

地顶孢霉培养物对奶牛体外发酵的影响

李 洋, 窦秀静, 张立阳, 张永根

(东北农业大学动物科技学院, 黑龙江哈尔滨 150030)

中图分类号: S823

文献标识码: A

摘 要: 本试验的目的是研究地顶孢霉培养物对奶牛体外发酵的影响。在人工瘤胃液中, 地顶孢霉培养物的添加剂量是 0.00, 0.30, 0.60 和 0.90 g/L。在体外发酵的 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48 和 72 h 记录产气量。在 24 h 时间点, 取出发酵液测定其 pH 值, 干物质消失率, 挥发性脂肪酸和氨态氮的浓度, 瘤胃微生物菌群相对数量, 甲烷产量和发酵效率。结果表明: 在 24 h 时间点, 地顶孢霉培养物显著降低了瘤胃 pH 值($P<0.05$), 提高了体外产气量($P<0.05$), 体外干物质消失率($P<0.05$), 挥发性脂肪酸含量($P<0.05$) 和氨态氮浓度($P<0.05$), 促进了部分瘤胃微生物的相对菌群数量($P<0.05$), 并降低了甲烷产量($P<0.05$), 但对发酵效率和乙丙比 ($P>0.05$) 没有显著影响。综上所述, 地顶孢霉培养物能够改善瘤胃体外发酵参数, 调节瘤胃微生物菌群结构, 对饲料营养物质的利用可能有促进作用。

关键词: 地顶孢霉培养物; 瘤胃发酵; 奶牛; 体外

古尼虫草是我国稀有的中药材, 其药理成分与冬虫夏草生药相似, 具有免疫调节, 抗炎镇痛等功效^[1]。古尼虫草中功能性成分(虫草酸、虫草素和虫草多糖等)使其具有优秀的药理作用^[2], 但昂贵的价格限制了其在动物生产中的应用和发展。地顶孢霉培养物是由从古尼虫草分离的地顶孢霉菌经人工发酵而得到的产品, 拥有虫草素、虫草酸、多糖、甾醇和氨基酸等功能性成分, 可被用于天然古尼虫草的替代物质。据证明, 添加地顶孢霉培养物能够提高仔猪增重^[3], 提高蛋鸭的体重和产蛋率, 改善蛋品质^[4]。另外, 一些研究也已经证明了地顶孢霉培养物的功能性成分对动物的生长性能, 免疫和抗氧化能力有积极影响^[5, 6]。并且, 虫草素和虫草多糖具有抑菌作用^[7]。在肉鸡中的研究发现, 虫草提取物能够抑制病原菌的生长, 增加肠道内乳酸菌的数量, 转而提高肉鸡体增重^[8]。因此, 地顶孢霉培养物通过对瘤胃微生物的影响来调节瘤胃发酵的作用是非常期待的。因为, 瘤胃发酵的改善是提高奶牛生产性能的有效手段。因此, 本试验的目的就是研究地顶孢霉培养物对奶牛体外发酵的影响, 为地顶孢霉培养物在奶牛生产中的应用提供理论基础和数据支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

地顶孢霉培养物 (*Acremonium terricola* culture, ATC) 购自合肥迈可罗生物工程有限公司。地顶孢霉培养物是由古尼虫草中提取的地顶孢霉菌经固液双相发酵得到的灭活的虫草类真菌饲料添加剂, 含有 26.84% 粗蛋白质 (CP)、5.00% 粗纤维 (CF)、3.06% 粗脂肪 (EE)、4.04% 粗灰分 (ash) 和 61.06% 无氮浸出物 (NFE) [干物质 (DM) 基础]。其中功能性成分含量分别是: 虫草酸 84.50 g/kg、虫草多糖 44.60 g/kg、虫草素 0.432 g/kg、甾醇 0.597 g/kg、总氨基酸 218.1 g/kg。

