

应用¹⁵N 和嘌呤估测肉羊微生物 N 产量的研究

马涛¹, 刁其玉^{1*}, 邓凯东², 姜成钢¹, 屠焰¹, 张乃锋¹, 王永超¹, 刘洁¹, 赵一广¹

(1. 中国农业科学院饲料研究所 农业部饲料生物技术重点实验室, 北京 100081;

2. 金陵科技学院动物科学与技术学院, 南京 210038)

摘要: 本试验通过比较 2 种微生物标记物¹⁵N 和嘌呤(Purine bases, PB)估测肉羊瘤胃微生物 N 产量的效果, 旨在建立不同方法之间的内在联系, 为准确地估测肉羊微生物 N 提供依据。试验选用 12 只平均体质量为(41.3±2.8) kg 的杜寒杂交(杜泊羊×小尾寒羊杂交)绵羊公羔, 随机均分为 3 组, 按照自由采食、自由采食量的 70% 和 40% 3 个干物质采食水平饲喂, 试验共持续 25 d, 其中预试期 10 d, 正试期 15 d, 最后 5 d 采集瘤胃食糜和十二指肠食糜并测定¹⁵N 和 PB。结果表明, 瘤胃细菌成分(氮含量、嘌呤含量和嘌呤/氮)不受日粮处理的影响($P>0.05$); 十二指肠干物质、有机物、非氨氮和嘌呤流量均随日粮饲喂水平的降低显著下降($P<0.05$); 应用¹⁵N 和 PB 计算得到的微生物 N 产量均随日粮饲喂水平的降低而显著降低($P<0.05$), 计算得出的微生物合成效率则均不受日粮处理的显著影响($P>0.05$)。¹⁵N 测定的微生物 N 在各处理内的变异性要小于 PB 测定得到的微生物 N, 因此应用¹⁵N 来测定微生物 N 能够得到更为准确可靠的结果。

关键词: 肉羊; ¹⁵N; 嘌呤; 微生物 N

中图分类号: S826.92; S815.4

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)12-1910-07

Study on Microbial N Yield Measured with ¹⁵N and Purine Bases in Mutton Sheep

MA Tao¹, DIAO Qi-yu^{1*}, DENG Kai-dong², JIANG Cheng-gang¹, TU Yan¹,
ZHANG Nai-feng¹, WANG Yong-chao¹, LIU Jie¹, ZHAO Yi-guang¹

(1. Key Laboratory of Feed Biotechnology of Ministry of Agriculture, Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; 2. College of Animal Science and Technology, Jinling Institute of Technology, Nanjing 210038, China)

Abstract: Two different microbial markers, ¹⁵N and purine bases(PB), were used in this experiment with the purpose to establish the relationship between the two methods and provide a precise way for measuring microbial N yield in mutton sheep. Twelve Dorper (Small-tailed Han crossbreds, noncastrated male lambs ((41.3±2.8) kg BW) were randomly assigned to three levels of dry matter intake: *ad libitum* intake, 70% or 40% of the *ad libitum* intake, with four lambs at each level. The experiment lasted for 25 d (10 d for adaptation and 15 d for trial period). The ruminal bacterial components (N, purine bases and purine bases/N) were not affected by dietary treatment ($P>0.05$). Duodenal flows of dry matter, organic matter, non-ammonia nitrogen and PB decreased significantly with decrease of feed intake ($P<0.05$). Microbial N yield measured with either ¹⁵N or PB decreased significantly with decrease of feed intake ($P<0.05$) whereas the efficiency of microbial synthesis was not affected by dietary treatment for both markers ($P>0.05$). The result indicate that microbial N measured with ¹⁵N showed a smaller within-treatment variation than that measured with PB, and thus ¹⁵N can be a reliable marker for accu-

收稿日期: 2012-03-05

基金项目: 国家现代农业肉羊产业技术体系专项资金(CARS-39); 公益性行业科研专项“饲料营养价值与畜牧饲养标准研究与应用”(200903006-03)

作者简介: 马涛(1987-), 男, 山东青岛人, 博士生, 主要从事动物营养与饲料方面研究, E-mail: nemesisematao@yahoo.com.cn

* 通讯作者: 刁其玉, 教授, 博导, E-mail: diaoqiuyu@mail.caas.net.cn

rately quantifying microbial N.

