



# 乳酸链球菌素对瘤胃体外发酵、甲烷生成及功能菌群数量的影响

申军士, 刘壮, 陈亚迎, 吕朋安, 朱伟云\*

江苏省消化道营养与动物健康重点实验室, 南京农业大学消化道微生物研究室, 江苏 南京 210095

**摘要:** 【目的】旨在通过体外静态模拟瘤胃发酵法研究乳酸链球菌素(NI)对瘤胃发酵、甲烷生成及功能菌群数量的影响。【方法】以不添加任何添加剂处理做阴性对照(NC), 以莫能菌素(MON, 5  $\mu\text{mol/L}$ )做阳性对照, 试验组NI添加水平分别为3 (NI-3)、9 (NI-9)和27 mg/100 mL (NI-27), 每个处理4个重复, 分别于培养后的0、3、6、9、12、24 h测定产气量和甲烷产量。培养24 h后, 采集发酵液样品, 用于发酵参数和菌群数量的测定。【结果】与NC组相比, 添加NI和MON均能显著降低产气量和甲烷产量( $P<0.05$ ); 添加NI对pH值、干物质消失率(DMD)和有机物消失率(OMD)无显著影响( $P>0.05$ ); NI-9处理组与NC组相比氨态氮浓度显著降低( $P<0.05$ ), 而NI-3和NI-27组氨氮浓度没有显著变化( $P>0.05$ ); 相比而言, MON处理组DMD、OMD和氨氮浓度与NC组相比均显著降低( $P<0.05$ ), 而pH值与其他各处理组相比没有差异( $P>0.05$ ); 与NC组相比, NI各处理组和MON组乙酸浓度及乙丙比均显著降低( $P<0.05$ ), 丙酸浓度显著提高( $P<0.05$ )。功能菌方面, *qPCR*结果显示添加NI和MON对总菌和拟杆菌门数量均无显著影响( $P>0.05$ ); 与NC相比, 添加NI对原虫、甲烷菌、真菌和厚壁菌门数量均无显著影响( $P>0.05$ ), 而MON组原虫、甲烷菌、真菌和厚壁菌门数量显著降低( $P<0.05$ ); NI和MON处理均显著提高了硫还原菌和*C. aminophilum*数量( $P<0.05$ ), 但*C. sticklandii*数量不受影响( $P>0.05$ )。【结论】添加适宜浓度的NI可降低瘤胃甲烷与氨的生成, 但并不影响饲料消化, 这种发酵模式的改变可能与瘤胃功能菌群数量与多样性的变化密切相关。

**关键词:** 乳酸链球菌素, 体外发酵, 甲烷, 发酵参数, 功能菌群

瘤胃微生物群落是反刍动物必不可少而独特的组成部分, 它通过不同微生物种群(细菌、真菌、原虫、甲烷菌等)的协同作用将摄入的饲料快

速降解转化, 为宿主提供挥发性脂肪酸、蛋白质和维生素等营养物质。然而, 在反刍动物瘤胃代谢过程中, 大约有2%–15%的饲料能量以甲烷的

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(31402101); 江苏省自然科学基金青年基金(BK20140696); 中央高校基本科研业务费专项资金(Y02015023)

\*通信作者。Tel: +86-25-84395523; E-mail: zhuweiyun@njau.edu.cn

收稿日期: 2015-11-23; 修回日期: 2016-02-12; 网络出版日期: 2016-03-11

形式被损失掉<sup>[1]</sup>, 而甲烷又是仅次于CO<sub>2</sub>的第二大温室气体; 同时, 由于饲料蛋白的降解产氨速率远超氨的利用速率, 导致25%–30%的饲料蛋白都以尿素的形式被排放<sup>[2]</sup>。因此, 反刍动物排放的甲烷和尿素不仅污染环境, 而且造成了饲料能量和蛋白的损失。离子载体莫能菌素(MON)对瘤胃发酵有较好的调控作用, 能抑制甲烷、氨以及乳酸的生成, 作为饲料添加剂可明显提高反刍动物生产性能<sup>[3]</sup>, 而抗生素存在的残留及耐药性问题令人担心, 今后其应用将受到更严格的限制。因此, 寻找既能降低甲烷生成, 又能提高饲料能量和蛋白利用效率的绿色添加剂是今后研究的重点。

乳酸链球菌素(NI), 商品名尼辛, 它是由一些乳酸链球菌产生的一种小分子多肽抗菌物质<sup>[4]</sup>。NI的作用主要是抑制革兰氏阳性菌的生长, 并能抑制芽胞杆菌属或梭状芽胞杆菌属孢子的形成, 由于其作用完后可被酶直接降解, 无残留, 使其成为抗生素的理想替代物<sup>[5]</sup>。NI对动物无毒, 并且已经被美国FDA批准在人类食品中使用, 也是目前研究最透彻的、唯一用于商业生产的细菌素。前人所做的体外研究结果表明NI能够在不影响挥发性脂肪酸产生的前提下抑制氨基酸的脱氨基及产甲烷作用<sup>[6]</sup>。然而, 有研究者怀疑NI会被瘤胃中的蛋白酶降解, 从而影响NI使用效果, 但Lee等研究表明, NI在瘤胃与微生物结合速度比其降解速度要快, 因此它可以被用来调控瘤胃发酵<sup>[7]</sup>。也有体内试验结果发现给绵羊日粮中添加适量NI会使甲烷排放降低10%<sup>[8]</sup>。尽管在前人的研究中, NI和MON均对瘤胃发酵表现出相似的效应, 但对于它们如何改变微生物群系还知之甚少。本试验利用体外静态模拟瘤胃发酵法, 通过添加不同浓度NI来探讨其对瘤胃发酵参数、甲烷生成及功能菌数量的影响, 旨在为NI在反刍动物生产上的应用提供理论科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