1.2 试验动物和日粮

体外发酵底物为精料与粗料混合底物,均匀混合后通过 1-mm 筛。发酵瘤胃液取自 3 头体重 600 kg 左右的装有永久性瘤胃瘘管的健康荷斯坦奶牛。晨饲前分别收集 3 头奶牛的瘤胃液,均匀混合,奶牛饲喂日粮配方与发酵底物相同。配方的成分和营养组成如下(干物质基础):苜蓿 2.41%,羊草 27.21%,玉米青贮 20.47%,玉米 22.95%,DDGS 11.16%,小麦麸 4.98%,豆粕 9.15%,石粉 0.96%,磷酸氢钙 0.23%,盐 0.16%,预混料 0.32%(每千克预混料含有 4.56 g 铜,4.59 g 锰,12.1 g 锌,60 mg 钴,2000 000 IU 维生素 A,3450 000 IU 维生素 D)。精粗比 5:5,日粮中含有粗蛋白 15.31%,中性洗涤纤维 52.96%,酸性洗涤纤维 26.55%(干物质基础)。

1.3 试验设计

地顶孢霉培养物的添加量分别为 0.00, 0.30, 0.60 和 0.90 g/L。瘤胃液通过四层纱布进行过滤,再向其中通入二氧化碳。分别称取 13.2 g 二水氯化钙,10.0 g 四水氯化锰,1.0 g 六水氯化钴,8.0 g 六水氯化铁,4.0 g 碳酸氢铵,35.0 g 碳酸氢钠,5.7 g 磷酸氢二钠,6.2 g 磷酸氢二钾,0.6 g 硫酸镁,0.1% 刃天青以及 4 mg 氢氧化钠,加入蒸馏水后共 1000 ml 混和,制成缓冲液(pH 值 6.9)。并按瘤胃液:缓冲液以 1:2 的比例混匀。大约 200 mg 底物被准确称重并放入 100 ml 注射器内。抽取 30 ml 人工瘤胃液。在 3、6、9、12、24、36、48 和 72 h 各时间点分别记录产气量。在 24 h 时间点,分别对瘤胃液的 pH 值,氨态氮浓度(NH₃-N)和挥发性脂肪酸(VFA)以及瘤胃微生物的相对菌群数量进行了分析。

1.4 样品收集和测定

1.4.1 营养水平的测定

根据 AOAC 的方法进行干物质(AOAC, 930.15)、粗蛋白质(AOAC, 976.05)、粗灰分(AOAC, 942.05)、钙和磷含量(AOAC, 935.13)的测定^[9]。粗纤维和粗脂肪含量的测定根据《饲料分析及饲料质量检测技术》^[10]。中性洗涤纤维(NDF)和酸性洗涤纤维(ADF)含量根据 Van Soest 的方法,采用纤维分析仪(Ankom200,美国安康公司)进行测定^[11]。虫草酸、虫草素、虫草多糖和甾醇含量采用高效液相色谱法(高效液相色谱仪型号 model-8800,日本 HITACHI 公司)进行测定^[12]。氨基酸含量采用全自动氨基酸分析仪(model-8900,日本 HITACHI 公司)进行测定。

在 24 h 时间点,取发酵液,四层纱布过滤并离心,立即测定瘤胃液 pH。取样品存放于 10 mL 离心管中,加入 25% 的偏磷酸 1 mL,放于 -20℃ 的冰箱中,待测瘤胃液中 VFA 和 NH₃-N 的浓度。

1.4.2 瘤胃液 pH 的测定

采用 Startorius Basic pH 值 Meter PB-20 型酸度计。

1.4.3 瘤胃液 NH₃-N 的测定

瘤胃液 NH₃-N 采用冯宗慈比色法进行测定。

1.4.4 瘤胃液 VFA 浓度的测定

用气相色谱仪(岛津 GC—2010,日本)测定瘤胃液中总挥发性脂肪酸的含量。

1.4.5 瘤胃微生物相对菌群含量的测定

瘤胃液中的总 DNA 提取采用的是珠磨-十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法^[13]。风干后的 DNA 溶于 TE 缓冲液后,于 -20℃ 待测。用紫外可见分光光度计测定所提取的总 DNA 的浓度和纯度,确保 OD_{260nm} 与 OD_{280nm} 比值在 1.6~1.8 之间。通过荧光定量 PCR 的方法对瘤胃液中的总菌、普雷沃氏菌(*Prevotella*)、黄色瘤胃球菌(*Ruminococcus flavefaciens*)、白色瘤胃球菌(*Ruminococcus albus*)、产琥珀酸丝状杆菌(*Fibrobacter succinogenes*)、溶纤维丁酸弧菌(*Butyrivibrio fibrisolvens*)、牛链球菌(*Streptococcus bovis*)、溶淀粉琥珀酸单胞菌(*Succinimonas amylolytica*)、嗜淀粉瘤胃杆菌(*Ruminobacter amylophilus*),原虫(*Protozoa*)和反刍兽新月单胞菌(*Selenomonas ruminantium*)的相对含量进行检测,引物参考 Khafipour

