7卷　4期
1995年10月

动物营养学报
ACTA ZOONUTRIMENTA SINICA

Vol.7, No.4, 33~37
Oct. 1995

应用羊粪液取代瘤胃液两级离体消化试验的探索

吴天星　　　彭大惠　杨诗兴
(浙江农业大学，杭州，310029)　(中国农业科学院兰州畜牧所，兰州，750004)

摘要　应用羊粪液法和瘤胃液法两级离体消化试验的配对比较，通过七次不同日期所做的配对试验，测得同一种标准苜蓿草粉干物质消化率平均值分别为 56.40 ± 1.78%和 56.64±3.53%，两者差异不显著（$P>0.05$）。测得 32 种饲草的干物质消化率平均值分别为 52.54±10.16%和 53.12±10.74%，差异亦不显著（$P>0.05$）。瘤胃液法测得的消化率（Y）和羊粪液测得相应结果（X）呈高度相关（$r=0.97$，$P<0.01$）。它们的直线回归方程为：$Y=1.022X-0.598$　$n=32$，$RSD=2.77$。上述结果可为羊粪液离体消化试验的完善和应用提供参考。

关键词　体外消化　绵羊　粪微生物　瘤胃微生物

埃及学者 Share 等（1987）报告，应用羊粪液进行两级离体消化试验（in vitro）测定 38 种牧草的消化率和上述牧草在常规消化试验（in vivo）所得的相应结果有强相关（$r=0.89$，$P<0.01$），其直线回归方程为 in vivo = 1.003 × in vitro。两级离体消化试验经 Tilley 和 Terry（1963）多年的多方面的验证，已被公认为间接测定饲草常规体外消化率的一种比较可靠的方法。但是此法要求采集反刍动物瘤胃液，必须有相应的瘤胃瘘管羊，对试验条件和工作量都有较高的要求。而羊粪液来源方便，处理简单，易于操作，对两级离体消化法的推广应用较有利。本研究以羊粪液法和瘤胃液法进行两级离体消化配对试验来测定牧草干物质消化率，为羊粪液法代替瘤胃液法，进而广泛应用于反刍动物饲草营养价值评定及放牧采食量的研究提供科学依据。

1　材料和方法

配对试验包括对照组和试验组，其中对照组为 Tilley 和 Terry（1963）所报道的常规瘤胃液法两级离体消化试验，试验组将第一级消化试验中的瘤胃液改成羊粪液。

1.1　羊粪液的制备

将 3 只采集瘤胃液的瘘管羊加挂集粪袋，收集其 1 小时内排泄的粪样混合均匀，将新鲜羊粪在瓷盘中研细后，加入经预热的 Kansas 缓冲营养液，它包括 A 液和 B 液。

A 液组成为：KH_2PO_4，10g / l；$MgSO_4 \cdot 7H_2O$，0.5g / l；NaCl，0.5g / l；$CaCl \cdot H_2O$，0.1g / l。

B 液组成为：Na_2CO_3，15.0g / 100ml，$Na_2S \cdot 9H_2O$，1.0g / 100ml。使用时，每 1000ml A

收稿日期：　1994－02－22

液和 20ml B 液混匀即成。

在瓷盘中制备羊粪液时，每 50g 鲜粪加入 300ml 缓冲液，通过 4 层纱布滤入保温瓶内，并通入 CO_2 调节 pH 值在 6.8～6.9 范围内即可备用。

试验组羊粪液和样品量设立三个组合：

①200mg 样品量和 20ml 羊粪液；

②350mg 样品量和 30ml 羊粪液；

③500mg 样品量和 40ml 羊粪液。

1.2 试验设计

试验包括三个方面：

①在上述 3 种条件下使用羊粪液法两级离体消化试验测定 6 种牧草的干物质消化率。

②试验组和对照组分别用 7 次不同日期采集的瘤胃液和羊粪液下测定同一种标准苜蓿草粉的消化率；

③试验组和对照组配对试验，测定 32 种饲草的干物质消化率。

1.3 胃蛋白酶

选用郑州生物制药厂生产的胃蛋白酶，其活性为 1∶10000 即一个酶分子在一分钟内能催化 10000 个底物分子。

1.4 体外消化试验操作步骤

①称取测定样品 500mg(精确到 0.0001g)，投入 50ml 玻璃离心管内。每个样品做 3 个重复测定，每批样品的测定设置 4 个空白管，4 至 5 个培养管作标准苜蓿草粉的干物质消化率测定。

