

反刍动物营养试验手册

-----消化代谢试验部分(修改版)

反刍动物营养研究室
中国农业科学院畜牧研究所

二〇〇四年六月一日

前言

2003 年在本研究室进行了为期四个月的奶牛消化代谢实验，实验操作过程中，采用了许多方法，成功失败皆有。每每在失败之后方知实验操作之重要，经验积累之难得，于是便有了将这些看似简单的方法和提示落实于文字的想法，希望能给做相关实验的人员些许提示和帮助。但毕竟能力有限，在实验过程中因力求细致准确而有因简就繁之嫌，有些文字表达方面过于累赘，错误和不当之处在所难免，同时，由于实验内容要求，所涉及的方法有限，所以这只能是抛砖引玉，希望大家能够不吝指出，并不断改进，使之逐渐完善！

手册的形成是在导师王加启研究员指导督促以及实验室各位老师同学帮助下，集实验小组各成员（王吉峰博士、汪水平硕士和姚美蓉硕士）的工作结果而成！

2004

2002 级博士研究生 李树聪
年 7 月 13 日
于反刍动物营养研究室

目 录

饲料及其剩余料样品的采集 1

瘤胃液pH，NH3-N 和VFA 样品采集和保存 2

瘤胃动态食糜样品采集和保存 3

分离瘤胃微生物样品采集 4

瘤胃原虫计数用样品的采集和保存 5

乳样的采集和保存 6

小肠液采集及其预处理 7

粪样采集及其预处理 8

尿样采集及其预处理 9

瘤胃原虫计数方法 10

酸性洗涤不溶灰分的测定 12

氨氮测定方法-氧化镁直接蒸馏法 13

瘤胃液氨氮检测方法—靛酚比色法 15

瘤胃液VFA 测定—气相色谱法 18

瘤胃微生物量测定方法嘌呤碱基法 21

Co—EDTA 配制 24

铬染纤维的制备 25

原子吸收测定用容器洗涤方法 27

干法灰化食糜流量监测用指示剂（Co Cr Yb）测定 28

湿法消化食糜流量监测用指示剂（Co Cr Yb）测定 29

瘤胃液中Co浓度的测定 30

指示剂的配合和使用方法 31



饲料及其剩余料样品的采集

一、采样方法

预试期每天饲喂时准确记录饲喂量，观察饲料采集速度，记录采食完 85～95% 饲料所需时间，调整剩余料采集时间。

每天早晨采集饲料样，采集量为精料 5%，苜蓿干草 10%，羊草 10%，青贮饲料 10%。精料可以在配合完成时采集，但注意和配合好的饲料一同保存，在规定采样时间取回处理，以保证样品和实际摄入日粮成分一致。采样过程中精料、苜蓿干草、羊草在常温保存；青贮料采样称重后及时 65℃ 烘干测定初水份后保存，如不能及时烘干，及时密封放入冰箱冷冻保存。采集完成后，各样品混合均匀，适当四分法缩样，风干，全部 2mm 筛粉碎，混合均匀，室温保存备用。

采集饲料样的同时收集剩余料，收集时间根据情况可定为采食完成后半小时至饲喂前半小时，准确称重，记录，取 10-20% 立即密封放入冰柜 -20℃ 保存，四天采样完成后，混合均匀，65℃ 烘干，计算初水分后 2mm 粉碎，然后根据剩余料数量适当缩小样品，室温保存备用。

二、采样时间

进入正试期后收粪或采集肠液之前一天开始采样，连续采集三～四天。



瘤胃液 pH，NH₃-N 和 VFA 样品采集和保存

一、采样方法

各时间点从瘤胃均匀选取三—四个位点，共抽取瘤胃液 200-300ml 至抽滤瓶，轻轻摇匀，取约 100ml，直接测定 pH 值后，四层纱布过滤。其余瘤胃液倒回瘤胃（过量抽出主要为保证采样代表性）。

准确量取过滤后瘤胃液 20ml，加入 7.2N 硫酸 0.2ml，摇匀，分装为两份—20℃冷冻保存，用于测定 VFA 及其备用。

另取过滤后瘤胃液 10ml，4℃保存，尽快用于测定NH₃-N浓度。

二、采样时间

早 7:30(采食前)，9:30，11:30，13:30，15:30，17:30，19:30（采食前）。



瘤胃动态食糜样品采集和保存

一、采集时间：

第一天：07:30(采食前)，08:30，09:30，10:30，11:30，13:30，15:30，17:30，19:30(采食前)，23:30

第二天：07:30(采食前)，11:30，19:30(采食前)