等^[14]报道的序列, 序列见表 1。荧光定量 PCR 所用仪器为 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪, Real-time PCR SYBR Green I RT-PCR 试剂盒购自大连宝生物公司。荧光定量 PCR 扩增反应程序为: 95 °C 变性 7 min, 55 °C 1 min, 72 °C 3 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 7 min。

根据测得的阈值循环 (Ct), 计算目标菌的相对含量, 公式如下:

$$\text{目标菌相对含量 (\%)} = 2^{-(Ct_{\text{目标菌}} - Ct_{\text{总菌}})} \times 100^{[13]}$$

表 1 目标菌的 PCR 引物序列

Table 1 Primers used for RT-PCR detection of microbial species

Target species tested	Forward primer
	Reverse primer
总菌	GAAGAGTTTGATCATGGCTCAG
Total bacterial primers	CTGCTGCCTCCCGTAG
黄色瘤胃球菌	CGAACGGAGATAATTTGAGTTACTTAGG
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	CGGTCTCTGTATGTTATGAGGTATTACC
白色瘤胃球菌	CCCTAAAAGCAGTCTTAGTTCG
<i>Ruminococcus albus</i>	CCTCCTTGCGGTTAGAACA
产琥珀酸丝状杆菌	GTTCGGAATTACTGGGCGTAAA
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	CGCCTGCCCTGAACATC
溶纤维丁酸弧菌	ACCGCATAAGCGCACGGA
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	CGGGTCCATCTTGACCGATAAAT
牛链球菌	TTCCTAGAGATAGGAAGTTTCTTCGG
<i>Streptococcus bovis</i>	ATGATGGCAACTAACAAATAGGGGT
普雷沃氏菌	GCGAAAGTCGGATTAATGCTCTATG
<i>Prevotella</i>	CCCATCCTATAGCGGTAACCTTTG
溶淀粉琥珀酸单胞菌	CGTTGGGCGGTCATTTGAAAC
<i>Succinimonas amylolytica</i>	CCTGAGCGTCAGTTACTATCCAGA
反刍兽新月单胞菌	GGCGGGAAGGCAAGTCAGTC
<i>Selenomonas ruminantium</i>	CCTCTCCTGCACTCAAGAAAGACAG
嗜淀粉瘤胃杆菌	CTGGGGAGCTGCCTGAAT
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	CATCTGAATGCGACTGGTTG
原虫	GCTTTCGWTGGTAGTGTATT
<i>Protozoa</i>	CTTGCCCTCYAATCGTWCT

1.4.6 发酵效率和甲烷产量计算公式

发酵效率 (FE) 计算公式^[15]: 发酵效率 = (0.622 × 乙酸 + 1.092 × 丙酸 + 1.56 × 丁酸) / (乙酸 + 丙酸 + 2 × 丁酸)。甲烷产量计算公式^[16]: 甲烷产量 = 0.45 × 乙酸 - 0.275 × 丙酸 + 0.40 × 丁酸。以上挥发酸数值均为摩尔比。

1.4.7 体外消失率的测定

在 24 h 时间点, 将发酵液转移到 50-mL 离心管中, 离心弃掉上清液体 (500 × g, 10 分钟, 4 °C), 重复三次操作。然后将离心管在 65 °C 下烘干 48 h, 称重, 测定体外干物质消失率 (IVDMD)。

1.5 数据处理与分析

产气量的计算公式为: $GP = a + b(1 - \exp^{-ct})$ 。其中 a 为可溶性快速产气量; b 为不可溶性慢速产气量; c 为产气速率。气体产率的分析使用 SAS 的非线性(NLIN)过程。有效产气速率(EG_p)计算公式= $a + b[c / (c + k)]$, c 是一个产气速率常数, k 是一段速率常数假定为 $0.05/h^{[6]}$ 。数据采用 SAS 9.1.2 软件包中的正交实验模型进行分析, $P < 0.05$ 代表差异显著, 结果用平均值和标准误的形式表示。

