

不同精粗比底物下瘤胃真菌和纤维降解细菌共培养发酵特性及菌群变化

孙云章,毛胜勇,姚文,朱伟云*

(南京农业大学消化道微生物研究室 南京 210095)

摘 要 采用体外厌氧共培养技术,研究了瘤胃真菌和纤维降解细菌在不同精粗比(A组为全粗料,B组3:7,C组5:5,D组7:3,E组为全精料)底物下菌群变化及其共培养发酵特性。结果表明:与0h相比,发酵至24h时B组和C组的厌氧真菌数量有较大幅度的上升,A组和D组则有所下降,E组未检测到真菌生长,纤维降解细菌随精粗比的增加呈上升趋势。发酵至48h时,各组均未检测到真菌生长;从A组到C组细菌数量呈上升趋势,此后急剧下降。DGGE结果表明,A、B和C组(精粗比低于5:5)的DGGE图谱相似,有11条共有条带,但是当精粗比上升到7:3时,条带数目显著下降。随精料比例的增加,整个发酵期共培养系统中pH值显著下降($P < 0.05$)。整个发酵期间,共培养系统发酵产生的VFA主要为乙酸,丙酸和丁酸的量较少,乙酸与丙酸比值从A组到C组呈下降趋势,此后呈上升趋势。随精料比例的上升,发酵48h时总挥发性脂肪酸浓度从A组到C组呈上升趋势,此后呈下降趋势。发酵48h的羧甲基纤维素酶活和木聚糖酶活均以A组最高,而 α -淀粉酶活从A组到D组逐渐增大,而E组最低,仅为B、C、D组的1/4~1/3。

关键词 瘤胃真菌,纤维降解细菌,共培养,精粗比,发酵,微生物菌群

中图分类号 S852.6 文献标识码 A 文章编号 1001-6209(2006)03-0422-05

瘤胃厌氧真菌具有很强的植物细胞壁降解能力,在粗饲料的降解过程中起着重要的作用,但瘤胃中还存在多种高活性纤维降解细菌,如白色瘤胃球菌(*Ruminococcus albus*)、黄化瘤胃球菌(*Ruminococcus flavefaciens*)及产琥珀酸丝状杆菌(*Fibrobacter succinogenes*)等,这些纤维降解细菌与真菌之间无疑存在着直接的底物竞争关系。早期的研究表明,白色瘤胃球菌和黄化瘤胃球菌能抑制厌氧真菌 *Neocallimastix frontalis* 对玉米茎和纤维素的降解能力^[1,2],最近 Dehority 等^[3]通过体外共培养试验证实瘤胃细菌能显著抑制瘤胃真菌的生长及其纤维降解能力。与瘤胃细菌相比,厌氧真菌数量低、生长速度慢,在瘤胃系统中处于劣势,但经过数百万年的进化,真菌能在与细菌的激烈竞争中存活下来,无疑存在其特有的存活机制。但是,以往有关瘤胃真菌与纤维降解细菌互作研究所用的菌株均为单一菌株,且底物或全为粗饲料,或为纯纤维素,难以真实反映混合瘤胃真菌和纤维降解细菌的互作关系。在实际生产中,动物日粮常以一定精粗比例配合而成,常用范围为4:6到6:4,为追求效益,更高比例的精料也常见于奶牛生产中。但是,在不同日粮精粗比下纤

维降解细菌和厌氧真菌菌群的变化关系不清楚。此外,受传统微生物方法的限制,共培养系统中的菌群变化不易准确反映。变性梯度凝胶电泳(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)技术利用DNA或RNA对微生物遗传特性进行表征,可直接再现微生物群落遗传多样性和动态变化,因而越来越受到重视。为此,本试验选择全粗料、全精料以及不同精粗比的日粮为发酵底物,采用体外共培养法结合DGGE技术,研究了瘤胃真菌与纤维降解细菌在不同精粗比底物下菌群变化及共培养发酵特性,旨在探讨瘤胃真菌与纤维降解细菌的互作关系。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 混合瘤胃厌氧真菌和混合纤维降解细菌的分离与纯化分别参照朱伟云^[4]和Jarvis等^[5]的方法。