Key words: mutton sheep; ¹⁵N; purine bases; microbial N

反刍动物的蛋白质营养需要通常采用小肠可消化蛋白质体系(MP)来评价,该体系将进入反刍动物小肠的微生物蛋白质剖分为日粮非降解蛋白质(UDP)和瘤胃微生物蛋白质(MCP)2大部分^[1]。在正常饲喂条件下,MCP是反刍动物主要的蛋白质来源^[2],占进入小肠的蛋白质比例为40%~80%^[3],因此定量微生物N具有重要意义。定量微生物N需要标记物,标记物分为外源标记物和内源标记物2大类^[4],外源标记物主要包括放射性或稳定性同位素,而内源标记物则是微生物固有的物质,包括核酸和嘌呤等^[5]。目前,国内外研究中常用的外源和内源标记物分别是¹⁵N和嘌呤(Purine bases, PB),其中¹⁵N是一种稳定性同位素,能够对瘤胃微生物N进行标记,其优点在于测定结果平行性较好且对环境没有污染;而PB是微生物核酸的固有成分,通过测定微生物PB含量以及微生物PB和N的比例,便可计算出微生物N产量,应用该标记物进行测定的操作过程简单易行,且对试验条件要求不高,因此在大多数实验室都能进行测定。

本研究分别应用¹⁵N和PB这2种标记物对肉羊不同采食水平下的微生物N产量进行测定,并对测定结果进行比较,旨在建立不同方法之间的内在联系,为更准确地测定肉羊微生物N产量提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及日粮

本试验选用6月龄体况健康,平均体质量为(41.3±2.8)kg的杜寒杂交绵羊公羔12只,按照自由采食(AL)、自由采食量的70%(70%AL)和自由采食量的40%(40%AL)3个干物质采食水平饲喂。试验日粮为一种全混颗粒饲料,日粮成分见表1,另外需要制备一部分标记饲料,制备过程如下:在制粒前将约300g YbCl₃·6H₂O、1.3kg Li-Co-ED-TA^[6]和200g (¹⁵NH₄)₂SO₄(¹⁵N丰度为10%)溶于6L蒸馏水,与300kg日粮充分混匀后制粒,其中Yb和Co分别作为十二指肠固相、液相标记物。

1.2 试验设计与饲养管理

试验采用单因子试验设计,将12只公羔随机分为3组,每个组4只羊,每只羊为1个重复。试验共持续25d,其中预试期10d,饲喂未标记饲料使每组

羊只适应日粮梯度;正试期15d饲喂标记饲料,并在最后5d采集瘤胃和十二指肠食糜以测定¹⁵N和PB。预试期确定“自由采食量”,以AL组中羊只最低的干物质采食量定为“自由采食量”,从而确定70%AL和40%AL组的干物质采食量。试验羊只单笼饲养,每天08:00饲喂1次,自由饮水。

1.3 指标测定与方法

1.3.1 样品采集与处理 预试期第5天每只羊采集十二指肠食糜100mL,置于-20℃冰箱保存,以备测定¹⁵N天然丰度。

采食正试期第1~3天每隔6h采集1次十二指肠食糜,次日提前2h采集当日的样品,每次采集食糜100mL,具体采样时间点为:第1天08:00、14:00和20:00;第2天02:00、06:00、12:00、18:00和24:00;第3天04:00、10:00、16:00和22:00。每个时间点的十二指肠食糜采完后按羊只分别混合,共计12个样品,每个样品1200mL,将其中800mL于1000g离心15min(4℃),以分别获得十二指肠液相和固相食糜,将每只羊分离后的液相、固相和剩余400mL十二指肠食糜置于-20℃冰箱保存。

