

文章编号:1000-8551(2011)02-0317-08

利用¹⁵N 示踪技术研究尿素在人工瘤胃中的代谢

高占锋^{1 2} 王红云² 付才² 黄志国² 吕林^{1 2}
刘彬¹ 赵广永³ 罗绪刚¹

(1. 中国农业科学院畜牧研究所矿物元素营养研究室, 动物营养学国家重点实验室, 北京 100193;
2. 河北省农林科学院遗传生理研究所, 河北 石家庄 050051; 3. 中国农业大学动物科技学院, 北京 100193)

摘要:通过人工瘤胃短期发酵, 采用 4 × 2 析因完全随机试验设计, 利用¹⁵N 标记尿素代替日粮粗蛋白的 0%、10%、20%、40%, 分别发酵 24 和 48h, 研究日粮不同尿素添加量对瘤胃发酵参数的影响及其在瘤胃中的代谢。结果表明:不同尿素添加量和发酵时间对瘤胃 pH 影响不显著 ($P > 0.05$), 添加尿素处理的瘤胃液氨态氮浓度在发酵 48h 时显著高于发酵 24h; 尿素添加量和发酵时间对颗粒相和液相微生物的含氮量影响不显著 ($P > 0.05$); 瘤胃食糜各相中的尿素氮与日粮尿素添加量呈显著的正线性相关关系 ($P < 0.01$); 瘤胃食糜各组分总氮中尿素氮所占的比例与日粮尿素添加量呈显著的正线性相关关系 ($P < 0.01$); 日粮尿素在瘤胃食糜各组分中的分配数量依次为上清液 (54.88% ~ 73.03%) > 未消化饲料 (27.83% ~ 37.56%) > 液相微生物 (7.99% ~ 10.18%) > 颗粒相微生物 (4.5% ~ 6.17%), 尿素添加量和发酵时间不改变尿素氮在瘤胃食糜的发展趋势。

关键词:¹⁵N 示踪技术; 尿素; 微生物蛋白; 非蛋白氮

METABOLISM OF DIET UREA IN THE RUMEN *in vitro* BY ¹⁵N-TRACER TECHNIQUE

GAO Zhan-feng^{1 2} WANG Hong-yun² FU Cai² HUANG Zhi-guo² LV Lin¹
LIU Bin¹ ZHAO Guang-yong³ LUO Xu-gang¹

(1. Mineral Nutrition Research Division, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences/State Key Laboratory of Animal Nutrition, Beijing 100193;
2. Genetics and Physiology Institute, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang Hebei 050051, China;
3. Academy of Animal Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193)

Abstract: A completely randomized design involving 4 × 2 factorial arrangement of treatments was used to investigate effects of urea in diet (urea replaced diet CP of 0, 10%, 20%, and 40%) and fermentation time (24 and 48h) on rumen fermentation parameters and the metabolism of urea in the rumen *in vitro*. Results showed that different amendments of urea in diets and fermentation time had no significant effect on pH of rumen digesta ($P > 0.05$); the concentration of NH₃-N, however, was increased significantly from 24 to 48h in each treatment ($P < 0.01$). There was significantly positive linear correlations between urea nitrogen in fractions of rumen digesta and the quantity of urea in diets ($P < 0.01$), and between the ratio of urea nitrogen to total nitrogen in fractions of rumen digesta and the quantity of urea in diet. The distribution of diet urea in fractions of rumen digesta followed the order of supernatant fluid (54.88% ~ 73.03%) > undigested feed (27.83% ~ 37.56%) > liquid-associated microbe (7.99% ~ 10.18%) > particle-

收稿日期:2010-05-16 接受日期:2010-11-02

基金项目:河北省自然科学基金(C2006000742)

作者简介:高占锋(1964-),男,河北安国人,副研究员,博士,研究方向为反刍动物营养、同位素示踪。Tel:0311-87652131;E-mail:gzhf1964@163.com

通讯作者:罗绪刚(1963-),男,四川金堂人,研究员,博士生导师,研究方向为矿物元素生化、分子营养。Tel:010-62810184;E-mail:wlysz@263.net

associated microbe(4.50% ~6.17%) The quantity of urea in diets and fermentation time did not affect the trend of the distribution.

Key words: ^{15}N tracer technique; urea; rumen microbial protein; non-protein nitrogen

尿素等一些非蛋白质含氮化合物被称为非蛋白氮 (Non-Protein Nitrogen, NPN), 可为瘤胃微生物蛋白的合成提供所需的氮源。主要的 NPN 有铵盐、尿素及其衍生物。在实际应用中, 尿素价格低廉, 使用最多^[1]。在畜牧业发达国家, 对尿素的研究应用进展较快, 1990 年饲用尿素量已超过 170 万吨, 近些年以较快速度增加^[2]。我国于上世纪 60 年代开始使用尿素, 尿素在动物瘤胃中的分解速度较快易造成氨中毒等问题制约了在我国的应用。随着我国畜牧业的发展, 蛋白质资源短缺的问题日益突出, 充分利用反刍动物的代谢特点, 研究瘤胃微生物利用尿素等 NPN 的机制, 对科学合理利用 NPN 具有重要的指导意义。目前, ^{15}N 标记主要应用于瘤胃微生物标记, 借以研究食糜中不同微生物的流通量, 估算微生物的外流速度, 进而估测微生物的合成量^[3-5]。而利用 ^{15}N 示踪技术研究尿素在瘤

胃中的代谢未见报道。本研究利用 ^{15}N 标记尿素, 通过人工瘤胃短期发酵技术, 研究尿素代替不同比例的日粮粗蛋白对瘤胃发酵参数及其在瘤胃中代谢的影响, 为研究尿素在瘤胃中的代谢规律提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验日粮与试验设计