1.1.2 试剂和仪器 羧甲基纤维素、木聚糖(Sigma),可溶性淀粉(广东汕头西陇化工厂),引物(Invitrogen),Taq DNA聚合酶(Promega试剂盒),气相色谱仪(日本岛津),珠磨仪(Mini-Bead-beater-8,

基金项目:教育部科学技术研究重点项目(02119),国家自然科学基金(30371041)

* 通讯作者。Tel 86-25-84395523; Fax 86-25-84395314; E-mail zhuweiyun@jau@hotmail.com

作者简介:孙云章(1976-),男,湖北石首人,博士研究生,主要从事瘤胃微生物研究。E-mail sunyunzhang@yahoo.com.cn

收稿日期 2005-07-05 接受日期 2005-09-07 修回日期 2005-11-10

BioSpec), PCR 仪(T1, Biometra), Dcode DGGE 系统、GS-800 型扫描仪(Bio-Rad)。

1.2 试验设计

试验设 5 个处理(A、B、C、D、E),其底物精粗比分别为全粗料、3:7、5:5、7:3、全精料。每个处理 3 个重复,每个重复的底物均为 1g,由精料(玉米粉)和粗料(稻草片段,约 0.5mm)组成。培养基按朱伟云等^[4]的方法配制,各处理接种 10mL 已生长 48h 的瘤胃真菌培养液和 5mL 经 10 倍稀释的纤维降解细菌培养液(稀释后细菌数量为 1.5×10^8 CFU/mL)。对照组注入 15mL 无菌厌氧的蒸馏水。所有处理和对照在 39℃ 下静止培养 48h。发酵至 0h、24h 和 48h,对各培养瓶中厌氧真菌计数,同时,从各培养瓶中分别取出培养液 10mL,立即测定 pH 值,剩余样品 -20℃ 冻存备用。

1.3 指标测定

厌氧真菌计数采用 MPN 法^[6],瘤胃细菌的计数采用 Hungate 滚管计数法^[7],挥发性脂肪酸的测定采用气相色谱法^[8]。羧甲基纤维素酶、木聚糖酶活力的测定参照 Lowe 等^[9]的方法, α -淀粉酶活力的测定参照 Mountfort 和 Asher^[10]的方法。

1.4 DGGE

取 5mL 发酵液 10000r/min 离心 10min,收集沉淀。Bead-beater 法提取 DNA,PCR 及 DGGE 参照朱伟云等^[11]和姚文等^[12]的方法。电泳采用 Dcode DGGE 系统,电泳缓冲液为 $0.5 \times$ TAE,电泳温度为 60℃,首先在 200V 电压下电泳 10min,随后在 85V 的固定电压下电泳 12h。电泳结束后进行硝酸银染色,DGGE 凝胶以 GS-800 型扫描仪扫描。

1.5 数据处理

试验数据经 Excel 2000 初步整理后,利用 SPSS (11.5)单因子多重比较中 Duncan 法进行统计分析,各时间点数据用该处理中 3 个重复以平均值 \pm 标准差($\bar{X} \pm SE$)表示。

2 结果和分析

2.1 不同精粗比底物下共培养系统中瘤胃真菌和细菌数量的变化

由表 1 可知,与 0h 相比,发酵 24h 时 B、C 两组的瘤胃真菌数量有较大幅度的增加,其中 B 组增加的幅度最大,为 0h 的 10 倍,A 组和 D 组的真菌数量减少,而 E 组则检测不到真菌;纤维降解细菌随底物精料的增加呈上升趋势。发酵至 48h 时各组均检测不到真菌;从 A 组到 C 组纤维降解细菌数量呈上升趋势,此后呈递减趋势。

表 1 不同精粗比底物下共培养系统中真菌数量(TFU/mL)和细菌数量(CFU/mL)的变化

Table 1 Effect of different substrates on fungal and bacterial population density in co-cultures

Group	Fungal population density			Bacterial population density		
	0h	24h	48h	0h	24h	48h
A	45	15	0	1.5×10^8	1.1×10^9	2.5×10^8
B	45	450	0	1.5×10^8	3.4×10^9	6.1×10^9
C	45	150	0	1.5×10^8	6.5×10^9	6.8×10^9
D	45	15	0	1.5×10^8	3.2×10^{10}	3.1×10^8
E	45	0	0	1.5×10^8	1.3×10^{10}	2.2×10^8

Data of fungal population density from three-tube MPN table.

