

不同饲养水平下瘤胃微生物蛋白合成效率的研究*

孙维斌¹, 王加启², 毛玉胜¹, 陈 宏^{1,3}

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨陵 712100; 2 中国农业科学院 畜牧研究所, 北京 100094;

3 徐州师范大学 生物技术研究所, 江苏 徐州 221009)

[摘 要] 用6头装有瘤胃、十二指肠、回肠瘘管的西门塔尔杂交阉牛, 以 Cr_2O_3 为指示剂测定食糜流量, 用嘌呤氧化法测定RNA当量, 研究不同饲养水平下, 西门塔尔杂交阉牛瘤胃微生物蛋白的合成效率。结果表明, 瘤胃微生物蛋白的合成效率随饲养水平的变化呈规律性变化趋势。其中低饲养水平、中饲养水平较高, 高饲养水平较低。在低、中、高3种饲养水平下, 瘤胃微生物对瘤胃降解氮(RDN)的转化效率(MN/RDN , g/g)分别为 0.64 ± 0.08 , 0.52 ± 0.16 , 0.23 ± 0.03 , 对瘤胃可利用能(RDOM, 瘤胃可消化有机物)的利用效率(MN/RDOM , g/kg)分别为 24.66 ± 4.96 , 27.17 ± 15.18 , 11.92 ± 1.86 。

[关键词] 西杂阉牛; 饲养水平; 瘤胃微生物蛋白; 合成效率

[中图分类号] S816.32

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2002)06-0034-04

在粗饲料的消化过程中, 瘤胃微生物的厌氧发酵起了重要的作用。研究表明^[1], 饲料中大约有70%~80%的可消化有机物和50%的粗蛋白在瘤胃中消化, 同时也合成了对肉牛具有重要营养作用的微生物蛋白(microbial crude protein, MCP)。随着对瘤胃这一活体发酵罐代谢机理认识的深入, 各国先后提出了一些新的蛋白质体系, 如美国的降解和非降解体系^[2,3], 法国的小肠可消化蛋白体系(PDI)^[4]等, 为进一步研究提高反刍动物蛋白质利用效率的营养调控措施及节约饲料蛋白质资源提供了依据。当前, 估测进入小肠的不同来源的蛋白质数量及品质特性的研究, 已成为国内外反刍动物蛋白质营养新体系进一步完善和研究的重点, 而瘤胃微生物对日粮蛋白质的降解和合成效率正是其核心内

容。本研究以我国华北地区的常规饲料为基础日粮, 探讨不同饲养水平下肉牛瘤胃微生物蛋白的合成效率, 以期为我国肉牛饲养业的发展提供一些参考。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 试验动物及管理 以6头体重约(400±24)kg, 安装有瘤胃、十二指肠、回肠末端瘘管的西门塔尔杂交阉牛为试验动物。每日饲喂2次, 早8:00, 晚20:00, 专人护理。

1.1.2 试验期日粮组成 根据NRC(1996)肉牛饲养标准, 以棉籽饼、玉米等为原料, 按不同饲养水平配制3种日粮(表1)。

表1 试验日粮组成及其营养指标

Table 1 Ingredients and nutrient parameters of diets

饲养水平 Feeding levels	日粮构成/% Dietary ingredients					营养指标 Nutritional parameters							
	氨化稻草 Ammonia- ted rice straw	棉籽饼 Cotton- seed meal	玉米 Ground corn	添加剂 Addi- tives	合计 Total	代谢能 浓度 ME/ (MJ·kg ⁻¹)	粗蛋白/% CP	氮能比 CP/ME	中性 洗涤 纤维/% NDF	酸性 洗涤 纤维/% ADF	淀粉/% Starch	Ca/%	P/%
低Low	45.80	15.27	38.17	0.76*	100.00	6.90	11.68	16.90	48.88	27.43	26.58	0.38	0.29
中Middle	32.09	19.26	47.50	1.15**	100.00	8.75	14.86	16.90	38.04	22.93	31.48	0.47	0.32
高High	5.25	38.92	55.29	0.54**	100.00	11.89	20.12	16.90	24.84	11.73	38.28	0.69	0.49