试验所用乳酸链球菌素(浙江新银象生物工程有限公司)标准品组成: 2.5%乳酸链球菌素、77.5% NaCl和20%脱脂奶粉; 活性:  $\geq 1 \times 10^6$  IU/g; 产品批号: 150514。莫能菌素为北京索莱宝科技有限公司生产的莫能菌素钠。发酵底物为0.5 g混合精料(玉米34%、豆粕16%)和0.5 g粉碎羊草。

### 1.2 试验设计

采用单因素多水平试验设计, 设阴性、阳性2个对照组和3个试验组。阴性对照(Negative control, NC)不添加任何添加剂; 阳性对照为莫能菌素(MON, 5  $\mu$ mol/L); 3个乳酸链球菌素(NI)试验组添加水平分别为3 (NI-3)、9 (NI-9)和27 mg/100 mL (NI-27)。每个处理4个重复。采用波杂山羊为瘤胃液供体, 进行体外发酵。

### 1.3 瘤胃液接种及体外培养

瘤胃液采自南京农业大学动物房3只健康成年波杂山羊[(25 $\pm$ 2) kg], 日粮精粗比为50:50(精料补充料500 g, 羊草与苜蓿干草各250 g), 每日8点和17点等量饲喂, 自由饮水。饲前按1:1:1的比例利用负压原理通过采集器经口腔采集瘤胃液保存于经39  $^{\circ}$ C预热并充满二氧化碳的自封袋内, 置于39  $^{\circ}$ C保温杯中, 并迅速带回实验室, 经搅拌后用4层纱布过滤, 过滤后的瘤胃液用来接种(在获取瘤胃液以及处理瘤胃液的过程中均需严格厌氧)。缓冲液参照Theodorou等<sup>[9]</sup>方法配制, pH调至7.00。将过滤后的瘤胃液在厌氧条件下与缓冲液充分混合(瘤胃液:缓冲液体积比10:90), 厌氧分装100 mL混合液于容积为180 mL的发酵瓶中, 置于39  $^{\circ}$ C恒温水浴箱中恒温培养24 h。

### 1.4 指标测定

发酵过程中动态测定0、3、6、9、12、24 h产气量与甲烷产量。参照Theodorou等<sup>[9]</sup>方法测定产气量; 参考Wang等<sup>[10]</sup>和Yang等<sup>[11]</sup>描述的气相色谱

谱法的条件使用气相色谱仪(GC-2014, Shimadzu, Japan)测定甲烷浓度,并结合产气量计算出甲烷产量;发酵24 h后立即从各发酵瓶取5 mL发酵液用pH计(Ecoscan pH 5, Singapore)测pH值。随后冰浴发酵瓶终止发酵,采集发酵液样品,冻存于-20 °C冰箱,待测氨态氮、挥发性脂肪酸(VFA)、干物质(DMD)及有机物质消失率(OMD)和功能菌群数量。

参照Weatherburn<sup>[12]</sup>方法,解冻样品后,4000 r/min离心10 min,取上清测定氨态氮浓度;参照马艳艳<sup>[13]</sup>方法测定DMD及OMD;参考秦为琳<sup>[14]</sup>方法测定VFA浓度,并进行适当的改进:样品12000 r/min离心10 min,上清液用水相滤膜(0.22 μm)过滤后用等量乙醚提取,然后使用气相色谱仪(7890A, Agilent, UK)进行测定。测定条件为:进样口加热器220 °C,压力26.1 psi,总流量169.72 mL/min,隔垫吹扫流量3 mL/min,分流比30:1,柱箱温150 °C,检测器温度250 °C,空气流量300 mL/min,氢气流量30 mL/min,尾吹气流量25 mL/min,载气为氮气。

## 1.5 功能菌群定量

### 1.5.1 DNA提取: 1 mL发酵液样品解冻后在

9000×g, 4 °C条件下离心5 min,弃上清加入1 mL CTAB (Hexadecyltrimethylammonium bromide, 十六烷基三甲基溴化铵)转移至镉珠管中,利用Bead Beat提取瘤胃微生物总DNA<sup>[15-16]</sup>。提取的发酵液微生物DNA使用Nanodrop 2000分光光度计(Thermo Fisher Scientific, Inc., Madison, Wisconsin, USA)测定DNA浓度(ng/μL)以及260 nm与280 nm OD 比值(1.8-2.0), -20 °C保存备用。

**1.5.2 Real-time PCR定量菌群:** 构建20 μL反应体系(10 μL SYBR GREEN、0.4 μL ROX、0.4 μL 引物F、0.4 μL引物R、6.8 μL双蒸水、2 μL模板),使用ABI7500 Real-time PCR仪对瘤胃发酵液中总菌、真菌、原虫、甲烷菌、硫还原菌(Sulfate-reducing bacteria, SRB)、厚壁菌门、拟杆菌门、斯氏梭菌(*Clostridium sticklandii*)和嗜胺梭菌(*Clostridium aminophilum*)进行定量分析。分别以总菌、厚壁菌门、拟杆菌门、*C. sticklandii*和*C. aminophilum*的16S rRNA基因,以真菌和原虫的18S rRNA基因,以甲烷菌的甲基辅酶M还原酶(mcrA)基因和硫还原菌的亚硫酸还原酶(*dsrA*)基因作为模板制作各目标菌定量的标准曲线。Real-time PCR引物序列见表1。

