

体外法研究延胡索酸二钠对瘤胃微生物 发酵活力及甲烷产量的影响

毛胜勇, 王新峰, 朱伟云*

(南京农业大学动物科技学院, 江苏 南京 210095)

摘要:为探讨延胡索酸二钠对瘤胃甲烷产量及瘤胃微生物发酵活力的影响,本研究共设计了 3 个试验来阐明该问题。试验 1 采用体外批次培养,研究了不同日粮条件下(高牧草日粮、中等水平牧草的日粮和低牧草日粮)添加延胡索酸二钠(0, 4 和 7 mmol/L)对山羊瘤胃微生物发酵及甲烷产量的影响。结果表明,较对照相比,添加延胡索酸二钠显著提高了累积产气量、pH 值和 TVFA 产量($P < 0.05$),降低了甲烷产量($P < 0.05$),其中高牧草日粮组下降幅度最大。试验 2 探讨了延胡索酸二钠对黄化瘤胃球菌发酵粗饲料活力的影响。结果表明,与对照组相比;添加延胡索酸二钠显著提高了黄化瘤胃球菌数量及其对黑麦草的降解率($P < 0.05$);试验 3 探讨了延胡索酸二钠对瘤胃真菌发酵粗饲料活力的影响,结果显示,延胡索酸二钠显著降低了厌氧真菌发酵的总产气量、干物质消失率及羧甲基纤维素酶酶活($P < 0.05$)。结果说明,延胡索酸二钠在降低甲烷产量方面与发酵底物的天然特性有关,其中对高牧草日粮的作用效应最为显著;延胡索酸二钠可提高瘤胃混合微生物与瘤胃纤维降解菌发酵粗饲料的能力,但对瘤胃真菌的发酵活力具有抑制效应。

关键词:延胡索酸二钠;瘤胃微生物;甲烷;批次培养

中图分类号:S852.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-5759(2010)02-0069-07

* 反刍动物瘤胃微生物区系主要由瘤胃细菌、原虫、厌氧真菌和古菌组成,这些微生物发酵底物生成乙酸、丙酸及丁酸、甲烷和二氧化碳等,其中甲烷不仅造成饲料的能量损失,同时也是导致地球出现“温室效应”的主要气体之一。据报道,来自反刍动物瘤胃发酵产生的甲烷约为 0.8~1.2 亿 t,而且这一比例还以每年 1% 的速度递增^[1]。前人研究表明,通过应用离子载体类抗生素如莫能霉素、卤代物以及不饱和脂肪酸可降低瘤胃甲烷产量^[2,3],然而,卤代物的使用存在动物福利问题,而莫能霉素和脂肪酸对反刍动物瘤胃纤维降解有负效应^[4,5]。因此,寻求新的瘤胃甲烷调控手段非常必要。

近年来一些研究报道表明,有机酸如延胡索酸和苹果酸等可通过加快瘤胃发酵体系中氢的代谢,从而降低甲烷产量,提高丙酸产量^[6]。但综合有关延胡索酸对甲烷产量影响的研究报道,发现该方面结果很不一致。Lo'pez 等^[6]发现,在混合日粮中添加 7.35 mmol/L 的延胡索酸,甲烷产量降低 17%;Carro 和 Ranilla^[7]报道,在精饲料以及混合日粮中添加 4~10 mmol/L 的延胡索酸,甲烷产量略有降低;而 Beauchemin 和 McGinn^[8]研究表明,延胡索酸不能降低羔羊瘤胃甲烷产量;归纳这些报道,推测延胡索酸对甲烷产量的影响程度可能取决于日粮结构不同及延胡索酸添加水平。为评定上述假设,本试验利用体外培养技术,研究了日粮结构与延胡索酸二钠在调控甲烷产量方面的互作效应,在此基础上,探讨了延胡索酸二钠对主要产氢微生物发酵的影响,拟进一步阐明延胡索酸二钠在调控甲烷生成方面的具体机制。