2 结果与分析

2.1 地顶孢霉培养物对体外产物参数的影响

不同时间点的体外产气量和产气参数如表 2 所示。在 3 h 时间点, 产气量随着地顶孢霉培养物的添加呈线性降低 ($P < 0.05$)。然而, 24 h 时间点, 与对照组相比, 地顶孢霉培养物的添加线性增加了总产气量; 0.90 g/L 组差异最显著 ($P < 0.05$)。试验组的快速产气部分显著低于对照组 ($P < 0.05$), 但是慢速产气部分, 潜在产气部分和有效产气速率均显著高于对照组 ($P < 0.05$)。

表 2 地顶孢霉培养物对体外产气量的影响

Table 2. Effects of *Acremonium Terricola* culture on *in vitro* cumulative gas production

时间点 Times (h)	添加剂量 Dose (g/L)				SEM	P 值	正交		
	0.00	0.30	0.60	0.90			线性	二次	三次
产气量 Gas production(mL/ 每 0.1 g 底物)									
3h	11.03 ^a	10.87 ^a	8.20 ^b	7.87 ^b	0.56	0.01	0.0012	0.8852	0.0893
6h	18.17	18.33	17.17	17.00	0.66	0.47	0.1783	0.8196	0.4817
9h	25.08	26.42	25.75	25.75	0.69	0.62	0.6759	0.3604	0.4108
12h	30.33	30.17	30.33	31.67	0.81	0.55	0.2821	0.3804	0.8234
24h	43.33 ^b	44.67 ^{ba}	45.00 ^{ba}	46.50 ^a	0.57	0.03	0.0230	0.0381	0.2503
36h	48.75 ^b	48.25 ^b	52.42 ^a	54.42 ^a	0.86	0.0026	0.0006	0.1851	0.1142
48h	51.50 ^b	50.33 ^b	55.33 ^a	58.00 ^a	1.06	0.0032	0.0008	0.1075	0.1100
72h	53.50 ^c	54.00 ^c	58.00 ^b	62.50 ^a	0.79	0.0001	<0.0001	0.0353	0.4208
产气参数 Gas production parameters*									
a (mL/ 每 0.1 g 底物)	1.25 ^a	0.69 ^a	-2.13 ^b	-2.27 ^b	0.69	0.01	0.0024	0.7642	0.1466
b (mL/ 每 0.1 g 底物)	52.57 ^c	52.50 ^c	60.36 ^b	64.59 ^a	0.86	<0.0001	<0.0001	0.0380	0.0175
a+b (mL/ 每 0.1 g 底物)	53.82 ^c	53.19 ^c	58.22 ^b	62.32 ^a	0.65	<0.0001	<0.0001	0.0067	0.0532
c ($G_p \cdot h^{-1}$)	0.067	0.0711	0.0650	0.0603	0.003	0.13	0.0688	0.1624	0.3918
有效产气速率 EG_p (%)	31.28 ^b	31.50 ^b	31.97 ^{ba}	33.02 ^a	0.37	0.04	0.0083	0.2907	0.8502

a, b, c 和 d 同行肩标不同字母代表差异显著 ($P < 0.05$)。

*a=快速产气部分; b=慢速产气部分; c=每小时产气速率; a + b=潜在产气部分; EG_p =有效产气速率。

2.2 地顶孢霉培养物对 24 小时体外消失率和发酵指标的影响

地顶孢霉培养物对体外消失率和发酵参数的影响见表 3。与对照组相比, 地顶孢霉培养物的添加线

性提高了体外干物质消失率, 乙酸, 丙酸, 丁酸和异戊酸的浓度, 0.90 g/L 组差异最显著 ($P<0.05$)。然而, 试验组线性降低了瘤胃 pH 值 ($P<0.05$), 乙酸的摩尔比例和甲烷产量 ($P<0.05$)。地顶孢霉培养物对其它体外发酵指标没有显著影响 ($P>0.05$)。