注: * 含0.64%的添加剂和0.51%的盐; ** 仅含添加剂, 盐在饲喂时另外添加。

Note: * contains 0.64% of additives and 0.51% of sodium chloride; ** only contains additives, 0.51% of sodium chloride was added at feeding

* [收稿日期] 2001-11-22

[基金项目] 国家“九五”科技攻关重中之重项目专题(96-003-04-09)

[作者简介] 孙维斌(1973-), 男, 陕西留坝人, 讲师, 在读博士, 主要从事养牛生产及生物技术与动物遗传育种研究。

1.1.3 试验安排 全部试验分为3期,每期用6头瘰管牛进行试验;每期试验预试期11 d,正试期5 d,在正试期采集各种样品。

1.2 方法

标记物Cr₂O₃的投放、各种样品的采集及RNA的测定(嘌呤氧化法)均参照文献[5](RNA标准曲

线如图1);常规成分的测定参照文献[6];微生物分离方法、氨氮的测定方法参照文献[7];Cr₂O₃的测定参照文献[8](Cr标准曲线如图2);挥发性脂肪酸用高效液相色谱仪(HPLC)测定;所有数据用SA S软件处理,进行二因素方差分析。

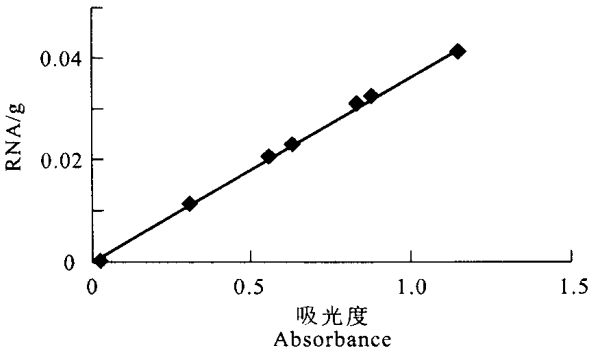


图1 RNA标准曲线
Fig. 1 RNA standard curve

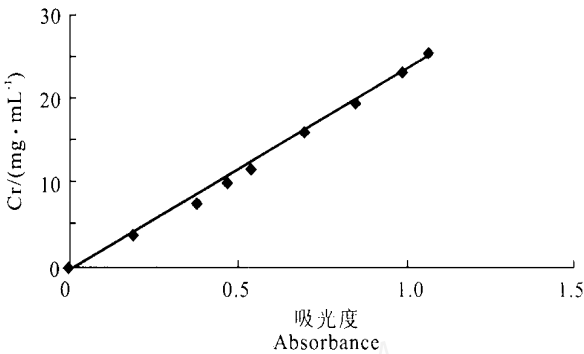


图2 Cr标准曲线
Fig. 2 Cr standard curve

2 结果与分析

2.1 饲养水平对瘤胃pH值的影响

不同饲养水平下瘤胃pH值的变化见图3。

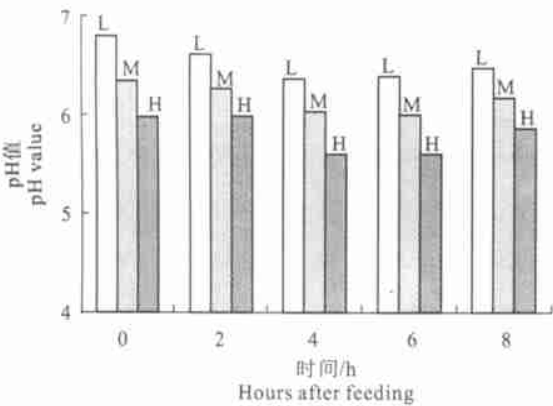


图3 不同饲养水平下瘤胃pH值的变化规律
L. 低饲养水平;M. 中饲养水平;H. 高饲养水平
Fig. 3 Changing regulation of rumen pH value at different feeding levels
L. Low feeding level;M. M iddle feeding level;H. High feeding level