表1. 瘤胃目标微生物实时定量PCR引物序列

Table 1. Primers used for real-time qPCR of the rumen target organisms

Target organisms	Primers sequences (5'→3')	Annealing temp./°C	References
Total bacteria	F: CGGCAACGAGCGCAACCC R: CCATTGTAGCACGTGTGTAGCC	60	[17]
Fungi	F: GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTC R: CAAATTCACAAAGGGTAGGATGATT	60	[17]
Protozoa	F: GCTTCCGWTGGTAGTGTATT R: CTTGCCCTCYAATCGTWCT	54	[18]
Methanogens	F: TTCGGTGGATCDCARAGRGC R: GBARGTCGWA WCCGTAGAATCC	60	[19]
Sulfate-reducing bacteria (SRB)	F: CCAACATGCACGGYTCCA R: CGTCGAACTTGAACCTTGAACCTTGTAGG	60	[20]
Firmicutes	F: GGAGYATGTGGTTTAATTTCGAAGCA R: AGCTGACGACAACCATGCAC	60	[21]
Bacteroidetes	F: GGARCATGTGGTTTAATTTCGATGAT R: AGCTGACGACAACCATGCAG	60	[21]
<i>C. sticklandii</i>	F: ATCAAAGAATTTTCGGATAGG R: CAAGTTCACCAGTTTCAGAG	61	[22]
<i>C. aminophilum</i>	F: ACGGAAATTACAGAAGGAAG R: GTTCCAAAGCAATTCCAC	57	[22]

Real-time PCR反应条件: (1) 95 °C预变性 30 s; (2) 95 °C变性5 s, 60 °C退火和延伸30 s并采集荧光信号, 40个循环; (3) 熔解曲线分析, 60 °C升至95 °C, 60 °C保温1 min、95 °C保温15 s, 自动采集荧光。

## 1.6 数据分析

微生物定量数据经StepOne™ Software v2.2.2初步计算, 与其余各试验数据经Excel 2007初步整理后, 利用SAS 9.2广义线性模型(GLM)对所有指标进行方差分析和显著性分析, 采用Duncan法进行多重比较。同时, 采用正交多项式矩阵(Orthogonal polynomial contrasts)对NI不同剂量进行一次(linear)和二次(quadratic)效应分析。显著性水平为 $P<0.05$ 。

## 2 结果和分析

### 2.1 不同乳酸链球菌素水平下产气量和甲烷产量的变化

**2.1.1 产气量变化:** 由图1可知, 随发酵时间延长, 各处理组产气量呈逐渐上升趋势, 前9 h发酵较为迅速, 之后速度逐渐变缓。结合表2可知, 与

NC组相比, 随NI添加量的增加, 产气量线性降低( $P<0.05$ )。NI-3、NI-9、NI-27和MON组总产气量分别比NC组降低2.43%、6.35%、8.22%和18.31%, 且NI-9、NI-27和MON组的总产气量与NC组相比均显著下降( $P<0.05$ )。

**2.1.2 甲烷产量变化:** 由图2和表2可知, 随发酵时间延长, 各处理组甲烷产量均呈逐渐上升趋势。体外培养24 h后, 与NC组相比, 添加不同剂量NI均显著降低甲烷总产量( $P<0.05$ ), NI-3、NI-9和NI-27试验组甲烷产量分别比NC组降低14.5%、22.6%、29.0%, 但甲烷产量都显著高于MON组( $P<0.05$ )。NI各试验组中甲烷减少量占总产气减少量比例分别为83.7%、50.0%和49.7%, 而MON组中这一比例仅为32.8%。

### 2.2 不同乳酸链球菌素水平下瘤胃发酵参数的变化

**2.2.1 pH值变化:** 由表2可知, 体外培养24 h后, 与NC组相比, 各NI试验组和MON组的pH值均无显著变化( $P>0.05$ )。

**2.2.2 干物质(DMD)及有机物消失率(OMD)变化:** 由表2可知, 与NC组相比, 各NI试验组DMD及OMD均无显著变化( $P>0.05$ ), 而MON组DMD及OMD均显著降低( $P<0.05$ )。

表2. 乳酸链球菌素对体外发酵24 h总产气量、甲烷产量、pH、氨氮浓度、DM和OM消化率的影响

Table 2. Effects of nisin on total gas and methane production, pH, ammonia concentration, DM and OM digestibility in the *in vitro* rumen mixed cultures at 24 h

Items	MON	NC	NI-3	NI-9	NI-27	SEM	P-value		
							Trt	Linear	Quadratic
Total gas /mL	144.1 <sup>d</sup>	176.4 <sup>a</sup>	172.1 <sup>ab</sup>	165.2 <sup>bc</sup>	161.9 <sup>c</sup>	3.0	<0.01	<0.01	0.11
Methane /mL	14.2 <sup>c</sup>	24.8 <sup>a</sup>	21.2 <sup>b</sup>	19.2 <sup>c</sup>	17.6 <sup>d</sup>	0.4	<0.01	<0.01	<0.01
TG-M /mL	129.9 <sup>b</sup>	151.6 <sup>a</sup>	150.9 <sup>a</sup>	146.0 <sup>a</sup>	144.3 <sup>a</sup>	2.8	<0.01	0.07	0.38
pH value	6.71	6.70	6.69	6.71	6.71	0.01	0.44	0.25	0.80
NH <sub>3</sub> -N /(mg/dL)	11.5 <sup>c</sup>	12.9 <sup>a</sup>	12.6 <sup>ab</sup>	12.2 <sup>b</sup>	12.6 <sup>ab</sup>	0.2	<0.01	0.40	0.04
DMD /%	47.5 <sup>b</sup>	51.7 <sup>a</sup>	51.9 <sup>a</sup>	51.9 <sup>a</sup>	51.9 <sup>a</sup>	0.4	<0.01	0.77	0.74
OMD /%	48.0 <sup>b</sup>	52.9 <sup>a</sup>	53.1 <sup>a</sup>	52.8 <sup>a</sup>	52.7 <sup>a</sup>	0.4	<0.01	0.59	1.00

MON, monensin 5 μmol/L; NC, negative control (no additives); NI-3, nisin 3 mg/100 mL; NI-9, nisin 9 mg/100 mL; NI-27, nisin 27 mg/100 mL; SEM, standard error means; Trt, treatment; TG-M, Total gas – methane; <sup>a-d</sup>means within a row with different superscripts differ ( $P<0.05$ ). The same as follows.

