

DOI:10.11686/cyxb2019124

http://cyxb.magtech.com.cn

周瑞, 刘立山, 吴建平, 等. 牛至精油对绵羊瘤胃体外养分降解率、发酵特性及 CH₄ 产量的影响. 草业学报, 2019, 28(11): 168—176.

Zhou R, Liu L S, Wu J P, *et al.* Effects of oregano essential oil on nutrient degradability, rumen fermentation, and CH₄ production in sheep. Acta Prataculturae Sinica, 2019, 28(11): 168—176.

牛至精油对绵羊瘤胃体外养分降解率、发酵特性及 CH₄ 产量的影响

周瑞^{1,2}, 刘立山^{1,2}, 吴建平^{1,2,4}, 韦胜³, 郎侠^{1,2*}, 王彩莲^{1,2*}

(1. 甘肃省农业科学院畜牧与绿色农业研究所, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃省牛羊种质与秸秆饲料化重点实验室, 甘肃 兰州 730070; 3. 甘肃农业大学动物科学技术学院, 甘肃 兰州 730070; 4. 西北师范大学新农村发展研究院, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 试验旨在研究牛至精油对绵羊瘤胃体外养分降解率、发酵特性及 CH₄ 产量的影响。采用单因素完全随机试验设计, 在培养液中分别添加 0(CON)、100(EO₁)、400(EO₂)、700(EO₃) 和 1000 mg · L⁻¹ (EO₄) 牛至精油, 每组 4 个重复。发酵 48 h 后测定养分降解率、发酵参数及不同时间总产气量和 CH₄ 产量。结果表明: 1) 与 CON 组相比, 干物质降解率、粗蛋白降解率、中性洗涤纤维降解率在 EO₁ 组中均显著升高 ($P < 0.05$), 在 EO₄ 组中均显著降低 ($P < 0.05$), EO₂ 组中均无显著差异 ($P > 0.05$), 干物质降解率在 EO₃ 组中显著降低 ($P < 0.05$), 添加牛至精油对酸性洗涤纤维降解率 (ADFD) 无显著影响 ($P > 0.05$); 2) EO₁ 组 pH 最低, 而总挥发性脂肪酸 (TVFA)、丙酸浓度最高, 且乙酸浓度显著高于 EO₂、EO₃ 和 EO₄ ($P < 0.05$), 但乙酸/总挥发性脂肪酸显著低于 EO₃、EO₄ 组 ($P < 0.05$), 乙酸/丙酸显著低于 CON 组 ($P < 0.05$)。与 CON 组相比, 牛至精油组丁酸、丁酸/总挥发性脂肪酸和氨氮浓度显著降低 ($P < 0.05$); 3) 发酵 36 h 后, 总产气量、甲烷产量均随牛至精油的添加而逐渐降低, 与 CON 组相比, EO₁ 组发酵 18~48 h 总产气量显著降低 ($P < 0.05$), EO₂、EO₃ 和 EO₄ 组总产气量、CH₄ 产量在发酵 18 h 后均显著降低 ($P < 0.05$), EO₄ 组甲烷百分比在发酵 12~36 h 显著降低 ($P < 0.05$)。综上所述, 在绵羊瘤胃体外培养液中添加牛至精油能够提高饲粮养分降解率, 调控瘤胃发酵, 降低总产气量和甲烷产量, 体外条件下添加量不应高于 100 mg · L⁻¹。

关键词: 牛至精油; 体外发酵; 养分降解率; 发酵特性; 甲烷产量

Effects of oregano essential oil on nutrient degradability, rumen fermentation, and CH₄ production in sheep

ZHOU Rui^{1,2}, LIU Li-shan^{1,2}, WU Jian-ping^{1,2,4}, WEI Sheng³, LANG Xia^{1,2*}, WANG Cai-lian^{1,2*}

1. Gansu Academy of Agricultural Science, Lanzhou 730070, China; 2. Key laboratory for Sheep, Goat, and Cattle Germplasm and Straw Feed in Gansu Province, Lanzhou 730070, China; 3. College of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 4. Institute of Rural Development, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China

Abstract: We evaluated the effects of oregano essential oil on the nutrient degradability, rumen fermentation, and CH₄ production of sheep in an *in vitro* fermentation system. The experiment had a single-factor design. Oregano essential oil (OEO) was added to the medium at four different levels: 0 (CON), 100 (EO₁), 400 (EO₂), 700 (EO₃), and 1000 mg · L⁻¹ (EO₄). Each group had four replicates. After fermentation for 48 h,