试验日粮取自河北冀丰动物营养科技有限公司奶牛场, 经粉碎过 40 目 ($\phi 0.42\text{mm}$) 筛^[7], 测定各饲料原料的干物质 (Dry Matter, DM)、粗蛋白 (Crude Protein, CP)、粗灰分 (Crude Ash, CA)、粗脂肪 (Ether Extract, EE)、粗纤维 (Crude Fibre, CF)、中性洗涤纤维 (Neutral Detergent Fibre, NDF)、无氮浸出物 (Nitrogen Free Extract, NFE) 等。日粮营养成分见表 1。

表 1 日粮营养成分

Table 1 The nutrient content of the diets

项目 item	饲养标准 feeding standard	处理 treatment			
		CK	I	II	III
消化能 digestable energy (DE, MJ/kg)	13.00	12.85	12.79	12.73	12.50
粗蛋白 crude protein (CP, %)	14.38	14.37	14.34	14.32	14.31
粗脂肪 EE (%)		3.43	3.34	3.28	3.21
粗纤维 CF (%)		15.99	15.70	15.30	14.79
无氮浸出物 NFE (%)		57.27	58.71	60.12	62.74
中性洗涤纤维 NDF (%)		37.87	38.23	37.97	37.99
Ca (%)	0.31	0.32	0.31	0.33	0.31
P (%)	0.25	0.33	0.29	0.29	0.25
S (%)	0.24	0.23	0.23	0.23	0.23
E-N (g/kgDM)		1.92	-2.68	-7.45	-16.88

注: 每千克日粮中含 V_A 1550IU, V_D 170IU, V_E 20IU, Fe 65mg, Cu 15mg, Mn 32mg, Zn 40mg, Co 0.28mg, I 1.32mg, Se 0.25mg.

Note: Diet contained (per kilogram diet, DM) V_A 1550IU, V_D 170IU, V_E 20IU, Fe 65mg, Cu 15mg, Mn 32mg, Zn 40mg, Co 0.28mg, I 1.32mg, Se 0.25mg.

采用 4×2 析因完全随机试验设计, 试验处理见表 2。4 种 ^{15}N 尿素添加量分别为代替日粮蛋白质的 0%、10%、20%、40%, 日粮编号分别为对照 (CK)、处理 I、处理 II、处理 III (相当于日粮中添加尿素 0%、0.5%、1.0%、2.0%); 2 个发酵时间分别为 24 和 48h。共 8 个处理, 每个处理设 10 个重复, 每个重复为 1 个人工瘤胃体外发酵试管。日粮按 NY/T 816-2004 饲养标准中绵羊体重 35kg、平均日增重 0.2kg 设计, 能氮平衡 (Energy Nitrogen Balance, E-N) 参照《肉牛营养需要

和饲养标准》计算^[6], 精粗比 50:50, 各处理粗蛋白和消化能 (Digestable Energy, DE) 水平接近, 尿素在试验前以溶液形式添加。

1.2 绵羊的饲养与瘤胃液的收集制备

1.2.1 取瘤胃液绵羊的饲养 3 只体重 $35 \pm 2\text{kg}$, 12 月龄, 装有瘤胃瘘管的小尾寒羊饲喂对照组全混合日粮, 共饲喂 10d。试羊日采食量 (DM) 1.2kg, 分别在每日上午 8:00 和下午 6:00 各等量喂 1 次, 自由饮水, 专人管理。

表 2 试验处理设计
Table 2 Design of experimental treatments

项目 item	CK		I		II		III	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
尿素代替日粮蛋白比例 diet CP replaced by urea (%)	0	0	10	10	20	20	40	40
日粮中尿素添加量 (% 干物质) urea in diet (% DM)	0	0	0.5	0.5	1.0	1.0	2.0	2.0

1.2.2 瘤胃液的收集制备 饲喂对照日粮 10d 后,每日上午 8:00 饲喂前,从每只试羊的瘤胃中分别抽取 250ml 瘤胃液,注入同一保温瓶混匀,4 层纱布过滤,过滤后的瘤胃液注入持续通入 CO₂ 的 2L 玻璃瓶中,并保持在 39℃ 水浴中备用^[8]。

1.3 ¹⁵N 标记尿素溶液与缓冲液配制

准确称取 1.500g ¹⁵N 丰度为 30.02% 的标记尿素(上海化工研究院生产),溶于 100ml 超纯水中,配制 15.000mg/ml(0.495mmol N/ml)的标记尿素溶液。

参照 Baumgardt 等^[10]和梁建光^[11]的方法配制缓冲液,配置好的缓冲液溶于 1L 超纯水中,将配制好的缓冲液 5L,置于玻璃瓶内,通入 CO₂ 2min,调 pH 至 6.7,保持在 39℃ 水浴中备用。缓冲液配方如下(g/L): NaHCO₃ 9.80g, NaHCO₃ 9.80g, KCl 0.57g, CaCl₂ 0.04g, Na₂HPO₄ · 7H₂O 7.00g, NaCl 0.47g, MgSO₄ · 7H₂O 0.12g(所用试剂均为分析纯)。

1.4 体外发酵

以 250ml 的三角瓶作为人工瘤胃发酵容器,用精确控温(39℃ ± 0.5℃)的水浴摇床作为控温装置^[9]。

采用短期人工瘤胃发酵技术进行体外发酵。准确称取 1.500g 日粮 DM(包括尿素添加量)于 250ml 三角瓶中,加入人工唾液 100ml,再加入相应体积的¹⁵N 标记尿素溶液和超纯水,为保证试验的一致性,¹⁵N 尿素溶液和超纯水总体积为 2ml,处理 I 为 0.5ml ¹⁵N 尿素溶液 + 超纯水 1.5ml,处理 II 为 1ml ¹⁵N 尿素溶液 + 超纯水 1ml,处理 III 为 2ml ¹⁵N 尿素溶液。通 CO₂ 至饱和,加入瘤胃液 50ml,再通 CO₂ 至饱和,用带有小孔的塑料膜封口,计为 0h,39℃ ± 0.5℃ 恒温水浴,搅拌转速为 22r/min^[7]。每次 4 个处理,每处理 2 个培养瓶,分别在培养后 24 和 48h 取样。共重复 10 次。