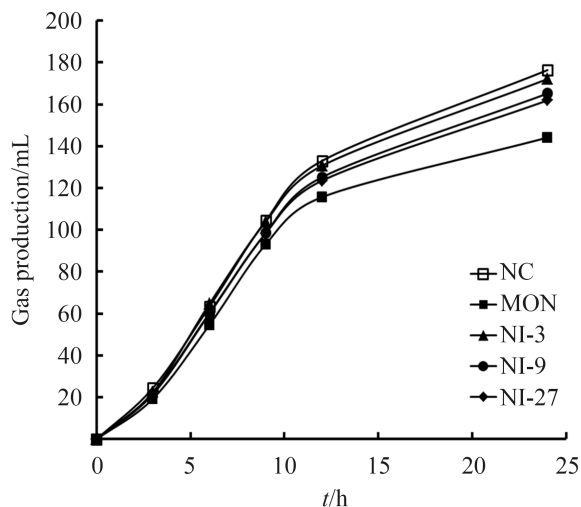


图 1. 乳酸链球菌素对体外发酵24 h产气量动态变化的影响

Figure 1. Effects of nisin on the dynamic change of gas production in 24 h of *in vitro* fermentation.

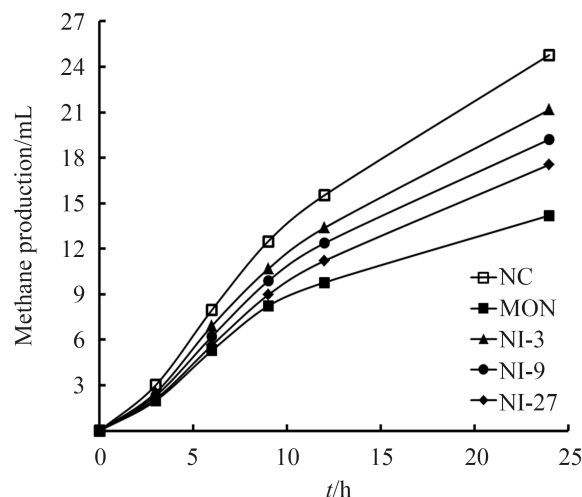


图 2. 乳酸链球菌素对体外发酵24 h甲烷产量动态变化的影响

Figure 2. Effects of nisin on the dynamic change of methane production in 24 h of *in vitro* fermentation.

**2.2.3 氨态氮浓度变化:** 由表 2 可知, 各试验组氨态氮浓度随 NI 添加水平的提高而先降低后升高, 但整体呈现降低的趋势, 且 NI-9 组显著低于 NC 组 ( $P < 0.05$ )。相对于 NC 组, NI-3、NI-9、NI-27 和 MON 组的氨态氮浓度分别降低了 2.33%、5.43%、2.33% 和 10.85%, 但各 NI 试验组氨态氮浓度均显著高于 MON 组 ( $P < 0.05$ )。

**2.2.4 挥发性脂肪酸(VFA)浓度变化:** 由表 3 可

知, 体外发酵 24 h 后, 与 NC 组相比, MON 组和 NI 各试验组总 VFA 浓度均显著降低 ( $P < 0.05$ ); NI 各试验组丙酸浓度均显著提高 ( $P < 0.05$ ), 乙酸浓度及乙丙比显著降低 ( $P < 0.05$ ), 并呈极显著的剂量效应 ( $P < 0.01$ ); 添加各水平 NI 均显著降低了丁酸和戊酸的浓度 ( $P < 0.05$ ); NI-9 和 NI-27 组显著降低了总支链挥发性脂肪酸 (BCVFA)、异戊酸和异丁酸浓度 ( $P < 0.05$ ), NI-3 组无显著作用 ( $P > 0.05$ )。

表 3. 乳酸链球菌素对体外发酵 24 h 挥发性脂肪酸浓度的影响

Table 3. Effects of nisin on volatile fatty acid (VFA) concentration in the *in vitro* rumen mixed cultures at 24 h.

Items	MON	NC	NI-3	NI-9	NI-27	SEM	P-value		
							Trt	Linear	Quadratic
Total VFA /(mmol/L)	118.5 <sup>c</sup>	137.0 <sup>a</sup>	127.2 <sup>b</sup>	124.1 <sup>bc</sup>	125.2 <sup>b</sup>	1.9	<0.01	0.01	<0.01
Acetate /(mmol/L)	68.0 <sup>d</sup>	87.7 <sup>a</sup>	77.0 <sup>b</sup>	72.9 <sup>c</sup>	70.7 <sup>cd</sup>	1.0	<0.01	<0.01	<0.01
Propionate /(mmol/L)	41.8 <sup>a</sup>	34.2 <sup>c</sup>	37.4 <sup>b</sup>	39.1 <sup>b</sup>	42.6 <sup>a</sup>	0.6	<0.01	<0.01	0.03
Isobutyrate /(mmol/L)	0.99 <sup>c</sup>	1.44 <sup>a</sup>	1.35 <sup>ab</sup>	1.28 <sup>b</sup>	1.37 <sup>ab</sup>	0.04	<0.01	0.56	0.02
Butyrate /(mmol/L)	6.15 <sup>c</sup>	11.08 <sup>a</sup>	9.13 <sup>b</sup>	8.83 <sup>b</sup>	9.09 <sup>b</sup>	0.20	<0.01	<0.01	<0.01
Isovalerate /(mmol/L)	1.29 <sup>b</sup>	2.16 <sup>a</sup>	2.03 <sup>ab</sup>	1.76 <sup>ab</sup>	1.34 <sup>b</sup>	0.16	<0.01	<0.01	0.52
Valerate /(mmol/L)	0.32 <sup>b</sup>	0.65 <sup>a</sup>	0.30 <sup>b</sup>	0.29 <sup>b</sup>	0.29 <sup>b</sup>	0.05	<0.01	<0.01	<0.01
Acetate/Propionate	1.63 <sup>d</sup>	2.57 <sup>a</sup>	2.06 <sup>b</sup>	1.87 <sup>c</sup>	1.66 <sup>d</sup>	0.02	<0.01	<0.01	<0.01
Total BCVFA /(mmol/L)	2.16 <sup>c</sup>	3.63 <sup>a</sup>	3.38 <sup>ab</sup>	2.95 <sup>b</sup>	2.80 <sup>b</sup>	0.20	<0.01	0.02	0.14

