性很低,而原虫基本不具有纤维降解活性。研究显示,试验结果的不一致主要是由试验方法造成的。本试验也可能低估了单培养的产气量和降解率,其原因尚不清楚。

在混合培养(B + P、B + F和P + F)中,B + P和P + F的产气量显著高于各自相应的单培养,尤其是B + P,表明细菌和原虫之间在降解植物细胞壁过程中存在协同效应。此结果与Yoder等^[25]和Onodera等^[26]的结果一致。Newbold等^[27]证明原虫虽可降低瘤胃细菌总数,但纤维分解菌的数量却未减少。Opin^[28]认为虽然原虫不是动物生存所必需,但原虫的存在可以加快植物纤维的消化速度。在短期体外培养中,由于原虫可以吞噬真菌的菌丝和孢子囊,一般认为原虫和真菌之间可能存在负协同效应^[22]。但本试验却发现原虫和真菌间存在正协同效应,特别是未球磨玉米秸细胞壁在培养36h后产气量逐步上升至试验结束。

2) 对各种微生物区系的气体成分(CO₂、CH₄和H₂)进行分析发现,WRF、P、B + P和P + F区系中CH₄的百分含量很高。由于单培养原虫的CH₄产量与WRF、B + P和P + F区系没有差异,且在这些区系当中都存在原虫,推测CH₄累积可能与原虫有密切关系。这与前人的研究发现相吻合,即去除原虫后CH₄数量减少约30%~45%^[29~31]。原虫的主要代谢产物是CO₂、H₂和VFA^[3,32],并不包括CH₄;本试验的负对照显示,瘤胃微生物的产气可以被化学试剂有效抑制,且其他区系的甲烷的产量很低,CH₄从何而来?已知瘤胃球菌、真细菌、梭菌、厌氧真菌和原虫都可以产生氢气,特别是原虫。而且原虫还可以产生大量的甲酸。据测定体外培养的原虫每个每天可产生5nmol的氢气和100nmol的甲酸。瘤胃内的甲烷菌则利用原虫产生的氢气和甲酸来合成甲烷^[31]。据此分析,我们认为甲烷菌只有在原虫体内与其形成内共生体(endosymbionts)才有可能不被抗生素抑制、并充分利用原虫代谢产生的氢气和甲酸合成甲烷,但此机制还有待进一步试验证实。

本试验没有观察到培养液上清液中纤维素酶和木聚糖酶活性与产气量或降解率间的一致性变化规律,这与Lee等^[13]的结果不一致。只有真菌的木聚糖酶活性显著高于其它区系($P < 0.01$)。这是否与纤维素酶或半纤维素酶在培养液和发酵底物间的分布不同有关还不清楚。Coleman^[9]也发现在绵羊瘤胃液上清液中纤维素酶活性非常低的现象。

在微生物各区系中以 P、P + F 和 WRF 的 $\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度较高。推测原虫在植物细胞壁降解过程中对氮的分解代谢作用较强。原虫可以吞噬细菌并同化相当一部分细菌氮和其它蛋白质;同时蛋白质又可为原虫提供可发酵能量^[3]。去原虫可以降低瘤胃氨浓度,故原虫又被喻为瘤胃产氨的催化剂^[33]。

WRF 和 B + P 的总 VFA 浓度显著高于其他区系,说明细菌和原虫的互作对植物细胞壁降解贡献程度更大,这与其产气量和降解率结果相吻合。与其他区系相比,细菌和原虫共培养区系的乙酸摩尔比例无明显改变,但丙酸的比例增加了,而丁酸和戊酸的比例相应减少。此结果与 Yoder 等^[25]的结果不一致,他们发现细菌和原虫共同培养区系的乙酸比例下降,而丁酸的比例增加。

3) 通过对瘤胃微生物不同区系的细胞壁降解活性及发酵参数的综合比较发现,WRF 的细胞壁降解活性最高,其次是 B + P 区系,说明瘤胃细菌和原虫在植物细胞壁降解过程中发挥着重要作用。玉米秸细胞壁经球磨处理后,可以显著提高其产气量和降解率。这可能是由于增大了玉米秸细胞壁颗粒的表面积,从而增加了微生物的作用位点的缘故^[11]。与此同时,伴随着降解活性的提高,发酵液的 pH 值降低, $\text{NH}_3\text{-N}$ 和总 VFA 的浓度增高,这更进一步说明微生物的体外发酵程度明显提高了。