随着饲养水平的提高,瘤胃pH值显著下降($P < 0.05$) (图3),其中,低饲养水平最高,平均为 6.51 ± 0.18 ,高饲养水平最低,平均为 5.78 ± 0.21 (表2),这与不同饲养水平下日粮的构成有关。3种饲养水平下日粮精粗比分别为5:5,7:3和9:1,

随饲养水平的提高动物摄入的易发酵碳水化合物(淀粉)增加,碳水化合物发酵速度加快,瘤胃液乳酸大量积累,从而引起瘤胃pH值的下降。特别是在高饲养水平下,日粮中精料达90%,其瘤胃pH在1 d内的各时间点均低于瘤胃正常的pH值(6~7)水平。

2.2 饲养水平对瘤胃发酵特征的影响

饲养水平对瘤胃发酵特征有明显的影响(表2)。低饲养水平、中饲养水平间瘤胃液总挥发性脂肪酸中的乙酸比例差异不显著($P > 0.05$),二者明显高于高饲养水平下总挥发性脂肪酸中的乙酸比例($P < 0.05$)。随着饲养水平的提高,总挥发性脂肪酸中的丙酸比例显著升高($P < 0.05$),这与日粮中所含淀粉量的增加有关,因为易发酵的碳水化合物(淀粉)发酵主要生成丙酸,而粗纤维发酵主要产生丁酸和乙酸。低饲养水平、中饲养水平间丁酸比例差异不显著($P > 0.05$),均低于高饲养水平($P < 0.05$)。随着饲养水平的提高,乙酸和丁酸浓度之和与丙酸的比值升高,低饲养水平、中饲养水平之间差异不显著($P > 0.05$),均高于高饲养水平($P < 0.05$);乙酸/丙酸随饲养水平的提高而降低,且随饲养水平的提高,瘤胃发酵由乙酸型发酵逐渐转变为丙酸型发酵。另外,在高饲养水平下,各试验牛的瘤胃中均有大量泡沫积累,不同程度的出现瘤胃臌气现象。

表 2 不同饲养水平下的瘤胃发酵特征

Table 2 Rumen fermentation characteristics at different feeding levels

指标 Item s	饲养水平 Feeding levels		
	低 Low level	中 M iddle level	高 High level
精：粗 Ratio of concentrate and forge	5：5	7：3	9：1
瘤胃 pH 值 Rumen pH value	6.51±0.18 a	6.14±0.15 b	5.78±0.21 c
瘤胃液NH ₃ 质量浓度/(mg·mL ⁻¹) Rumen fluid ammonia concentration	0.14±0.03 a	0.22±0.07 b	0.72±0.14 c
瘤胃液总挥发性脂肪酸质量浓度/(mg·mL ⁻¹) Total volatile fatty acid in rumen fluid	4.95±0.30 a	4.02±0.44 b	114.13±0.31 b
乙酸/% Acetatic acid	67.60±2.00 a	69.80±3.72 a	60.20±7.30 b
丙酸/% Propionic acid	15.80±1.00 a	18.60±3.47 a	21.20±8.00 b
丁酸/% Butyric acid	14.80±1.27 a	13.20±2.43 a	18.60±8.42 a
(乙酸+ 丁酸)/丙酸 (Acetatic acid+ Butyric acid)/Propionic acid	5.22±0.28 a	4.53±0.67 a	3.79±0.64 b
乙酸/丙酸 Acetatic acid/Propionic acid	4.29	3.82	2.87
发酵类型 ^[9] Fementation type	乙酸型 Acetate type	乙酸型 Propionate type	乙—丙型 Acetate-propionate type

注：相同字母者差异不显著($P>0.05$),不同字母者差异显著($P<0.05$ 或 $P<0.01$)(以下同)。
Note: In this and subsequent tables, means with the same letter are not significantly different ($P>0.05$) and with the different subscripts are significantly different ($P<0.05$ and $P<0.01$).