正试期第4和第5天每隔6h采集1次瘤胃食糜,次日提前3h采集当日的样品,每次采集250mL,具体采样时间点为:第4天08:00、14:00和20:00;第5天02:00、05:00、11:00、17:00和23:00。每个时间点的瘤胃食糜采完后,将其与等体积的生理盐水混合并置于搅拌机中搅拌1min(20000r·min⁻¹)以分离附着于固相食糜上的细菌,搅拌液于4层纱布上过滤,将滤液首先于1000g下离心10min(4℃),之后将上清液于20000g下离心45min(4℃),从而得到细菌颗粒,将每个时间点的细菌颗粒按羊只分别混合,共计12个样品,置于-20℃冰箱保存。

1.3.2 测定项目及方法 日粮、十二指肠食糜(液相和固相)以及瘤胃细菌干物质、灰分和粗蛋白质测定采用常规方法^[7]。十二指肠食糜(液相和固相)以及瘤胃细菌中的嘌呤采用Zinn和Owens的方法^[8]进行测定。日粮、十二指肠食糜(未固液分离部分)以及瘤胃细菌中的¹⁵N采用同位素质谱仪进行测定。十二指肠食糜(液相和固相)中的Yb和Co采用原子吸收光谱仪进行测定。

1.4 计算及数据处理

十二指肠食糜流量在测定 Yb 和 Co 含量的基础上通过重组食糜的方法^[9]进行计算,计算公式为: $x = \text{固相食糜质量}(D); y = \text{液相食糜质量}(F); x - y$ 或 $x + y = \text{真正食糜质量}(TD); S_D, S_F, S_{TD} = \text{液相标记物 Co 的浓度}; P_D, P_F, P_{TD} = \text{固相标记物 Yb 的浓度};$ 则, $x \times S_D + y \times S_F = x \times P_D + y \times P_F$; 因此, $y/x = (P_D - S_D)/(S_F - P_F) = R$ 。

其中 R 为重组因子,即重组食糜时需要从单位食糜中加上或减去的液体的单位数量。从而, $(S_D + R \times S_F)/(1 + R) = S_{TD} = (P_D + R \times P_F)/(1 + R) = P_{TD}$; 食糜流量 $= 1/S_{TD} = 1/P_{TD}$ 。

应用¹⁵N 测定瘤胃 MN 的计算公式如下^[10]:

$$MN/NAN_{\text{digesta}} = (E - NAN_{\text{digesta}})/(E - N_{\text{bacteria}}),$$

其中, NAN_{digesta} 为十二指肠非氨氮含量, $(E - NAN_{\text{digesta}})$ 和 $(E - N_{\text{bacteria}})$ 分别为十二指肠非氨氮和瘤胃细菌氮中的¹⁵N 超过自然丰度的部分,因为十二指肠食糜和瘤胃细菌¹⁵N 自然丰度非常接近^[11],因此本试验只采集十二指肠食糜并测定¹⁵N 自然丰度。

数据统计分析采用 SAS 软件的单因素方差分析(One-way ANOVA)进行显著性检验,并采用邓肯氏法进行多重比较。试验结果以“平均数±标准差”表示。

2 结果

2.1 瘤胃细菌、十二指肠食糜¹⁵N 丰度和瘤胃细菌成分

由表 2 可以看出,十二指肠食糜¹⁵N 天然丰度基本稳定在 0.363%,而瘤胃细菌和十二指肠食糜¹⁵N 富集度随采食水平的降低呈下降趋势,其中 AL 和 70% AL 间差异不显著($P > 0.05$),但在 70% AL 和 40% AL 间差异显著($P < 0.05$)。细菌氮含量随采食水平的降低呈下降趋势,但在 3 组间差异不显著($P > 0.05$);细菌嘌呤含量在 3 组间差异不显著($P > 0.05$),AL 最高,70% AL 最低;细菌嘌呤/氮随日粮采食水平降低有升高趋势,但在 3 组间差异不显著($P > 0.05$)。

