

持续动态瘤胃发酵系统的结构功能比较研究进展

安朋朋^{1,2}, 周凌云^{1*}, 李发弟², 姜雅慧¹, 王典¹, 沈维军¹

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所 反刍动物营养国家重点实验室, 北京 100193;

2. 甘肃农业大学动物科学技术学院, 兰州 730070)

摘要: 持续动态瘤胃发酵系统是在体外模拟瘤胃内发酵环境, 用于瘤胃微生物代谢以及评定日粮营养价值等方面研究的机械装置。该装置是由一系列具有不同功能的设备组成。目前较新的人工瘤胃模拟系统主要能实现发酵环境中各发酵参数的实时监控并对发酵产物如产气量等进行准确计量, 但与实体瘤胃内环境还存在一定差距。本文通过对国内外几种典型的持续动态瘤胃发酵系统的各部分结构和功能进行对比分析, 比较各自的优缺点, 提出了较为合理的设计方法。总之, 持续动态瘤胃发酵系统的设计向着自动化方向发展, 但在食糜样品的采集方法等方面还需改进。

关键词: 人工瘤胃; 体外模拟; 结构设计

中图分类号: Q482; S826

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)07-1009-06

Comparison Review of the Structure and Function of Continuous Culture Systems of Rumen Mixed Microorganism

AN Peng-peng^{1,2}, ZHOU Ling-yun^{1*}, LI Fa-di², JIANG Ya-hui¹, WANG Dian¹, SHEN Wei-jun¹

(1. State Key Laboratory of Animal Nutrition, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. College of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: Continuous culture system of rumen mixed microorganisms is an instrument designed to *in vitro* simulate fermentation process of microbes in the rumen, in which medium is continuously added at a constant rate, and culture fluid is removed at the same rate. The instrument, consisting of different functional devices, can be used for researching nutrient metabolism of rumen microorganisms and evaluating nutritional value of rations. Until now, this kind of system can monitor the fermentation parameter and accurately measure the fermentation product like gas production, but it doesn't equate to rumen environment. Based on comparison of advantages and disadvantages of structure designs and functional devices among several continuous culture systems in the literatures, some reasonable suggests were suggested for the instrumental design of continuous cultures for rumen microbes. In a word, the design of the continuous dynamic culture system is developed to the direction of automation, however, some aspects like the way of collecting chyme are needed to improve.

Key words: artificial rumen; *in vitro* simulation; structural design

人工瘤胃是对瘤胃功能进行模拟的一种机械装置, 它通过在体外接种反刍动物的瘤胃液对饲料进

行瘤胃模拟发酵, 并利用一些配套设备来控制发酵条件, 同时收集样品, 从而最大程度模拟营养物质在

收稿日期: 2010-12-15

基金项目: 现代农业技术体系建设专项资金(nycytx-04-01)

作者简介: 安朋朋(1987-), 男, 山东泰安人, 硕士, 主要从事反刍动物营养与牛奶质量改良研究, E-mail: anpen870611@163.com

* 通讯作者: 周凌云, Tel: 010-62813901, E-mail: anyal1977@263.net

瘤胃中的降解过程。人工瘤胃对瘤胃体外模拟技术的探索始于20世纪40年代^[1],但由于当时的科技水平,最初的模拟方法简单且功能单一,其中应用较为广泛的方法有两级离体消化法^[2]和产气量法^[3],这2种方法均属于批次培养法。批次培养法使用的设备简便,容易操作,试验周期短,产气量法可以同时进行大量的样本分析^[4],且与体内法具有高度相关性^[5],但由于无法实现营养物质连续添加和代谢废物的及时排出,使得该方法无法长时间稳定发酵。持续动态瘤胃发酵系统作为一种连续培养系统,可以较好地模拟瘤胃内环境,从而较为真实地模拟瘤胃发酵,因此被许多研究者采纳。

随着科技水平的不断提高,20世纪70年代开始出现了具有长时间稳定发酵特点的持续动态瘤胃发酵系统,其中具有代表性的有 Rusitec 装置^[6]、Hoover 等^[7]的连续培养装置(CC装置)以及夏兆刚等^[8]的双外流连续培养系统等。持续动态瘤胃发酵系统可以控制微生物发酵条件,并能持续排出发酵废物,使得发酵系统内微生物能长期存活并使瘤胃环境保持稳定,因此是评价饲料动态降解率和瘤胃代谢的很好的方法。

