

乙酸与丙酸比对体外瘤胃液挥发性脂肪酸发酵模式和微生物群体多样性的影响

尹召华¹ 王梦芝^{2*} 王洪荣^{2*} 张洁² 喻礼怀²

(1. 扬州大学实验农牧场, 扬州 225009; 2. 扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225009)

摘要: 本文主要研究乙酸与丙酸比(乙/丙)对体外瘤胃液挥发性脂肪酸发酵模式及微生物群体多样性的影响。试验以4头瘤胃瘘管山羊提供瘤胃液, 设4个处理, 培养底物乙/丙分别为30:70、50:50、70:30和100:0。测定培养液中挥发性脂肪酸的浓度的变化, 并通过单链构象多态性(SSCP)图谱检测细菌和原虫的群体多样性。结果表明: 培养液乙酸浓度以100:0组最高, 显著高于其他3组($P < 0.05$), 50:50组最低; 丙酸浓度以30:70组最高, 显著高于50:50和70:30组($P < 0.05$); 丁酸的浓度30:70组显著高于70:30组($P < 0.05$); 各组培养液乙/丙均接近3:1, 30:70组显著低于70:30和100:0组($P < 0.05$)。细菌SSCP图谱显示, 50:50组条带数最多, 100:0组条带数最少; 原虫的SSCP图谱以100:0组条带数最多, 30:70组条带数最少。细菌、原虫的SSCP图谱皆以50:50和70:30组图谱间相似性指数为高。总之, 乙/丙对培养液挥发性脂肪酸模式、细菌或原虫的群体多样性都存在影响。

关键词: 瘤胃; 细菌; 原虫; 乙酸、丙酸比; 多样性

中图分类号: S826

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2011)12-2129-07

瘤胃微生物在反刍动物消化生理中至关重要。碳水化合物在反刍动物瘤胃中被微生物降解为挥发性脂肪酸(VFA), VFA可提供机体可消化能的70%~80%^[1]。VFA包括甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸、异戊酸和己酸等。乙酸、丙酸和丁酸约占瘤胃发酵VFA总产量的95%, 也是机体代谢最为重要的几种VFA。丁酸在瘤胃液中含量相对较低(10%左右), 而且可由乙酸转化; 乙酸和丙酸是饲料在瘤胃内发酵产生的两大主要有机酸, 饲料的种类和微生物的区系不同, 发酵产生乙酸与丙酸比(乙/丙)也不同, 如非结构性碳水化合物在瘤胃中的发酵率很高, 产生VFA总量也较多, 但乙/丙较低, 而粗饲料则相反。因此, 瘤胃液乙/丙可反映饲料在瘤胃中的发酵模式; 同时, VFA又为微生物发酵底物和合成微生物蛋白质(MCP)提供能量和碳架。鉴于微生物生长对底物

的选择性^[1], 乙/丙也会影响微生物蛋白质的合成以及不同区系瘤胃微生物(细菌、原虫等)的群体结构, 进而影响整个机体的消化与营养代谢^[2]。迄今为止, 国内外尚未见通过体外培养研究乙/丙影响瘤胃微生物VFA发酵模式以及原虫、细菌群体多样性的报道。为此, 本研究设置4种乙/丙进行人工模拟瘤胃体外发酵试验, 旨在研究瘤胃液乙/丙对微生物发酵模式及群体多样性的影响, 期为反刍动物瘤胃微生物营养代谢调控的研究提供基础性资料。

1 材料与方法

1.1 供瘤胃液动物及瘤胃液的采集

试验在扬州大学实验农牧场进行。选用4只健康、体重(37.6±1.3)kg、安装有永久性瘤胃瘘管的徐淮山羊羯羊作为瘤胃液供体。单圈饲养,

收稿日期: 2011-07-11

基金项目: 国家自然科学基金(31072051); 江苏省自然科学基金基础研究项目(SBK201121885)

作者简介: 尹召华(1964—), 男, 江苏泰州人, 博士, 从事动物营养与遗传育种研究。E-mail: mengzhiwang@yahoo.cn

* 通讯作者: 王梦芝, 讲师, E-mail: mengzhiwang@yahoo.cn; 王洪荣, 教授, 博士生导师, E-mail: hrwang@yzu.edu.cn