1 材料与方 法

1.1 材料、动物饲养条件及瘤胃液的获取

延胡索酸二钠为陕西省渭南市化工实业有限公司生产,分析纯。

本试验选用 4 头装有永久性瘤胃瘘管的本地成年公山羊,单圈饲养,日粮为青干草,同时每日每头补饲自配

* 收稿日期:2009-04-14;改回日期:2009-05-31

基金项目:国家自然科学基金项目(30530560)资助。

作者简介:毛胜勇(1973-),男,四川仪陇人,副教授。E-mail: maoshengyong@163.com

* 通讯作者。E-mail: zhuweiyun@njau.edu.cn

精料 200 g(玉米:豆粕=7:3),自由饮水。试验当日,于未喂料之前经瘤胃瘘管分别从 4 头羊的瘤胃腹囊下部抽取瘤胃内容物,放入充满二氧化碳的塑料管内。同时,在相同部位取经 3 层纱布过滤的瘤胃液,将取得的瘤胃液和瘤胃内容物放入一电子搅拌器中,在厌氧条件下搅拌 30 s 后,经 0.125 nm 尼龙绢过滤,取过滤后的瘤胃液接种。

1.2 培养基的配制

本试验的瘤胃微生物培养基参照 Longland 等^[9] 配制。试验接种时,以 1:5 的比例将瘤胃液和已预热至 39℃ 的厌氧培养基混合,取 60 mL 混合后的培养液厌氧分装至发酵瓶中,发酵瓶用橡胶塞和铝盖封口后,置于 39℃ 下厌氧培养 24 h。厌氧真菌培养基按朱伟云等^[10] 的方法配制。

1.3 试验设计

1.3.1 不同日粮条件下添加延胡索酸二钠 发酵底物分别为牧草含量高的日粮[黑麦草(*Lolium perenne*):精饲料,8:2](HF)、牧草含量中等的日粮(黑麦草:精饲料,5:5)(MF)、牧草含量低的日粮(黑麦草:精饲料,2:8)(CF)(其中精饲料由玉米和豆粕组成,比例为 7:3,皆过孔径为 2 mm 的筛),底物量为 0.5 g,针对各发酵底物,分别设处理组、对照组及空白组,其中处理组中延胡索酸二钠的添加浓度为 4,7 mmol/L,对照组除不添加延胡索酸二钠外,底物及培养基成分同相应处理组,空白组为阳性空白(无底物,接种)。各处理发酵 24 h 结束后,其间定时测定产气量及甲烷产量,发酵结束后测定发酵液的 pH 值,同时取发酵内容物与发酵液上清液置于一 20℃ 冰箱保存,备测挥发性脂肪酸(VFA)浓度。

1.3.2 延胡索酸二钠处理 黄化瘤胃球菌由本试验室保存。试验设延胡索酸二钠处理组、对照组和空白组,其中对照组不添加延胡索酸二钠,处理组中延胡索酸二钠的添加浓度分别为 4,7,10 mmol/L,空白组除不接种外,其他成分与处理组一致,各试验组均设 5 个重复。培养基成分及厌氧制作同 1.3.1。培养基厌氧分装至含 0.86 g 黑麦草粉(过孔径为 2 mm 的筛)的发酵瓶中,发酵瓶用橡胶塞和铝盖封口后,于 116℃ 下灭菌 20 min。将发酵瓶预热至 39℃ 后,接种 10 mL 黄化瘤胃球菌纯培养液,所有处理和对照在 39℃ 下静止培养 48 h。培养结束后,将所有培养物转入离心管中,在 4 000 r/min 下离心 15 min,取离心后的上清液,经常规处理后,冻存备测挥发性脂肪酸浓度。同时将离心沉淀转入已称重的钳锅内,于 105℃ 烘至恒重,以对照作校正,计算底物的干物质消失率。

1.3.3 延胡索酸二钠对瘤胃真菌发酵活力的影响 延胡索酸二钠对瘤胃真菌的发酵活力:混合瘤胃厌氧真菌的分离参见毛胜勇等^[11] 的方法,单一厌氧真菌(*Neocallimastix frontalis*)来自本研究室保存。发酵底物均为 1 g 稻草秸(过孔径为 2 mm 的筛),培养基混合瘤胃真菌试验设延胡索酸二钠处理组、对照组和空白组,其中对照组不添加延胡索酸二钠,处理组中延胡索酸二钠的添加浓度分别为 4,7 及 10 mmol/L,空白组除不接种外,其他成分与处理组一致,各试验组均设 5 个重复,培养时间为 168 h。各处理接种 10 mL 已生长 48 h 的瘤胃真菌培养液,对照注入等量无菌厌氧去离子水,于 39℃ 下静止培养。培养期间,定时测定各发酵瓶中的产气量,发酵结束后,测定底物的干物质消失率,方法同上。