表 3 地顶孢霉培养物对 24 小时体外消失率和发酵指标的影响

Table 3. Effects of *Acremonium Terricola* culture on dry matter digestibility and fermentation indicators after 24 h *in vitro* incubation

项目 Items	添加剂量 Dose (g/L)				SEM	P 值	正交		
	0.00	0.30	0.60	0.90			线性	二次	三次
IVDMD ¹ (%)	46.96 ^c	51.86 ^b	55.04 ^a	55.13 ^a	0.71	<0.0001	<0.0001	0.0054	0.6753
pH	6.85 ^a	6.83 ^b	6.81 ^c	6.80 ^c	0.005	0.0005	<0.0001	0.1151	0.8783
乙酸 (mmol/L)	33.15 ^b	33.37 ^b	35.70 ^b	39.53 ^a	0.68	0.0006	0.0001	0.0298	0.8477
丙酸 (mmol/L)	12.21 ^b	12.73 ^b	15.69 ^a	15.88 ^a	0.73	0.01	0.0028	0.8285	0.1533
异丁酸 (mmol/L)	0.57	0.67	0.58	0.60	0.05	0.59	0.9814	0.4929	0.2555
丁酸 (mmol/L)	3.93 ^c	4.20 ^{cb}	4.91 ^b	5.89 ^a	0.24	0.0017	0.0003	0.1750	0.8637
异戊酸 (mmol/L)	0.81 ^b	0.69 ^b	0.85 ^b	1.03 ^a	0.06	0.01	0.0108	0.0207	0.3253
戊酸 (mmol/L)	0.59	0.64	0.66	0.79	0.04	0.06	0.0121	0.4284	0.5040
乙丙比	2.74	2.63	2.29	2.50	0.14	0.20	0.1308	0.2843	0.2378
摩尔比例, (%)									
乙酸	68.48 ^a	61.12 ^b	62.22 ^b	62.32 ^b	1.32	0.0159	0.0184	0.0222	0.1475
丙酸	25.22	23.32	27.34	25.04	1.36	0.2942	0.5815	0.8855	0.0788
异丁酸	1.17	1.22	1.01	0.94	0.10	0.2110	0.0715	0.5568	0.3561
丁酸	8.12	7.09	8.56	9.29	0.44	0.1420	0.0568	0.2235	0.4808
异戊酸	1.68	1.26	1.47	1.63	0.10	0.0694	0.9102	0.0210	0.1685
戊酸	1.21	1.17	1.15	1.24	0.08	0.8371	0.8370	0.4126	0.8224
发酵效率	0.75	0.76	0.77	0.76	0.004	0.1214	0.0841	0.2319	0.1641
CH ₄ e ²	27.13 ^a	24.17 ^b	23.91 ^b	24.87 ^b	0.53	0.0101	0.0183	0.0062	0.5537

a, b, c 和 d 同行肩标不同字母代表差异显著 ($P<0.05$).

¹ IVDMD, 体外干物质消失率.

² CH₄e, 通过挥发酸摩尔比计算的甲烷产量

2.3 地顶孢霉培养物对 24 小时瘤胃微生物相对菌群数量的影响

表 4 所示的是地顶孢霉培养物对瘤胃微生物相对菌群数量的影响。实时定量 PCR 的结果显示地顶孢霉培养物显著提高了黄色瘤胃球菌, 白色瘤胃球菌, 普雷沃氏菌, 溶淀粉琥珀酸单胞菌, 嗜淀粉瘤胃杆菌和原虫的相对菌群数量 ($P<0.05$), 但是降低了产琥珀酸丝状杆菌的相对菌群数量 ($P<0.05$), 对其它瘤胃微生物没有显著影响 ($P>0.05$)。

表4 地顶孢霉培养物对24小时瘤胃微生物相对菌群数量的影响

Table 4. Effects of *Acremonium Terricola* culture on relative population sizes of microflora after 24 h *in vitro* incubation