收稿日期: 2019-02-28; 改回日期: 2019-05-08

基金项目: 动物遗传育种与草食畜生产体系(2017GAAS30)和农业部公益性行业科研专项(201503134)资助。

作者简介: 周瑞(1991-), 女, 宁夏中宁人, 博士。E-mail: zhour1222@163.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: langxms@gsagr.ac.cn, 909930748@qq.com

nutrient degradability and fermentation parameters were measured. The total gas and CH_4 production were measured at 1, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36, and 48 h during fermentation. The main results were as follows: 1) Dry matter degradability (DMD), crude protein degradability (CPD), and neutral detergent fiber degradability (NDFD) were significantly increased in the EO_1 group ($P < 0.05$), significantly decreased in the EO_4 group ($P < 0.05$), and unaffected in the EO_2 group ($P > 0.05$) compared with the CON group. The DMD was significantly higher in the EO_3 group than in the CON group ($P < 0.05$). Addition of OEO did not affect the acid detergent fiber degradability (ADFD) ($P > 0.05$); 2) Among all groups, the EO_1 group had the lowest pH but the highest concentrations of total volatile fatty acids (TVFA) and propionate. The acetate concentration was higher in the EO_1 group than in the EO_2 , EO_3 , and EO_4 groups ($P = 0.011$), however, the percentage of acetate/TVFA was significantly lower in the EO_1 group than in the EO_3 and EO_4 groups ($P < 0.001$), and the ratio of acetate/propionate was significantly lower in the EO_1 group than in the CON group ($P < 0.05$). Compared with the CON group, all the EO groups showed significantly decreased concentrations of butyrate and $\text{NH}_3\text{-N}$, and lower butyrate/TVFA ratios ($P < 0.05$); 3) The total gas production and CH_4 production after 36 h of fermentation decreased as the OEO dose increased. Compared with the CON group, the EO_1 group showed significantly decreased total gas production from 18 to 48 h of fermentation ($P < 0.05$), and the EO_2 , EO_3 , and EO_4 groups showed significantly decreased total gas production and CH_4 production after 18 h of fermentation ($P < 0.05$). Compared with the CON group, all EO groups showed significantly lower CH_4 production from 12 to 36 h of fermentation ($P < 0.05$). In summary, supplementation with oregano essential oil can improve nutrient degradability, regulate rumen fermentation, and decrease total gas and CH_4 production; the optimal supplementation level is less than $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ in *in vitro* fermentation conditions.

Key words: oregano essential oil; *in vitro* fermentation; nutrient degradability; fermentation characteristics; CH_4 production

反刍动物每年 CH_4 排放量占全球人类活动 CH_4 排放总量的 26%^[1]。 CH_4 的排放不仅严重污染了大气环境,同时降低了家畜对饲料中能量的利用效率^[2]。近年来,人们研究了多种通过调节瘤胃发酵来减少反刍动物甲烷排放的方法,其中天然绿色饲料添加剂是研究的热点之一。大量研究表明,植物精油(essential oil, EO)及其生物活性化合物能够通过调控反刍动物瘤胃发酵来提高饲料能量利用率、降低 CH_4 排放^[3],同时,还可以影响瘤胃的生物氢化作用,调控脂肪酸的合成代谢,提高牛奶和肉类的营养品质^[4]。牛至精油(oregano EO)是从牛至(*Origanum vulgare*)中提取的具有抗菌、抗氧化活性的挥发油,其活性成分主要是香芹酚、百里酚、松油烯和芳樟醇等物质^[5]。Busquet 等^[6]在体外瘤胃发酵试验中发现,添加香芹酚($2.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)可以降低发酵液中氨氮浓度。另外,绵羊饲料中添加牛至精油减少甲烷排放量 12%^[7]。牛至精油还可以维持瘤胃 pH 稳定,提高干物质消化率,促进犊牛的生长发育^[8-9]。牛至精油中的活性成分香芹酚和百里酚能加速胃肠道上皮细胞的更新率,减少病原体对肠道上皮细胞的感染,抑制有害菌的生长^[10]。Patra 等^[11]研究发现,添加不同浓度的牛至精油(250 、 500 和 $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),随着添加量的增加总产气量、 CH_4 产量、干物质消化率、中性洗涤纤维消化率均显著降低,并影响挥发性脂肪酸的浓度。目前牛至精油在生产实践中的研究较少,并且对牛至精油浓度范围的研究较小,不同的研究对生产实践所提供的最适浓度不同,因此本研究在前人的研究基础上,增加了牛至精油的添加梯度,细化了添加水平的范围,以 100 、 400 、 700 和 $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 不同添加水平更进一步研究其对瘤胃体外养分降解率及发酵特性的影响,筛选牛至精油最佳添加量,为其在反刍动物生产中的合理利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供体动物及饲养管理