以(玉米+豆粕):羊草为 30:70 作为饲粮,日给料干物质质量为体重的 2%,08:00 和 20:00 分 2 次等量饲喂,自由饮水。

通过瘤胃瘘管,利用自制真空负压装置,在晨饲前从 4 头山羊瘤胃内各采约 150 mL 瘤胃液,过 4 层纱布,滤液装于预先通有 CO₂ 并 39 °C 预热的灭菌生理盐水瓶中,将所有瘤胃液混合均匀,39 °C 水浴保温送回实验室待用。

1.2 试验设计

试验按培养底物乙/丙不同分为 4 组, A、B、C 和 D 组乙/丙分别为 30:70、50:50、70:30、100:0, 各组能量水平一致。

1.3 体外培养

培养底物配制方法如下:体外培养试验开始前 30 min,按表 1 的体积取乙酸和丙酸溶于 20 mL 水中,用 1 mol/L NaOH 调 pH 为 7.0,再加人工唾液盐(配制参考 Menke 等^[3]的方法)至 80 mL 为乙酸、丙酸混合液,39 °C 水浴待用。

三角瓶经紫外线灭菌 30 min 后加入 1 g 酪蛋白;再在各瓶中分别加入按不同比例混合好的乙酸、丙酸混合液 80 mL(预先通 CO₂ 至饱和、39 °C 预热);而后加入瘤胃液 40 mL;塞好橡皮塞,通 CO₂、39 °C、震荡(50 r/min)培养。每组各设 3 个重复,另设 1 个不加底物的(仅含瘤胃液、人工唾液盐)空白对照。体外培养方法参照 Menke 等^[3]的方法进行。

表 1 培养底物的组成及能量水平

Table 1 Composition and energy levels of cultural substrates

项目 Items	组别 Groups			
	A	B	C	D
乙/丙 Acetate/propionate	30:70	50:50	70:30	100:0
原料 Ingredients				
乙酸 Acetate/mL	0.283	0.500	0.744	1.174
丙酸 Propionate/mL	0.661	0.500	0.319	0.000
酪蛋白 Casein	1.000	1.000	1.000	1.000
能量水平 Energy levels				
能值 Energy/kJ	17.86	17.85	17.83	17.80
能氮比 Energy/nitrogen/(g/MJ)	8.51	8.52	8.53	8.54

1.4 样品采集

分别在培养后 2、4、6、8、10、12、16 和 24 h 各采集 2 mL 培养液,并 -20 °C 冷冻保存,用于培养液 VFA 浓度的测定。培养结束后,取 10 mL 培养液分装 2 个离心管,其中 1 管用于分离培养液的原虫与细菌,分离后采用二苯胺显色法测定细菌、原虫的 DNA 含量;另 1 管用于微生物 DNA 的提取,提取得到的 DNA 进行群体多样性检测。

1.5 VFA 浓度测定

采用日本岛津 GC-14B 气相色谱仪按文献[4]的方法进行测定。

色谱条件:毛细管柱 CP-WAX(30 m × 0.53 mm × 1 μm);气化室 200 °C, FID 检测器 200 °C;柱温采用程序升温法,初温 100 °C,末温 150 °C,升温速率 3 °C/min,灵敏度为 10,衰减为 2⁵;以巴豆酸为内标物。

培养液处理:培养液经 15 000 × g 离心 10 min 后取上清液 1 mL,加 0.2 mL 20% 含 60 mmol/L 巴豆酸的偏磷酸,混匀后高速离心取上清液 0.4 μL 进样分析。

1.6 微生物分离及其 DNA 浓度测定

培养液微生物采用文献[5]的方法进行分离。1)原虫:取培养液加等体积生理盐水 39 °C 水浴震荡(125 r/min)培养 60 min,并辅以搅拌;再经 4 层纱布过滤,滤液离心(150 × g、10 min),收集沉淀为原虫,用生理盐水洗涤 2 次后用生理盐水悬浮,-20 °C 贮存待测。2)细菌:收集离心后的上清液,再高速离心(15 000 × g、15 min),收集沉淀为细菌,其余处理同原虫。