项目 Items	添加剂量 Dose (g/L)				SEM	P 值	正交		
	0.00	0.30	0.60	0.90			线性	二次	三次
黄色瘤胃球菌	7.99 ^c	8.76 ^{bc}	9.76 ^{ba}	11.10 ^a	0.48	0.0013	0.0001	0.5625	0.9710
白色瘤胃球菌	0.80 ^b	0.75 ^b	1.02 ^{ba}	1.12 ^a	0.09	0.02	0.0048	0.3945	0.2521
产琥珀酸丝状杆菌	0.09 ^a	0.06 ^b	0.04 ^c	0.02 ^d	0.0003	<0.0001	<0.0001	0.0356	0.2632
溶纤维丁酸弧菌	25.03	24.56	30.05	29.55	2.49	0.28	0.1026	0.9945	0.2963
牛链球菌	0.03	0.03	0.04	0.04	0.0003	0.26	0.2072	0.7341	0.1307
普雷沃氏菌	4.32 ^d	9.42 ^c	12.92 ^b	15.75 ^a	0.90	<0.0001	<0.0001	0.2236	0.8171
溶淀粉琥珀酸单胞菌	0.09 ^b	0.08 ^b	0.20 ^a	0.22 ^a	0.02	0.0002	<0.0001	0.6471	0.0345
反刍月形单胞菌	20.36	20.50	22.81	24.31	1.26	0.10	0.0203	0.5935	0.6007
嗜淀粉瘤胃杆菌	0.06 ^b	0.07 ^b	0.27 ^a	0.29 ^a	0.03	<0.0001	<0.0001	0.8723	0.0082
原虫	0.56 ^c	1.11 ^b	1.53 ^a	1.70 ^a	0.09	<0.0001	<0.0001	0.0417	0.7296

a, b, c 和 d 同行肩标不同字母代表差异显著($P < 0.05$).

3 讨论

体外发酵产气量的测定已经被广泛的应用于发酵动力学和饲料消化特性的研究,并且产气量与发酵底物降解、挥发性脂肪酸产量、瘤胃微生物的活性与生长^[17]、微生物蛋白合成^[18]以及瘤胃干物质降解率^[19]密切相关。本试验中,虽然我们地发现地顶孢霉培养物对产气量的增加存在一定延滞期,但是随着发酵时间的继续我们观察到了地顶孢霉培养物对体外产气量和发酵参数的积极影响。因此,结合本试验结果,我们推测地顶孢霉培养物对体外发酵的改善作用源自对瘤胃微生物的积极影响。

作为瘤胃内环境的重要指标,瘤胃 pH 值,氨态氮和挥发性脂肪酸等指标应被广泛研究。瘤胃微生物生存的最适 pH 值在 6.6-6.8 之间^[20],而长时间低于 6.4 的瘤胃内环境会对瘤胃微生物代谢和营养物质降解产生消极影响,甚至产生大量疾病^[21]。本试验中,虽然瘤胃 pH 值呈现下降趋势,但最低的 pH 值仍在最适范围内(6.75-6.83)。而瘤胃 pH 值显著降低的原因主要是因为挥发性脂肪酸含量的提高。本试验中,地顶孢霉培养物的添加增加了瘤胃液中氨态氮和挥发酸的含量,证明了地顶孢霉培养物可能会提高微生物蛋白的转化效率^[15],提高了瘤胃发酵参数和营养物质的降解率。瘤胃内原虫数量的降低也会导致氨态氮浓度的下降^[22]。高原虫数量也会增加瘤胃内的微生物氮的循环,从而提高瘤胃内氨态氮含量^[23,24]。高原虫数量也会导致丁酸含量的升高^[25]。与之相似,本试验中,氨态氮和挥发酸含量的提高同时伴随着瘤胃原虫和部分瘤胃微生物相对菌群数量的提高。Lee 等^[26]通过试验证明了产气量和纤维降解率的提高与瘤胃微生物数量和酶活之间存在高度的相关性。本试验中,地顶孢霉培养物的添加显著增加了部分纤维分解菌和非纤维分解菌的相对菌群数量。因此,瘤胃微生物数量的增加是提高底物发酵效率,挥发酸产量和体外干物质消失率的重要原因。