4 结 论

反刍动物瘤胃内植物细胞壁的降解是由瘤胃细菌、原虫和真菌的协同作用来完成的。瘤胃细菌和原虫对植物细胞壁的降解存在明显的协同效应,且相对贡献最大。关于单种瘤胃微生物(即细菌、原虫和真菌)降解植物细胞壁的作用还有待进一步研究证实。增大玉米秸细胞壁颗粒的表面积,可以显著提高其降解率。

本试验的气体成分和挥发性脂肪酸的气相色谱分析得到博士生常影和本科生张元庆、窦萌萌、实验员蒋丽萍等的大力支持和帮助,在此谨表谢意。

参 考 文 献

[1] Bauchop T. The anaerobic fungi in rumen fibre digestion [J]. *Agric Environ*, 1981, 6: 339 ~ 348
 [2] Clarke R T J. Protozoa in the rumen ecosystem [A]. In: Clarke R T J, Bauchop T, eds. *Microbial Ecology of the*

Gut [C]. New York: Academic Press, Inc, 1977. 251 ~ 275
 [3] Hungate R E. The Rumen and Its Microbes [M]. New York: Academic Press, Inc, 1966. 92 ~ 146
 [4] Stewart C S. Plant - animal and microbial interactions in ruminant fibre degradation [A]. In: Prins R A, Stewart C S, eds. *Microorganisms in Ruminant Nutrition* [C]. The Netherlands: Nottingham University Press, 1993. 13 ~ 28
 [5] Cheng K J, Forsberg C W, Minato H, et al. Microbial ecology and physiology of feed degradation within the rumen [A]. In: Tsuda T, Sasaki Y, Kawashima R, eds. *Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants* [C]. Toronto, Ontario, Canada: Academic Press, 1991, 595 ~ 624
 [6] Windham W R, Akin D E. Rumen fungi and forage fiber degradation [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1984, 48: 473 ~ 476
 [7] Dijkstra J, Tamminga S. Simulation of the effects of diet on the contribution of rumen protozoa to degradation of fibre in the rumen [J]. *Brit J Nutr*, 1995, 74: 617 ~ 634
 [8] Coleman G S. The cellulase content of 15 species of entodiniomorphid protozoa, mixed bacteria and plant debris isolated from the oxine rumen [J]. *J Agric Sci Camb*, 1985, 104: 349 ~ 360
 [9] Coleman G S. The distribution of carboxymethylcellulase between fractions from the rumen of sheep containing no protozoa or one of five different protozoal populations [J]. *J Agric Sci Camb*, 1986, 106: 121 ~ 127
 [10] Orpin C G. Studies on the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis* [J]. *J Gen Microbiol*, 1975, 91: 249 ~ 262
 [11] Dehority B A, Tirabasso P A. Effect of ruminal cellulolytic bacterial concentrations on in situ digestion of forage cellulose [J]. *J Anim Sci*, 1998, 76: 2905 ~ 2911
 [12] Menke K H, Steingass H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid [J]. *Anim Res Dev*, 1989, 28: 7 ~ 55
 [13] Lee S S, HA J K, Cheng K J. Relative contributions of bacteria, protozoa, and fungi to in vitro degradation of orchard grass cell walls and their interactions [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66: 3807 ~ 3813
 [14] Miller J L, Blum R, Glennon W E, et al. Measurement of carboxymethyl cellulase activity [J]. *Anal Biochem*, 1960, 1: 127 ~ 132
 [15] Broderick G A, Kang J H. Automated simultaneous determination of ammonia and amino acids in ruminal fluids and in vitro media [J]. *J Dairy Sci*, 1980, 63: 64
 [16] SAS Institute. User's Guide: Statistics [M]. Cary, N C, version 6 editions. SAS Institute, Inc, 1996
 [17] Schofield P. Gas production methods [A]. In: D Mello J P F, ed. *Farm Animal Metabolism and Nutrition* [C]. UK: CABI Publishing, 2000, 209 ~ 232