延胡索酸二钠对瘤胃真菌 *Neocallimastix frontalis* 的动态发酵:试验设延胡索酸二钠处理组、对照组和空白组,其中对照组不添加延胡索酸二钠,处理组中延胡索酸二钠的添加浓度 7 mmol/L,空白组除不接种外,其他成分与处理组一致。发酵底物同上,试验预设 0,24,48,72,96,120 h 时间点,各时间点分设对照组与延胡索酸二钠处理组,各组 3 个重复。分别于各计时间点取样测定发酵液中的羧甲基纤维素酶酶活和乙酸浓度,取样后,测定底物的干物质消失率,方法同上。

1.4 指标测定

产气量测定参照 Theodorou 等^[12] 的方法,VFA 的测定参照秦为琳^[13] 的方法。甲烷测定参照胡伟莲^[14] 的方法。纤维降解菌的计数方法参照陈洁^[15] 的方法。

1.5 数据分析

试验 1.3.1 中所得数据采用 SPSS(13.0)软件中 GLM 中 Univariate 进行方差分析,主效应分别是延胡索酸二钠与日粮类型。试验 1.3.2 中数据利用 SPSS(13.0)中 ANOVA 进行单因子方差分析,多重比较采用 LSD 法

检验。试验 1.3.3 中数据采用 SPSS(13.0)中 ANOVA 进行单因子方差分析延胡索酸二钠的处理效应;试验 1.3.3 中数据采用 SPSS(13.0)中 GLM 中 Repeated Measured 进行数据分析。数据结果以平均数±标准差表示。

2 结果与分析

2.1 添加延胡索酸二钠对 pH 值、甲烷及挥发脂肪酸产量、产气量及氨氮浓度的影响

较对照相比,添加延胡索酸二钠显著提高了 pH 值和总产气量($P<0.05$) (表 1),并呈显著的剂量效应($P<0.05$);日粮对各指标皆有显著影响($P<0.05$),在产气量方面,日粮与延胡索酸二钠之间有显著的互作效应($P<0.05$)。较对照相比,添加延胡索酸二钠显著降低了甲烷产量($P<0.05$),当以低牧草日粮为发酵底物时,添加 4 和 8 mmol/L 延胡索酸二钠的处理组中甲烷产量分别较对照组降低了 6.1%和 4.3%;而在以高牧草日粮为发酵底物时,延胡索酸二钠处理组的甲烷产量分别较对照组降低了 9.3%和 14.0%;较对照组相比,添加延胡索酸二钠均显著降低了乙丙比,提高了发酵体系中乙酸、丙酸及 TVFA 浓度($P<0.05$),但对丁酸浓度无显著影响($P>0.05$),延胡索酸二钠对丙酸及乙丙比具有显著的剂量效应($P<0.05$);在甲烷及乙丙比方面,延胡索酸二钠与底物间存在显著的互作效应($P<0.05$)。