微生物 DNA 浓度测定采用二苯胺显色法、参照赵亚华^[6]的步骤。制备小牛胸腺 DNA 钠盐(上海生工生物工程技术有限公司)标准溶液,绘

制以 DNA 浓度为横坐标、吸光度值为纵坐标的标准曲线。取分离后的原虫或细菌样品,调整至线性范围浓度后,2 mL 样品加 4 mL 二苯胺试剂于 60 °C 水浴中保温 1 h,使用 722N 型分光光度计(上海精科)测定 OD_{595 nm}。计算公式:

$$\text{DNA 浓度 (mg/mL)} = \text{根据标准曲线测得样品 DNA 浓度} \times \text{稀释倍数} \times 10^{-3}。$$

1.7 微生物遗传指纹分析

1.7.1 DNA 的提取

采用 Zhou 等^[7]的冻融法提取细菌、原虫的

DNA。采用 756 型紫外分析仪(天津普瑞斯)测定所提取 DNA 的浓度和纯度,0.7% 琼脂糖电泳检测 DNA 片段大小。

1.7.2 PCR

细菌用细菌 16S rDNA 的 V3 区兼并引物 F338 与 R518 进行 PCR 扩增^[8];原虫用纤毛虫 rDNA 的 ITS1 区兼并引物 F1738 与 R1951 进行 PCR 扩增^[9],2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物大小,引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

表 2 瘤胃微生物引物序列及参数

Table 2 Sequences and parameters of primers of rumen microbes

项目 Items	序列 Sequences(5'—3')	位置 Location	版本 Version	产物大小 Product size/bp
细菌 16S rDNA V3	上游:CCTACGGGAGGCAGCAG	338	S-D-B-338-a-S-17	181
Bacterial 16S rDNA V3	下游:ATTACCGCGGCTGCTGG	518	S-D-B-518-b-A-17	
原虫 rDNA ITS1	上游:AACAAGGTTTCCGTAGGT	1 738	S-D-P-1738-a-S-18	214
Protozoal rDNA ITS1	下游:ACTTCGCTGCGTTCTTCA	1 951	S-D-P-1951-b-A-18	

1.7.3 单链构象多态性(SSCP)检测与图谱分析

SSCP 检测参考 Schmalenberger 等^[10]的方法,图谱分析参照 Carriquo 等^[11]的方法。将 SSCP 图谱数字化,计算泳道(底物)间 Jaccard 相似性指数(C_j),公式为:

$$C_j = j / (a + b + j)。$$

式中:j 为 2 个泳道共有条带数;a 和 b 为 2 个泳道各自特有的带数。C_j 反映了群落间物种组成的相似性,本文中用 C_j 代表 2 个泳道(样品)的组带分布(即微生物群体结构)的相似程度。

1.8 统计分析

试验数据采用 Excel 软件进行整理,用 SPSS 16.0 软件中的 One-way ANOVA 过程进行分析和 Tukey 法进行多重比较。

2 结果

2.1 底物乙/丙对培养液 VFA 浓度的影响

由表 3 可见,A、B、C 和 D 组乙酸浓度平均值分别为 12.02、11.41、13.76 和 17.81 mmol/L。D 组乙酸浓度最高(P < 0.05),显著高于其他 3 组。其次为 C、A 组,B 组最低。A、B、C 和 D 组丙酸浓度平均值分别为 6.50、4.36、4.40 和 5.62 mmol/L,可

见 A 组丙酸浓度最高、B 组最低(P < 0.05)。A、B、C 和 D 组丁酸浓度平均值分别为 3.33、2.26、1.88 和 2.18 mmol/L,其中 A 和 C 组间差异显著(P < 0.05)。

从动态变化来看,各种 VFA 浓度变化趋势相似,随时间延长基本都呈上升趋势。C、D 组中乙酸浓度明显随培养时间延长而不断增加,而 A、B 组则变化较为平缓,A 组在 16 ~ 24 h 阶段有所下降。B 组的丙酸浓度在培养后 2 h 时高于其他 3 组,而后与其他组一样,基本呈现上升趋势;A 组丙酸浓度除 2 h 外基本持续在较高水平变化,但在 16 ~ 24 h 阶段也有所下降。丁酸浓度随培养时间的变化规律和丙酸的变化趋势类似。

2.2 底物乙/丙对培养液该比例及原虫和细菌 DNA 浓度的影响

由表 4 可见,各组培养液乙/丙平均值在 3:1 左右,大致呈现出随底物乙/丙升高而升高的规律,而且 A 组显著低于 C 和 D 组(P < 0.05)。从动态变化来看,培养液乙/丙随时间的波动变化较为平缓。细菌 DNA 浓度以 B 组最高、C 和 D 组次之,A 组最低;原虫 DNA 浓度以 B 组最高、A 组次之,均显著高于 C 和 D 组(P < 0.05)。