第三天：07:30(采食前)，19:30(采食前)

二、采集量及方法

各时间点，瘤胃均匀选取四个位点，总共取瘤胃固相内容物 500g 左右到一洁净小桶中，搅拌均匀，再从中取 100g，-20 °C 保存备用，其余放回瘤胃。

各时间点，瘤胃均匀选取四个位点，抽取瘤胃液 500ml，摇匀后量取 50ml，-20 °C 冷冻保存，其余瘤胃液倒回瘤胃。

备注：由于奶牛采食量及饮水量均很大，瘤胃内容物极其不均匀，采样时要严格操作，同时，注意每次采完样品的用具清洁干净，下次才可继续使用。



分离瘤胃微生物样品采集

一、采集时间点：

第一天：	07:30	13:30	19:30	01:30
第二天：	09:30	15:30	21:30	03:30
第三天：	11:30	17:30	23:30	05:30

二、采集量及方法

- 各时间点，瘤胃均匀选取四个位点，取瘤胃固相内容物约 100g，-20℃保存。
- 各时间点，瘤胃均匀选取四个位点，抽取瘤胃液 100ml，-20℃冷冻保存。



瘤胃原虫计数用样品的采集和保存

一、采样方法

从瘤胃均匀选取四个位点，抽取瘤胃液 200ml 至抽滤瓶，轻轻摇匀，取约 30ml 四层纱布过滤，其余瘤胃液倒回瘤胃。准确量取过滤后瘤胃液 10ml，加入 20ml M. F. S.，轻轻摇匀，室温下保存备用。

注意：整个操作尽量在短时间完成；加入 MFS 液后能保存十周左右。

二、采样时间

根据试验要求确定，以饲喂后二到三为佳。



乳样的采集和保存

一、采样方法

采样前搅拌均匀，乳样采样器缓慢插入奶桶，保证采样器内外样品一致，提起取样器取样，每头牛每次采集乳样总量 1%（根据产奶量确定，大约 0.5-1%，立即用乳品分析仪测定乳成分。其余样品放入冰箱 4℃ 保存，连续采集两天，每头牛两天样品混合均匀

注意乳中脂肪比重较小，乳汁容易分层，操作要细致快速，混合均匀后尽快根据需要分装多份。

二、采样时间

连续两~三天。

三、样品保存

在 -20℃ 冷冻保存。



小肠液采集及其预处理

一、采集时间点：

根据试验安排确定

二、采集量

十二指肠液 100 ~150ml，回肠液 50 ~100ml

三、采集方法

清洗瘘管口，打开塞子，将肠道内瘘管附近积存的食糜丢弃，然后开始采集肠液，手持烧杯，小心收集，尽量不要多采。采集回肠液时间较长，可将烧杯悬挂到瘘管上，注意观察等待，足量后及时收集。

立即测定 pH 值后，装入贴好标签的塑料瓶中，正放入冰柜中-20 °C 冷冻保存。全部采样结束后，混合均匀，取 50ml 立即用于测定氨氮，其余冻干保存。



粪样采集及其预处理

一、采集时间：

根据试验安排确定

二、采集量及方法

全收粪法：全量收集牛粪，测定重量，搅拌均匀，取 20% 放入塑料桶中搅匀，加 6N 盐酸 10%（酒石酸等有机酸较好）。定时按加酸粪量的 20% 采集样本，0~4 °C 冷冻保存。

直肠取粪：在采样时间点前后 30 分钟，奶牛排粪，则从无污染粪中搅拌均匀取样 200g，否则在各时间点直肠取粪 200g，搅拌均匀后，测定 pH 值。此后，100g 直接装入贴好标签的塑料袋中，放入冰柜中 -20 °C 冷冻保存。

每期实验结束后，同一头牛所有样品混合均匀，取鲜样测定氨态氮及总氮。其余样品 65 °C 烘干，2mm 粉碎，-20°C 冰箱冷冻保存。



尿样采集及其预处理

一、采集时间：

连续全量收集两至三天。

每天缩样三~四次。

二、采集方法

采用全收尿法，连续收集试验动物尿样。收尿前先在集尿器内加入200ml 6N盐酸，收尿期间适当摇动集尿器，在缩样时间点准确称量尿液重量，搅拌均匀后，润洗塑料量桶，用量桶准确取纱布过滤后样5%，装入贴好标签的塑料瓶中，4℃冰箱保存。其余尿液丢弃，尿箱加酸后继续收集。