2.3 饲养水平对瘤胃微生物蛋白的影响 影响(表 3)。

饲养水平对瘤胃微生物的产量及组分均有一定

表 3 饲养水平对瘤胃微生物蛋白的组份及其产量的影响

Table 3 Effects of feeding levels on compositions and yield of rumen microbial protein

指标 Item s	饲养水平 Feeding levels		
	低 Low level	中 M iddle level	高 High level
微生物 RNA 当量/% Microbial RNA equivalent	13.86±3.37 a	16.59±2.35 ab	18.35±1.52 b
微生物 N 当量/% Microbial nitrogen equivalent	6.77±1.02 a	7.18±0.90 a	6.47±0.65 a
(微生物 RNA 当量/微生物 N 含量)/% Microbial RNA equivalent/Microbial nitrogen content	2.07±0.56 a	2.45±0.87 ab	2.85±0.24 b
十二指肠食糜非氨氮含量(NAN)/% Non-ammonia nitrogen concentration in duodenum content	2.78±0.07 a	2.74±0.02 a	3.83±0.22 a
十二指肠食糜中 RNA 当量/% RNA equivalent in duodenum content	1.19±0.27 a	1.48±0.22 b	1.89±0.56 b
十二指肠 NAN 中微生物氮(MN) 的含量/% Microbial nitrogen concentration in duodenum non- ammonia nitrogen	0.23±0.06 a	0.47±0.20 a	0.17±0.03 b
十二指肠食糜 MN 流量/(g·d ⁻¹) Microbial nitrogen flux in duodenum content	33.62±9.00 a	76.02±3.12 b	34.03±6.05 a
微生物蛋白合成效率 Microbial protein synthesis efficiency			
MN/RDN [*] /(g·g ⁻¹)	0.64±0.08 a	0.52±0.16 a	0.23±0.03 b
MN/RDOM ^{**} /(g·kg ⁻¹)	24.66±4.96 a	27.17±3.18 a	11.92±1.86 b
回肠 RNA 当量/% Microbial RNA equivalent in ileum content	0.99±0.06 a	0.96±0.07 a	1.07±0.23 a
小肠 RNA 表观消化率/% Apparent digestibility of RNA in small intestine	56.45±11.51 a	69.15±4.99 b	63.90±3.27 a b

微生物 RNA 当量随饲养水平的提高而升高($P<0.05$),低饲养水平和中饲养水平、中饲养水平和高饲养水平之间差异不显著($P>0.05$),而高饲养水平与低饲养水平间差异显著($P<0.05$);饲养水平对瘤胃微生物氮含量没有影响($P>0.05$);十二指肠食糜中的 RNA 当量也受饲养水平的影响,中饲养水平和高饲养水平之间差异不显著($P>0.05$),二者均高于低饲养水平($P<0.05$);微生物氮在十二指肠氮流量中所占的比例受饲养水平的影响,低饲养水平和高饲养水平间差异不显著

($P>0.05$),二者均低于中饲养水平($P<0.05$);回肠食糜中的 RNA 当量不受饲养水平的影响($P>0.05$),小肠中 RNA 的表观消化率,低饲养水平和中饲养水平差异显著($P<0.05$),而中饲养水平和高饲养水平、高饲养水平和低饲养水平间差异不显著($P>0.05$)。

由表 3 可知,十二指肠微生物氮的流量受饲养水平的影响较大($P<0.05$),中饲养水平显著高于低饲养水平和高饲养水平。就微生物蛋白的合成效率而言,低饲养水平、中饲养水平间差异不显著

($P > 0.05$), 却均高于高饲养水平($P < 0.01$)。

3 讨 论

瘤胃内微生物蛋白质合成效率的测定是国内外蛋白质新体系研究的重要组成部分。影响瘤胃微生物合成效率的因素很多^[9~12], 但瘤胃微生物的生长主要依赖于瘤胃可利用能和可利用氮。因此, 国际上都采用瘤胃可利用能或瘤胃降解氮来衡量微生物蛋白的合成效率。