②每个培养管内加入 30ml Kansas 缓冲营养液，置于 39℃水浴锅内的培养架上预热。

③预热后，每个培养管加入 10ml 瘤胃液，或等量羊粪液，同时向培养管液面充二氧化碳气体，塞上橡皮塞，然后放于 39℃培养箱内进行培养。

④在放入培养箱后的第 2、4、6、8、10、24 小时，分别轻轻摇动离心管，使样品颗粒均匀分散于消化液中。

⑤经 48 小时培养以后，从培养箱内取出培养管，揭去塞子，分别加入 3ml 酸性胃蛋白酶(每 100ml 3N 盐酸溶解 10g 胃蛋白酶配制而成)，将离心管摇动均匀，使 pH 值控制在 1.2～1.5 的范围内，然后放置于 40℃的培养箱内。

⑥在加入胃蛋白酶后，分别在第 2、4、6、8、10、24 小时，各摇动一次。

⑦经 48 小时的胃蛋白酶消化后，每个离心管加入 5%$HgCl_2$ 溶液 1ml，以停止胃蛋白酶的消化作用。

⑧将培养管在离心机上以 3500rpm 离心 10 分钟，小心倾倒上清液。再加蒸馏水 30ml 以同样速度和时间再离心一次，倾倒上清液，放置于 105℃烘箱内烘至恒重。

⑨两级离体消化试验样品干物质消化率(IVDMD)的计算方程为：

$$IVDMD\% = 100 - \frac{W_3 - W_1 - W_2}{W_0 \cdot DM} \times 100$$

其中：W_0——样品重(g)；W_1——105℃下离心管恒重(g)；W_2——空白管残渣干重(g)；W_3——离心管加残渣 105℃恒重(g)；DM——样品干物质含量(%)。

2　结果与讨论

本研究在 3 个处理条件下进行羊粪液法两级离体消化试验，测得 6 种牧草的干物质消化率结果。经方差分析（如表 1）表明，三种处理条件下测得的牧草干物质消化率没有显著差异（$P > 0.05$）；不同样品的干物质消化率结果有极显著差异（$P < 0.01$）。这一结果表明：羊粪液法离体消化试验可以在每个培养管加入 200mg 样品和 20ml 羊粪液，测得可靠的结果。

应用上述 3 种处理条件下的羊粪液法分别和瘤胃液法进行两级离体干物质消化率测定试验的结果进行了比较，结果如表 2。两法测得消化率结果有高度相关（r 分别为 0.83、0.99 和 0.96，$P < 0.01$）。

上述 3 条直线方程，经 F 检验和 t 检验发现彼此差异不显著（$P > 0.05$），进一步表明羊粪液法试验可以采用 200mg 样品和 20ml 粪液的条件，这同 Share 等(1987)报告的结果一致。

羊粪液法和瘤胃液法的两级离体消化配对试验，测得 32 种饲草的干物质消化率平均值分别为 52.[illegible]±10.16%和 53.12±10.74%，差异不显著（$P > 0.05$），两者呈高度相关（r = 0.97，$P < 0.01$）。瘤胃液法测得消化率(y)和羊粪液法测得相应结果(x)的直线回归方程为：

$$Y = 1.022X - 0.598 \quad n = 32, \quad RSD = 2.77$$

Share 等(1987)发现用羊粪液法两级离体消化试验测得 38 种牧草的体外干物质消化率和常规体外消化试验测得相应结果有高度相关（r = 0.98、$P < 0.01$）。由于瘤胃液法两级离体消化试验测得饲草消化率和常规体内法测得相应结果有强相关，如：r = 0.86，$P < 0.01$(Tilly 和 Terry，1963)；r = 0.88，$P < 0.01$ (Terry，1973)；r = 0.90，$P < 0.01$ (Coelsho，1988)，r = 0.88，$P < 0.01$(谢坚中，1986)。由此可以推论羊粪液法测得的消化率和常规体内消化试验测得的相应结果也有强相关，从而进一步验证了 Share 等(1987)的报告结果。