2.2 十二指肠食糜流量、微生物氮产量和微生物合成效率

由表 3 可知,有机物、可消化有机物采食量均随日粮饲喂水平的降低显著下降($P < 0.05$),而有机物瘤胃表观消化率随日粮采食水平的升高呈上升趋

势,在 AL 和 40% AL 间差异显著($P < 0.05$);十二指肠干物质、有机物、非氨氮和嘌呤流量均随日粮饲喂水平的降低显著下降($P < 0.05$);¹⁵N 和 PB 计算得到的微生物 N 产量表现出相同的变化趋势且均受日粮采食水平的显著影响($P < 0.05$),其中应用¹⁵N 测得的微生物 N 产量均值为 $10.26 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$,而应用 PB 计算得到的微生物 N 产量均值为 $10.34 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$;应用 2 种标记物计算得到的微生物合成效率均不受采食水平的显著影响($P < 0.05$),其中¹⁵N 测得的微生物合成效率均值为 $20.75 \text{ g N} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ OMADR}$,而 PB 计算得到的 MN 产量均值为 $21.20 \text{ g N} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ OMADR}$;应用 2 种标记物得到的微生物 N 之间存在线性相关($P < 0.05$),相关方程为 $Y = 1.04 X - 0.52$ ($R = 0.94$,见图 1)。

表 1 日粮组成及营养成分表(干物质基础)

Table 1 Composition and nutrient levels of experimental diet (dry matter basis) %

项目 Item	含量 Content
原料 Ingredient	
羊草 Chinese wildrye hay	55.0
玉米 Corn	29.5
豆粕 Soybean meal	14.0
磷酸氢钙 CaHPO_4	0.84
食盐 NaCl	0.50
多矿添加剂 Mineral premix ¹⁾	0.12
多维添加剂 Vitamin premix ²⁾	0.04
合计 Total	100
营养水平 Nutrient level ³⁾	
干物质 DM	90.6
有机物 OM	91.6
粗蛋白质 CP	11.2
代谢能/($\text{MJ} \cdot \text{kg}^{-1}$) ME	9.01
中性洗涤纤维 NDF	62.0
酸性洗涤纤维 ADF	24.1
钙 Ca	0.66
总磷 TP	0.33

¹⁾. 每千克多矿添加剂含: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 26 g, FeSO_4 110 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 93 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 190 g, KI 70 g, Na_2SeO_3 42 g, CoCl_2 20 g; ²⁾. 每千克多维添加剂含: VA 1.9×10^8 IU, VD_3 7.2×10^8 IU, VE 1.7×10^4 IU; ³⁾. 所有指标均为实测值

¹⁾. Provided per kg of premix: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 26 g, FeSO_4 110 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 93 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 190 g, KI 70 g, Na_2SeO_3 42 g, CoCl_2 20 g; ²⁾. Provided per kg of premix: VA 1.9×10^8 IU, VD_3 7.2×10^8 IU, VE 1.7×10^4 IU; ³⁾. All nutrient levels are measured values

表 2 不同采食水平下肉羊瘤胃细菌、十二指肠食糜¹⁵N 丰度以及瘤胃细菌成分Table 2 Enrichment of ¹⁵N in ruminal bacteria and duodenal digesta as well as the bacterial components in mutton sheep with different level of feed intake

项目 Item	采食水平 Level of feed intake			SEM
	AL	70% AL	40% AL	
¹⁵ N 天然丰度/% ¹⁵ N natural abundance				
十二指肠食糜 Duodenal digesta	0.363	0.363	0.363	0.000 1
¹⁵ N 富集度/% ¹⁵ N enrichment				
瘤胃细菌 Ruminal bacteria	0.108 ^a	0.105 ^a	0.089 ^b	0.012
十二指肠食糜 Duodenal digesta	0.070 ^a	0.066 ^a	0.052 ^b	0.007
细菌成分 Bacterial component				
氮/(% DM) Nitrogen	8.13	8.03	7.99	0.02
嘌呤/($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ DM) Purine bases	12.32	12.21	12.30	0.04
嘌呤/氮 Purine bases/Nitrogen	1.51	1.52	1.54	0.007

同行数据上标不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$), 相同或无小写字母表示差异不显著($P > 0.05$)。下同