2.2 不同精粗比底物下共培养系统中瘤胃纤维降解细菌菌群的变化

图 1 为不同精粗比底物下发酵 24h 和 48h 共培养系统中纤维降解细菌菌群变化的 DGGE 图谱。发酵全期各样品之间有 6 条共有条带,提示部分纤维降解细菌能在不同精粗比底物的共培养系统中存在。但是,发酵全期 A、B、C 3 组均有 11 条优势条带,而发酵 24h 时 D 组和 E 组分别有 9 条和 7 条优势条带,发酵 48h 时 D 组和 E 组分别有 7 条和 6 条优势条带。此外,3 条优势条带仅见于发酵 24h 和 48h 的 A、B 和 C 组,D 组和 E 组未见此条带;另外 3 条优势条带存在于发酵 24h 的 A、B、C 和 D 组,发酵 48h 时仅存在于 A、B 和 C 组。提示底物的精粗比低于 5:5 时,共培养系统中纤维降解细菌种类多且相

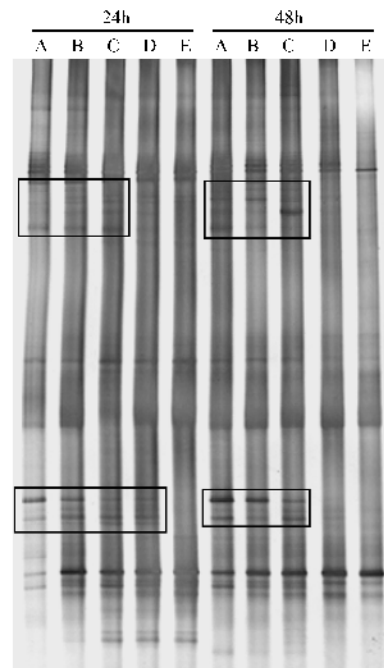


图 1 不同精粗比底物下共培养系统中纤维降解细菌菌群变化的 DGGE 图谱

Fig. 1 DGGE profile of cellulolytic bacteria community in co-cultures at different concentrate to crude substrates.

似,但是当精粗比上升到 7:3 时,共培养系统中的细菌种类明显下降。

2.3 不同精粗比底物对共培养系统中 pH 值和产气量的影响

由表 2 可知,随着精料比例的上升,整个发酵期

pH 值显著下降 ($P < 0.05$),其中, D 组和 E 组发酵全期的 pH 值均低于 6.0。随精料比例的增加,发酵前期 (0h ~ 24h) 累计产气量显著增加 ($P < 0.05$); 发酵后期 (24h ~ 48h) 各组累计产气量如下: B 组 > C 组 > D 组 > A 组 > E 组。

表 2 不同精粗比底物对共培养系统中 pH 值和产气量 (mL) 的影响

Table 2 Effect of different substrates of pH value and gas production by co-cultures

Group	pH Value		Gas production	
	24h	48h	0h ~ 24h	24h ~ 48h
A	6.55 ± 0.03 ^a	6.50 ± 0.04 ^a	64.44 ± 3.07 ^c	25.23 ± 2.67 ^c
B	6.28 ± 0.01 ^b	6.28 ± 0.02 ^b	93.22 ± 0.32 ^d	33.22 ± 2.67 ^a
C	6.09 ± 0.01 ^c	6.16 ± 0.04 ^c	124.05 ± 1.42 ^c	32.28 ± 0.71 ^a
D	5.68 ± 0.01 ^d	5.66 ± 0.03 ^d	144.38 ± 3.60 ^b	29.03 ± 1.28 ^b
E	4.77 ± 0.11 ^e	4.65 ± 0.04 ^e	161.62 ± 1.19 ^a	9.18 ± 0.92 ^d

a b c d e: values in the same row with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$). The same as follows.