持续动态瘤胃发酵系统是由许多结构上相互连接,功能上相互联系的子系统组合而成。从功能上可以将其分为3大部分:发酵培养系统、发酵控制系统和样品收集系统。发酵培养系统主要分为3个子系统:发酵罐主体、喂料系统、缓冲液输入系统;而发酵控制系统也分为3个子系统:搅拌系统、温度控制系统、pH调节系统;样品收集系统包括食糜收集系统和气体收集系统2个子系统。本文通过对现有的持续动态瘤胃发酵系统各子系统的结构或设计方法进行比较,提出较为合理的设计,总结其设计思路和发展方向,为以后的设计和研究提供参考。

1 发酵培养系统

反刍动物的瘤胃是微生物发酵的主要场所,饲料、水及唾液首先进入此处,为瘤胃微生物提供所需的营养物质。发酵培养系统正如反刍动物的瘤胃,是整个系统的主体。饲料及缓冲液的输入是微生物发酵的前提,因此本文将喂料系统和缓冲液输入系统也归入发酵培养系统中进行综述。

1.1 发酵罐主体

发酵罐是微生物发酵的场所,并为喂料装置、搅拌装置以及各类传感器提供安装位点。为便于搅

拌,减少饲料沉积死角,模拟装置多借鉴发酵工程中发酵罐的设计特点,罐体多设计成圆柱形或底部为锥体的圆柱形结构。罐内体积一般在1300~2000 mL之间,有效体积维持在1000 mL左右,也有少数装置的体积设计成4000 mL。体积越大,所需的瘤胃液越多,日喂料量及缓冲液输入量也相应增加,也就增加了试验前的准备工作,同时,所需要的制作材料也会增多,提高了设计成本。设计材料一般由聚碳酸酯、有机玻璃或不锈钢制成^[8]。也有使用玻璃材料制作的罐体,如 Teather 等^[9]设计的双外流连续培养装置,Stefan 等^[10]设计的连续培养系统等。施学仕等^[11]设计的半自动人工瘤胃装置使用640 mL玻璃标本瓶作发酵罐主体。瘤胃微生物对瘤胃内环境温度的变化非常敏感,选择不同的罐体材料将影响发酵系统的保温效果,从模拟瘤胃内环境的角度考虑,应选择具有热绝缘性的材料较为理想。

1.2 喂料系统

喂料系统为发酵培养系统定时、定量提供饲料,以使微生物获得所需的发酵底物。加料的过程中,空气很容易进入发酵罐而对微生物的代谢产生影响,因此,喂料系统的设计需考虑该问题,以尽量减少加料过程空气的混入。另外,喂料系统的设计应尽量适应各种类型的饲料,对饲料形态的要求越少越好。

已经设计出来的喂料系统的结构多种多样。Fuchigami 等^[12]将粉碎的饲料均匀铺在长650 mm、宽75 mm的履带上面,向安装在发酵罐上的漏斗匀速输送饲料,利用安装在漏斗中央的1根螺旋钻的转动将饲料带入发酵罐内,它通过控制履带马达的转速来达到控制饲料添加速度的目的。该装置可以实现饲料的连续添加,同时通过不断向漏斗吹送CO₂来防止空气进入发酵罐,但由于设计过于复杂,占用空间大,因此不提倡使用。Hoover 等设计的自动喂料装置由饲料输送管和传动装置构成,首先将24 h所需的颗粒饲料盛放在输送管中,然后由一个齿轮电机带动螺旋杆转动,推动螺旋杆上的铝块向前移动,同时带动了固定在铝块上的活塞杆,活塞的推进使输送管中的饲料不断从加料口落入发酵罐内,当铝块移动一定距离后,触动了前方的微动开关使齿轮电机反转,将活塞复位^[7]。相比 Fuchigami 等^[12]的设计,这套装置相对简单,占用空间小,但对饲料形态的要求较高,以小的颗粒饲料最为适合,粉碎的饲料易引起堵塞。新西兰反刍动物营养与温室

气体减排研究所的 Stefan 等^[10]设计的自动喂料装置利用安装在发酵罐顶部,下端可开合的不锈钢管,由步进电机驱动活塞运动,将管内的饲料压入罐内,电机的工作由电脑控制。在加料前,活塞将管内的饲料压实以减少空气的混入,因此颗粒饲料并不适合该套装置,不过 Stefan 等认为,该套装置可以添加新鲜牧草。它将 Hoover 装置中横向的输送管改为竖向,可能是在机械空间的合理利用上有所考虑,另外,应该可以避免堵塞的问题,同时结构简单,操作也相对简便^[7,10]。