反刍动物甲烷的排放不仅损失大量的饲料能量,而且会对环境造成不良影响。因此,减少甲烷产量对经济和环境都具有重要的意义。降低甲烷产量但不减少产气量的饲料添加剂是最有前景的,因为,产气量的降低意味着有机物的降解率和能量供给的减少^[27]。值得注意的是,本试验中,地顶孢霉培养物的添加在提高产气量的同时还降低了乙酸摩尔比例和甲烷的产生。可以推测,本试验中甲烷产量的降低可能是由于乙酸比例的降低和地顶孢霉培养物对氢气产生菌(某些纤维分解菌)的抑制作用^[28,29]。地顶孢

霉培养物增加了黄色瘤胃球菌和白色瘤胃球菌的相对菌群数量,但是降低了产琥珀酸丝状杆菌的数量。众所周知,产琥珀酸丝状杆菌是反刍动物体内最广泛的纤维分解菌之一^[30],且与甲烷的产生存在密切关系。前人研究已经证明,某些植物次级代谢产物和虫草素均能够抑制产琥珀酸丝状杆菌的生长,但是原因尚不清楚^[31-33]。一些文章也报道了,虫草及其成分能够增加益生菌的数量^[8],选择性的抑制肠道有害菌^[7]。因此,我们推测地顶孢霉培养物的添加刺激了部分瘤胃微生物的生长,导致了瘤胃发酵的积极作用。

4 结论

本试验研究结果表明,地顶孢霉培养物可以提高瘤胃产气量,增加瘤胃液中氨态氮和挥发酸的浓度并且降低瘤胃 pH 值。对瘤胃微生物具有一定的促进作用。证明地顶孢霉培养物在调控奶牛瘤胃发酵方面具有巨大潜力。在未来的研究中,应进一步探索地顶孢霉培养物影响瘤胃微生物的机制和对奶牛生产性能的影响。

参考文献:

- [1] Xiao J H, Liang Z Q, Liu A Y, et al. Immunosuppressive activity of polysaccharides from *Cordyceps gunnii* mycelia in mice in vivo/vitro[J]. International Journal of Food Agriculture and Environment, 2004,2(3-4):69-73.
- [2] Huang J Z, Liang Z Q, Liu A Y. Protection on the anamorph of *Cordyceps pruinosa* Petch to anti-ultraviolet radiation in *Bacillus thuringiensis*[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 1992,5:63-67.
- [3] 魏建忠, 张玮, 李郁, 等. 地顶孢霉培养物对保育仔猪生产性能及免疫水平的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2009(2):33-35.
- [4] 孙汉巨, 李晓祥, 丁琦, 等. 虫草饲料添加剂对蛋鸭生产性能及鸭蛋品质的影响[J]. 安徽农业科学, 2011,39(6):3618-3620.
- [5] Deng B, Wang Z P, Tao W J, et al. Effects of polysaccharides from mycelia of *Cordyceps sinensis* on growth performance, immunity and antioxidant indicators of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Aquaculture Nutrition, 2015,21(2):173-179.
- [6] Wang M, Meng X Y, Yang R L, et al. *Cordyceps militaris* polysaccharides can enhance the immunity and antioxidation activity in immunosuppressed mice[J]. Carbohydrate Polymers, 2012,89(2):461-466.
- [7] Ahn Y J, Park S J, Lee S G, et al. Cordycepin: selective growth inhibitor derived from liquid culture of *cordyceps militaris* against *Clostridium* spp[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000,48(7):2744-2748.
- [8] Koh J H, Suh H J, Ahn T S. Hot-water extract from mycelia of *Cordyceps sinensis* as a substitute for antibiotic growth promoters[J]. Biotechnology Letters, 2003,25(7):585-590.
- [9] AOAC. Official Methods of Analysis. 17th ed.[M]. Arlington, VA, USA: Association of Official Analytical Chemist., 2000.
- [10] 李洋, 王明君, 李仲玉, 等. 不同比例的湿玉米纤维饲料对奶牛瘤胃降解规律与表观消化率的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2015,51(7):54-59.