1.5 测试样品采集与制备

培养结束后,发酵管在碎冰中冷却。然后于 27000 × g、4℃ 下离心 25min,准确记录上清液体积,并立即测定上清液 pH(4℃),然后取上清液约 50ml 于 -20℃ 保存,用于测定 NH₃ - N、N% 及 ¹⁵N 丰度。沉淀的分离按 Kennedy^[12]、Koenig 等^[13]改进的方法进行。

1.5.1 未消化饲料 上述沉淀加入 40ml 1% 甲醛、0.85% 生理盐水,振荡 30s,冰浴冷却 60min,振荡 30s,220 × g、4℃ 离心 10min。沉淀加入 16ml 超纯水重悬,27000 × g、4℃ 下离心 25min,小心弃掉上清液,沉淀冷冻干燥 48h(-58℃,12Pa),空气中平衡 3d,称重,作为未消化饲料(Undigested Feed, UDF)样品,测定 DM、N%、¹⁵N 丰度。液相部分按 1.5.2 处理。

1.5.2 颗粒相微生物样品 1.5.1 液相部分再 1000 × g、4℃ 离心 10min。沉淀加入 8ml 超纯水重悬,27000 × g、4℃ 下离心 25min,弃掉上清液,沉淀冷冻干燥 48h(-58℃,12Pa),空气中平衡 3d,称重,为颗粒相微生物(Particle-Associated Microbe, PAM)样品,测定 DM、N%、¹⁵N 丰度。再离心后的液相部分按 1.5.3 处理。

1.5.3 液相微生物 1.5.2 中液相部分重新 27000 × g、4℃ 离心 25min。沉淀加入 8ml 超纯水,重悬,27000 × g、4℃ 下离心 25min,弃掉上清液,沉淀冷冻干燥 48h(-58℃,12Pa),空气平衡 3d,称重,作为液相微生物(Liquid-associated microbe, LAM)样品,测定 DM、N%、¹⁵N 丰度。

1.6 测试指标与方法

DM、CP、CA、EE、CF、NDF、NFE 杨胜^[14]的方法进行;pH 采用 PB10 pH 计测定(赛多利斯科学仪器北京有限公司);NH₃ - N:将 SF 解冻,取 10~20ml(约含 N 2mg),采用氧化镁直接蒸馏法测定(KJELTEC SYSTEM 1002 DISTILLING UNIT,TECATOR),按鲁如坤^[15]的方法进行;N%:采用凯氏定氮法,按鲁如坤^[15]的方法进行;¹⁵N 丰度:采用 ZHT-03 质谱计(北京分析仪器厂)进行测定,将凯氏定氮后的滴定液浓缩至含氮约为 1mg/ml,取 1ml 该浓缩液,在真空条件下(5 × 10⁻⁵ Pa)与次溴酸铈反应,将 NH₄⁺ - N 转化为氮气进入质谱计测定 ¹⁵N 丰度,离子源真空度 1 × 10⁻⁷ Pa。

1.7 数据分析

采用 Excel2003 对数据进行整理,利用 SAS 6.12 软件 ANOVA LSD 法对所有试验数据进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 尿素添加量对瘤胃发酵参数及食糜各组分干物质的影响

瘤胃发酵参数是衡量瘤胃发酵状况的重要指标,本试验中瘤胃发酵参数及食糜各组分的干物质含量见表3。

表3 不同处理瘤胃食糜各指标的变化
Table 3 Effect of treatments on indices of ruminal digesta

组分 fraction	处理 treatment	发酵时间 fermentation time			
		24h	48h	SEM	P
pH					
上清液 SF	CK	7.24	7.45	0.09	0.14
	I	7.18	7.23	0.06	0.53
	II	7.11	7.15	0.05	0.46
	III	7.19	7.37	0.10	0.23
	SEM	0.07	0.10		
	P	0.57	0.15		
mg N/100ml					
上清液氨 SF-NH ₃	CK	18.61 ^{aA}	30.79 ^{bA}	0.54	0.00
	I	20.86 ^{aB}	31.92 ^{bB}	0.41	0.00
	II	21.19 ^{aBC}	32.60 ^{bBC}	0.43	0.00
	III	22.29 ^{aC}	32.86 ^{bC}	0.33	0.00
	SEM	0.47	0.26		
	P	0.00	0.00		
DM (mg)					
未消化饲料 UDF	CK	902 ^{aAB}	758 ^b	12.35	0.00
	I	906 ^{aA}	752 ^b	11.52	0.00
	II	878 ^{aC}	722 ^b	7.63	0.00
	III	883 ^{aBC}	755 ^b	15.72	0.00
	SEM	6.96	15.74		
	P	0.02	0.35		
DM (mg)					
颗粒相微生物 PAM	CK	44	51	4.28	0.28
	I	49	41	2.88	0.10
	II	48	46	3.24	0.77
	III	46	38	3.27	0.15
	SEM	2.56	3.66		
	P	0.60	0.09		
DM (mg)					
液相微生物 LAM	CK	111	123	6.69	0.26
	I	111	103	4.48	0.22
	II	119	108	6.00	0.22
	III	117	109	7.96	0.54
	SEM	4.78	7.12		
	P	0.56	0.27		

注: A、B、C(a、b)同列(行)字母不同者差异显著($P < 0.05$), $n = 10$ 。表4同。

Note: Least squares means SEM based on $n = 10$, values in the same column (row) followed by different superscripts A, B, C (a, b) mean significant difference at $P < 0.05$. The same as following Table 4.