试验选取 3 只体况和体重 $[(56.68 \pm 2.14) \text{ kg}]$ 相近装有永久瘤胃瘘管的健康公羊(德国美利奴 \times 小尾寒羊

的杂交 1 代)作为瘤胃液供体羊。试验羊单栏饲养,饲粮参照国家研究委员会(National Research Council, NRC)(2007)^[12]推荐营养需要配制,精粗比为 34.5 : 65.5,其组成及营养水平见表 1。每天分别于 8:00 和 18:00 等量饲喂两次,先粗后精,自由饮水。采集瘤胃液进行体外产气试验前供体羊预饲 7 d。

表 1 试验饲粮组成及营养水平
Table1 Composition and nutrient of experimental diet (dry matter basis)

原料 Ingredients	含量 Content (%)	营养水平 Nutrient levels ²⁾	含量 Content
玉米全贮 Whole corn silage	65.50	消化能 Digestible energy (DE, MJ · kg ⁻¹)	14.21
玉米 Corn	25.74	粗蛋白 Crude protein (CP, %)	15.13
豆粕 Soybean meal	2.34	中性洗涤纤维 Neutral detergent fiber (NDF, %)	51.17
菜粕 Rapeseed meal	2.34	酸性洗涤纤维 Acid detergent fiber (ADF, %)	38.03
棉粕 Cottonseed meal	2.34	钙 Calcium (Ca, %)	0.41
石粉 Limestone	0.58	磷 Phosphorus (P, %)	0.27
食盐 NaCl	0.58		
1%预混料 ¹⁾ Premix	0.58		
合计 Total	100		

¹⁾ 每 kg 预混料含有 One kg of premix contained the following: V_A 220000 IU, V_D 372000 IU, V_E 2000 IU, D-生物素 D-biotin 40 mg,烟酰胺 Nicotinic acid amide 2000 mg, Mn (as manganese sulfate) 710 mg, Zn (as zinc sulfate) 2005 mg, Fe (as ferrous sulfate) 830 mg, Cu (as copper sulfate) 680 mg, Co (as cobalt sulfate) 12 mg。²⁾ 消化能为计算值,其他为实测值。Digestive energy were calculated values and others were measured values.

1.2 试验设计

牛至精油购自美国 Ralco 动物营养公司,牛至精油的主要活性成分为:香芹酚(carvacrol,含量为 80%~85%),百里香酚(thymol,含量为 2.5%~3.0%),对伞花烃(p-cymene,含量为 3.5%~9.0%), γ -萜品烯(γ -terpinene,含量为 2.0%~5.5%)。试验采用单因素完全随机设计,分为 5 个处理组,每个处理组 4 个重复,发酵瓶(250 mL)中分别添加 5 个不同水平的牛至精油:不添加牛至精油组(CON),添加 100(EO₁)、400(EO₂)、700(EO₃)和 1000 mg · L⁻¹(EO₄)牛至精油组。另设置一个空白对照(4 个重复),即不添加发酵底物和牛至精油,用于发酵瓶产气量的校正。

1.3 体外发酵及样品采集

于晨饲后 2 h 通过瘤胃瘘管采集瘤胃内容物,用 4 层纱布过滤,将过滤后的瘤胃液装于提前充满 CO₂ 的保温瓶迅速带回实验室,整个操作于 39 ℃ 水浴中进行。体外产气装置采用 ANKOM RFS(美国 ANKOM technology corporation)全自动记录装置气体测量系统。发酵所用底物与供体动物所喂饲粮一致。将烘干后的饲粮通过高速粉碎机(XFB-200)粉碎约 1 mm 颗粒,再准确称取约 1200 mg 饲粮样品投入 250 mL 发酵瓶中,每个发酵瓶中分别加入相应质量的牛至精油。接种时迅速将每个瓶中加入 100 mL 预热的人工瘤胃缓冲液和 50 mL 过滤后的瘤胃液,人工瘤胃缓冲液按 Menke 等^[13]方法配制,并向瓶中持续通入 CO₂ 30 s 后,立即加上瓶塞,并将每个发酵瓶与产气装置的每个传感器相连接,于 39 ℃ 下连续培养 48 h,自动记录产气压力。分别在不同发酵时间点(1、3、6、9、12、18、24、36 和 48 h)利用密封气体进样针采集 5 mL 发酵瓶顶部气体,用于 CH₄ 产量的测定。发酵结束后,将所有发酵瓶在冰水中终止发酵,收集 15 mL 发酵液测定发酵参数,将剩余发酵液离心收集发酵残渣测定养分含量。