1.3 缓冲液输入系统

缓冲液输入系统为发酵培养系统定量输送缓冲液。大多数输入系统由缓冲液贮存罐、泵运装置和输送管道构成。Vatthauer 等^[13]指出,人工瘤胃的泵运装置必须具有可以在较宽范围的泵运速度内工作的能力。较宽的泵运速度范围可以为研究不同液相稀释率对微生物代谢活性的影响提供基础。蠕动泵可以为缓冲液输入系统提供动力,其泵运速度可以根据发酵罐的体积及试验要求调整,它可以长时间稳定工作,并可以同时为多个发酵罐输送缓冲液。如今较多的人工瘤胃持续动态发酵系统选用蠕动泵作为缓冲液输入系统的动力装置,而 Stefan 等所设计的连续培养系统首先采用了注射泵作为动力来源^[14]。注射泵是一种新型液体传输装置,与蠕动泵相比具有精确性高、平稳性好等优点,但价格相对较高,且一台注射泵只能为一个发酵罐连续输送缓冲液。对于动力装置的选择应根据实际需要而定。

2 发酵控制系统

反刍动物的瘤胃为微生物的发酵提供了适宜的温度和 pH 条件,并通过瘤胃壁规律性的蠕动促进了微生物和营养物质的混合。发酵控制系统为微生物提供适宜的发酵条件,以使其新陈代谢高效稳定的进行。

2.1 搅拌系统

搅拌系统的作用是使发酵罐内容物得到混合,以促进微生物的发酵,同时也帮助食糜收集装置获得有代表性的样品。现在的人工瘤胃技术尚无法做到对瘤胃壁收缩功能的真实模拟。借鉴发酵工程中常用的方法,人工瘤胃持续动态发酵系统多采用机械搅拌方式。以电机带动桨叶转动是较常采用的方式,中国农业大学设计的双外流连续培养系统采用变速电机驱动 2 组叶轮,并用电子时间控制器自动

控制搅拌和间歇时间,以便更加符合瘤胃的蠕动规律^[15]。日本明治大学设计的装置由电机带动数列毛刷转动,在发挥搅拌功能的同时起到防止安装在搅拌轴下方的溢流管滤网堵塞的作用^[16]。Teather 的瘤胃模拟系统配备的搅拌电机可以在较大的速度范围内工作,正常工作速度为 $10\sim 12\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,在收集样品前将速度提高到 $100\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 以使罐内食糜充分混合。但密封圈需经常检查更换,以防止密封不严引发漏气现象。另外,磁力搅拌器也被用于为搅拌系统提供动力,Stefan 等的设备就利用安装在发酵罐底部的步进电机带动磁体旋转,进而向安装在发酵罐内的转子提供扭矩力。美国伊利诺大学设计的连续培养装置^[17]以及 Hoover 等^[7]的装置也都使用了磁力搅拌器实现搅拌功能。使用磁力搅拌器不存在漏气的风险,但有可能由于罐内固体物质的积累而造成搅拌轴偏离中心位置,从而影响搅拌效果。还有一些装置采用了气泡搅拌的方式,通常往发酵罐底部通入 CO_2 或 N_2 ,在搅拌的同时实现了维持罐内的乏氧状态,但使用这种方法的装置无法对罐内产气进行收集和分析,因此不提倡使用^[6]。相比之下,以电机带动叶片实现搅拌的方式较为理想,在发酵系统的设计中也最常被采用。

2.2 温度控制系统

温度控制系统为发酵罐内微生物的代谢提供适宜的温度条件,一般维持在 $39.0\sim 39.5\text{ }^\circ\text{C}$ 之间。温度的变化对微生物的发酵活动影响非常明显, $0.5\text{ }^\circ\text{C}$ 的温差即会对发酵结果造成非常显著的影响,因此,有必要对人工瘤胃内温度进行精确控制。