2.1.1 尿素添加量对瘤胃食糜 pH 和氨态氮浓度的影响 表3表明,尿素添加量与发酵时间对瘤胃上清液(SF)的 pH 影响均不显著($P > 0.05$),但随发酵时间的延长,各处理 pH 有上升的趋势,其范围在 7.11~7.45 之间。而发酵 24 和 48h 瘤胃上清液液氨(SF-NH₃-N)浓度各处理间差异极显著($P < 0.01$):发酵 24h,各处理间 SF-NH₃-N 浓度均随尿素添加量的提高显著增大,其中对照组为 18.61mgN/100ml,极显著低于处理 I、处理 II 和处理 III 的 20.86、21.19 和 22.29mgN/100ml($P < 0.01$),处理 I 显著低于处理 III ($P < 0.05$),处理 II 和处理 III 间差异不显著($P > 0.05$);发酵 48h 的 SF-NH₃-N 浓度与发酵 24h 时呈现相同的规律,即对照组(30.79mgN/100ml)极显著低于处理 I、处理 II 和处理 III 的 31.92、32.60 和 32.86mgN/100ml($P < 0.01$),处理 I 显著低于处理 III ($P < 0.05$),处理 II 和处理 III 间差异不显著($P > 0.05$)。

2.1.2 尿素添加量对瘤胃食糜各组分干物质的影响

从表3可以看出,各处理发酵 24 和 48h,瘤胃食糜未消化饲料(UDF)的干物质(DM)较对照明显减少;随着发酵时间的延长,各处理的 DM 由发酵 24h 的 878~906mg 减少到发酵 48h 的 722~758mg;不同尿素添加量间发酵 24h 对 UDF 的 DM 有显著影响($P < 0.05$),但发酵 48h 对 UDF 的 DM 影响不显著($P > 0.05$)。瘤胃微生物组分中,颗粒相微生物(PAM)、液相微生物(LAM)的干物质在不同处理、不同发酵时间之间均差异不显著($P > 0.05$),PAM、LAM 总量基本稳定,表明发酵 24h 瘤胃微生物就基本达到最大产量。

综合以上分析,瘤胃发酵 24h 至 48h 间,不同尿素添加量处理间的 pH 差异不显著,但有上升的趋势;SF-NH₃-N 浓度随发酵时间的延长和尿素添加量的增加而显著增加;PAM、LAM 的干物质在 24h 已基本稳定,即 MCP 合成主要在 0~24h,24~48h 日粮的降解不能提高瘤胃微生物的合成量,在日粮发酵 24h 以后,日粮蛋白质降解的总代谢结果是转化为瘤胃液氨浓度的升高。

2.2 尿素添加量对瘤胃食糜各组分含氮量的影响

瘤胃微生物的代谢受发酵条件、发酵环境、日粮组成和物理性状等众多因素的影响,导致微生物内容物组成的变化,从而引起其含氮量的变化。不同尿素添加量和发酵时间对各组分含氮量的影响见表4。

表4结果表明,各处理瘤胃食糜中 UDF 的含氮量随着发酵时间的延长而逐渐降低,其中处理 I 和处理 II 差异显著($P < 0.05$);发酵 24h,各处理 UDF 的含氮

表 4 不同尿素添加量和发酵时间对
各瘤胃食糜各组分 N% 的影响

Table 4 Effect of treatments and fermentation time on
N% of ruminal digesta fractions

组分 fraction	处理 treatment	发酵时间 fermentation time			
		24h	48h	SEM	P
未消化饲料 UDF	CK	4.62 ^A	4.37	0.16	0.28
	I	4.49 ^{aAB}	4.09 ^b	0.10	0.02
	II	4.44 ^{aB}	4.00 ^b	0.11	0.02
	III	4.35 ^B	4.33	0.14	0.94
	SEM	0.06	0.14		
	P	0.02	0.20		
颗粒相微生物 PAM	CK	8.03	8.32	0.28	0.47
	I	8.65 ^a	8.11 ^b	0.17	0.05
	II	8.17	7.94	0.25	0.52
	III	8.32	8.65	0.22	0.32
	SEM	0.22	0.25		
	P	0.251	0.23		
液相微生物 LAM	CK	6.62	6.70	0.09	0.53
	I	6.70	6.64	0.088	0.61
	II	6.49	6.72	0.116	0.21
	III	6.59	6.46	0.269	0.75
	SEM	0.17	0.18		
	P	0.85	0.75		

量随尿素添加量的增加而减少,其中对照组显著高于处理 II 和处理 III ($P < 0.05$),但 3 个不同尿素添加量处理间差异不显著 ($P > 0.05$);发酵 48h,各处理差异均不显著 ($P > 0.05$)。瘤胃食糜中 PAM 和 LAM 的含氮量在相同发酵时间不同处理以及相同处理不同发酵时间差异均不显著 ($P > 0.05$),表明在本试验条件下, PAM 和 LAM 的含氮量比较稳定,不受发酵时间和尿素添加量的影响。

2.3 尿素氮在瘤胃食糜中的分布

瘤胃食糜中各组分的总氮来源于日粮氮和尿素氮,尿素在瘤胃中分解为 NH_3 ,为微生物所利用,因此尿素 N 在瘤胃食糜各组分的分布反映了尿素的代谢去向。其分布主要有 4 种(表 4):存在于 SF 中的 $\text{NH}_3\text{-N}$ 和微生物吸收尿素氮后裂解的含氮产物(SF-Urea-N);PAM 吸收的尿素氮(PAM-Urea-N);LAM 吸收的尿素氮(LAM-Urea-N);附着于 UDF 中微生物吸收的尿素氮(UDF-Urea-N)。瘤胃食糜中不同组分尿素氮含量的变化反映了各组分吸收尿素氮的总量变化,而各组分尿素氮/总尿素氮的变化反映了添加的尿素氮在各组分中的分配程度。