1.4 测定指标及测定方法

1.4.1 饲粮养分测定 参照《饲料分析及饲养质量检测技术》^[14]测定饲粮和发酵残渣干物质(dry matter, DM)、粗蛋白(crude protein, CP)、酸性洗涤纤维(acid detergent fiber, ADF)和中性洗涤纤维(neutral detergent fiber, NDF)含量。干物质降解率(dry matter degradability, DMD)、粗蛋白降解率(crude protein degradability,

CPD)、酸性洗涤纤维降解率(acid detergent fiber degradability,ADFD)、中性洗涤纤维降解率(neutral detergent fiber degradability,NDFD),根据 Tilley 等^[15]的方法计算。

1.4.2 发酵参数及CH₄产量测定 用 pH 211 型精密 pH 计(HAN-NA)测定发酵液 pH 值;使用苯酚一次氯酸钠比色法测定 NH₃-N 浓度^[16];采用试剂盒(南京建成生物工程研究所)配合 WD-2102B 型全自动酶标仪(北京六一生物科技有限公司)测定微生物蛋白(microbial protein,MCP)含量,测定方法按照试剂盒说明书进行;采用气相色谱仪(日本岛津 GC-2010 Plus)测定挥发性脂肪酸(volatile fatty acid,VFA)和 CH₄ 含量^[17]。ANKOM RFS 气体测量系统自动记录产气瓶发酵产生的压力,气压可以转化成气体体积,根据理想气体方程,累计产气量可以按以下公式进行计算:

$$V_x = V_j P_{psi} \times 0.068004084$$

式中:V_x 为产气总体积(mL);V_j 为发酵瓶顶部空间体积(mL);P_{psi} 为气体测量系统自动记录的压力(kPa)。

1.5 数据统计与分析

利用 Excel 软件进行数据整理,采用 SPSS 19.0 软件的 One-way ANOVA 和 GLM 进行方差分析。以 P<0.05 作为差异显著的判断标准。

2 结果与分析

2.1 体外情况下牛至精油对饲料养分降解率的影响

与 CON 组相比,EO₁ 组 DMD 显著升高 1.81%(P<0.001),而 EO₃、EO₄ 组分别显著下降 1.65%、2.14%(P<0.001);EO₁ 组 CPD、NDFD 分别显著升高 2.05%(P=0.032)、1.65%(P=0.009),而 EO₄ 组分别显著降低 1.91%(P=0.032)、1.16%(P=0.009)。牛至精油对 ADFD 无显著影响(P=0.106)(表 2)。

表 2 牛至精油对体外养分体外降解率的影响
Table 2 Effects of oregano EO on nutrient degradability of diet in vitro

项目 Items	处理 Treatments					SEM	P 值 P-value
	CON	EO ₁	EO ₂	EO ₃	EO ₄		
干物质降解率 DMD (%)	56.81b	58.62a	57.18b	55.16c	54.67c	0.611	<0.001
粗蛋白质降解率 CPD (%)	45.76b	47.81a	46.55b	45.82b	43.85c	0.743	0.032
中性洗涤纤维降解率 NDFD (%)	26.75b	28.40a	27.03b	26.24bc	25.59c	0.862	0.009
酸性洗涤纤维降解率 ADFD (%)	26.52a	26.96a	27.33a	27.19a	27.58a	0.941	0.106

注:同行不同小写字母表示差异显著(P<0.05),相同字母表示差异不显著(P>0.05),SEM 为平均标准误。下同。
Note: In the same row, values with different small letters mean significant difference (P<0.05), while with the same letters mean no significant difference (P>0.05). SEM indicates: Mean standard error. The same below.