与NC组相比, MON组丙酸浓度显著提高( $P<0.05$ ), 其余各项挥发酸均显著降低( $P<0.05$ ), 此趋势与NI的作用趋势相同。

### 2.3 不同乳酸链球菌素水平下功能菌群数量的变化

由表4可知, 与NC组相比, NI各试验组和MON组中总菌数量数值上有降低, 但差异并不显著( $P>0.05$ ); NI各试验组原虫、真菌和甲烷菌数量与NC组相比均无显著变化( $P>0.05$ ), 而SRB的数量有逐渐升高的趋势, 并且NI-27剂量组SRB数量显著高于NC组( $P<0.05$ ), MON组中原虫、真菌和甲烷菌的数量显著低于其他各处理组( $P<0.05$ ), SRB数量与NC组相比显著升高( $P<0.05$ ); NI各试验组中厚壁菌门和拟杆菌门数量与NC组相比均无显著变化( $P>0.05$ ), 而MON组中厚壁菌门数量显著低于其他各处理组( $P<0.05$ ), 但拟杆菌门数量无显著变化( $P>0.05$ ); NI各试验组和MON组中*C. sticklandii*数量与NC组相比均无显著变化( $P<0.05$ ), 而*C. aminophilum*数量显著提高( $P<0.05$ ), 并随NI添加量的递增而显著升高( $P<0.05$ )。

## 3 讨论

乳酸链球菌素(NI)和莫能菌素(MON)的化学结构与性质有很大差异, 但它们均可使得离子穿

过细胞膜。NI的抑菌作用类似阳离子表面活性剂, 它直接作用于细胞膜, 与细胞膜上的磷脂蛋白相结合, 并在细胞膜上形成孔道造成细胞膜结构变化或引起膜通透性改变, 从而破坏细胞质膜<sup>[23]</sup>。MON是一种环形的离子载体, 它携带许多单价的金属离子穿过微生物的细胞膜, 通过改变细胞膜的离子转运, 引起膜内外离子平衡的改变<sup>[24]</sup>。NI和MON的抑菌作用均具有选择性, 并且主要对革兰氏阳性菌起作用。前人体外研究发现NI和MON对瘤胃发酵调控表现出了相似的效应<sup>[25]</sup>, 体内试验也发现NI具有良好的甲烷减排效果<sup>[8]</sup>, 但对于它们如何改变微生物菌群进而调控瘤胃发酵还知之甚少。本研究通过qPCR技术对瘤胃功能菌群进行定量, 初步探讨了NI对瘤胃发酵调控的微生物机制。

有研究表明, 饲料OMD与体外培养时的产气量具有高度相关性, 产气量高, 说明饲料在瘤胃内的发酵程度高, 同时也可反映瘤胃微生物活性的强弱<sup>[26]</sup>。本研究发现, 试验组中甲烷减少量占总产气减少量比例为50%左右甚至更高, 说明总产气量的减少有一半以上是由于甲烷减少而造成的, 去除甲烷的影响后, 试验组的剩余气量、OMD和DMD的变化均不显著, 表明NI并不影响体外发酵的产气量、OMD和DMD; 相反, MON

表4. 乳酸链球菌素对体外发酵24 h功能菌群数量的影响

Table 4. Effects of nisin on microbial populations (log copy numbers /mL) in the *in vitro* rumen mixed cultures at 24 h

Items	MON	NC	NI-3	NI-9	NI-27	SEM	P-value		
							Trt	Linear	Quadratic
Total bacteria	12.27	12.48	12.35	12.27	12.38	0.10	0.54	0.70	0.11
Fungi	7.48 <sup>b</sup>	9.07 <sup>a</sup>	9.13 <sup>a</sup>	8.92 <sup>a</sup>	8.93 <sup>a</sup>	0.09	<0.01	0.09	0.30
Protozoa	9.64 <sup>b</sup>	9.99 <sup>a</sup>	10.04 <sup>a</sup>	9.94 <sup>ab</sup>	10.12 <sup>a</sup>	0.12	0.08	0.29	0.42
Methanogens	9.52 <sup>b</sup>	10.01 <sup>a</sup>	9.96 <sup>a</sup>	9.87 <sup>a</sup>	9.93 <sup>a</sup>	0.10	0.02	0.60	0.28
SRB	8.28 <sup>ab</sup>	8.16 <sup>c</sup>	8.15 <sup>c</sup>	8.22 <sup>bc</sup>	8.35 <sup>a</sup>	0.03	<0.01	<0.01	0.95
Firmicutes	10.98 <sup>b</sup>	11.51 <sup>a</sup>	11.35 <sup>a</sup>	11.27 <sup>a</sup>	11.31 <sup>a</sup>	0.09	0.02	0.18	0.08
Bacteroidetes	12.16	12.38	12.30	12.28	12.26	0.07	0.33	0.27	0.40
<i>C. sticklandii</i>	5.83	5.79	5.79	5.79	5.83	0.06	0.98	0.40	0.75
<i>C. aminophilum</i>	8.24 <sup>a</sup>	6.83 <sup>d</sup>	7.12 <sup>c</sup>	7.51 <sup>b</sup>	8.34 <sup>a</sup>	0.08	<0.01	<0.01	0.06

SRB: sulfate-reducing bacteria.