表 5 尿素 N 在瘤胃各组分中的分布

Table 5 The distribution of urea-N in ruminal digesta fractions

组分 fraction	处理 treatment	尿素 nrea-N (nmol)				尿素 N/总尿素 N urea N/total urea N (mol/mol)			
		24h	48h	SEM	P	24h	48h	SEM	P
上清液尿素氮 SF-Urea-N	I	139 ^{aA}	181 ^{bA}	2.98	0.00	56.17 ^a	73.03 ^{bA}	1.21	0.00
	II	271 ^{aB}	342 ^{bB}	4.01	0.00	54.88 ^a	69.17 ^{bB}	0.81	0.00
	III	579 ^{aC}	693 ^{bC}	8.57	0.00	58.48 ^a	70.10 ^{bAB}	0.87	0.00
	SEM	13.92	11.96			1.05	0.99		
	P	0.00	0.00			0.07	0.03		
颗粒相微生物尿素氮 PAM-Urea-N	I	15 ^{aA}	12 ^{bA}	0.87	0.03	6.17 ^{aA}	4.91 ^b	0.35	0.03
	II	27 ^B	24 ^B	1.51	0.22	5.45 ^{AB}	4.87	0.31	0.22
	III	48 ^C	44 ^C	4.59	0.56	4.90 ^B	4.50	0.46	0.56
	SEM	2.61	3.46			0.32	0.50		
	P	0.00	0.00			0.04	0.82		
液相微生物尿素氮 LAM-Urea-N	I	24 ^A	24 ^A	1.59	0.80	9.88	9.65	0.64	0.80
	II	49 ^B	50 ^B	1.65	0.51	9.86	10.18	0.33	0.51
	III	88 ^C	79 ^C	7.13	0.42	8.85	7.99	0.72	0.42
	SEM	2.60	5.73			0.48	0.70		
	P	0.00	0.00			0.25	0.10		
未消化饲料尿素氮 UDF-Urea-N	I	93 ^A	87 ^A	4.46	0.35	37.56	35.02	1.80	0.35
	II	171 ^{aB}	138 ^{bA}	7.55	0.01	34.53 ^a	27.83 ^b	1.53	0.01
	III	328 ^C	336 ^B	26.88	0.84	33.17	33.95	2.72	0.84
	SEM	6.47	19.61			1.17	2.67		
	P	0.00	0.00			0.05	0.15		

注:A、B、C(a、b) 同列(行)字母不同者差异显著($P < 0.05$), $n = 10$ 。表 6 同。

Note: Least squares means SEM based on $n = 10$, values in the same column (row) followed by different superscripts A, B, C (a, b) mean significant difference at $P < 0.05$. The same as following Table 6.

2.3.1 瘤胃食糜中不同组分尿素氮含量的变化 表 5 表明,发酵 24h 与 48h 相比,不同尿素添加量处理的 SF-Urea-N 均随发酵时间的延长而增加,且各处理间差异达极显著水平 ($P < 0.01$); PAM-Urea-N 随发酵时间的延长而减少,其中处理 I 在不同发酵时间差异显著 ($P < 0.05$); 发酵时间对不同尿素添加量处理的 LAM-Urea-N 影响均不显著 ($P > 0.05$); 发酵时间对处理 I 和处理 III 的 UDF-Urea-N 影响不显著 ($P > 0.05$),但对

处理 II 有显著影响 ($P < 0.05$)。

相同发酵时间, SF-Urea-N、PAM-Urea-N、LAM-Urea-N、UDF-Urea-N 均随尿素添加量的增加显著增加,各处理间呈显著水平 ($P < 0.05$)。对各组分中尿素氮与尿素添加量进行回归,结果显示呈极显著的线性正相关关系 ($P < 0.01$), R^2 在 0.547 ~ 0.951 之间 (表 6)。表明瘤胃食糜各组分中尿素氮随日粮尿素添加水平的增加而线性增加。

表 6 瘤胃食糜各组分尿素氮与尿素添加量的回归方程

Table 6 The regression equation for urea-N in ruminal digesta fractions to urea applied

组分 fraction	24h	R ²	P	48h	R ²	P
上清液尿素氮 SF-Urea-N	$Y = 14.75x - 14.62$	0.895	0.000	$Y = 17.16x + 4.95$	0.945	0.000
颗粒相微生物尿素氮 PAM-Urea-N	$Y = 1.10x + 4.52$	0.655	0.000	$Y = 1.07x + 1.95$	0.547	0.000
液相微生物尿素氮 LAM-Urea-N	$Y = 2.08x + 5.05$	0.887	0.000	$Y = 1.78x + 9.52$	0.554	0.000
未消化饲料尿素氮 UDF-Urea-N	$Y = 7.85x + 14.23$	0.951	0.000	$Y = 8.54x - 12.46$	0.739	0.000

注:简单线性回归 x : 尿素 N 代替日粮 N 的百分数; Y : 某组分中来源于尿素 N 的 nmol 数 $n = 10$ 。

Note: Simple linear regression, x : represents the percentage of replaced diet N by urea N; Y : represents the nmol of N in the fractions derived from urea, $n = 10$