2.2 牛至精油对体外瘤胃发酵参数的影响

EO₁ 组 pH 显著低于其他 4 组(P<0.05),TVFA、丙酸浓度显著高于其他 4 组(P<0.05),丙酸/总挥发性脂肪酸显著高于 CON、EO₂ 和 EO₄ 组(P<0.05);EO₁ 组乙酸浓度显著高于 EO₂、EO₃ 和 EO₄ (P<0.05),但乙酸/总挥发性脂肪酸显著低于 EO₃、EO₄ 组(P<0.05);与 CON 相比,添加牛至精油组均显著降低了培养液丁酸、丁酸/总挥发性脂肪酸和 NH₃-N 浓度(P<0.05),但对 MCP 浓度无显著影响(P=0.563)(表 3)。

2.3 牛至精油对体外发酵总产气量和 CH₄ 产量的影响

结果显示,时间对总产气量、CH₄ 产量以及 CH₄/总产气均有显著效应(P<0.001),牛至精油添加水平和时间的互作用对 CH₄ 产量有显著效应(P<0.05),但对总产气量和 CH₄/总产气无显著效应(P>0.05)(表 4)。从牛至精油不同添加水平来看,总产气量、CH₄ 产量、CH₄/总产气整体呈现降低趋势;EO₁ 组在发酵 1、3、9、12 h 时总产气量、CH₄ 产量、CH₄/总产气均无显著变化(P>0.05),发酵 6、18~48 h 时总产气量显著降低(P<0.05),CH₄ 产量无显著变化,CH₄/总产气显著升高(P<0.05);EO₂、EO₃ 组在发酵 1 h 时,CH₄ 产量、总产气

量、CH₄/总产气均无显著变化($P>0.05$),发酵 3、6、24、48 h 时,总产气量、CH₄ 产量显著降低($P<0.05$),CH₄/总产气无显著变化($P>0.05$),发酵 18、36 h 时总产气量、CH₄ 产量、CH₄/总产气均显著降低($P<0.05$),发酵 12 h 时,总产气量无显著变化($P>0.05$),CH₄ 产量、CH₄/总产气显著降低($P<0.05$);EO₄ 组在发酵 1 h 时总产气量、CH₄ 产量、CH₄/总产气均无显著变化($P>0.05$),发酵 6、12、18、36 h 时总产气量、CH₄ 产量、CH₄/总产气均显著降低($P<0.05$),发酵 3、9、24、48 h 时总产气量、CH₄ 产量显著降低($P<0.05$),CH₄/总产气无显著变化($P>0.05$)。

表 3 牛至精油对体外瘤胃发酵参数的影响

Table 3 Effects of oregano EO on parameters *in vitro* fermentation

项目 Items	处理 Treatments					SEM	P 值 P-value
	CON	EO ₁	EO ₂	EO ₃	EO ₄		
pH	5.48c	5.33d	5.59bc	5.65b	5.75a	0.032	0.010
总挥发性脂肪酸 TVFA (mmol · L ⁻¹)	132.17b	137.47a	121.48c	124.92c	111.11d	1.831	0.041
乙酸 Acetate (mmol · L ⁻¹)	80.57ab	82.57a	74.35c	78.58b	71.58d	1.021	0.011
乙酸/总挥发性脂肪酸 Acetate/TVFA (%)	60.97c	60.06c	61.20c	62.91b	64.43a	0.007	<0.001
丙酸 Propionate (mmol · L ⁻¹)	39.76b	43.44a	36.58c	38.55b	32.85d	0.702	0.027
丙酸/总挥发性脂肪酸 Propionate /TVFA (%)	30.09bc	31.60a	30.10bc	30.86ab	29.56c	0.004	0.002
丁酸 Butyrate (mmol · L ⁻¹)	1.66a	1.35b	1.15c	0.93d	0.81d	0.063	0.039
丁酸/总挥发性脂肪酸 Butyrate/TVFA (%)	1.26a	0.98b	0.95b	0.74c	0.73c	0.001	<0.001
乙酸/丙酸 Acetate/propionate	2.03b	1.90c	2.03b	2.04b	2.18a	0.042	0.024
氨态氮 NH ₃ -N (mg · dL ⁻¹)	14.97a	11.57b	10.60b	11.92b	11.42b	0.651	0.001
微生物蛋白 MCP (mg · mL ⁻¹)	0.30a	0.31a	0.29a	0.33a	0.33a	0.032	0.563