温度控制的方法基本上可以分为 3 类:气浴法、电热管控温法和水浴法。气浴法使用气体作为热能输送媒体,由于气体热容低,能量散失快,恒温效果有限,在持续动态瘤胃发酵系统中很少被采用。日本明治大学 1992 年设计的装置采用电热管控温法,它利用电热管及温度传感器将发酵罐内的温度控制在一定的范围内。但电热管与发酵液接触面积小,要达到预设温度需要提高电热管的功率,容易造成局部温度过热的情况。相比而言,水浴法则是最多被采用的方法。Hoover 等 1976 年设计的连续培养装置使用了一种喷淋的水浴方式^[7]。Slyter 等的连续培养系统利用离心泵将温水池中的水泵入水浴锅中,通过回流管实现水循环^[17]。Teather 等的装置则使用了水浴夹套的形式,在泵水系统的作用下,恒温水从夹套的底部入口进入,并从顶部出口回流,形

成温水循环,这种设计使整个发酵罐被一层温水包裹住,恒温效果好,并且不影响外接设备及溢流口在侧面的安装,整体外形简洁美观^[9]。

总结各种温控方式,利用水浴夹套的方式外观简洁,恒温效果好,并且侧壁有较大的空间可用于安装外接设备,相比而言更为理想。同时,利用温度传感器和控制器之间的数据传输实现温度的反馈调节是一种值得提倡的设计思路。

2.3 pH 调节系统

在瘤胃发酵过程中,pH 是一个重要的发酵参数,正常瘤胃 pH 维持在 6~7 之间。pH 的变化不仅会影响饲料在瘤胃中的降解消化,还会影响微生物的生长^[18-19]。因此,要想实现稳定发酵,系统必须具有调节 pH 的功能。很多连续培养装置都有 pH 调节系统,使 pH 稳定在正常的瘤胃发酵条件下^[8]。日本明治大学的装置使用 2% 的 Na_2CO_3 作为 pH 调节液,由一个常闭电磁阀控制调节液进入发酵罐,通过 pH 计和 pH 控制器的数据流通实现对电磁阀的控制。Teather 和 Stefan 等装置的 pH 调节系统与其基本相同^[9-10]。Stefan 等装置使用计算机软件实现 pH 控制器的功能,而以蠕动泵替代电磁阀用于向罐内定量输送调节液,并且在调节液输入发酵罐后适度提高搅拌速度以使罐内 pH 得到稳定^[10]。有些连续培养系统并没 pH 调节系统,而仅仅依靠缓冲液的缓冲作用来维持罐内 pH 的稳定,但在运行一段时间后,罐内 pH 往往会出现降低的情况,在使用高精料饲料进行发酵试验时,这种情况尤为显著,往往使发酵无法长时间连续进行^[12]。所以,pH 调节系统在增加发酵可利用饲料类型、维持长时间发酵稳定等方面发挥重要作用。

3 样品收集系统

设计人工瘤胃的目的是能实现对瘤胃微生物发酵的实时监测,因此,对发酵样品的采集必不可少。样品收集系统从发酵罐内获取具有代表性的样品,以便能连续、准确地反映微生物发酵的状况,取得试验所需的数据。

3.1 食糜收集系统

食糜收集系统通过对发酵罐内的发酵物进行取样,获得具有代表性的发酵样品,以对整个发酵过程进行检测,获取连续的发酵数据。Rusitec 装置利用一个一侧固定在发酵罐盖子上的倒“U”形管作为溢流通道,“U”形管的一端开口于发酵液面上,由于微

生物发酵产生大量的气体,使得罐内压力较罐外大,在正压力的作用下,液相食糜通过“U”形管排出。Teather 等的装置在发酵罐侧面开有水平溢流管,一个“T”形管被安装在溢流口内侧,管的下端开口于发酵罐底部 1/3 处,而上端开口于顶部的气相层,以防止负压对液体溢流的阻碍^[9]。Stefan 等在研究了 Teather 等的溢流装置后发现,使用水平溢流通道极易引起溢流管的堵塞,特别是在使用高纤维日粮时,这种情况尤为严重,同时出现了溢流液中干物质含量降低的现象^[9-10]。将溢流通道做成斜 45° 很好地解决了溢流孔堵塞的问题,使每天的干物质消失率维持稳定状态^[13]。溢流液排出后,需尽快将其冷却至 4 °C 以下,以停止其中的微生物活动。另外,除了获取液相食糜外,以上 2 种装置均设有取样孔,用于获取混合食糜样品,Teather 装置将取样孔设在罐盖上,而 Stefan 等将其设在了发酵罐侧面靠近罐底的位置^[9-10]。取样在每天早上喂料之前进行,在取样前将搅拌速度提高以使食糜混合均匀。然而,通过取样孔获取样品无法对食糜颗粒大小进行控制,有些尚未得到充分消化的颗粒被取出,这对营养物质消化率的测定结果影响很大。如何解决这一问题尚需进一步研究。