2.3.2 瘤胃食糜各组分中尿素氮/总尿素氮的变化 从表 5 看出,与发酵 24h 相比,发酵 48h,各处理 SF-Urea-N/总尿素氮显著提高,差异达显著水平 ($P < 0.05$)。各处理由 24h 的 54.88% ~ 58.48% 提高到 48h 的 69.17% ~ 73.03%; PAM-Urea-N/总尿素氮随发酵时间的延长逐渐降低,其中处理 I 在不同发酵时间差异显著 ($P > 0.05$),各处理由 24h 的 4.90% ~ 6.17% 降低到 48h 的 4.50% ~ 4.91%; 发酵时间对各处理 LAM-Urea-N/总尿素氮的影响不显著 ($P > 0.05$); 不同发酵时间对 UDF-Urea-N/总尿素氮的影响在处理 I 和处理 III 中差异不显著 ($P > 0.05$),处理 II 差异显著 ($P < 0.05$)。

发酵 24h, PAM-Urea-N/总尿素氮、LAM-Urea-N/总尿素氮、UDF-Urea-N/总尿素氮均随尿素添加量的增加而降低,其中 PAM-Urea-N/总尿素氮差异显著 ($P < 0.05$), SF-Urea-N/总尿素氮差异不显著。发酵 48h,各处理间 PAM-Urea-N/总尿素氮、LAM-Urea-N/总尿素氮、UDF-Urea-N/总尿素氮差异不显著 ($P > 0.05$), SF-Urea-N/总尿素氮差异显著 ($P < 0.05$)。无论发酵 24h 或 48h,尿素氮在瘤胃食糜各组分中的分配比例均呈现 SF > UDF > LAM > PAM 的规律,超过 50% 以上的尿素氮分布于 SF 中;在微生物组分中,分布于 UDF 的比例最高,达 27.83% ~ 37.56%,其次为

LAM, 为 7.99% ~ 10.18%, PAM 最低,仅为 4.50% ~ 6.17%,表明尿素合成的微生物蛋白大部分粘附于未消化饲料中。

3 讨论

3.1 不同尿素添加量和发酵时间对瘤胃 pH 的影响

瘤胃液 pH 与日粮组成、动物采食等密切相关。反刍动物采食期间瘤胃液 pH 呈现高-低-高的波动变化,这种变化稳定在适当的范围内,一般为 5.0 ~ 7.8^[16]。对于体外培养,由于代谢产物的积累影响发酵,多数研究在 24h 内进行,其 pH 取决于酸碱代谢产物的相对水平。由于日粮组成的影响,不同研究方法、不同日粮瘤胃液 pH 差异较大。本试验仅对瘤胃液发酵 24 和 48h 两个时间点进行了研究,以添加不同尿素量(0、0.5、1.0 和 2.0)代替日粮 CP 的 0、10%、20%、40% 瘤胃液 pH 范围为 7.11 ~ 7.45,尿素添加量及发酵时间对瘤胃液 pH 无显著影响,与姜丽平^[17]在反刍动物体内研究结果为 6.8 ~ 7.5 相近。赵国琦等^[7]利用人工瘤胃体外发酵研究不同精粗比日粮对羊瘤胃液影响的结果表明:在 24h 内,采食不同日粮的瘤胃液 pH 由 0h 的 6.70 ~ 6.74 降至 24h 的 5.61 ~ 5.89,而且在 8h 内下降最快,但未出现最低点,与本研究有差异;

Stokes 等^[18]利用奶牛进行的研究中,采食后 12h,采食 3 种日粮的瘤胃液 pH 分别为 5.9、6.6、6.3,采食后 6h 的 pH 最低。因此,本研究与上述结果的差异可能与日粮组成有关,但这种差异仍在正常范围值内。另外,本研究的发酵时间为 24h 和 48h,属发酵后期,因此瘤胃液 pH 较一般水平略高。

3.2 不同尿素添加量和发酵时间对瘤胃 NH₃-N 浓度的影响

反刍动物由于其特殊的消化系统,可以利用 NPN 代替部分日粮蛋白质,一般的 NPN 在瘤胃的降解速度快,采食后瘤胃液 NH₃ 浓度 2~4h 达到高峰^[19-21]。在低氮日粮条件下,反刍动物依靠尿素循环节约氮的消耗,保证瘤胃内适宜的 NH₃ 浓度,以利于微生物合成蛋白质^[22]。Chizzotti 等^[1]的研究表明:日粮 NPN (尿素+硫酸铵)代替日粮蛋白(CP 12.5% DM)的 46.5% 时不影响肉牛的生产性能和瘤胃微生物合成。

本试验根据瘤胃饲料能量和氮源平衡,在日粮中添加 0~2% DM (代替日粮粗蛋白的 0~40%) 的尿素,同一发酵时间,各处理瘤胃液 NH₃ 浓度差异不显著,表明尿素水平对 24h 或 48h 的瘤胃液 NH₃ 浓度影响不显著。辛杭书^[23]利用体外发酵的研究表明,尿素、包被尿素和大豆分离蛋白作为氮源,发酵 0~24h 内 NH₃ 浓度变化较大,而 24h 时基本一致,表明发酵 24h 后,瘤胃 NH₃ 浓度主要受发酵时间的影响。本试验各处理的瘤胃液 NH₃ 浓度 48h 时为 30.792~32.863mg/100ml,显著高于 24h 时的 18.608~22.292mg/100ml ($P < 0.01$)。颗粒相微生物(PAM)和液相微生物(LAM)的 DM 和 N% 无显著变化,而未消化饲料(UDF)的 DM 和 N% 显著减少,表明 24~48h 微生物的分解大于合成代谢,导致瘤胃液 48h NH₃ 浓度显著提高。因此,体外培养有效的发酵时间应在 24h 以内,与冯仰廉^[24]、赵国琦等^[7]的结论一致。