3 讨论

3.1 牛至精油对饲料养分体外瘤胃降解率的影响

体外养分降解率不仅能够反映饲料在发酵体系中被微生物的降解程度,还能反映其被动物消化利用的难易程度^[18]。关于不同植物精油对体内和体外养分降解率的影响报道不尽相同。体外研究表明,添加 5、50 mg · L⁻¹ 植物精油活性成分(丁香酚,柠檬烯和百里香酚)对干物质降解率无显著影响^[19],另外,添加 250、500 和 1000 mg · L⁻¹ 丁香油、桉树油和大蒜油对体外养分消化率无显著影响^[11]。而金恩望等^[20]研究发现,添加量高于 1.0 g · L⁻¹ 的植物精油(茶树油、肉桂油、丁香油)能抑制饲料底物的降解,而当添加量低于 1.0 g · L⁻¹ 时,对体外干物质降解率无显著影响。本试验结果与其不同,原因可能是不同的植物精油对养分降解率影响的剂量不同。然而也有研究表明牛至油对饲料养分降解率无显著影响^[21]。以上结果表明,由于不同植物精油及其有效化学成分复杂多样,导致其功能特性各异,对体外养分消化率的影响也各不相同。本研究发现,添加 100 mg · L⁻¹ 牛至精油时,养分降解率最高,当牛至精油添加量大于 100 mg · L⁻¹ 时,养分降解率逐渐下降,其原因可能是牛至精油添加量为 100 mg · L⁻¹ 时,可以选择性地促进瘤胃原虫、细菌和真菌的活性,改善瘤胃机能^[22],从而提高饲料养分降解率,添加量高于 100 mg · L⁻¹ 时,可能对瘤胃微生物活性及瘤胃发酵产生抑制作用,降低饲料养分降解率。

3.2 牛至精油对体外瘤胃发酵参数的影响

挥发性脂肪酸是饲料中碳水化合物在瘤胃中降解的主要产物,是反刍动物主要的能量来源以及合成乳脂和体脂的重要原料^[23]。瘤胃 pH 是衡量反刍动物瘤胃内环境稳态的重要指标,主要受饲料性质、唾液分泌量和有机酸积累的影响^[24]。徐方华^[25]利用瘤胃体外批次培养方法研究发现,牛至油可以提高培养液 pH,且与牛至油的添加水平成正比。另外,张然等^[21]研究表明,体外培养液中添加牛至油可以显著提高培养液 pH,而添加高水

表 4 牛至精油对体外发酵总产气量和 CH₄ 产量的影响

Table 4 Effects of oregano EO on total gas production and CH₄ production *in vitro* fermentation

时间	处理 Treatments					SEM	P 值 P-value		
Time (h)	CON	EO ₁	EO ₂	EO ₃	EO ₄		Tre	T	Tre×T
总产气量 Total gas (mL · g ⁻¹ DM)									
1	16.36a	15.68a	14.39a	14.67a	15.56a	1.032	0.369	<0.001	0.625
3	33.64a	30.65ab	29.63b	28.54b	27.69b	2.243	0.049		
6	59.39a	54.29b	53.69bc	52.83bc	49.63c	3.272	0.037		
9	80.26a	76.34ab	76.38ab	75.64b	74.29b	2.333	0.012		
12	95.16a	90.20ab	89.52ab	89.46ab	85.79b	3.822	0.002		
18	119.33a	112.58b	108.52c	106.48c	102.69c	3.214	0.003		
24	138.71a	130.43b	124.20b	124.40b	125.01b	3.612	0.004		
36	142.36a	133.69b	130.37b	129.67b	127.92b	3.721	<0.001		
48	150.06a	140.25b	136.33b	135.18b	134.92b	3.903	<0.001		
甲烷产量 CH ₄ (mL · g ⁻¹ DM)									
1	9.52a	8.24a	7.13a	7.68a	8.64a	0.917	0.067	<0.001	0.017
3	18.73a	17.76ab	16.14bc	15.58c	14.94c	1.051	0.032		
6	28.95a	27.11a	24.45b	23.81bc	20.84c	1.222	0.013		
9	36.66a	34.26ab	34.65ab	32.48bc	30.73c	1.421	0.042		
12	37.30a	35.41a	29.58b	29.10b	27.73b	1.331	0.006		
18	50.67a	46.92ab	45.62bc	43.99cd	41.68d	1.211	0.003		
24	42.98a	41.67a	38.81b	38.21b	36.59b	1.673	<0.001		
36	46.68a	44.96a	39.12b	39.64b	37.69b	1.582	<0.001		
48	45.24a	43.52a	40.96b	40.33b	38.95b	1.724	<0.001		
甲烷/总产气 CH ₄ /total gas (%)									
1	58.35a	52.93a	49.55a	52.51a	55.38a	4.224	0.372	<0.001	0.106
3	55.85a	57.61a	54.54a	54.55a	54.73a	1.699	0.350		
6	48.62b	50.24a	46.15b	45.09b	42.78c	1.459	0.001		
9	45.24a	44.39a	45.33a	42.95a	42.13a	1.395	0.155		
12	40.10a	39.09a	33.01b	32.47b	33.15b	1.478	<0.001		
18	42.12a	41.17b	41.89b	41.38b	41.79b	1.715	0.019		
24	30.31b	32.47a	31.38ab	30.61b	29.92b	1.922	0.024		
36	32.06b	34.04a	29.97c	30.28c	29.67c	1.128	0.046		
48	29.27bc	31.61a	30.10ab	29.59bc	28.94c	1.436	0.043		