2.4 不同精粗比底物对共培养系统中 VFA 的影响

由表 3 可知,整个发酵期间,共培养系统发酵产生的 VFA 主要为乙酸,丙酸和丁酸的量较少,乙酸与丙酸比值从 A 组到 C 组呈下降趋势,此后呈上升趋势。发酵 24h 时,各组总挥发性脂肪酸浓度无显著差异,乙酸占总挥发性脂肪酸 (TVFA) 的比例差异

不显著,丙酸和丁酸占 TVFA 的比例从 A 组到 C 组呈上升趋势,此后呈递减趋势。发酵 48h 时,随精料比例的上升,总挥发性脂肪酸浓度从 A 组到 C 组呈上升趋势,此后呈下降趋势。乙酸比例从 A 组到 C 组呈下降趋势,此后呈上升趋势,丙酸比例从 A 组到 C 组呈上升趋势,此后呈下降趋势。

表 3 不同精粗比底物对共培养系统中 VFA 的影响

Table 3 Effect of different substrates on total VFA concentration and profile in co-cultures

Time	Group	Total VFA (mmol/L)	Acetate (%)	Propionate (%)	Butyrate (%)	Acetate/Propionate
24h	A	14.85 ± 1.54	90.18 ± 1.06 ^b	5.15 ± 0.55 ^b	5.18 ± 0.72 ^b	19.56 ± 2.22 ^b
	B	13.00 ± 1.93	86.26 ± 0.91 ^c	7.97 ± 0.71 ^a	6.87 ± 0.39 ^a	12.61 ± 1.17 ^c
	C	12.60 ± 0.94	87.45 ± 1.07 ^c	6.45 ± 1.25 ^{ab}	6.92 ± 0.73 ^a	15.88 ± 2.99 ^{bc}
	D	13.24 ± 0.18	90.13 ± 1.36 ^b	4.87 ± 0.99 ^b	5.49 ± 0.61 ^b	21.04 ± 3.82 ^b
	E	12.57 ± 0.99	92.23 ± 0.19 ^a	3.38 ± 0.53 ^c	3.62 ± 0.30 ^c	30.06 ± 4.30 ^a
48h	A	16.11 ± 1.48 ^a	82.71 ± 2.68 ^b	12.69 ± 2.41 ^b	6.84 ± 0.98	8.10 ± 1.73 ^c
	B	16.44 ± 2.11 ^a	82.38 ± 2.43 ^b	13.26 ± 3.01 ^b	6.74 ± 0.35	7.78 ± 1.62 ^c
	C	17.24 ± 1.72 ^a	77.47 ± 0.32 ^c	20.89 ± 5.30 ^a	6.49 ± 1.14	5.00 ± 1.28 ^c
	D	14.31 ± 2.36 ^{ab}	87.11 ± 1.34 ^{ab}	6.42 ± 1.19 ^c	7.31 ± 0.53	15.93 ± 2.91 ^b
	E	11.83 ± 0.51 ^b	89.11 ± 1.34 ^a	4.57 ± 0.46 ^c	6.84 ± 0.77	22.03 ± 2.18 ^a

2.5 不同精粗比底物对共培养系统中酶活的影响

由表 4 可知,发酵 48h 时, A 组羧甲基纤维素酶活显著高于其余 4 组 ($P < 0.05$),且 4 组之间差异不显著。木聚糖酶活则随底物精料比例的上升显著下

降 ($P < 0.05$)。α-淀粉酶活从 A 组到 D 组呈上升趋势, C 组和 D 组显著高于其余各组 ($P < 0.05$)。E 组酶活最低,仅为 B、C、D 组的 1/4 ~ 1/3,但与 A 组差异不显著。