试验证明, 只有在瘤胃氮浓度较低时, 日粮氮水平才会影响微生物蛋白的合成, 当瘤胃氮质量浓度达到 20~50 mg/L 时, 瘤胃微生物对瘤胃降解氮的利用效率最大, 而此时日粮蛋白水平约为 12%~13%; 当瘤胃氮质量浓度高于 20~50 mg/L 时, 到达小肠的微生物氮与瘤胃可消化有机物呈正相关。Klusmeyer 等^[13]报道, 日粮蛋白水平由 11% 上升到 14.5% 时, 氮的摄入量大大增加, 但到达小肠的微生物氮几乎不变。另外, Potkanski^[14]证实, 在日粮蛋白水平不超过 14% 时, 流经十二指肠的微生物蛋白会随日粮蛋白水平的提高而增加, 而在日粮蛋白水平

高于 14% 时, 流经十二指肠的微生物蛋白不随日粮蛋白水平的提高而增加。以上结果表明, 在一般饲养水平下, 日粮蛋白达到 14% 时, 微生物蛋白对瘤胃降解氮的利用效率最大。本研究中, 低、中和高饲养水平下, MN/RDN 分别为 0.64, 0.52, 0.23, 均低于其他新体系的平均值 0.80, 这可能与瘤胃内的氨浓度较高有关^[15]。

微生物蛋白的合成量还受日粮总可消化养分(TDN)和瘤胃可发酵能(RDOM)的影响。有试验结果表明^[16], MN 产量与 ME 的进食量呈正比关系。本研究中, 在低、中饲养水平下瘤胃微生物氮的合成效率分别为 24.66, 27.17 g/kg DOM (可消化有机物), 这与莫放等^[11]推荐的 23.04 g/kg DOM 相当, 但在高饲养水平下仅有 11.92 g/kg DOM。另外, 本研究中还发现, 饲养水平对瘤胃微生物的氮含量没有影响, 但随饲养水平的提高, 微生物 RNA 含量及十二指肠食糜中 RNA 含量升高, 这与 Czerkawski^[17]的研究结果有所不同, 原因有待于进一步探讨。

[参考文献]

- [1] 谢选武 反刍动物饲料[M]. 成都: 四川科学出版社, 1989
- [2] Burroughs W, Nelson D K, Mertens D R. Protein physiology and its application in the lactating cow: The metabolizable protein feeding standard[J]. J Anim Sci, 1975, 41: 933- 944
- [3] Burroughs W, Nelson D K, Mertens D R. Production efficiency in the high-production cow: evaluation of protein nutrition by metabolizable protein and urea fermentation potential[J]. J Dairy Sci, 1974, 58: 611
- [4] Verite R, Jounet M, Jarrige R. A new system for the protein feeding of ruminants: the PDI system[J]. Livestock Prod Sci, 1979, 6: 349
- [5] 卢德勋, 谢崇文 现代反刍动物营养研究方法和技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1990
- [6] 杨 胜 饲料分析及饲料质量检测技术[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1996
- [7] 陈喜斌 不同氮源日粮在瘤胃发酵和消化规律的研究[D]. 北京: 北京农业大学, 1994
- [8] 姜云侠, 李文英 碱烧结法测定三氧化二铬的精确度检验及其在猪消化试验中的应用[R]. 北京: 中国农业科学院畜牧研究所科学研究报告, 1983
- [9] 毛玉胜 黄牛高产理论与实践[M]. 西安: 陕西科技出版社, 1996
- [10] 韩兴泰 牦牛瘤胃细菌中核糖核酸含量及其与细菌总氮比值的研究[J]. 动物营养学报, 1998, 10(2): 35- 39
- [11] 莫 放, 冯仰廉 RNA 和 DA PA 标记法测牛瘤胃微生物蛋白的研究[J]. 动物营养学报, 1991, 3: 2
- [12] Ørskov E R, McDonald I The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage[J]. J Agric Sci Camb, 1979, 92: 499
- [13] Klusmeyer T H, McCarthy R D, Clark J H, et al Effects of source and amount of protein on ruminal fermentation and passage of nutrients to the small intestine of lactating cows[J]. J Dairy Sci, 1990, 73: 526
- [14] Potkanski 饲喂粗料日粮(不同蛋白水平)的羔羊的不同氮组分和单个氨基酸的十二指肠流动和吸收[A]. 第五届国际蛋白质代谢与营养讨论会论文摘要[C]. 北京: 中国畜牧兽医学动物营养研究会, 1985
- [15] 陈喜斌, 冯仰廉 日粮降解氮转化为瘤胃微生物氮效率影响因素的研究[J]. 中国畜牧杂志, 1995, 31(4): 3- 5
- [16] Hoover W H. 瘤胃内蛋白质和碳水化合物的相互作用[J]. 国外畜牧学—草食家畜, 1991, 1: 26- 28
- [17] Czerkawski J W. Chemical composition of microbial matter in rumen[J]. J Sci Food Agric, 1976, 27: 62