表 3 底物乙/丙对培养液 VFA 浓度的影响

Table 3 Effects of acetate to propionate ratio of substrates on concentrations of volatile fatty acids in the culture medium

mmol/L

项目 Items	时间 Time/h	组别 Groups			
		A	B	C	D
乙酸 Acetate	2	5.88 ± 1.11	8.25 ± 2.14	7.61 ± 0.55	6.40 ± 0.38
	4	7.15 ± 1.06	6.89 ± 0.66	8.47 ± 0.38	8.93 ± 0.08
	6	9.92 ± 0.71	10.46 ± 2.59	8.55 ± 1.48	11.87 ± 0.64
	8	12.00 ± 1.65	11.33 ± 1.33	14.70 ± 4.25	15.77 ± 0.92
	10	13.66 ± 4.28	10.27 ± 2.81	13.87 ± 0.94	16.00 ± 3.64
	12	17.53 ± 4.28	13.26 ± 2.48	17.39 ± 0.93	20.83 ± 0.70
	16	20.98 ± 0.58	18.28 ± 4.01	18.64 ± 0.33	28.89 ± 2.18
	24	17.51 ± 3.67	19.56 ± 2.30	30.73 ± 5.15	47.25 ± 4.11
	平均值 Mean	12.02 ± 1.98 ^b	11.41 ± 1.66 ^b	13.76 ± 2.68 ^b	17.81 ± 4.46 ^a
	丙酸 Propionate	2	1.54 ± 0.22	4.16 ± 2.67	1.94 ± 0.30
4		1.86 ± 0.34	1.76 ± 0.07	1.86 ± 0.19	2.36 ± 0.21
6		3.14 ± 0.69	2.80 ± 0.92	2.35 ± 0.38	3.22 ± 0.20
8		5.70 ± 2.93	4.36 ± 1.07	4.46 ± 1.38	5.32 ± 0.59
10		7.08 ± 1.78	2.88 ± 1.26	4.31 ± 0.13	5.27 ± 1.69
12		9.51 ± 1.08	4.84 ± 1.78	5.71 ± 0.77	6.87 ± 0.85
16		15.23 ± 1.80	7.62 ± 0.86	6.36 ± 0.12	10.69 ± 1.16
24		12.81 ± 0.45	9.27 ± 0.13	10.86 ± 2.38	13.31 ± 1.82
平均值 Mean		6.50 ± 1.69 ^a	4.36 ± 0.87 ^b	4.40 ± 0.99 ^b	5.62 ± 1.36 ^{ab}
丁酸 Butyrate		2	0.91 ± 0.12	2.78 ± 1.78	1.25 ± 0.21
	4	1.10 ± 0.05	1.03 ± 0.10	1.03 ± 0.21	1.11 ± 0.07
	6	1.82 ± 0.02	1.55 ± 0.22	1.30 ± 0.15	1.35 ± 0.16
	8	3.41 ± 0.89	2.30 ± 0.68	1.87 ± 0.26	2.10 ± 0.26
	10	3.94 ± 0.21	1.88 ± 0.42	1.93 ± 0.04	1.97 ± 0.55
	12	4.77 ± 1.50	2.86 ± 0.42	2.52 ± 0.16	2.66 ± 0.23
	16	7.43 ± 2.09	3.37 ± 0.19	2.62 ± 0.07	3.72 ± 0.23
	24	5.45 ± 0.81	3.45 ± 0.02	3.52 ± 0.53	4.92 ± 0.98
	平均值 Mean	3.33 ± 0.76 ^a	2.26 ± 0.34 ^{ab}	1.88 ± 0.29 ^b	2.18 ± 0.46 ^{ab}

同行数据肩标相邻字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 相间字母表示差异极显著 ($P < 0.01$), 相同或无字母肩标表示差异不显著 ($P > 0.05$)。下表同。

In the same row, values with adjacent letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$), and with alternate letter superscripts mean significant difference ($P < 0.01$), but with the same or no letter superscripts mean no significant difference ($P > 0.05$). The same as below.