固相食糜的滞留时间和液相稀释率对微生物的数量及发酵影响很大。Hoover 等的研究发现,提高固液相外流速率会引起原虫数量的降低,使乙酸与丙酸的比例下降,同时降低氮的利用效率和菌体合成量^[20-22]。孟庆翔等研究显示,将液相稀释率由 $0.03 \cdot \text{h}^{-1}$ 提高到 $0.06 \cdot \text{h}^{-1}$ 对挥发酸产量及比例没有影响,但发酵液 pH 和每日细菌总量显著提高,原虫数量显著降低^[23]。大量试验均表明,过快的固液稀释率往往导致原虫数量的下降甚至消失,主要原因是原虫的分裂周期长,生长速度慢,对固液稀释率的变化更加敏感。但不同研究报道的结果差异很大,固相食糜的滞留时间从 5~50 h 均有报道,而报道的液相稀释率从 $0.02 \cdot \text{h}^{-1}$ 到 $0.33 \cdot \text{h}^{-1}$ 不等,这与试验人员所使用的发酵装置不同有很大的关系。

另外,为了模拟瘤胃壁对发酵终产物的吸收功能,有些发酵系统安装了透析膜和相应的管道系统,可以将发酵液中的 VFA 移出发酵罐,从而保持发酵系统中 VFA 浓度的稳定。Weller 和 Pilgrim 比较了带有透析装置的人工瘤胃与绵羊瘤胃中的原虫和 VFA 数量,结果显示,该装置可以较好的维持发酵液中原虫的数量和 VFA 的浓度^[24]。

3.2 气体收集系统

发酵产气量和气体的成分可以反映出微生物新陈代谢的状况,因此,对产气量的测量和气体成分分析是必要的。较早的气体收集系统多是用一定的收集装置将发酵产生的气体收集起来,用于测定气体产量和气体成分。Rusitec 装置在食糜收集瓶的瓶塞上安装有集气袋,当收集气体时,通过发酵罐盖子上的通气阀向罐内缓慢通入 CO_2 和 N_2 的混合气体,将罐内的气体压入集气袋。日本明治大学的装置在气体收集系统上与之有相似之处,不过它在食糜收集瓶和集气袋之间安装了 CO_2 吸收瓶,收集到的气体主要是 CH_4 成分^[15]。另外,有些装置还使用集气瓶集气,中国农业大学曾使用排水法测定产气量。以上设计有许多缺点:无法对产气量和气体成分进行连续的监测;需向罐内通入气体以增加罐内压力;需经常更换集气袋或集气瓶。Stefan 等设计的系统没有专门的集气装置,而是使用了一种微量气体流量计,该装置能检测到每秒 0.9 mL 的气体流量,将其与发酵罐内部相通,无需加压,即可实时监测罐内气体的产生情况,而气体成分的测定则是通过与发酵罐相连的 2 个气体探测器完成的^[10]。这套装置较好地解决了对发酵产气的体积和成分测定问题。

4 小结及展望

持续动态瘤胃发酵系统为研究瘤胃发酵提供了一个体外试验平台,是随着对反刍动物营养学研究的不断深入而不断发展起来的。这一技术结合了动物营养学、微生物发酵学、机械设计以及电子传感器等多学科的相关内容,并随着各学科的发展而得到不断的改进。总体来看,设计逐渐向自动化、智能化方向发展,如温度和 pH 的反馈调节、搅拌速度的自动控制以及气体成分的实时监测等功能上,都显示了这一发展趋势。但在食糜样品的收集方面,各种设计所采用的方法都不甚合理,虽然可以在一定程度上控制固液食糜的不同外流速度,但不能很好地获取具有代表性的样品,无法准确地反映发酵状况,因此,未来的设计需在固液食糜的收集方法上做进一步的改进。

参考文献:

[1] 李喜艳,王加启,魏宏阳,等. 瘤胃发酵体外模拟方法及其应用[J]. 中国饲料, 2009, 21:4-7.