表 1 延胡索酸二钠对甲烷和挥发性脂肪酸产量的影响

Table 1 Effect of disodium fumarate on the methane and VFA production

指标 Index	日粮 Diet	延胡索酸二钠 Disodium fumarate (mmol/L)			显著性 Significance (P 值 Value)			
		0	4	8	延胡索酸二钠 Disodium fumarate		日粮 Diet	互作效应 Disodium fumarate×Diet
					处理效应 Treated effect	剂量效应 Dosage effect		
pH	LF	5.93±0.05	6.03±0.07	6.07±0.04	<0.001	<0.001	<0.001	0.319
	MF	6.13±0.03	6.15±0.02	6.19±0.06				
	HF	6.27±0.04	6.31±0.03	6.36±0.03				
总产气量 Total gas production (mL/g DM)	LF	119±5	128±2	135±4	<0.001	<0.001	<0.001	0.027
	MF	100±3	107±4	117±2				
	HF	91±3	108±2	115±2				
甲烷 CH ₄ (μmol/g DM)	LF	494±23	464±21	473±12	<0.001	0.681	<0.001	0.003
	MF	463±21	452±11	422±39				
	HF	399±17	362±26	343±31				
乙酸 Acetate (mmol/L)	LF	12.11±2.52	15.61±1.21	17.82±1.47	<0.001	0.943	<0.001	0.167
	MF	15.59±1.01	24.35±2.10	23.69±6.11				
	HF	18.31±2.02	22.36±2.47	21.04±1.59				
丙酸 Propionate (mmol/L)	LF	10.25±2.10	15.19±0.73	17.31±0.55	<0.001	<0.001	<0.001	0.437
	MF	7.92±0.29	13.15±0.76	15.77±2.17				
	HF	8.00±0.73	11.56±0.92	13.62±1.15				
丁酸 Butyrate (mmol/L)	LF	10.62±0.67	11.47±0.77	10.78±0.61	0.113	0.851	<0.001	0.873
	MF	7.65±0.57	7.99±0.45	7.77±0.92				
	HF	4.45±0.41	4.75±0.57	4.32±0.42				
总挥发性脂肪酸 TVFA (mmol/L)	LF	33.74±5.21	42.28±1.12	45.91±2.02	<0.001	0.266	0.015	0.313
	MF	31.16±1.72	45.49±3.15	47.24±9.04				
	HF	30.75±3.09	38.66±2.45	38.98±2.94				
乙丙比 A:P	LF	1.19±0.22	1.03±0.10	1.03±0.06	<0.001	<0.001	<0.001	0.013
	MF	1.97±0.09	1.85±0.06	1.48±0.21				
	HF	2.29±0.12	1.95±0.30	1.55±0.42				

2.2 延胡索酸二钠对黄化瘤胃球菌发酵粗饲料活力的影响

添加 4, 8 和 128 mmol/L 延胡索酸二钠的处理组中累计产气量分别较对照组提高了 12.96%, 27.13% 和 36.05% ($P < 0.05$)。较对照组相比, 添加 8 和 12 mmol/L 延胡索酸二钠处理组的丙酸浓度、黄化瘤胃球菌数量及干物质消失率显著提高 ($P < 0.05$)。延胡索酸二钠处理显著提高了 TVFA 和乙酸产量 ($P < 0.05$), 添加延胡索酸二钠对丁酸浓度的影响较小, 仅在 12 mmol/L 剂量时与对照组有显著差异 ($P < 0.05$) (表 2)。

表 2 延胡索酸二钠对黄化瘤胃球菌发酵活力的影响

Table 2 Effect of disodium fumarate addition on *in vitro* fermentation of *Ruminococcus flavefaciens*

指标 Index	延胡索酸二钠 Disodium fumarate (mmol/L)			
	0	4	8	12
累计产气量 Cumulative gas production (mL/g DM)	94.79±3.21 a	108.02±4.47 b	129.58±4.72 c	147.60±4.75 d
乙酸 Acetate (mmol/L)	11.59±0.02 a	13.44±0.54 b	12.28±0.36 a	13.23±0.50 b
丙酸 Propionate (mmol/L)	2.25±0.11 a	2.32±0.19 a	2.97±0.07 b	2.67±0.22 b
丁酸 Butyrate (mmol/L)	1.71±0.18 a	1.64±0.08 a	1.81±0.09 a	2.16±0.10 b
总挥发性脂肪酸 TVFA (mmol/L)	15.50±50.05 a	17.40±0.77 b	17.06±0.48 b	18.70±0.72 b
干物质消失 Dry matter loss (%)	41.80±0.35 a	40.97±0.85 a	42.88±0.37 b	43.32±0.74 b
纤维降解菌数量 Number of cellulolytic bacteria ($\times 10^5$ /mL)	4.20±2.80 a	3.00±0.50 a	9.50±2.00 b	26.70±2.90 c

注: 同行不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: Values in the row with different letters mean significantly different ($P < 0.05$).