组产气量、OMD和DMD较NC组均显著下降,且甲烷减少量占总产气减少量比例仅为32%,表明MON抑制了饲料的降解和瘤胃微生物的正常活动,对瘤胃的副作用更大,此结果与Wallace等<sup>[3]</sup>一致。厚壁菌门和拟杆菌门作为消化道中主要的能量供体微生物,能降解包括果胶、纤维素、半纤维素等在内的非淀粉多糖,生成短链脂肪酸,主要是乙酸、丙酸和丁酸,还有氢气和二氧化碳等<sup>[27]</sup>。由于厚壁菌门多数为革兰氏阳性菌,拟杆菌门大多为革兰氏阴性菌,本试验观察到受MON影响厚壁菌门数量显著降低而拟杆菌门未受影响,而添加NI对厚壁菌门和拟杆菌门数量均无影响,表明相对于NI,厚壁菌门对MON的敏感性更高。

本研究发现,添加NI和MON均显著地抑制了甲烷的产生,并在NI试验组中呈极显著的剂量效应,此结果与Callaway<sup>[25]</sup>、王华<sup>[28]</sup>所得结果一致。反刍动物甲烷产量除与甲烷菌数量和种类密切相关以外,其它微生物也能通过参与氢气代谢或者影响甲烷菌或微生物群里的其他功能菌的数量来对甲烷生成产生影响<sup>[29]</sup>。瘤胃中有诸多产甲烷菌,其中与原虫共生的产甲烷菌甲烷产量占瘤胃总甲烷产量的9%–25%<sup>[30]</sup>,共生甲烷菌从原虫及其他微生物的代谢产物中获取氢合成甲烷。有研究发现,47%的甲烷排放变化可以由原虫的数量变化解释,表明原虫在产甲烷的过程中扮演了催化剂的角色<sup>[29]</sup>。在本次试验中,MON显著地降低了发酵液中甲烷菌和原虫的数量,而NI并未对甲烷菌和原虫数量产生显著影响,与甲烷产量变化不一致。分析原因可能是NI对原虫的抑制作用具有选择性,与甲烷菌共生关系较强的原虫受到了抑制,使得剩余的共生关系较弱的原虫数量有了一定的增长;此外,NI对甲烷菌也可能具有选择性抑制作用,活性较高的甲烷菌受到抑制,活性较低的甲烷菌变为优势菌群,使得整体的甲烷菌数量并未显著降低,其中的机理还待进一步研

究。在厌氧环境中,硫还原菌(SRB)会与甲烷菌竞争共同的底物(氢气、甲酸和乙酸)。本试验中,MON和NI均升高了SRB的数量,其原因可能是产甲烷的减弱造成了氢气的积累,进而提高了SRB的丰度。在瘤胃中,真菌和甲烷菌也存在协同作用,甲烷菌利用真菌的发酵产物( $H_2$ 、 $CO_2$ 等)生成甲烷,本研究发现MON组真菌数量显著降低,说明MON也可通过抑制真菌等氢产生菌来减少甲烷的产生,而NI对真菌数量没有显著影响。

瘤胃发酵所产生的VFA是反刍动物的重要能量来源。本研究发现,添加NI和MON后,总VFA产量均显著降低,但NI各试验组与NC组相比,消化率无显著差异,此结果与瘤胃内的复杂代谢相关,瘤胃内代谢途径繁多,尽管NI抑制了VFA的生成,但可能并未抑制其他的代谢途径,瘤胃代谢之间的补偿效应保证了饲料的消化。乙酸浓度降低,丙酸升高,乙丙比降低,说明NI和MON均改变了瘤胃发酵模式,这与Callaway等<sup>[25]</sup>、Wallace等<sup>[3]</sup>所报道的结果相一致。NI降低了总VFA,这与王华<sup>[28]</sup>的结果不一致,可能是由于样品来源不同或底物组成的差异所致。丙酸与甲烷生成量之间呈负相关,甲烷生成受到抑制时可导致氢积累,会转移到其他的氢利用途径,比如丙酸和丁酸合成途径。本试验发现,相对于NC组,各NI组和MON组丙酸浓度均显著增加,同时甲烷产量也显著降低,说明NI和MON处理使瘤胃内更多的氢被转移到丙酸的合成过程,从而提高了丙酸浓度。丙酸浓度的提高意味着糖异生作用的增强,说明NI和MON均可通过改变瘤胃的发酵作用来促进饲料能量的利用,并且减少甲烷的产生,而这种变化可能与瘤胃功能菌群数量和多样性的变化密切相关。

瘤胃液中的氨态氮浓度是瘤胃内环境参数的一个重要指标,反映了瘤胃内微生物氮的供应状况。本试验中添加NI和MON均使得发酵液中氨氮浓度显著降低,这与Oeztuerk等<sup>[31]</sup>研究结果相一

致,其原因可能是NI和MON通过抑制瘤胃内微生物对氨基酸的脱氨基作用,从而减少氨的产量。然而,NI降低氨的程度不如MON组降低的明显,这可能是因为瘤胃内脱氨基微生物对MON的敏感性更强。瘤胃原虫对蛋白降解有十分显著的作用,去除原虫会导致瘤胃氨氮浓度的降低<sup>[32]</sup>。本试验观察到原虫数量与氨氮浓度的变化是一致的,也证实了原虫与氨氮浓度的相关关系。此外,本试验测定了发酵液中2株高效产氨菌(Hyper ammonia-producing bacteria, HAB) *C. sticklandii*和 *C. aminophilum*的数量。结果显示添加MON和NI均使得*C. aminophilum*显著增加,而*C. sticklandii*则无显著变化,这与氨氮浓度降低的结果不一致。其原因一方面可能与HAB产生抗性有关,有研究表明*C. aminophilum*可通过改变细胞结构来对抗MON<sup>[33]</sup>。另一方面可能是MON和NI抑制了瘤胃中存在的其他HAB,进而降低了氨氮浓度。申军士等<sup>[34]</sup>综述前人研究结果推测大量未纯培养的HAB可能还没有被发现,而它们在瘤胃脱氨基产氨过程中又可能起着非常重要的作用。支链挥发性脂肪酸(BCVFA)和戊酸是氨基酸脱氨基的产物,本研究发现相对于NC组,MON组和NI试验组的BCVFA和戊酸均显著降低,表明NI和MON可通过抑制微生物对氨基酸的脱氨基作用,进而降低氨氮浓度。