关于瘤胃液 NH₃ 浓度的变化范围,不同研究结果差异较大,Stokes 等^[18]利用奶牛进行的 3 种日粮研究中,瘤胃液 NH₃ 浓度在 48h 内的平均值为 8.0~21.2mg/100ml,最高 27mg/100ml;张桂国^[25]在日粮中添加 1% 尿素时瘤胃氨氮浓度平均 5.21mg/100ml,而张曦^[21]在对绒山羊饲喂不同尿素日粮的研究中发现,各处理的 NH₃ 浓度变化范围为 5~22.89mg/100ml。McAllan 等^[26]总结他人的资料认为 NH₃ 浓度低于 7mmol/L 时,MN/RDN 最大,而当 NH₃ 浓度高于 20mmol/L 时,MN/RDN 最低;陈喜斌等^[20]利用体内法研究表明,瘤胃氨浓度与 MN/RDN 呈曲线负相关。由

于本试验为人工瘤胃体外发酵 24h 与上述结果接近,而发酵 48h,由于在发酵后期不存在瘤胃的吸收,故导致氨的积累,高于上述结果。

3.3 不同尿素添加量和发酵时间对瘤胃微生物含氮量的影响

瘤胃微生物的分离一般利用差速离心进行分离。Storm 等^[27]对相关研究进行了总结,瘤胃原虫和细菌的 N 含量平均为 6.36% 和 7.77%;Stokes 等^[18]采用 3 种日粮进行的研究中,瘤胃内容物原虫和细菌的含氮量(% OM)分别为:4.78%~6.44%、8.01%~8.87%;Martin 等(1994)研究了两种日粮对奶牛瘤胃内容物的影响,其 LAP (Liquid-Associated Protozoa)、LAB (Liquid-Associated Bacteria) 和 PAB (Particle-Associated Bacteria) 的含氮量(% OM)分别为:4.7%~5.5%、8.5%~9.1%、7.5%~8.4%;史清河^[28]对绵羊瘤胃微生物的分析结果为液相和固相微生物的平均含氮量为 8.82% DM 和 7.33% DM,有的报道瘤胃细菌含氮量约占 DM 的 4.8%~10.6%,原虫约占 DM 的 3.8%~7.8%^[29],上述结果大多数采集的是体内微生物样本,总的趋势是细菌的含氮量高于原虫的含氮量,一般认为是由于原虫吞噬饲料颗粒导致其含氮量下降。赵国琦等^[7]利用体外培养测得的细菌含氮量为 5.83%~6.29%,本试验研究结果为 PAM 和 LAM 的 N% 分别为 7.940%~8.649% 和 6.461%~6.704%,尿素添加量和培养时间对其含氮量影响不显著,表明在本试验条件下,PAM 和 LAM 的含氮量基本稳定。尽管含氮量范围与上述研究结果相近,但 PAM 含氮量高于 LAM,却与上述研究结果相反,推测可能与微生物的分离方法和饲料微小颗粒干扰有关。

3.4 不同尿素添加量和发酵时间对尿素在瘤胃食糜中分配的影响

目前,瘤胃微生物的分离主要利用差速离心进行^[30,31],关于尿素在瘤胃食糜中分配的研究未见报道。本试验利用¹⁵N 标记技术和差速离心方法将瘤胃食糜分离为 SF、UDF、PAM 和 LAM,研究了不同尿素添加量和发酵时间对尿素在瘤胃食糜中分配的影响。从本结果看,不同发酵时间瘤胃食糜各组分的尿素氮均随日粮尿素添加量的增加而增加,并呈显著的线性关系。由于尿素在瘤胃中很快分解为 NH₃,日粮尿素实质上是以氨的形式为瘤胃微生物所利用,因此,瘤胃微生物在生长增值过程中所利用的氨与日粮氨含量呈线性关系。

从尿素在瘤胃各组分的分配看,尽管不同尿素添加量和不同发酵时间对其有一定影响,但均不改变其

分配比例的趋势,在微生物组分中,分布于未消化饲料的比例最高,即大部分的微生物尚未得到分离,与 Dehority^[32]的结果一致。

4 结论

本试验条件下瘤胃发酵正常,不同尿素添加量和发酵时间对瘤胃液 pH 影响不显著 ($P > 0.05$),各处理 SF-NH₃-N 的浓度随发酵时间的延长和尿素添加量的增加显著提高 ($P < 0.01$),由发酵 24h 时的 18.61 ~ 22.29mgN/100ml 提高到发酵 48h 时的 30.79 ~ 32.86mgN/100ml;瘤胃食糜 PAM、LAM 的干物质在 24h 已基本稳定,日粮降解和 MCP 合成主要在 0 ~ 24h 24 ~ 48h 日粮的降解伴随瘤胃液 NH₃-N 浓度的提高,主要是日粮氮素的无效循环。

尿素添加处理和发酵时间对 PAM、LAM 含氮量的影响不显著 ($P > 0.05$),分别为 7.940% ~ 8.649%, 6.641% ~ 6.704%;发酵 24h 和 48h,瘤胃食糜不同组分中尿素 N 总量与日粮尿素添加水平呈线性正相关关系;日粮尿素在瘤胃食糜各组分中的分配数量依次为上清液 > 未消化饲料 > 液相微生物 > 颗粒相微生物 (SF-Urea-N > UDF-Urea-N > LAM-Urea-N > PAM-Urea-N);尿素合成的微生物大部分粘附于未消化饲料。

参考文献:

[1] Chizzotti H M, Pereira O G, Tedeschi L O, Valadares F S C, Chizzotti M L, Leão M I, Pereira D H. Characteristics, and microbial efficiency in crossbred steers Effects of dietary nonprotein nitrogen on performance, digestibility, ruminal [J]. Journal of Animal Science, 2008, 86(5): 1173 - 1181