2.3 细菌和原虫 SSCP 图谱分析

图 1 为瘤胃细菌、原虫区系的 SSCP 图谱, 图谱上的条带反映了不同底物下培养液中的优势菌群, 条带的数量和位置的复杂性说明了菌群的多样性。由细菌 SSCP 图谱可见, B 组条带数最多为 16 条, D 组条带数最少为 5 条, A、B、C 和 D 组都有 2 条共有的优势条带 a 和 b; 另外的 2 条优势带 c 和 d 为 B 和 C 组共有, 而 A 和 D 组没有。Jac-

card 相似性指数表明, B 和 C 组的细菌图谱相似性较高 (0.52), 图谱中有 10 条共有条带。

由原虫的 SSCP 图谱可见, D 组条带数最多为 17 条, A 组条带数最少为 10 条。B 和 C 组分别为 12、11 条, 但 B 和 C 组条带灰度明显高于 D 组。A、B、C 和 D 组共有 2 条优势条带 e 和 f。原虫 SSCP 指纹图谱也以 B 和 C 组间相似性指数较高 (0.50)。

表 4 底物乙/丙对培养液该比例和微生物 DNA 浓度的影响

Table 4 Effects of acetate to propionate ratio of substrates on the ratio and microbes DNA concentration of culture medium

项目 Items	时间 Time/h	组别 Groups			
		A	B	C	D
乙/丙 Acetate/propionate	2	3.79 ± 0.19	2.81 ± 1.29	3.97 ± 0.33	3.59 ± 0.48
	4	3.86 ± 0.14	3.93 ± 0.52	4.59 ± 0.27	3.82 ± 0.37
	6	3.37 ± 0.96	3.85 ± 0.35	3.63 ± 0.04	3.69 ± 0.03
	8	3.06 ± 1.86	2.68 ± 0.35	3.32 ± 0.08	2.98 ± 0.16
	10	2.03 ± 1.16	3.88 ± 0.72	3.21 ± 0.12	3.14 ± 0.31
	12	1.88 ± 0.67	2.95 ± 0.58	3.08 ± 0.25	3.09 ± 0.49
	16	1.40 ± 0.13	2.37 ± 0.26	2.93 ± 0.11	2.71 ± 0.09
	24	1.37 ± 0.24	2.11 ± 0.21	2.86 ± 0.15	3.66 ± 0.81
	平均值 Mean	2.54 ± 0.33 ^b	3.04 ± 0.23 ^{ab}	3.32 ± 0.23 ^a	3.25 ± 0.15 ^a
细菌 DNA Bacteria DNA/(ng/mL)	8.10 ± 0.70 ^c	15.40 ± 1.70 ^a	9.80 ± 0.20 ^b	11.00 ± 1.40 ^{ab}	
原虫 DNA Protozoa DNA/(ng/mL)	9.60 ± 1.30 ^b	25.40 ± 2.60 ^a	4.30 ± 0.40 ^c	2.70 ± 0.40 ^c	

表 5 瘤胃细菌、原虫的相似性指数矩阵

Table 5 The matrix of kindred index for rumen bacteria and protozoa

项目 Items	组别 Groups	B 组 Group B	C 组 Group C	D 组 Group D
细菌 Bacteria	A 组 Group A	0.37	0.47	0.33
	B 组 Group B		0.52	0.39
	C 组 Group C			0.41
原虫 Protozoa	A 组 Group A	0.25	0.29	0.27
	B 组 Group B		0.50	0.47
	C 组 Group C			0.33

3 讨论

乙酸是反刍动物代谢所需能量的主要来源。丙酸则是反刍动物重要的葡萄糖前体,丙酸型发酵能为机体提供更多的能量,因而乙/丙影响能量的利用率^[12];同时,乙酸通过葡萄糖经磷酸戊糖途径代谢和葡萄糖存在依赖关系。因此,通过调整乙/丙可提高能量利用率。VFA 既是碳水化合物在瘤胃的终产物,也是瘤胃微生物生长所需的重要碳架和能量来源。乙酸和丙酸通过不同的代谢途径提供瘤胃微生物生长所需要的营养物质和能量,乙/丙不同,瘤胃微生物的群体结构也可能不同,进而又导致发酵模式的不同,改变发酵产物乙/丙。可见,底物与微生物间存在复杂的互作关系。

本研究表明,培养液乙酸浓度以 100:0 组最高、丙酸浓度以 30:70 组最高,这可能是由于 100:0 组底物中乙酸浓度较高、而 30:70 组底物中丙酸较高,进而导致利用和代谢相应酸的某些种类微生物