## 4 结论

综上所述,适宜浓度的NI和MON处理均可以改变瘤胃发酵类型,增加丙酸摩尔浓度,降低瘤胃氨氮浓度,但与MON相比,NI能在显著抑制甲烷生成的同时而不影响饲料消化,这种发酵模式的改变可能与瘤胃功能菌群数量与多样性的变化密切相关。尽管如此,对NI来说,体外试验终究与实际生产条件有很大差异。因此,仍需要更多的体内试验对NI的作用效果及机理作进一步的探究。

## 参考文献

- [1] Johnson KA, Johnson DE. Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*, 1995, 73(8): 2483–2492.
- [2] Lobley GE, Bremner DM, Zuur G. Effects of diet quality on urea fates in sheep as assessed by refined, non-invasive<sup>[15N15N]</sup> urea kinetics. *British Journal of Nutrition*, 2000, 84(4): 459–468.
- [3] Wallace RJ, Czerkawski JW, Breckenridge G. Effect of monensin on the fermentation of basal rations in the rumen simulation technique (Rusitec). *British Journal of Nutrition*, 1981, 46(1): 131–148.
- [4] Harris LJ, Fleming HP, Klaenhammer TR. Developments in nisin research. *Food Research International*, 1992, 25(1): 57–66.
- [5] Ren LY, Yang YY, Zhang JM, Yi HX, Zhang LW. Advance on antibacterial mechanism of lactic acid bacteria antimicrobial peptides. *China Food Additives*, 2015, (1): 143–149. (in Chinese)  
任璐雅, 杨艳艳, 章检明, 易华西, 张兰威. 乳酸菌抗菌肽(细菌素)抗菌机理的研究进展. *中国食品添加剂*, 2015, (1): 143–149.
- [6] Sar C, Santoso B, Mwenya B, Gamo Y, Kobayashi T, Morikawa R, Kimura K, Mizukoshi H, Takahashi J. Manipulation of rumen methanogenesis by the combination of nitrate with  $\beta$ 1–4 galacto-oligosaccharides or nisin in sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 2004, 115(1/2): 129–142.
- [7] Lee SS, Mantovani HC, Russell JB. The binding and degradation of nisin by mixed ruminal bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, 42(3): 339–345.
- [8] Santoso B, Mwenya B, Sar C, Gamo Y, Kobayashi T, Morikawa R, Kimura K, Mizukoshi H, Takahashi J. Effects of supplementing galacto-oligosaccharides, *Yucca schidigera* or nisin on rumen methanogenesis, nitrogen and energy metabolism in sheep. *Livestock Production Science*, 2004, 91(3): 209–217.
- [9] Theodorou MK, Williams BA, Dhanoa Ms, McAllan AB, France J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 1994, 48(3/4): 185–197.
- [10] Wang XF, Mao SY, Liu JH, Zhang LL, Cheng YF, Jin W, Zhu WY. Effect of the gynosaponin on methane production and microbe numbers in a fungus-methanogen co-culture. *Journal of Animal Feed Science*, 2011, 20(2): 272–284.
- [11] Yang CJ, Mao SY, Long LM, Zhu WY. Effect of disodium fumarate on microbial abundance, ruminal fermentation and