[2] 李华慧. 高效尿素添加剂的研究与应用 [J]. 中国畜牧兽医, 2007 34(2):17 - 20

[3] 赵广永,冯仰廉. PEG 和 Cr-EDTA 作为绵羊瘤胃液相标记物的比较研究 [J]. 动物营养学报, 1997 9(2):30 - 34

[4] Ouellet D R, Demers M, Zuur G, Lobley G E, Seoane J R. Effect of dietary fiber on endogenous nitrogen flows in lactating dairy cows [J]. Journal of Dairy Science, 2002, 85(11): 3013 - 3025

[5] Gonzalez-Ronquillo M, Balcells J, Guada J A, Vicente F. Purine derivative excretion in dairy cows: Endogenous excretion and the effect of exogenous nucleic acid supply [J]. Journal of Dairy Science, 2003, 86(4): 1282 - 1291

[6] 冯仰廉主编. 肉牛营养需要和饲养标准 [M]. 北京:中国农业大学出版社, 2000

[7] 赵国琦,丁健,孙龙生,张艳云,刘大林,贾亚红,陈小连. 体外试验中不同粗精比对山羊瘤胃细菌氨态氮利用效率的影响 [J]. 畜牧兽医学报, 2004 35(6):640 - 64

[8] Ward J D, Spears J W. Comparison of copper lysine and copper sulfate as copper sources for ruminants using in vitro methods [J]. Journal of Dairy Science, 1993, 76(10):2994 - 2998

[9] 赵广永,冯仰廉. 反刍动物灌注营养技术原理与应用 [J]. 动物营养学报, 1996 8(4):1 - 5

[10] Baumgardt B R, Taylor M W, Cason J L. Evaluation of forages in the laboratory. II. Simplified artificial rumen procedure for obtaining repeatable estimates of forage nutritive value [J]. Journal of Dairy Science, 1962, 45(1): 62 - 68

[11] 梁建光. 有机锌源的化学特性及其对奶牛的生物学活性和作用机理研究 [D]. 中国农业科学院研究生论文, 2006

[12] Kennedy D W, Craig W M, Southern L L. Ruminal distribution of zinc in steers fed a polysaccharide - zinc complex or zinc oxide [J]. Journal of Animal Science, 1993, 71(5):1281 - 1287

[13] Koenig K M, Newbold C J, McIntosh F M, Rode L M. Effects of protozoa on bacterial nitrogen recycling in the rumen [J]. Journal of Animal Science, 2000, 78(9): 2431 - 2445

[14] 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, 1993:16 - 63

[15] 鲁如坤主编. 土壤农业化学分析方法 [M]. 北京:中国农业科技出版社, 2000:147

[16] 韩正康,沈延法,楼震生,王贤纯,余品良. 羊长久性双筒 T 形瘘管及其安装的手术方法 [J]. 南京农业大学学报, 1988, 11(3): 131 - 132

[17] 娄丽平. 不同氮源对绵羊氮代谢和瘤胃发酵的影响 [D]. 东北农业大学研究生论文, 2007

[18] Stokes S R, Hoover W H, Miller T K, Blauweikel R. Ruminal digestion and microbial utilization of diets varying in type of carbohydrate and protein [J]. Journal of Dairy Science, 1991, 74(3): 871 - 881

[19] 朱丽华,冯仰廉,莫放,杨雅芳. 不同非蛋白氮在牛瘤胃中氨释放规律 [J]. 中国奶牛, 1995(6):19 - 20

[20] 陈喜斌,冯仰廉. 糊化淀粉对尿素的缓释效果的研究 [J]. 饲料博览, 1995 3:5 - 7

[21] 张曦. 不同硫水平日粮对辽宁绒山羊生绒期消化代谢及产绒性能的影响 [D]. 沈阳农业大学研究生论文, 2009

[22] 徐作明,夏科,郝伟斌. 反刍动物非蛋白氮研究进展 [J]. 养殖与饲料, 2009, (3):59 - 61

[23] 辛杭书. 包被尿素与蒸汽压片玉米组合对活体外瘤胃氨氮释放和发酵参数的影响 [J]. 中国农业大学学报, 2007, 12(3):41 - 45

[24] 冯仰廉主编. 反刍动物营养学 [M]. 北京:科学出版社, 2004

[25] 张桂国. 不同 NPN 水平下肉牛硫需要量及营养物质代谢规律的研究 [D]. 山东农业大学研究生论文, 2003

[26] McAllan A B, Lewis P E, Griffith E S. The effects of frequency of feeding on some quantitative aspects of digestion in the rumens of growing steers [J]. Arch Tierernahr, 1987, 37(9):791 - 803

[27] Storm E, Orskov E R. The nutritive value of rumen microorganisms in ruminants. 1. Large - scale isolation and chemical composition of rumen microorganisms [J]. British Journal of Nutrition, 1983, 50(2): 463 - 470

[28] 史清河. 奶牛氨基酸营养与乳蛋白含量和产量的关系 [J]. 中国饲料, 2000 8:16 - 18

[29] 许曾曾. 白质饲料种类和添加不同水平对活体外瘤胃发酵和微生物氨基酸组成的影响 [D]. 中国农业大学研究生论文, 2004

[30] Craig W M, Broderick G A, Ricker D B. Quantitation of ruminal microorganisms associated with the particulate phase of ruminal ingesta [J]. Journal of Nutrition, 1987, 117(1):56 - 62

[31] Martin C, Williams A G, Michalet - Doreau B. Isolation and characteristics of the protozoal and bacterial fractions from bovine ruminal contents [J]. Journal of Animal Science, 1994, 72(11): 2962 - 2968

[32] Dehority B A, Grubb J A. Effect of short - term chilling of rumen contents on viable bacterial numbers [J]. Application of Environmental Microbiology, 1980, 39(2):376 - 381

(责任编辑 邱爱枝)