- [18] Menke K H, Raab L, Salewski A, et al. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro* [J]. *J Agric Sci Camb*, 1979, 93: 217 ~ 222
- [19] Hidayat K, Hillman K, Newbold C J, et al. The contributions of bacteria and protozoa to ruminal forage fermentation *in vitro*, as determined by microbial gas production [J]. *Anim Feed Sci Tech*, 1993, 42: 193 ~ 208
- [20] Williams A G, Withers S E. Effect of ciliate protozoa on the activity of polysaccharide-degrading enzymes and fiber breakdown in the rumen ecosystem [J]. *J Appl Bact*, 1991, 70: 144 ~ 155
- [21] Demeyer D I. Rumen microbes and digestion of plant cell walls [J]. *Agric Environ*, 1981, 6: 295 ~ 337
- [22] Joblin K N. Bacterial and protozoal interactions with ruminal fungi [A]. In: Akin D E, Ljungdahl L G, Wilson J R, et al, ed. *Microbial and Plant Opportunities to Improve Lignocellulose Utilization by Ruminants* [C]. London: Elsevier Science Publishing Co, Inc, New York, Amsterdam, 1990, 311 ~ 324
- [23] Amos H E, Akin D E. Rumen protozoal degradation of structurally intact forage tissues [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1978, 36: 513 ~ 522
- [24] Williams A G, Strachan N H. The distribution of polysaccharide-degrading enzymes in the bovine digesta ecosystem [J]. *Current Microbiol*, 1984, 10: 215 ~ 220
- [25] Yoder R D, Trenkle A, Burroughs W. Influence of rumen protozoa and bacteria upon cellulose digestion *in vitro* [J]. *J Anim Sci*, 1966, 25: 609 ~ 612
- [26] Onodera R, Yamasaki N, Murakami K. Effect of inhabitation by ciliate protozoa on the digestion of fibrous materials *in vivo* in the rumen of goats and in an *in vitro* rumen microbial ecosystem [J]. *Agric Biol Chem*, 1988, 52: 2635 ~ 2637
- [27] Newbold C J, Griffin P W, Wallace R J. Interaction between rumen bacteria and ciliate protozoa in their attachment to barley straw [J]. *Lett Appl Microbiol*, 1989, 8: 63 ~ 66
- [28] Orpin C G. The role of ciliate protozoa and fungi in the rumen digestion of plant cell walls [J]. *Anim Feed Sci Tech*, 1983/84, 10: 121 ~ 143
- [29] Eadie J M, Gill J C. The effect of the absence of rumen ciliate protozoa on growing lambs fed on a roughage-concentrate diet [J]. *Brit J Nutr*, 1971, 26: 155 ~ 167
- [30] Whitelaw F G, Eadie J M, Bruce L A, et al. Methane formation infaunated and ciliate-free cattle and its relationship with rumen volatile fatty acid proportions [J]. *Brit J Nutr*, 1984, 52: 261 ~ 275
- [31] Ushida K, Tokura M, Takenaka, et al. Ciliate protozoa and ruminal methanogenesis [A]. In: Onodera R, Itabashi H, Ushida K, et al. eds. *Rumen Microbes and Digestive Physiology in Ruminants* [C]. Tokyo: Japan Scientific Societies Press, 1997. 209 ~ 220
- [32] Williams A G. Metabolic activities of rumen protozoa [A]. In: Nolan J V, Leng R A, Demeyer D I, eds. *The Roles of Protozoa and Fungi in Ruminant Digestion* [C]. Armidale, Australia: New England, 1988, 97 ~ 126
- [33] Jouany J P, Ushida K. Plant cell-wall degradation by rumen protozoa [A]. In: Prins R A, Stewart C S, eds. *Microorganisms in Ruminant Nutrition* [C]. The Netherlands: Nottingham University Press, 1994. 69 ~ 78

科研简讯

“青刈黑麦、紫花苜蓿高产优质产业化生产技术集成试验示范”通过验收

2003年9月20日,我校承担的国家农业科技跨越计划项目“青刈黑麦、紫花苜蓿高产优质产业化生产技术集成试验示范”在河北省沧州市南皮县、吴桥县通过农业部专家组验收。项目组经过3年的努力,在青刈黑麦、紫花苜蓿产业化技术集成试验示范中完成新品种审定3个,通过苜蓿、黑麦的施肥、灌溉、杂草防除等一系列技术措施的研究,提出栽培技术标准3套,加工技术标准7套,产品利用技术标准6套;其中青刈黑麦示范面积约667 hm²,推广面积约6670万hm²,干草产量在节水灌溉条件下可达到1.2~1.6万kg·hm⁻²;紫花苜蓿示范面积和推广面积分别达到0.5和5.5万hm²,干草产量在旱作和节水灌溉等不同生产条件下分别达到7500~10500kg·hm⁻²和16500kg·hm⁻²,优质产品产量达到4万t,圆满完成了指标任务。

(科技处供稿)