增加,而使培养液中相应酸的比例较高所致。而培养液乙酸和丙酸浓度皆以 50:50 组最低,这可能是由于该组微生物活性较高,生长繁殖较快对底物的利用较多所致。这与本文所测定的细菌、原虫 DNA 浓度在 50:50 组最高相一致。另外,该结果也与反映微生物多样性的图谱有一定的一致性。例如 50:50 组细菌 SSCP 图谱条带数最多;50:50 组原虫的条带数仅次于 100:0 组,而且该组图谱中的条带灰度明显高于 100:0 组。这些结果表明 50:50 组细菌、原虫群体较为多样,而且群体量也较大^[13]。进一步检测发现,细菌、原虫的 SSCP 图谱组间相似程度各有差异,但都以 50:50 和 70:30 组图谱间相似性指数较高,表明了在一一定的比例范围内,底物接近则微生物的群体结构也相近。以上结果说明底物对微生物有一定的影响,可以通过底物或饲料的改变来调控微生物的代谢,进而调控机体消化代谢,与前人的研究有一定的一致性^[14-15]。例如 Tajima 等^[16]曾研究发现,荷斯坦奶牛的饲料从粗饲料突然转变为高精料情

况下,瘤胃球菌消失,而乳酸利用菌成为优势菌群;王梦芝等^[9]报道的蛋白源不同微生物的种群结构也不同。

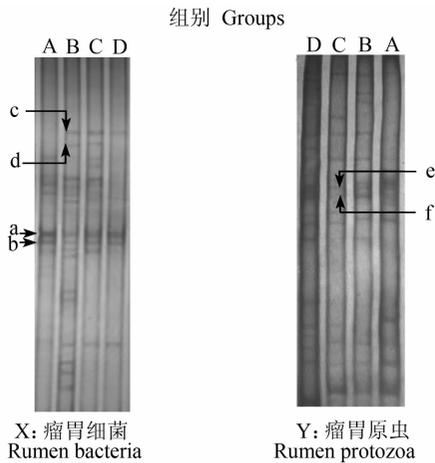


图1 瘤胃细菌和原虫区系的SSCP分析
Fig. 1 SSCP analysis of rumen bacteria and protozoa

动物采食饲料后,淀粉以及可溶性碳水化合物在瘤胃中发酵产生VFA的速度较快,VFA的浓度增加。随着发酵的进行,瘤胃上皮对VFA吸收的增加及向后部消化道流出速度的加快,引起瘤胃中VFA的浓度又开始下降。而与体内研究不同的是,本批次培养为不连续培养,作为不连续发酵装置,其产生的VFA不能够被瘤胃壁吸收和通过后部消化道排出,因此随培养时间的延长,本试验记录的VFA的产量逐渐升高。但在一定的范围内,培养液具有一定的缓冲能力,不影响微生物的正常发酵^[17]。而且除了VFA被吸收或排出,培养液乙酸、丙酸的浓度也反映了发酵和微生物对VFA的利用情况,所以常常被用来进行机理研究。至于乙/丙对瘤胃中微生物群体结构等影响还需要进一步研究。

4 结论

① 底物乙/丙为100:0时培养液乙酸浓度最高,30:70时丙酸浓度最高,50:50时乙酸、丙酸浓度均为最低。

② 细菌、原虫SSCP图谱组间相似程度不同,底物乙/丙为50:50和70:30时图谱间相似程度最高。

参考文献:

[1] 冯仰廉. 反刍动物营养学[M]. 北京: 科学出版社,

2004.