In the same row, values with different small letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$), values with the same letter or without small letter superscripts mean no significant difference ($P > 0.05$). The same as below

表 3 不同采食水平下肉羊十二指肠食糜流量、微生物氮产量和微生物合成效率

Table 3 Duodenal digesta flow, microbial N yield, and microbial efficiency in mutton sheep at different level of feed intake

项目 Item	采食水平 Level of feed intake			SEM
	AL	70% AL	40% AL	
采食量/($\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$) Intake				
有机物 Organic matter	1 485.7 ^a	1 064.1 ^b	746.4 ^c	91.32
可消化有机物 Digestible organic matter	1 038.2 ^a	750.1 ^b	573.5 ^c	53.52
瘤胃表观消化率/% Ruminal apparent digestibility				
有机物 Organic matter	43.3 ^a	45.4 ^{ab}	48.0 ^b	0.69
十二指肠流量/($\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$) Duodenal flow				
干物质 Dry matter	757.01 ^a	538.25 ^b	381.25 ^c	48.13
有机物 Organic matter	706.50 ^a	481.25 ^b	354.75 ^c	45.43
非氨氮 Non-ammonia nitrogen	22.23 ^a	15.23 ^b	11.63 ^c	1.43
嘌呤 Purine bases	18.65 ^a	14.43 ^b	9.63 ^c	1.18
微生物氮产量/($\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$) Microbial N				
应用 ¹⁵ N With ¹⁵ N	14.40 ^a	9.60 ^b	6.78 ^c	0.97
应用嘌呤 With purine bases	13.71 ^a	10.17 ^b	7.14 ^c	0.87
微生物合成效率/($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ OMADR) Microbial efficiency				
应用 ¹⁵ N With ¹⁵ N	20.34	20.73	21.19	0.45
应用嘌呤 With purine bases	19.36	21.95	22.30	0.95

OMADR. 瘤胃表观可消化有机物

OMADR. Organic matter apparently digested in rumen

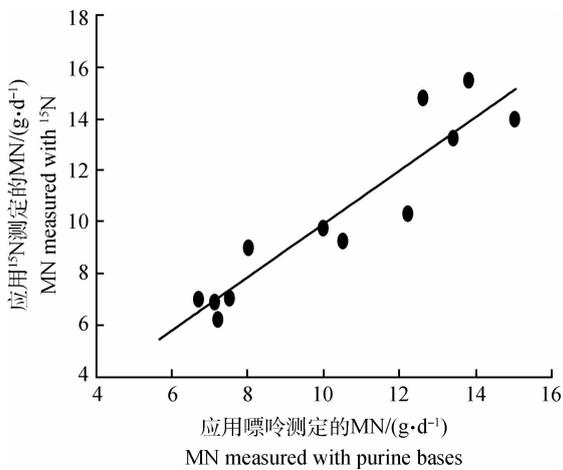


图1 应用嘌呤测定的MN和应用¹⁵N测定的MN之间的线性关系

Fig. 1 Correlation between MN measured with purine bases and MN measured with ¹⁵N

3 讨论

3.1 ¹⁵N丰度的测定

¹⁵N作为一种稳定性同位素对环境没有污染,通常情况下日粮中的¹⁵N仅为天然丰度,因此加入的外源¹⁵N只会标记微生物N而不会标记日粮N或体组织N^[12]。本试验中,测定的十二指肠食糜¹⁵N天然丰度为0.363%,略低于IAEA的标准值0.366%^[13],这可能是由于在某些氮代谢过程中¹⁴N的利用要优先于¹⁵N^[14]。本试验中,瘤胃细菌和十二指肠食糜¹⁵N丰度变化分别为0.089%~0.108%和0.052%~0.070%,由于同位素质谱仪具有极高的精确度(能够精确至0.001%),因此,通常情况下0.01%~0.05%的丰度便能够保证测定结果的准确性^[15]。