- [11] Van Soest P J, Robertson J B, Lewis B A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition.[J]. Journal of Dairy Science, 1991,74(10):3583-3597.
- [12] Chang C, Lue M, Pan T. Determination of adenosine, cordycepin and ergosterol contents in cultivated *Antrodia camphorata* by HPLC method.[J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2005,13(4):338-342.
- [13] 辛杭书, 段春宇, 张永根, 等. 饲料中添加海南霉素对奶牛瘤胃微生物区系的影响[J]. 动物营养学报, 2012,24(11):2249-2256.
- [14] Khafipour E, Li S, Plaizier J C, et al. Rumen microbiome composition determined using two nutritional models of subacute ruminal acidosis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009,75(22):7115-7124.
- [15] Pang D G, Yang H J, Cao B B, et al. The beneficial effect of *Enterococcus faecium* on the *in vitro* ruminal fermentation rate and extent of three typical total mixed rations in northern China[J]. Livestock Science, 2014,167(9):154-160.
- [16] Moss A R, Jouany J P, Newbold J, et al. Methane production by ruminants: Its contribution to global warming[J]. Annales De Zootechnie, 2000,49(3):231-253.
- [17] Getachew G, Robinson P H, Depeters E J, et al. Relationships between chemical compositions, dry matter degradation and *in vitro* gas production of several ruminant feeds[J]. Animal Feed Science and Technology, 2004,111:57-71.
- [18] Krishnamoorthy U, Steingass H, Menke K H. Preliminary observations on the relationship between gas production and microbial protein synthesis *in vitro*[J]. Archiv Animal Nutrition, 1991,41(5):521-526.
- [19] 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, 1988,28(1):7-55.
- [20] Depeters E J, Bath D L. Canola meal versus cottonseed meal as the protein supplement in dairy diets[J]. Journal of Dairy Science, 1986,69(1):148-154.
- [21] Erdman R A, Hemken R W, Bull L S. Dietary sodium bicarbonate and magnesium oxide for early postpartum lactating dairy cows: effects on production, acid-base metabolism, and digestion.[J]. Journal of Dairy Science, 1982,65(5):712-731.
- [22] Williams A G, Coleman G S. The rumen protozoa[M]. New York, NY: Springer-Verlag, 1991.
- [23] Jouany J P. Effect of rumen protozoa on nitrogen utilization by ruminants.[J]. Journal of Nutrition, 1996,126(4):1335S-1346S.
- [24] Williams A G, Withers S E. Changes in the rumen microbial population and its activities during the refaunation period after the reintroduction of ciliate protozoa into the rumen of defaunated sheep. [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1993,39(1):61-69.
- [25] Howard B H. Biochem J. 89, 89P as cited in: R. E. Hungate. The Rumen and Its Microbes. p 139.[M]. San Diego, CA: Academic Press, 1963.
- [26] Lee S S, Choi C K, Ahn B H, et al. *In vitro* stimulation of rumen microbial fermentation by a rumen anaerobic fungal culture[J]. Animal Feed science and Technology, 2004,115(3):215-226.
- [27] Pirondini M, Colombini S, Malagutti L, et al. Effects of a selection of additives on *in vitro* rumi

- nal methanogenesis and in situ and in vivo NDF digestibility.[J]. *Animal Science Journal*, 2015,86(1):59-68.
- [28] Wang Y, Mcallister T A, Yanke L J, et al. Effect of steroidal saponin from *Yucca schidigera* extract on ruminal microbes.[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2000,88(5):887, 896.
- [29] Castillejos L, Calsamiglia S, Ferret A. Effect of essential oil active compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow in in vitro systems[J]. *Journal of Dairy Science*, 2006,89(89):2649-2658.
- [30] Stewart C S, Flint H J, Bryant M P. The rumen bacteria, in *The Rumen Microbial Ecosystem*, ed. by Hobson PN and Stewart CS[M]. London: Blackie Academic & Professional, 1997.
- [31] Wang Y, Alexander T W, McAllister T A. *In vitro* effects of phlorotannins from *Ascophyllum nodosum* (brown seaweed) on rumen bacterial populations and fermentation[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2009,89(13):2252-2260.
- [32] Mcsweeney C S, Palmer B, Bunch R, et al. Effect of the tropical forage calliandra on microbial protein synthesis and ecology in the rumen[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2001,90(1):78-88.
- [33] Kim W Y, M D H, Lee S J, et al. Effects of *Cordyceps militaris* on the growth of rumen microorganisms and *in vitro* rumen fermentation with respect to methane emissions[J]. *Journal of Dairy Science*, 2014,97:7065-7075.