2.3 延胡索酸二钠对瘤胃真菌发酵活力的影响

2.3.1 延胡索酸二钠对混合瘤胃真菌发酵粗饲料活力的影响 较对照组相比, 发酵 48 h 后, 延胡索酸二钠各处理组的累计产气量开始低于对照组 ($P < 0.05$), 发酵末各处理组的底物干物质消失率分别较对照组降低了 20.04%, 46.50% 和 54.78% ($P < 0.05$), 累计产气量分别较对照组降低了 12.89%, 29.69% 和 43.38% ($P < 0.05$) (图 1)。

2.3.2 延胡索酸二钠对厌氧真菌发酵黑麦草动态的影响 较对照组相比, 至接种 24 h 后, 添加延胡索酸二钠显著降低了处理组发酵液上清中羧甲基纤维素酶活力、底物表观干物质消失率和乙酸浓度 ($P < 0.05$)。发酵至终点时, 延胡索酸二钠处理组中羧甲基纤维素酶酶活较对照组降低了 41.39% ($P < 0.05$), 干物质消失率较对照组降低了 38.34% ($P < 0.05$), 乙酸较对照组降低了 27.70% ($P < 0.05$) (图 2)。

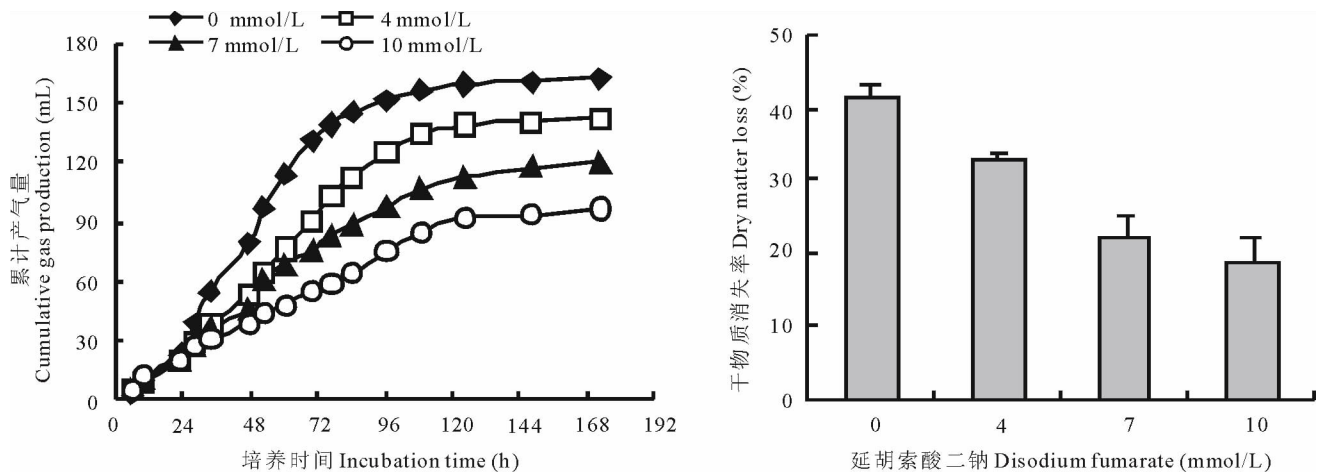


图 1 延胡索酸二钠对混合瘤胃真菌发酵黑麦草的影响

Fig. 1 Effect of disodium fumarate addition on the ryegrass fermentation by mixed rumen fungus