注：Tre 表示不同梯度牛至精油，T 表示发酵时间。

Note: Tre indicates different concentrations of oregano essential oil, T indicates fermentation times.

平的牛至油(300、400 mg · L⁻¹)显著降低了培养液 TVFA 浓度和丙酸比例,同时培养液乙酸占 TVFA 比例和乙酸/丙酸显著升高。本研究发现,低浓度的牛至精油(100 mg · L⁻¹)显著升高了 TVFA、丙酸浓度,同时 pH 显著降低,而高浓度(大于 100 mg · L⁻¹)的牛至精油使 pH 显著升高,这可能是高浓度的牛至精油抑制了瘤胃发酵,使得 TVFA 和乙酸、丙酸、丁酸浓度显著降低,本研究中养分降解率变化与此相一致。另外本研究中乙酸占 TVFA 的比例在高浓度(大于 100 mg · L⁻¹)条件下显著升高,而丙酸、丁酸占 TVFA 的比例显著降低,这些结果表明高浓度的牛至精油会使瘤胃更加趋向于乙酸发酵。林波^[26]研究发现,在体外培养液中添加高浓度牛至油(500、750 mg · L⁻¹),能够破坏瘤胃壁细胞膜的完整性,影响瘤胃的健康发育,从而抑制瘤胃发酵。Patra 等^[27]

试验表明,体外培养液中添加牛至油会减少瘤胃原虫、细菌和主要纤维素分解菌(产琥珀酸丝状杆菌、黄色瘤胃球菌和白色瘤胃球菌)的数量,且与牛至油的添加水平呈线性关系。结合本试验结果,可以推断高浓度(大于 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)牛至精油可能通过影响微生物活性,降低 TVFA 浓度,抑制瘤胃发酵。

$\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度是饲料含氮物质在瘤胃内降解及微生物对氮利用的综合反映^[28]。 $\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度作为评价瘤胃中氮存留率的重要指标,其降低意味着瘤胃中蛋白降解率的降低或者瘤胃微生物对 $\text{NH}_3\text{-N}$ 利用率的提高。大量体外试验表明,植物精油能够抑制瘤胃 NH_3 的产生,提高氮的利用率。Wang 等^[7]研究表明,给绵羊连续饲喂 15 d 添加 $250 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ 牛至油预混剂的饲料后,绵羊瘤胃液氨氮浓度显著降低。Noorian 等^[29]研究发现,植物精油可以降低 $\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度,并且可以减少原虫的数量。本试验结果表明,添加牛至精油 $\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度显著降低,而牛至精油对 MCP 浓度无显著影响,可能是牛至精油能够抑制瘤胃产氨菌的生长,降低脱氨酶活性,使得氨基酸脱氨基作用降低^[30],同时生成的 TVFA 和 $\text{NH}_3\text{-N}$ 降低,也可能会抑制瘤胃液原虫数量,降低 $\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度^[31]。另外,由于发酵处于密闭的发酵瓶内,发酵 48 h 后发酵底物不断被消耗,微生物总数以及活性基本处于稳定状态,因此 MCP 浓度无显著差异。