- methane emission in goats under different forage: concentrate ratios. *Animal*, 2012, 6(11): 1788–1794.
- [12] Weatherburn MW. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry*, 1967, 39(8): 971–974.
- [13] Ma YY, Cheng YF, Zhu WY. Different origins and stubbles of alfalfa: evaluation of nutritive value by an *in vitro* fermentation method. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2014, 26(8): 2421–2432. (in Chinese)  
马艳艳, 成艳芬, 朱伟云. 体外发酵法评价不同产地、不同茬次苜蓿的营养价值. *动物营养学报*, 2014, 26(8): 2421–2432.
- [14] Qin WL. Determination of rumen volatile fatty acids by means of gas chromatography. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 1982, 5(4): 110–116. (in Chinese)  
秦为琳. 应用气相色谱测定瘤胃挥发性脂肪酸方法的研究改进. *南京农业大学学报*, 1982, 5(4): 110–116.
- [15] Zoetendal EG, Akkermans ADL, De Vos WM. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(10): 3854–3859.
- [16] Bürgmann H, Pesaro M, Widmer F, Zeyer J. A strategy for optimizing quality and quantity of DNA extracted from soil. *Journal of Microbiological Methods*, 2001, 45(1): 7–20.
- [17] Denman SE, McSweeney CS. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. *FEMS Microbiology Ecology*, 2006, 58(3): 572–582.
- [18] Sylvester JT, Karnati SKR, Yu Z, Karnat M, Karnat JL. Development of an assay to quantify rumen ciliate protozoal biomass in cows using real-time PCR. *Journal of Nutrition*, 2004, 134(12): 3378–3384.
- [19] Denman SE, Tomkins NW, McSweeney CS. Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 62(3): 313–322.
- [20] Devkota S, Wang Y, Musch MW, Leone V, Fehlner-Peach H, Nadimpalli A, Antonopoulos DA, Jabri B, Chang EB. Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in  $10^{-6}$  mice. *Nature*, 2012, 487(7405): 104–108.
- [21] Guo XL, Xia XJ, Tang RY, Wang KN. Real-time PCR quantification of the predominant bacterial divisions in the distal gut of Meishan and Landrace pigs. *Anaerobe*, 2008, 14(4): 224–228.
- [22] Patra AK, Yu ZT. Effects of vanillin, quillaja saponin, and essential oils on *in vitro* fermentation and protein-degrading microorganisms of the rumen. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(2): 897–905.
- [23] Jack RW, Tagg JR, Ray B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiology Review*, 1995, 59: 171–200.
- [24] Pressman BC. Biological applications of ionophores. *Annual Review of Biochemistry*, 1976, 45: 501–530.
- [25] Callaway TR, Carneiro AMS, De Melo C, Russell JB. The effect of nisin and monensin on ruminal fermentations *in vitro*. *Current Microbiology*, 1997, 35(2): 90–96.
- [26] Menke KH, Steingass H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research Development*, 1988, 28: 7–55.
- [27] Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 2006, 444(7122): 1022–1023.
- [28] Wang H, Li XZ, Yan CG, Jin HD, Zhou W, Liu ZG. Effects of nisin on rumen *in vitro* fermentation, methanogenesis of Yanbian cattle. *Feed Research*, 2011, 12: 55–56, 59. (in Chinese)  
王华, 李香子, 严昌国, 金辉东, 周薇, 刘志刚. 尼辛对延边黄牛瘤胃体外发酵与甲烷生成的影响. *饲料研究*, 2011, (12): 55–56, 59.
- [29] Morgavi DP, Forano E, Martin C, Newbold CJ. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal*, 2010, 4(7): 1024–1036.
- [30] Newbold CJ, Lassalas B, Jouany JP. The importance of methanogens associated with ciliate protozoa in ruminal methane production *in vitro*. *Letters in Applied Microbiology*, 1995, 21(4): 230–234.
- [31] Oeztuerk H, Emre B, Sagmanligil V, Piskin I, Fidanci UR, Pekcan M. Effects of nisina and propolis on ruminal fermentation *in vitro*. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 2010, 9(21): 2752–2758.
- [32] Firkins JL, Yu Z, Morrison M. Ruminal nitrogen metabolism: perspectives for integration of microbiology and nutrition for dairy. *Journal of Dairy Science*, 2007, 90(S): E1–E16.
- [33] Rychlik JL, Russell JB. The adaptation and resistance of *Clostridium aminophilum* F to the butyrylvibriocin-like substance of *Butyrivibrio fibrisolvens* JL5 and monensin. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, 209(1): 89–94.
- [34] Shen JS, Mao SY, Zhu WY. Ruminal hyper ammonia producing bacteria in ruminants: community structure, function and its manipulation. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2015, 27(8): 2323–2327. (in Chinese)  
申军士, 毛胜勇, 朱伟云. 反刍动物瘤胃高效产氨菌菌群结构、功能及其调控. *动物营养学报*, 2015, 27(8): 2323–2327.

# Effects of nisin on *in vitro* fermentation, methanogenesis and functional microbial populations of the rumen

Junshi Shen, Zhuang Liu, Yaying Chen, Peng'an Lv, Weiyun Zhu\*

Laboratory of Gastrointestinal Microbiology, Jiangsu Key Laboratory of Gastrointestinal Nutrition and Animal Health, College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China

**Abstract:** [Objective] This study was conducted to evaluate the effects of nisin on *in vitro* fermentation, methanogenesis and functional microbial populations of the rumen. [Methods] The negative control did not contain any additives. Monensin (5  $\mu\text{mol/L}$ ) was added as positive control. Nisin was added at 3 doses: 3 (NI-3), 9 (NI-9), and 27 mg/100 mL (NI-27). Each treatment contained 4 replicates. Gas and methane production was measured at 0, 3, 6, 9, 12, and 24 h after incubation. Samples of culture were collected at 24 h, and used to measure rumen fermentation parameters and functional microbial populations. [Results] Compared with negative control, both nisin and monensin addition dramatically reduced gas and methane production ( $P < 0.05$ ). Nisin addition had no effect on pH, dry matter degradability, and organic matter degradability ( $P > 0.05$ ). Ammonia concentration was reduced by NI-9 ( $P < 0.05$ ), but was not influenced by NI-3 and NI-27 ( $P > 0.05$ ). In contrast, monensin addition significantly lowered dry matter degradability, organic matter degradability, and ammonia concentration ( $P < 0.05$ ), but had no influence on pH ( $P > 0.05$ ). Compared with negative control, both nisin and monensin addition significantly reduced acetate concentration and acetate-propionate ratio ( $P < 0.05$ ), and increased propionate concentration ( $P < 0.05$ ). Quantitative real-time PCR results showed that both nisin and monensin addition had no effects on the populations of total bacteria and Bacteroides ( $P > 0.05$ ). Compared with negative control, the populations of protozoa, methanogens, fungi and Firmicutes were not influenced by nisin ( $P > 0.05$ ), but were significantly reduced by monensin addition ( $P < 0.05$ ). Both nisin and monensin addition significantly increased the populations of sulfur-reducing bacteria and *Clostridium aminophilum* ( $P < 0.05$ ), but had no influence on the population of *Clostridium sticklandii* ( $P > 0.05$ ). [Conclusion] Appropriate nisin addition could reduce methanogenesis and ammoniogenesis, while had no adverse effect on feed digestion. These effects are probably associated with the variation of rumen functional microbial populations and communities.

**Keywords:** nisin, *in vitro*, methane, fermentation parameter, functional microbiota

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China for the Youth (31402101), by the Jiangsu Provincial Natural Science Foundation for the Youth (BK20140696), and by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (Y02015023)

\*Corresponding author. Tel: +86-25-84395523; E-mail: zhuweiyun@njau.edu.cn

Received: 23 November 2015; Revised: 12 February 2016; Published online: 11 March 2016