- [2] TILLEY J M A, TERRY R A. A two-stage technique for the digestion of forage crops[J]. *J Br Grassl Soc*, 1963, 18:104-111.
- [3] MENKE K H, RAAB L, SALEWSKI A. The estimation of the digestibility and metabolisable energy content of ruminant feeding stuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor [J]. *J Agric Sci*, 1979, 93:217-222.
- [4] 孙菲菲,刘桂芬,孙国强,等. 体外法评定反刍动物饲料营养价值的研究进展[J]. 饲料广角, 2011, 13: 39-42.
- [5] 任莹,赵胜军,唐兴,等. 利用体外产气法评定反刍动物饲料的营养价值[J]. 中国饲料, 2009, 23: 16-19.
- [6] CZERKAWSKI J W, BRECKENRIDGE G. Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec) [J]. *Br J Nutr*, 1977, 38: 371-384.
- [7] HOOVER W H, CROOKER B A, SNIFFEN C J. Effects of differential solid-liquid removal Rates on protozoa numbers in continuous cultures of rumen contents[J]. *J Anim Sci*, 1976, 43:528-534.
- [8] 夏兆刚,孟庆祥. 双外流连续培养系统模拟瘤胃消化[J]. 中国饲料, 2002, 23:27-28.
- [9] TEATHER R M, SAUER F D. A naturally compartmented rumen simulation system for the continuous culture of rumen bacteria and protozoa [J]. *J Dairy Sci*, 1988, 71:666-673.
- [10] STEFAN M, PETER L, HOFFMANN E M, et al. Evaluation of a stratified continuous rumen incubation system [J]. *Anim Feed Sci Technol*, 2009, 151: 32-43.
- [11] 施学仕,韩正康. 瘤胃发酵的体外模拟-人工瘤胃和山羊瘤胃纤毛虫培养中数量和 pH 及 Eh 变化的观察 [J]. 南京农学院学报, 1983, 1:122-126.
- [12] FUCHIGAMI M, SENSU T, HORIGUCHI M. A simple continuous Cultrue system for rumen microbial digestion study and effects of defaunation and dilution rates [J]. *J Dairy Sci*, 1989, 72:3070-3078.
- [13] VATTHAUER R J, HINDS F C, GARRIGUS U S. Continuous *in vitro* culture system for ruminant research I: Design [J]. *J Anim Sci*, 1970, 30:618-623.
- [14] STEFAN M. A fermentation system for rapid and accurate modeling of rumen function [M]. MAF of the New Zealand, 2009.
- [15] 孟庆翔. 双外流连续培养系统用于瘤胃发酵的体外模拟:技术综述[J]. 动物营养学报, 1999, 11:45-50.

- [16] TSUNEO H, MASATOSHI S, KOHJI O. Maintenance of protozoa and methanogens, and fiber digestion rumen-simulating continuous culture[J]. *J Gen Appl Microbiol*, 1993, 39:35-45.
- [17] SLYTER L L, NELSON W O, WOLIN M J. Modifications of a device for maintenance of the rumen microbial population in continuous culture[J]. *Appl Microbiol*, 1964, 12(4):374-377.
- [18] RUSSELL J B, DOMBROWSKI D B. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1980, 39:604-610.
- [19] MOULD F L, ØRSKOV R E. Manipulation of rumen fluid pH and its influence on cellulolysis in sacco, dry matter degradation and the rumen microflora of sheep offered either hay or concentrate[J]. *Anim Feed Sci Technol*, 1983, 10:1-14.
- [20] CALSAMIGLIA S, FERRET A, DEVANT M. Effects of pH and pH fluctuations on microbial fermentation and nutrient flow from a dual-flow continuous culture system [J]. *J Dairy Sci*, 2002, 85: 574-579.
- [21] ABUGHAZALEH A A, RILEY M B, THIES E E, et al. Dilution rate and pH effects on the conversion of oleic acid to trans C18:1 positional isomers in continuous culture [J]. *J Dairy Sci*, 2005, 88: 4334-4341.
- [22] HOOVER W H, CRAWFORD R J Jr, STERN M D. Effects of solids and liquid flows on fermentation in continuous cultures. III. Solids Retention Time[J]. *J Anim Sci*, 1982, 54:849-854.
- [23] 孟庆翔,高仲元, KERLEY M S,等. 稀释率对于活体外瘤胃发酵和微生物生长效率的影响[J]. *动物营养学报*, 1999, 11(1):10-16.
- [24] WELLER R A, PILGRIM A F. Passage of protozoa and volatile fatty acids from the rumen of the sheep and from a continuous *in vitro* fermentation system [J]. *Br J Nutr*, 1974, 32:341-351.

(编辑 郭云雁)