3.2 瘤胃细菌成分

反刍动物瘤胃微生物N的测定首先需要分离得到瘤胃细菌,该细菌样品必须能够代表整个瘤胃以及进入小肠的细菌群体^[16],目前主要有2种细菌分离方式,一种是从过滤的瘤胃液中分离获得混合细菌(Total mixed bacteria, TB);另一种是分别从过滤的瘤胃液以及滤出的食糜中分离出液相细菌(Fluid associated bacteria, FAB)和固相细菌(Particle associated bacteria, PAB)。不论采用何种细菌分离方式,细菌的嘌呤/氮必须要保持恒定,这是应用PB作为微生物标记物估测微生物N的一个重要前提。本试验采用的是从过滤的瘤胃液中分离获

得混合细菌(TB)的方式,结果表明,细菌氮、嘌呤以及嘌呤/氮等成分均不受日粮处理的显著影响,这与Cecava^[16]和Broderick^[17]等得出的结论一致。其中瘤胃细菌嘌呤/氮变化为1.51~1.54,该比例高于Cecava^[16]和Broderick^[17]等得出的相应范围(分别为1.28~1.31和1.28~1.32),这种差异可能是由于动物品种或是日粮成分不同造成的。

在分离并比较TB、FAB和PAB成分的研究中,Cecava^[16]和Carro^[18]等均得出FAB的嘌呤/氮要高于PAB和TB,而TB和PAB的嘌呤/氮则比较接近,事实上由于FAB在瘤胃细菌总体中只占很少一部分(小于10%)^[19-20],因此,TB的嘌呤/氮并不一定介于FAB和PAB之间,而若以FAB的嘌呤/氮为标准很可能会低估微生物N产量。另外,由于FAB和PAB只是一个很笼统的分类,两者并不存在严格的界限^[21],因而会导致在分离过程的某部分细菌既可以视作PAB也可以视作FAB^[16],而TB的分离过程涉及到的步骤较少,中间环节引入的误差也相应减少,相对而言用于测定微生物N产量更加可靠^[16, 18]。

3.3 应用2种标记物测定结果的比较

应用¹⁵N和PB作为微生物标记物在研究中存在着不一致的结果,在某些研究中应用PB测定结果高于应用¹⁵N测定结果^[22],而另外一些研究结论则相反^[23-25]。理论上来说,由于日粮中的PB可能未被瘤胃微生物完全降解,进入十二指肠食糜的PB并非全部来源于瘤胃微生物,因此应用PB可能会高估微生物N产量^[26],然而在分离瘤胃细菌的过程中,由于离心等处理造成的细菌细胞裂解等因素^[27]会带来PB的损失,最终可能使应用PB计算得出的微生物N低于实际值。本试验中,应用¹⁵N和PB得出的微生物N结果比较接近,平均值分别为10.26和10.34 g·d⁻¹,低于ARC的估测值(16.37 g·d⁻¹;微生物N=可消化有机物采集量×0.65×32)^[28],这可能是由于本试验中测定的肉羊有机物瘤胃消化率(43.3%~48.0%)低于上述消化率(65%)造成的。

在一些相关研究中发现,应用PB作为微生物标记物比应用¹⁵N作为微生物标记物测定结果的变异性要高^[18, 23, 29],本试验也发现,应用PB得到微生物N产量在各处理内的标准差要高于应用¹⁵N测定的微生物N产量,应用PB作为微生物标记物测定结果变异性较大的原因可能在于Zinn和Owens^[8]

对 PB 进行分析测定的方法缺乏足够的精确性^[23], 而尽管针对上述方法存在着一些改进^[30-31], 但仍无法完全解决结果变异性高的问题, 相比之下, 应用¹⁵N 作为标记物测定微生物 N 因为测定步骤相对简便以及测定仪器的高精确性使得其测定结果更加精确。本试验建立的应用¹⁵N 测定的微生物 N 和应用 PB 测定的微生物 N 之间的相关方程的相关系数为 0.94, 该系数高于 Carro 和 Miller^[18] ($R=0.88$) 和 Reynal 等^[29] ($R=0.69$) 分别通过体外培养和在奶牛上建立的相应方程的相关系数, 说明在本试验条件下应用¹⁵N 和 PB 测定肉羊微生物 N 结果具有很高的一致性, 但考虑到应用 PB 作为微生物标记物测定结果的变异性较大, 因此, 应用¹⁵N 来测定微生物 N 能够得到更为准确可靠的结果。