表 4 不同精粗比底物对共培养系统中 48h 酶活 (U/mL) 的影响

Table 4 Enzyme activity of 48h fermentation by co-cultures

Group	CMCase	Xylanase	α-amylase
A	0.085 ± 0.003 ^a	5.57 ± 0.19 ^a	2.93 ± 0.20 ^c
B	0.074 ± 0.001 ^b	3.81 ± 0.02 ^b	6.70 ± 0.47 ^b
C	0.077 ± 0.003 ^b	2.97 ± 0.08 ^c	7.94 ± 0.01 ^a
D	0.076 ± 0.001 ^b	2.48 ± 0.063 ^d	8.36 ± 0.73 ^a
E	0.076 ± 0.001 ^b	2.18 ± 0.15 ^e	2.23 ± 0.21 ^c

One unit of CMCase or xylanase activity was defined as the amount of enzyme that produced 1 μmol of glucose per minute per mL of supernatant. One unit of α-amylase activity was defined as the amount of enzyme that produced reducing sugar equivalent to 1 μmol of glucose per minute per mL of supernatant.

3 讨论

瘤胃中纤维降解细菌和厌氧真菌是降解饲料粗纤维的主要瘤胃微生物,其发酵产生大量的乙酸、琥珀酸和氢气,只有少量丙酸,而瘤胃中其他微生物利用琥珀酸和氢气进而产生大量的丙酸、甲烷等。本试验共培养系统中只有厌氧真菌和瘤胃纤维降解细菌,利用该系统是为了探讨这些主要纤维降解菌对粗纤维的发酵特性。因此,本研究发酵系统产生大量的乙酸,乙酸与丙酸比值是几倍于瘤胃中整体发酵产生的比值。研究表明,底物的精粗比对共培养系统中真菌和纤维降解细菌数量均有很大的影响。发酵至24h时,B组和C组(底物精粗比分别为3:7和5:5)瘤胃真菌和细菌数量与0h相比均有较大幅度的提高,提示适当的精粗比有利于瘤胃真菌和纤维降解细菌在发酵前期建立起相对稳定的共培养体系。但是,随着精料比例的增大,真菌数量逐渐降低直到消失,细菌数量逐渐上升,同时系统的产气量显著增加。提示瘤胃纤维降解细菌能利用精料迅速生长,导致共培养系统中pH值急剧下降,加之试验初期真菌数量较低(45TFU/mL),且具有较长的生长滞后期^[13],因此尚未大量繁殖的真菌的生长受到抑制。

Castillejos等^[14]体外连续培养试验表明,高精料底物(精粗比9:1)发酵时总挥发性脂肪酸(TVFA)浓度高于低精料日粮(精粗比4:6)发酵的TVFA浓度。本试验结果表明,底物从全粗料到精粗比为5:5时,发酵48h的TVFA浓度随精料比例的增加呈上升趋势,但精粗比达到7:3时TVFA浓度开始下降。可能是因为精料比达到7:3时,共培养系统的微生物迅速发酵导致pH值迅速下降到5.68,而据Russell等^[15]报道,当pH值低于6.0时,瘤胃球菌和产琥珀酸丝状杆菌等主要的纤维降解细菌的生长会受到抑制。本试验DGGE和滚管计数结果也表明,精粗比达到7:3时,共培养系统中的纤维降解细菌种类和数量均显著下降,这可能是导致TVFA产量下降的主要原因。

Russell^[16]报道,pH值对体外发酵系统中乙酸与丙酸比值有很大的影响,pH值从6.5下降到5.3时,乙酸与丙酸比值显著降低,但pH值低于5.3时,乙酸与丙酸比值显著上升。本研究表明,底物从全粗料到精粗比为5:5时,发酵48h时的pH值维持在6.09以上,随精料比例的增加,丙酸比例呈上升趋势,乙酸与丙酸比值呈下降趋势。但是,当精粗比达

到7:3时,pH值下降到5.66,丙酸比例显著下降,乙酸与丙酸比值显著上升,这可能是由于共培养系统中丙酸产生菌比乙酸产生菌对低pH值更敏感^[16]。

本研究酶活分析表明,全粗料组的羧甲基纤维素酶和木聚糖酶活最高,提示纤维含量丰富的底物可诱导共培养系统中纤维降解酶的产生。 α -淀粉酶活随着精料比例的增加显著上升,提示精料能诱导共培养系统中 α -淀粉酶的产生^[10]。但以玉米(全精料)作为唯一底物时 α -淀粉酶活却显著降低,此时共培养系统中的pH值降到5.0以下,可能抑制了产 α -淀粉酶的菌的生长。