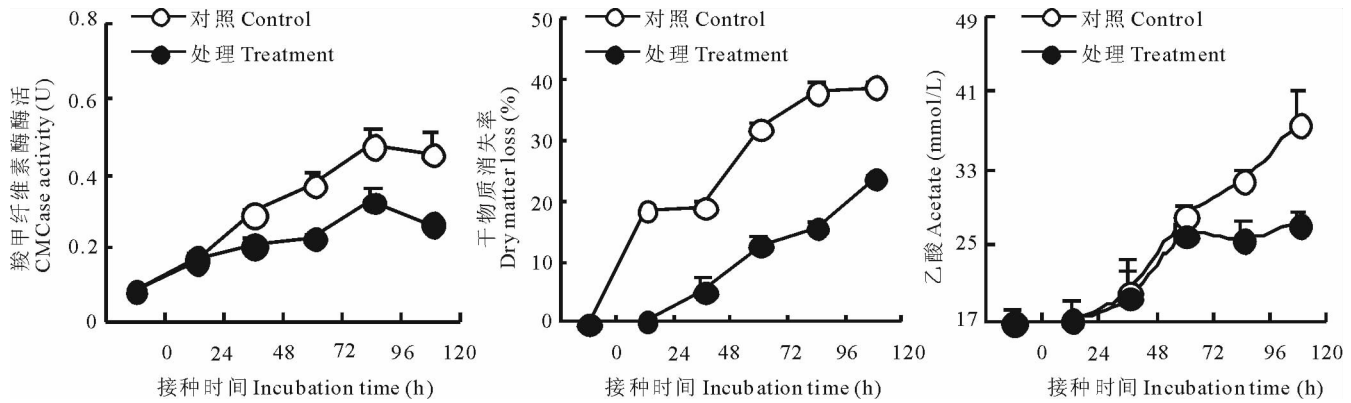


图 2 延胡索酸二钠对瘤胃真菌纯培养发酵黑麦草的影响

Fig. 2 Effect of disodium fumarate addition on the ryegrass fermentation by *N. frontalis*

3 讨论

延胡索酸,又称富马酸,是生物体代谢过程中三羧酸循环的中间代谢产物。与 Asanuma 等^[16]报道一致,本试验结果表明,添加延胡索酸二钠显著提高了发酵体系中的总产气量、TVFA 产量及丙酸比例,降低了乙丙比值。综合本研究结果与前人报道,TVFA 浓度升高的原因除与延胡索酸自身被瘤胃微生物发酵转化成乙酸或丙酸有关外;还与培养体系中纤维降解菌的活性增加相关^[6,16]。在本研究中,添加延胡索酸二钠显著促进纤维降解细菌的增殖,该结果也进一步佐证了延胡索酸二钠可通过上述 2 种手段影响挥发性脂肪酸生成。Wolin^[17]报道,瘤胃中挥发性脂肪酸组成比例与甲烷产量密切相关,当丙酸比例显著升高或乙丙比值显著降低时,甲烷产量会显著降低,而乙酸与丁酸比例升高,则甲烷产量增加。本研究结果也显示,添加延胡索酸二钠后发酵体系中乙丙比显著下降,甲烷产量也显著降低,该结果也与上述报道一致。

在瘤胃中,日粮结构是影响瘤胃微生物区系组成和代谢产物的主要因素^[18-21]。分析前人有关利用延胡索酸调控瘤胃甲烷生成的效应不一致的报道,研究发现,各试验所用的日粮显著不同;如 Beauchemin 和 McGinn^[8]的试验日粮以大麦(*Hordeum vulgare*)青贮为主(甲烷产量无变化),Wallace 等^[22]的试验日粮则以稻草为主(甲烷产量降低 75%)。本研究结果显示,延胡索酸二钠在降低甲烷产量方面与日粮种类显著相关,其中对粗饲料含量较高的日粮效果更佳。笔者推测,出现该结果的具体原因可能与不同日粮结构下延胡索酸还原菌群结构组成不一致有很大关系。Hattori 和 Matsu^[23]发现,不同日粮结构下瘤胃内延胡索酸还原菌群结构有很大差异。Asanuma 和 Hino^[24]体外纯培养显示,不同延胡索酸还原菌还原延胡索酸的能力差异很大;因此,在应用延胡索酸二钠调控甲烷生成的研究中,如果延胡索酸还原菌群结构组成不一样,最终通过延胡索酸—琥珀酸途径利用的氢的数量方面存在差异,进而导致延胡索酸在调控甲烷产量的效果上出现差异。