4 结 论

瘤胃细菌(TB)成分(氮含量、嘌呤含量、嘌呤/氮)不受日粮处理的显著影响, 应用 2 种微生物标记物测得的微生物 N 产量之间存在线性相关, 相关方程为 $Y=1.04X-0.52$ ($R=0.94$), 其中, Y 为¹⁵N 测定的微生物 N ($g \cdot d^{-1}$), X 为 PB 测定微生物 N ($g \cdot d^{-1}$)。 ¹⁵N 测定的微生物 N 在各处理内的变异性要小于 PB 测定得到的微生物 N, 因此应用¹⁵N 来测定微生物 N 能够得到更为准确可靠的结果。

参考文献:

- [1] GALVANI D B, PIRES C C, KOZLOSKI G V, et al. Protein requirements of Texel crossbred lambs [J]. *Small Rumin Res*, 2009, 81: 55-62.
- [2] SUBBA D B. Purine nitrogen index, a possible parameter for rapid feed evaluation in ruminants[D]. A thesis for the degree in M. Sc. In animal nutrition. University of Aberdeen, 1997: 12.
- [3] MCDONALD P, EDWARDS R A, GREENHALGH, et al. Animal nutrition [M]. Fifth edition. Longman scientific and technical, New York, 1995.
- [4] PUCHALA R, KULASEK G. Estimation of microbial protein flow from the rumen of sheep using microbial nucleic acid and urinary excretion of purine derivatives[J]. *Can J Anim Sci*, 1992, 72: 821-830.
- [5] 马 涛, 刁其玉, 邓凯东. 尿嘌呤衍生物法估测瘤胃微生物蛋白质产量的研究进展[J]. *动物营养学报*, 2011, 23(1): 10-14.
- [6] UDEN P, COLUCCI P E, VAN SOEST P J. Investigation of chromium, cerium and cobalts as markers in digesta: Rate of passage studies[J]. *J Sci Food Agric*, 1980, 31: 625-632.
- [7] AOAC. Official methods of analysis[M]. Arlington, Washington DC, USA, 1990.
- [8] ZINN R A, OWENS F N. A rapid procedure for purine measurement and its use for estimating net ruminal protein synthesis[J]. *Can J Anim Sci*, 1986, 66: 157-166.
- [9] FAICHNEY G J. The use of markers to partition digestion within the gastro-intestinal tract of ruminants [M]. MCDONALD I W and WARNER A C I, ed. University of New England Publishing Unit, Armidale, Australia, 1975.
- [10] KOENIG K M, IVAN M, TEFEREDEGNE B T, et al. Effect of dietary enterolobium cyclocarpum on microbial protein flow and nutrient digestibility in sheep maintained fauna-free, with total mixed fauna or with entodinium caudatum monofauna [J]. *Br J Nutr*, 2007, 98: 504-516.
- [11] AHVENJÄRVI S, VANHATALO, HUHTANEN P. Supplementing barley or rapeseed meal to dairy cows fed grass-red clover silage: I. Rumen degradability and microbial flow[J]. *J Anim Sci*, 2002, 80: 2176-2187.
- [12] BRODERICK G A, MERCHEN N R. Markers for quantifying microbial protein synthesis in the rumen [J]. *J Dairy Sci*, 1992, 75: 2618-2632.
- [13] PEOPLES M B, BERGERSEN F J, TURNER G L, et al. Use of the natural enrichment of ¹⁵N in plant available soil N for the measurement of symbiotic N₂ fixation. In: EA IA (ed) Stable isotopes in plant nutrition, soil fertility and environmental studies[C]. IAEA, Vienna, 1991: 117-129.
- [14] WATTIAUX M A, REED J D. Fractionation of nitrogen isotopes by mixed ruminal bacteria [J]. *J Anim Sci*, 1995, 73: 257-266.
- [15] BURRIS R H, WILSON P W. Methods for measurement of nitrogen fixation[M]. In methods in enzymology. Vol. 4. COLOWICH S P and KAPLAN N O, ed. Academic Press, New York, NY. 1957: 355.
- [16] CECAVA M J, MERCHEN N R, GAY L C, et al. Composition of ruminal bacteria harvested from steers as influenced by dietary energy level, feeding frequency, and isolation techniques[J]. *J Dairy Sci*, 1990, 73: 2480-2488.
- [17] BRODERICK G A, MERCHEN N R. Markers for