- [2] 熊本海, 卢德勋, 张子仪. 瘤胃乙酸与丙酸摩尔比例的改变对瘤胃发酵及血液指标的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2002, 33(6): 537-543.
- [3] MENKE K H, STEINGASS H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid[J]. Animal Research and Development, 1988, 28: 7-55.
- [4] 熊本海, 卢德勋, 高俊. 绵羊瘤胃VFA吸收效率及模型参数的研究[J]. 动物营养学报, 1999, 11: 248-255.
- [5] 王梦芝. 山羊瘤胃原虫与细菌吞噬关系和微生物AA变化机制的研究[D]. 博士学位论文. 扬州: 扬州大学, 2008.
- [6] 赵亚华. 生物化学与分子生物学实验技术教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2005.
- [7] ZHOU J, BRUNS M A, TIEDJE J M. DNA recovery from soils of diverse composition[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(2): 316-322.
- [8] MUYZER G, DE WAAL E C, UITTERLINDEN A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59: 695-700.
- [9] 王梦芝, 喻礼怀, 王洪荣, 等. 不同蛋白饲料对瘤胃微生物体外发酵和群体结构的影响[J]. 动物营养学报, 2009, 21(5): 673-679.
- [10] SCHMALENBERGER A, TEBBE C C. Bacterial diversity in maize rhizospheres: conclusions on the use of genetic profiles based on PCR-amplified partial small subunit rRNA genes in ecological studies[J]. Molecular Ecology, 2003, 12: 251-262.
- [11] CARRIJO J A, PINTO F R, SIMAS C, et al. Assessment of band-based similarity coefficients for automatic type and subtype classification of microbial isolates analyzed by pulsed-field gel electrophoresis[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43(11): 5483-5490.
- [12] ΦRSKOV, E R, GRUBB D A, SMITH J S. Efficiency of utilization of volatile fatty acids for maintenance and energy retention by sheep[J]. British Journal of Nutrition, 1979, 41: 541-552.
- [13] 朱伟云, 姚文, 毛胜勇. 变性梯度凝胶电泳法研究断奶仔猪粪样细菌区系变化[J]. 微生物学报, 2003, 8: 503-508.

- [14] CALSAMIGLIA S, STERN M D, FIRKINS J L. Effects of protein source on nitrogen metabolism in continuous culture and intestinal digestion *in vitro* [J]. *Journal of Animal Science*, 1995, 73:1819–1827.
- [15] TAJIIMA 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(6):2766–2774.
- [16] TAJIMA K, ARAI S, OGATA K, et al. Rumen bacterial community transition during adaptation to high-grain diet [J]. *Environmental Microbiology*, 2000(6):273–284.
- [17] PREVOT S, SENAUD J, BOHATIER J, et al. Variation in the composition of the ruminal bacterial microflora during the adaptation phase in an artificial fermentor (Rusitec) [J]. *Zoological Science Tokyo*, 1994, 11:871–878.

Acetate to Propionate Ratio: Effects on Volatile Fatty Acid Fermentation Pattern and Microorganisms Diversities in Rumen Fluid *in Vitro*

YIN Zhaohua¹ WANG Mengzhi^{2*} WANG Hongrong^{2*} ZHANG Jie² YU Lihuai²

(1. Yangzhou University Experiment Farm, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 2. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: This paper was conducted to investigate the effects of acetate to propionate ratio on the pattern of volatile fatty acid (VFA) fermentation and diversities of rumen microorganisms. Four goats fitted with permanent ruminal cannulas were used to provide rumen fluid for the *in vitro* study. The four treatments were set according to the acetate to propionate ratio in culture substrates, which were 30:70, 50:0, 70:30, and 100:0, respectively. Variation of VFA concentration was recorded, and diversities of bacteria and protozoa were investigated by SSCP fingerprint technique. The results showed as follows: acetate concentration of 100:0 group was the highest and was significantly higher than that of the other three groups ($P < 0.05$), while that of 50:50 group was the lowest. Propionate concentration of 30:70 group was the highest and was significantly higher than that of groups 50:50 and 70:30 ($P < 0.05$). Butyrate concentration of 30:70 group was significantly higher than that of 70:30 group ($P < 0.05$). Acetate to propionate ratios in culture medium of all the treatments were close to 3:1, while that of 30:70 group was significantly lower than that of groups 70:30 and 100:0 ($P < 0.05$). Bacterial SSCP fingerprint showed that bands number of 50:50 group was the most, while that of 100:0 group was the least; protozoa SSCP fingerprint showed that bands number of 100:0 group was the most, while that of 30:70 group was the least. Similarity index was the highest between 50:50 group and 70:30 group on both bacteria and protozoa fingerprints. In conclusion, the VFA pattern and diversities of rumen bacterial or protozoal community can be modified by acetate to propionate ratio *in vitro*. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2011, 23(12):2129-2135]

Key words: rumen; bacteria; protozoa; acetate to propionate ratio; diversity

* Corresponding author, WANG Mengzhi, lecturer, E-mail: mengzhiwang@yahoo.cn; WANG Hongrong, professor, E-mail: hrwang@yzu.edu.cn