用 7 次不同日期采集的羊粪液和瘤胃液进行两级离体消化试验配对测定标准苜蓿草粉的体外干物质消化率的平均值分别为 56.40±1.78%和 56.6±3.53%，差异不显著（$P > 0.05$）。其变异系数分别为 3.16%和 6.20%，前者变异较小。这可能由于不同日期采集的羊粪液和胃液中微生物种类和数目的变异大小不一致。因为瘤胃液中微生物区系复杂，受外界环境影响较

表 1　不同条件羊粪液法测得消化率方差分析

Table 1.　Analysis of variance of digestibility determined by sheep fecal organism in different conditions

变异来源 Source of variance	平方和 Sum of squares	自由度 Degrees of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	F 值($P < 0.01$) F value($P < 0.01$)
不同样品 Different samples	304.27	5	60.85	7.38**	5.64
不同条件 Different conditions	36.54	2	18.27	2.21	
误差 Error	82.53	10	8.25		
总和 Sum of	423.34	17			

** 表示差异极显著($P < 0.01$)

表 2 三种处理条件下的羊粪液法和瘤胃液法配对试验测得消化率结果分析

Table 2. In vitro dry matter digestibility by two IVDMD methods

称样量 Sample size	粪液量 Fecal fluid	直线回归方程 Regression equation	n Number	r Correlation coeffient	RSD
200mg	20ml	y = 1.012x − 0.039	8	0.83**	1.90
350mg	30ml	y = 1.001x ± 1.062	9	0.99**	2.10
500mg	40ml	y = 1.035x − 1.837	10	0.96**	3.14

** 表示有强相关($P < 0.01$)，其中 y 表示瘤胃液法测得消化结果；x 表示羊粪液法测得结果 RSD 为剩余标准差

大，故不同日期测得消化率结果变异也较大；而羊粪液中微生物来自后肠，为瘤胃液中微生物经胃肠消化液消化的剩余物，受外界环境影响较小，不同日期内其微生物区系变化较小，因而测得结果较为稳定。这一结果表明，羊粪液法两级离体消化试验测得牧草消化率变异较小，测定结果更加可靠。

本研究结果表明：正如 Tilley 和 Terry (1963) 首创的两级离体消化法，经过 20 余年的许多重复试验，至今才得到动物营养界的公认，用羊粪液代替瘤胃液进行两级离体消化试验，还需做大量重复试验，以臻完善。

参考文献

谢坚中. 1986. 应用两级离体消化试验法测定湖羊常用饲料和日粮的干物质消化率和消化能浓度的研究 中国农业科学院研究生毕业论文

Share H M, et. al, 1987. Use of fecal organisms from sheep for in vitro determination of digestibility *J. Agri. Sci., camb.* 109:257～259

Coelsho M et. al, 1988. A comparison of microbial, enzymatic, Chemical and near－infrared reflectance spectroscopy methods in forage evaluation. *Anim. Feed. Sci. and Tech.*, 20:219～231

Tilley J M A and R A Terry. 1963. A two stage technique for in vitro digestion of forage crops. *J. Brit Grassl. Sol.*, 18:104

A TWO STAGE TECHNIQUE FOR IN VITRO DIGESTION BY SHEEP FECAL ORGANISMS

Wu Tianxing

(Zhejiang Agricultural University, Hangzhou, 310029)

Peng Dahui　Yang Shixing

(Lanzhou Istitute of Animal Sciences, The Chinese Academy of Agricultural Sciences Lanzhou, 750004)

ABSTRACT

Rumen fluid and fecal organisms from sheep for in vitro determination of digestibility were compared in this study. 32 forage samples or feedstuffs for ruminants were used for the study. The averages of in vitro dry matter digestibility (IVDMD) of the forage species determined by fecal organisms and by rumen fluid were 53.12 ± 10.74% and 52.54 ± 10.16%, respectively, and no significant difference ($P < 0.05$) between the two values was found. The determined values had a highly significant positive correlation between the two methods ($r = 0.97, P < 0.01$). The relationship was represented by the equation: $Y = 1.022x - 0.598$, where Y is the IVDMD determined by use of rumen fluid; X is the IVDMD estimated by use of liquid suspension of sheep faeces. The residual standard deviation was 2.77.

Key words: In vitro digestion, Sheep, Fecal organisms, Rumen organisms