缩样前注意观察尿样，发现被粪污染或有阴道排出的粘液等时，该次样品只记录重量，不采样，同时做好记录。

采样结束后，将每头牛所有尿液混合均匀，留取200ml尿液，分装，-20℃冷冻保存。



瘤胃原虫计数方法

一、试剂：

染色液 M.F.S. (Methyl green-formalin-sodium chlori35% 福尔马林 100ml、NaCl 8.0g 甲基绿 0.6g 蒸馏水 900ml。

磷酸缓冲液：氯化钠 0.50%；无水乙酸钠 0.13%；磷酸二氢钾 0.03%；磷酸氢二钾 0.10% ；七水硫酸镁 0.01%；pH6.9~7.2

二、试验用品和设备

- 大口吸管 管口口径在 1mm 以上吸管
- 计数板 计数室深度约 0.2mm 以上（以保证大体积原虫正常进入）
- 显微镜 普通显微镜
- 手动计数器
- 吸水纸，擦镜纸，洗瓶，废液收集用烧杯等

三、瘤胃液样品采集

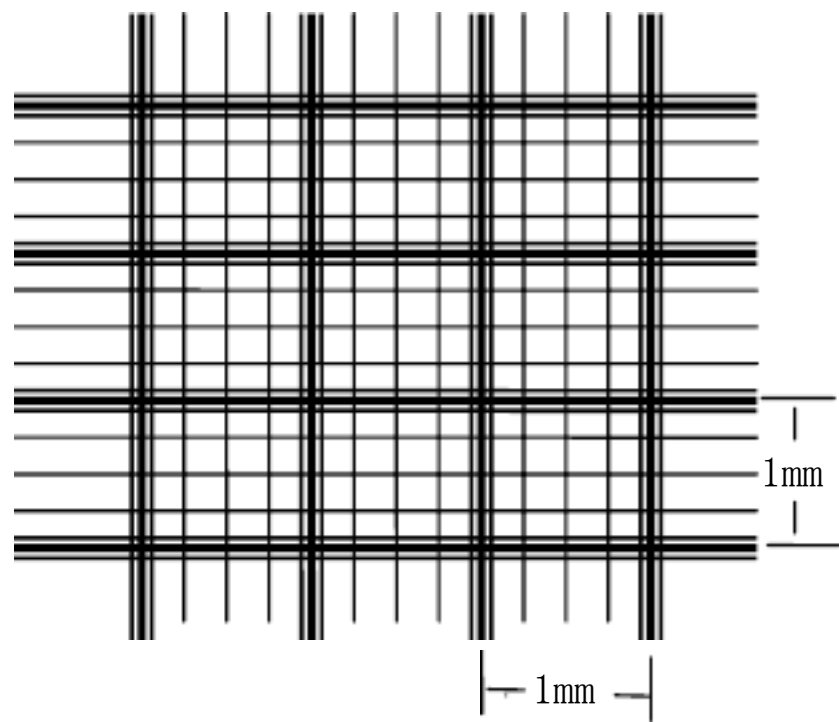
一般在采食后两小时，自瘤胃取样，也可根据试验安排定时取样，试验结果中须注明样品采集条件。

从不同位点（网胃、前背盲囊、背囊和腹囊），采用真空吸滤装置采集瘤胃液，再进行混合，放入 50~100ml 塑料试管中。

样品尽快送到实验室处理！

四、计数样品准备

分别吸取 5-10ml 瘤胃液和 2-9 倍体积的 M.F.S.混合均匀，放置至少 4h 后（过夜染色效果更佳）进行计数，原虫被固定染色后能保持数个星期。注意记录稀释倍数！



五、原虫计数：

将经过染色处理的样品液充分混和均匀，注意轻轻摇动，马上吸取适量点加在原虫计数器上，让液体充满计数室，小心盖上盖玻片，不要在计数区内产生气泡，静置 10 分钟让原虫细胞充分沉降；如果细胞浓度过大，在计数前用磷酸缓冲液进行稀释（大约每格约 7~8 个原虫细胞为最适浓度）；用 10×显微镜观察计数。

上图为本实验室使用计数板，规格为 0.2mm 深，每小格，1/16mm²，九个大方块，每个大方块又被分为十六个小方块，计数过程中，可采用全部 9 个大方格计数，或对角线 5 个方格计数。计数过程中采用计上不计下，计左不计右的原则次序技术。