在实际生产中,高精料日粮条件下,反刍动物瘤胃内发酵迅猛,pH可迅速下降,当低于5.5时可引起瘤胃酸中毒,进而严重影响动物瘤胃的正常发酵功能,而饲料中添加缓冲剂、苹果酸或延胡索酸盐可维持pH值、防止酸中毒发生^[17]。本研究也表明高精料引起了pH值的急剧下降,同时表明精粗比过高抑制纤维降解菌和厌氧真菌数量生长。近来研究表明,饲料中添加源自瘤胃的厌氧真菌制剂可促进瘤胃发酵以及氮的利用率^[18,19]。因此,在高精料条件下,在调节pH值的同时,在饲料中大量添加源自瘤胃的厌氧真菌也可能可以减轻酸中毒甚至使动物瘤胃恢复正常功能。毛胜勇等(2002)研究表明,去除厌氧真菌的山羊瘤胃重新引入厌氧真菌可使瘤胃恢复正常的发酵功能^[20]。因此,瘤胃厌氧真菌也可能具有进一步研究和开发的前景。但是,这方面还需大量的深入的研究。

参 考 文 献

- [1] Roger V, Grenet E, Jamot J, et al. Degradation of maize stem by two fungal species, *Piromyces communis* and *Caecomyces communis*, in pure culture or in association with cellulolytic bacteria. *Reprod Nutr Develop*, 1992, **32**: 321 - 329.
- [2] Bernalier A, Fonty G, Bonnemoy F, et al. Degradation and fermentation of cellulose by the rumen anaerobic fungi in axenic cultures or in association with cellulolytic bacteria. *Curr Microbiol*, 1992, **25**: 143 - 148.
- [3] Dehority BA, Tirabasso PA. Antibiosis between ruminal bacteria and ruminal fungi. *Appl Environ Microbiol* 2000, **66**: 2921 - 2927.
- [4] 朱伟云, 毛胜勇, 王全军, 等. 厌氧真菌体外筛选技术的研究. 南京农业大学学报, 2001, **24**: 44 - 48.
- [5] Jarvis BD, Annison EF. Isolation, classification and nutritional requirements of cellulolytic cocci in the sheep rumen. *J Gen Microbiol*, 1967, **47**: 295 - 307.
- [6] Theodorou MK, Gill M, King-Spooner C, et al. Enumeration of anaerobic chytridiomycetes as thallus forming units: novel method for quantification of fibrolytic fungal populations from the digestive tract ecosystem. *Appl Environ Microbiol*, 1990, **56**: 1073 - 1078.