氢是甲烷形成的重要底物之一,而黄化瘤胃球菌和瘤胃厌氧真菌是瘤胃中主要的产氢菌之一,因此,研究延胡索酸二钠对这些纤维降解菌的影响有助于揭示延胡索酸对瘤胃氢代谢流程的影响。Asanuma 等^[16]报道,黄化瘤胃球菌和白色瘤胃球菌在代谢中皆可产生延胡索酸还原酶,而延胡索酸还原酶可还原延胡索酸生成琥珀酸,因此添加延胡索酸二钠可加快发酵系统中氢利用,进而降低氢对微生物代谢过程的反馈抑制,从而提高微生物自身对底物的利用率。本研究结果与上述推测一致,添加延胡索酸二钠显著提高了黄化瘤胃球菌的发酵活力及其数量。但本研究首次发现,添加延胡索酸二钠显著降低了瘤胃真菌的发酵活力,引发该结果的具体原因尚不清楚。但食品与饲料添加剂领域的一些研究报道显示,延胡索酸二钠可用做饲料保存剂及食品保鲜剂,防止饲料或食品霉变,其作用机制主要为延胡索酸可渗透入细胞壁,进而干扰霉菌的代谢,由此起到抑菌作用^[25]。但由于厌氧真菌与好氧真菌在细胞壁结构与代谢过程方面皆存在显著差异,延胡索酸二钠是否是通过该机制来抑制瘤胃真菌的增殖,从而影响瘤胃真菌的发酵活力,尚不清楚,还需进一步研究。

综上所述,在以不同精粗比为底物时,添加延胡索酸二钠可显著提高发酵体系中的 pH 值、乙酸、丙酸、TVFA 和微生物蛋白产量,降低乙丙比,在降低甲烷产量方面,延胡索酸二钠对高牧草日粮组的效果更佳。延胡

索酸二钠可促进黄化瘤胃球菌增殖,但降低了瘤胃真菌发酵粗饲料的活力。

参考文献:

- [1] Moss A R, Jouany J P, Newbold J. Methane production by ruminants; Its contribution to global warming[J]. Annual Zootechnology, 2000, 49: 231-253.
- [2] Mathers J C, Miller E L. Some effects of choral hydrate on rumen fermentation and digestion in sheep[J]. Journal of Agricultural Science, 1982, 99: 215-224.
- [3] O'Kelly J C, Spiers W G. Effect of monensin on methane and heat production of steers fed lucerne hay either ad libitum or at the rate of 250 g/Hour[J]. Australian Journal of Agricultural Research, 1992, 43: 1789-1793.
- [4] Phillips M W, Gordon G L R. Fungistatic and fungicidal effects of the ionophores monensin and tetronasin on the rumen fungus *Neocallimastix* sp. LM1[J]. Letters in Applied Microbiology, 1992, 15: 116-119.
- [5] Cann I K O, Kobayashi Y, Onada A, *et al.* Effects of some ionophore antibiotics and polyoxins on the growth of anaerobic rumen fungi[J]. Journal of Applied Bacteriology, 1993, 74: 127-133.
- [6] Lo'pez S, Valde's C, Newbold C J, *et al.* Influence of sodium fumarate addition on rumen fermentation *in vitro*[J]. British Journal of Nutrition, 1999, 81: 59-64.
- [7] Carro M D, Ranilla M J. Influence of different concentrations of disodium fumarate on methane production and fermentation of concentrate feeds by rumen microorganisms *in vitro*[J]. British Journal of Nutrition, 2003, 90: 617-623.
- [8] Beauchemin K A, McGinn S M. Methane emissions from beef cattle; Effects of fumaric acid, essential oil, and canola oil[J]. Journal of Animal Science, 2006, 84: 1489-1496.
- [9] Longland A, Theodorou M K, Sanderson R, *et al.* Non-starch polysaccharide composition and *in vitro* fermentability of tropical forage legumes varying in phenolic content[J]. Animal Feed Science and Technology, 1994, 55: 161-177.
- [10] 朱伟云, 毛胜勇, 王全军, 等. 厌氧真菌体外发酵筛选技术的研究[J]. 南京农业大学学报, 2001, 24(3): 44-48.
- [11] 毛胜勇, 陈洁, 姚文, 等. 体外共培养法研究瘤胃真菌对瘤胃细菌发酵的影响[J]. 华中农业大学学报, 2005, 24: 610-612.
- [12] Theodorou M K, Williams B A, Dhanoam S, *et al.* A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds[J]. Animal Feed Science and Technology, 1994, 48: 185-197.
- [13] 秦为琳. 应用气相色谱法测定挥发性脂肪酸的改进[J]. 南京农学院学报, 1982, 5: 110-116.
- [14] 胡伟莲. 皂甙对瘤胃发酵与甲烷产量及动物生产性能影响的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2005: 7-24.
- [15] 陈洁. 山羊瘤胃厌氧真菌与细菌互作的体外研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2004: 22-32.
- [16] Asanuma N, Iwamoto M, Hino T. Effect of the addition of fumarate on methane production by ruminal microorganisms *in vitro*[J]. Journal of Dairy Science, 1999, 82: 780-787.
- [17] Wolin M J. A theoretical rumen fermentation balance[J]. Journal of Dairy Science, 1960, 43: 1452-1459.
- [18] 王聪, 黄应祥, 刘强, 等. 硫酸铜对西门塔尔牛瘤胃发酵及尿嘌呤衍生物的影响[J]. 草业学报, 2008, 17(1): 80-84.
- [19] 张石蕊, 易学武, 贺喜, 等. 不同精粗比全混合日粮饲养技术对南方奶牛采食行为、产奶性能和血清游离氨基酸的影响[J]. 草业学报, 2008, 17(3): 23-30.
- [20] 李向林, 张新跃, 唐一国, 等. 日粮中精料和牧草比例对舍饲山羊增重的影响[J]. 草业学报, 2008, 17(2): 85-91.
- [21] Tajima K, Aminov R I, Nagamine T, *et al.* Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67: 2766-2774.
- [22] Wallace R J, Wood T A, Rowe A. Encapsulated fumaric acid as a means of decreasing ruminal methane emissions[J]. International Congress Series, 2006, 1293: 148-151.
- [23] Hattori K, Matsui H. Diversity of fumarate reducing bacteria in the bovine rumen revealed by culture dependent and independent approaches[J]. Anaerobe, 2008, 14: 87-93.
- [24] Asanuma N, Hino T. Activity and properties of fumarate reductase in ruminal bacteria[J]. Journal of General Applied Microbiology, 2000, 46: 119-125.
- [25] 刘延贺, 胡现生. 延胡索酸与动物营养[J]. 郑州牧专学报, 1994, 14(3): 30-39.

Effects of disodium fumarate on *in vitro* methane production and fermentation of rumen microbial

MAO Sheng-yong, WANG Xing-feng, ZHU Wei-yun

(The College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Three experiments were conducted to investigate the effects of disodium fumarate on CH₄ production and fermentation by rumen micro-organisms. In experiment 1, rumen contents were collected from three local goats. Disodium fumarate was added to the incubation bottles to achieve final concentrations of 0, 4 and 8 mmol/L-fumarate. Results showed that disodium fumarate addition increased the final pH and the production of acetate and propionate linearly ($P < 0.001$), and reduced the amount of NH₃-N in the cultures. Compared with the control, adding disodium fumarate to batch cultures reduced CH₄ production. In experiment 2, the effect of disodium fumarate on the fermentation activity of *Ruminococcus flavefaciens* was investigated. Disodium fumarate was added to the incubation bottles to achieve final concentrations of 0, 4, 7 and 10 mmol/L. Disodium fumarate addition increased the dry matter loss, TVFA production, and the counts of *R. flavefaciens*. In experiment 3, the effect of disodium fumarate on ryegrass fermentation by rumen fungi was investigated. Disodium fumarate addition (0, 4, 7, and 10 mmol/L) reduced the dry matter loss and the cumulative gas production ($P < 0.01$). These results indicate that the effects of disodium fumarate on rumen fermentation mainly depend on the nature of the incubated substrate, with the high-forage diet showing the greatest response. Disodium fumarate addition increased the fermentation activity of the mixed rumen micro-organisms and of *R. flavefaciens*, but reduced the fermentation activity of the rumen fungi.

Key words: disodium fumarate; mixed rumen microorganism; methane; batch fermentation