- quantifying microbial protein synthesis in the rumen [J]. *J Dairy Sci*, 1992, 75: 2618-2632.
- [18] CARRO M D, MILLER E L. Comparison of microbial markers (^{15}N and purine bases) and bacterial isolates for the estimation of rumen microbial protein synthesis[J]. *Anim Sci*, 2002, 75: 315-321.
- [19] CRAIG W M, BRODERICK G A, RICKER D B. Quantitation of microorganisms associated with the particulate phase of ruminal ingesta[J]. *J Nutr*, 1987, 117: 56.
- [20] LEGAY-CARMIER F, BAUCHART D. Distribution of bacteria in the rumen contents of dairy cows given a diet supplemented with soya-bean oil[J]. *Br J Nutr*, 1989, 61: 725.
- [21] GONZALEZ-RONQUIHIO M, BALCELLS J, BELLENGUER A, et al. A comparison of purine derivatives excretion with conventional methods as indices of microbial yield in dairy cows[J]. *J Dairy Sci*, 2004, 87: 2211-2221.
- [22] CECAVA M J, MERCHEN N R, BERGER L L, et al. Effects of dietary energy level and protein source on nutrient digestion and ruminal nitrogen metabolism in steers[J]. *J Anim Sci*, 1991, 69: 2230-2243.
- [23] CALSAMIGLIA S, STERN M D, FRIKINS J L. Comparison of nitrogen-15 and purines as microbial markers in continuous culture[J]. *J Anim Sci*, 1996, 74: 1375-1381.
- [24] FIRKINS J L, LEWIS S M, MONTGOMERY L, et al. Effects of feed intake and dietary urea concentration on ruminal dilution rate and efficiency of bacterial growth in steers [J]. *J Dairy Sci*, 1987, 70: 2312-2321.
- [25] PEREZ J F, BALCELLS J, GUADA J A, et al. Rumen microbial production estimated either from urinary purine derivative excretion or from direct measurements of ^{15}N and purine bases as microbial markers: effect of protein source and rumen bacteria isolates [J]. *Anim Sci*, 1997, 65: 225-236.
- [26] SMITH R H, MCALLAN A B, HEWITT P, et al. Estimation of amounts of microbial and dietary nitrogen compounds entering the duodenum of cattle[J]. *J Agric Sci*, 1978, 90: 557-568.
- [27] HRISTOV A N, MCALLISTER T A, OUELLET D R, et al. Comparison of purines and nitrogen-15 as microbial flow markers in beef heifers fed barley- or corn-based diets [J]. *Can J Anim Sci*, 2005, 85: 211-222.
- [28] ARC. The nutrient requirements of ruminant livestock[M]. Suppl. No. 1, Commonwealth Agricultural Bureaux, Slough, 1984.
- [29] REYNAL S M, BRODERICK G A, BEARZL C. Comparison of four markers for quantifying microbial protein flow from the rumen of lactating dairy cows [J]. *J Dairy Sci*, 2005, 88: 4065-4082.
- [30] USHIDA K, LASSALAS B, JOUANY J P. Determination of assay parameters for RNA analysis in bacterial and duodenal samples by spectrophotometry influence of sample treatment and preservation[J]. *Reprod Nutr Dev*, 1985, 25: 1037-1046.
- [31] AHARONI Y, TAGARI H. Use of nitrogen-15 determinations of purine nitrogen fraction of digesta to define nitrogen metabolism traits in the rumen[J]. *J Dairy Sci*, 1991, 74: 2540-2547.

(编辑 郭云雁)