常数和计算（以计数 5 大格为例）。

常数：

计数区单个方格标准面积	1 mm ²
计数室深度	0.2mm
单个方格标准体积	0.2mm ³
计数区 5 个方格体积	1mm ³

计算：

$$\text{每 ml 或 g 所含原虫数} = 5 \text{ 个方格内总数} \times \text{稀释度} \times 1000$$

六、参考文献：

Boyne, A. W., J. M. Eadie and K. Rai1957. J Gen Microbiol.17:414.
Dehority, B. A.1984. Appl Environ Microbiol.48:182.
卢德勋，谢崇文，1991，现代反刍动物营养研究方法和技术，农业出版社



酸性洗涤不溶灰分的测定

一、试剂

2N 盐酸：

用 1L 容量瓶，加入约 700ml 蒸馏水，缓慢加入 166.7ml 浓盐酸，最好在通风橱中操作。

摇匀，定容至 1L

二、程序

洁净瓷坩埚 500 °C 灼烧 30min，干燥器冷却后，称重。

称取 3-5g 样品（同时测定 105 °C 干物质），设重复，放入已知重量的瓷坩埚

电炉上炭化完全后，转入茂福炉 500 °C 灼烧灰化至恒重（5-10 小时）

完全转入 600-800ml 烧杯中，加入 100ml 2N 盐酸，煮沸 5min

趁热用定量滤纸过滤，并用热蒸馏水洗涤至中性

按照 D 步骤操作

干燥器冷却后，称重。

三、计算

$$(\text{含灰分坩埚重量} - \text{坩埚重量}) / (\text{样品 DM 重量}) = \% \text{酸性洗涤不溶灰分}$$

四、备注

Van Soest (1991, J. Dairy Sci. 74:3588) 推荐使用酸性洗涤纤维灼烧后残渣为酸性洗涤不溶灰分。

此外也可以用 4N 盐酸消煮 3-5g 样品 30min 后，热水（80-100 °C）洗涤至中性后，650 °C 灰化的残渣作为酸性洗涤不溶灰分（卢德勋）。

五、参考文献

Van Keulen, J.V. and B.A. Young. 1977. Evaluation of acid insoluble ash as a natural marker in ruminant digestibility studies. J. Animal. Sci. 44:282.

卢德勋 谢崇文等 现代反刍动物营养研究方法和技术



氨氮测定方法--氧化镁直接蒸馏法

一、原理

通过弱碱（氢氧化镁）对铵态氮的作用， NH_4^+ 转换成 NH_3 释放出来，通过硼酸吸收，标准酸滴定后可以计算出样品中 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的量。

本方法中弱碱对有机态氮有一定水解能力，一般可忽略不计，但为提高测定精度，在确保蒸馏完全的前提下，每样品的蒸馏时间尽量保持一致。

二、试剂

氧化镁 化学纯。购买时注意选择高温灼烧的产品（灼烧过的产品质地疏松，轻质）。否则需经 500-600 度福炉灼烧后使用。

液体石蜡油，化学纯或医用。

2% 硼酸溶液，调节 pH 约等于 4.5 使之与指示剂混合呈淡红色。

指示剂：分别称取 0.1g 甲基红和 0.5g 溴甲酚绿指示剂，放入研钵中，并用 100ml 无水乙醇研磨溶解，在阴凉处保存期为三个月。

0.01-0.15M HCL 标准溶液。邻苯二甲酸氢钾法标定，按 GB601 制备。

三、仪器

凯氏定氮蒸馏装置，酸式滴定装置，250ml 三角瓶若干等。

四、方法步骤

量（称）取样品至蒸馏反应管中。推荐取样量瘤胃液 10-15ml，十二指肠液 10-15ml（g）、回肠液 10g，粪 10-15g。

加入氧化镁 0.8-1.2g 液体石蜡 1ml，蒸馏水约 25ml。

按照凯氏定氮法操作蒸馏，蒸馏时间为硼酸变色后继续蒸馏 7-8 分钟。滴定。

结果计算：

$$\text{样品NH}_3\text{-N \%} = \frac{(V_2 - V_1) \times C \times 0.014}{m} \times 100$$

V_2 - 滴定试样时所需要的标准酸溶液体积 ml

V_1 - 滴定空白时所需要的标准酸溶液体积，ml

M 样品质量或体积 g 或 ml



0.0140 每毫克当量氮的克数

五、重复性

每个试样取两个平行样进行测定，以其算数平均值为结果
氮含量在 以下时，允许相对偏差为 3%
氮含量在 以上时，允许相对偏差为 3%

注：本文主要参考中国农业大学畜牧系养牛教研组编写的《反刍动物营养学试验指导》及其 GB/T6432-94 饲料中粗蛋白测定方法。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/206214235144011052>