(下转第 42 页)

- encephalitis antibody in sera from humans, swine and several animal species [J]. J Virol Methods, 1984, 9 (2): 143- 151.
- [11] Shu P Y, Chen L K, Chang S F, et al. Antibody to the nonstructural protein NS1 of Japanese encephalitis virus: potential application of mAb-based indirect ELISA to differentiate infection from vaccination [J]. Vaccine, 2001, 19 (13- 14): 1753- 1763.
- [12] 巴德年. 现代免疫学技术与应用 [M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998.
- [13] 杜 平. 医用实验病毒学 [M]. 北京: 人民出版社, 1985.
- [14] 黄祯祥. 医学病毒学基础及实验技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1990.
- [15] Dewasthaly S, Ayachit V M, Sarthi S A, et al. Monoclonal antibody raised against envelope glycoprotein peptide neutralizes Japanese encephalitis virus [J]. Arch Virol, 2001, 146 (7): 1427- 1435.
- [16] 田长印, 赵文学, 蔡芝芳, 等. 乙脑单克隆抗体治疗流行性乙型脑炎的临床探讨 [J]. 中国人兽共患病杂志, 1997, 13 (4): 79.

Research of using HRP-SPA ELISA to detect Japanese B encephalitis antibody

CHEN Jian-ming¹, ZHANG Yan-ming¹, LI Xiao-cheng²

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Animal Quarantine Institute, Ministry of Agriculture, Qingdao, Shandong 266032, China)

Abstract: The HRP-SPA ELISA was established for detecting Japanese B Encephalitis (JEV) antibody. JEV antigen was propagated in Hela cell and purified by salting out method. HRP-SPA was used as second antibody. Chess titration test obtained optimal working requirement, such as antigen concentration 1:800, serum dilution 1:50, HRP-SPA dilution 1:1000. It showed that the ELISA had good repeatability, high specificity and high sensitivity. It was successfully applied for detecting antibody of JEV.

Key words: swine; HRP-SPA; ELISA; JEV antibody; veterinary diagnosis

(上接第 37 页)

Synthesis efficiency of rumen microbial protein at different feeding levels

SUN Wei-bin¹, WANG Jia-qin², MAO Yu-sheng¹, CHEN Hong^{1,3}

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Institute of Animal Science, China Academy of Agricultural Science, Beijing 100094, China;

3 Institute of Biotechnology, Xuzhou Normal University, Xuzhou, Jiangsu 221009, China)

Abstract: Six crossbred steers (Simmental × Indigenous yellow cattle) with cannulas in rumen, duodenum and terminal ileum are used for determining the effects of feeding level on synthesis efficiency of rumen microbial protein. The results show that the microbial efficiency was higher at low and middle feeding levels and lower at high feeding level. The efficiency of rumen degradable nitrogen incorporated into microbial protein (MN/RDN, g/g) at low, middle and high feeding level was 0.64 ± 0.08 , 0.52 ± 0.16 and 0.23 ± 0.03 , respectively. The energy utilization efficiency (MN/RDOM, g/kg) at low, middle and high feeding levels was 24.66 ± 4.96 , 27.17 ± 15.18 and 11.92 ± 1.86 , respectively.

Key words: Simmental crossbred steer; feeding level; rumen microbial protein; synthesis efficiency