- [7] Hungate RE. A roll tube method for the cultivation of strict anaerobes. In :Norris JR and Ribbons DW. *Methods in Microbiology* volume 3B. London ,UK :Academic press Inc ,1969 ,117 – 132.
- [8] 秦为琳. 应用气相色谱测定挥发性脂肪酸方法的研究改进. *南京农学院学报* ,1982 **5** :110 – 116.
- [9] Lowe SE ,Theodorou MK ,Trinci APJ. Cellulases and xylanase of an anaerobic rumen fungus growth on wheat straw , wheat straw holocellulose ,cellulose and xylan. *Appl Environ Microbiol* ,1987 **53** (6) :1216 – 1223.
- [10] Mountfort DO ,Asher RA. Production of α -amylase by the ruminal anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. *Appl Environ Microbiol* , 1988 **54** (9) 2293 – 2299.
- [11] 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. *微生物学报* ,2003 **43** (4) 503 – 508.
- [12] 姚文 ,朱伟云 ,韩正康 ,等. 应用变性梯度凝胶电泳和 16S rDNA序列分析对山羊瘤胃细菌多样性的研究. *中国农业科学* ,2004 **37** (9) :1374 – 1378.
- [13] Orpin CG ,Joblin KN. The rumen anaerobic fungi. In :Hobson PN and Stewart CS. *The Rumen Microbial Ecosystem*. London ,UK : Blackie Academic & Professional ,1997 ,140 – 196.
- [14] Castillejos L ,Calsamiglia S ,Ferret A ,*et al.* Effects of a specific blend of essential oil compounds and the type of diet on rumen microbial fermentation and nutrient flow from a continuous culture system. *Anim Feed Sci Technol* ,2005 **119** :29 – 41.
- [15] Russell JB ,David B ,Wilson B. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH ? *J Dairy Sci* ,1996 **79** :1503 – 1509.
- [16] Russell JB. The importance of pH in the regulation of ruminal acetate to propionate ratio and methane production *in vitro*. *J Dairy Sci* ,1998 **81** :3222 – 3230.
- [17] Castillo C ,Benedito JL ,Méndez J. Organic acids as a substitute for monensin in diets for beef cattle. *Anim Feed Sci Technol* ,2004 **115** : 101 – 116.
- [18] Lee SS ,Choi CK ,Ahn BH ,*et al.* *In vitro* stimulation of rumen microbial fermentation by a rumen anaerobic fungal culture. *Anim Feed Sci Technol* ,2004 **115** :215 – 226.
- [19] Paul SS ,Kamra DN ,Sastry VRB ,*et al.* Effect of administration of an anaerobic gut fungus isolated from wild blue bull (*Boselaphus tragocamelus*) to buffaloes (*Bubalus bubalis*) on *in vivo* ruminal fermentation and digestion of nutrients. *Anim Feed Sci Technol* , 2004 **115** :143 – 157.
- [20] 毛胜勇 ,王全军 ,姚文 ,等. 去除瘤胃厌氧真菌对山羊瘤胃消化代谢的影响. *南京农业大学学报* ,2002 **25** :61 – 64.

The dynamics of microorganism populations and fermentation characters of co-cultures of rumen fungi and cellulolytic bacteria on different substrates

SUN Yun-zhang , MAO Sheng-yong , YAO Wen , ZHU Wei-yun*

(Laboratory of Gastrointestinal Microbiology , College of Animal Science and Technology , Nanjing Agricultural University , Nanjing 210095 , China)

Abstract: *In vitro* co-culture technique and DGGE were used to investigate the dynamics of microorganism populations and fermentation characters of co-cultures of rumen fungi and cellulolytic bacteria at different substrates (concentrate to crude ratio in treatment A to E was all rice straw , 3:7 , 5:5 , 7:3 and all corn , respectively). The results showed that , compared with 0h , fungal population density at 24h increased in treatment B and C , but decreased in treatment A and D , and no fungi was detected in treatment E ; but cellulolytic bacteria population at 24h increased with the increasing of concentrate to crude ratio. At the end of 48h fermentation , no fungi were detected in all treatments ; cellulolytic bacteria population increased from treatment A to treatment C , but decreased from treatment D. DGGE results showed that samples collected in treatment A , B and C had similar DGGE patterns with about 11 dominant bands , but dominant bands in treatment D and E decreased markedly compared to treatments A , B and C. With the increasing of concentrate to crude ratio , pH value of the co-culture decreased dramatically ($P < 0.05$). During the fermentation periods , acetate was the major VFA in co-culture , the acetate to propionate ratio decreased from treatment A to treatment C , but increased from treatment D. With the increasing of concentrate to crude ratio , the total VFA at 48h increased from treatment A to treatment C , and then decreased. At the end of 48h fermentation , CMCase activity and xylanase activity were highest in treatment A. α -Amylase activity increased from treatment A to treatment D , but treatment E was the lowest in all treatments.

Keywords : Rumen fungi ; Cellulolytic bacteria ; Co-cultures ; Concentrate to crude ratio ; Fermentation ; Microorganism populations

Foundation item : Key project of Science and Technology of Education Ministry (02119) ; Chinese National Nature Science Found (30371041)

* Corresponding author. Tel 86-25-84395523 ; Fax 86-25-84395314 ; E-mail zhuweiyunnjau@hotmail.com

Received : 5 July 2005 / Accepted : 7 September 2005 / Revised : 10 November 2005