3.3 牛至精油对体外瘤胃发酵总产气量和 CH_4 产量的影响

总产气量是反映饲料可发酵程度及瘤胃微生物活性的重要指标^[31]。目前,植物精油对反刍动物总产气量的相关报道较少。反刍动物瘤胃内合成 CH_4 的主要途径是氢气还原二氧化碳形成甲烷,其次是乙酸、甲酸和丁酸等挥发性脂肪酸合成 CH_4 ^[32]。张然等^[21]研究表明,牛至油能调控瘤胃发酵和降低甲烷产量,但添加高水平(300 、 $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的牛至油对绵羊瘤胃发酵具有抑制作用。Chaudhary 等^[33]研究表明,添加 $450 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的百里香油和牛至油能显著降低体外发酵 CH_4 产量,而 50 、 $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的添加水平对 CH_4 产量没有显著影响。Oskoueian 等^[34]认为,植物精油在降低 CH_4 产量的同时伴随着对瘤胃微生物发酵的抑制,这种改变与植物精油的种类和剂量以及所采用的底物有关。Patra 等^[11]对 5 种植物精油(丁香油、桉树油、大蒜油、起酥油和薄荷油)在体外发酵试验中发现, $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 大蒜油对 CH_4 产生抑制最显著,表明植物精油对 CH_4 产量降低的效果与植物精油的种类和剂量有关。本研究发现,发酵时间对总产气、 CH_4 产量以及 CH_4 比例均具有显著效应,而发酵时间和处理的互作效应主要表现在对 CH_4 产量的影响上,对总产气和 CH_4 占总产气比例互作效应不显著。在发酵 $1 \sim 12 \text{ h}$,添加 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的牛至精油对总产气量、 CH_4 产量无显著影响,发酵 $18 \sim 48 \text{ h}$,由于碳水化合物的减少,可能会导致发酵产生的 CO_2 等其他气体相应降低,使得总产气量降低,而 CH_4 可能会通过累积的 VFA 以及甲醇等途径合成^[35],因此 CH_4 产量无显著变化,当添加量高于 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,从整体看,牛至精油对总产气量、 CH_4 产量均有抑制作用,尤其对发酵 18 、 36 h 时 CH_4 产量的抑制作用大于对总产气量的抑制作用,这可能与瘤胃发酵气体的产生机制有关,高剂量的牛至精油一方面抑制了产 CH_4 菌的生长^[36]并改变了古细菌群落结构,从而减少了 CH_4 产量^[37],另一方面,可能抑制微生物对碳水化合物的利用,抑制瘤胃发酵,本研究 TVFA 降低的结果与此一致,总产气量下降的同时 CH_4 产量也相应降低,最终使得 CH_4 产量在总产气量中的比例显著下降。

4 结论

1) 添加 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 牛至精油可提高 DMD、CPD、NDFD,添加量大于 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时养分降解率逐渐降低。

2) 牛至精油可降低培养液丁酸和 $\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度,添加 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 牛至精油可提高培养液 TVFA、乙酸和丙酸浓度,而添加量大于 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 牛至精油降低培养液 TVFA、乙酸和丙酸浓度,对瘤胃发酵产生抑制作用。

3) 添加 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 牛至精油可降低发酵 18 h 后总产气量,但对 CH_4 产量无显著影响,添加量高于 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,可以降低总产气量和 CH_4 产量。

综合认为,在绵羊瘤胃体外发酵条件下,牛至精油添加量不应高于 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

参考文献 References:

[1] Kirschke S, Bousquet P, Ciais P, *et al.* Three decades of global methane sources and sinks. *Nature Geoscience*, 2013, 6(10):

813—823.

- [2] Eckard R J, Grainger C, Klein C A M D. Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production; A review. *Livestock Science*, 2010, 130(1): 47—56.
- [3] Tekippe J A, Hristov A N, Heyler K S, *et al.* Erratum to rumen fermentation and production effects of *Origanum vulgare* L. leaves in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 2012, 95(1): 498.
- [4] Lourenço M, Cardozo P W, Calsamiglia S, *et al.* Effects of saponins, quercetin, eugenol, and cinnamaldehyde on fatty acid biohydrogenation of forage polyunsaturated fatty acids in dual-flow continuous culture fermenters. *Journal of Animal Science*, 2008, 86(11): 3045.
- [5] Amorati R, Foti M C, Valgimigli L. Antioxidant activity of essential oils. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2013, 61(46): 10835—10847.
- [6] Busquet M, Calsamiglia S, Ferret A, *et al.* Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture. *Journal of Dairy Science*, 2005, 88(7): 2508—2516.
- [7] Wang C J, Wang S P, Zhou H. Influences of flavomycin, ropadiar, and saponin on nutrient digestibility, rumen fermentation, and methane emission from sheep. *Animal Feed Science & Technology*, 2009, 148(2): 157—166.
- [8] Chen H, Liu T, Wu J P, *et al.* Effects of oregano essential oil on growth and hematogenic immunity of newborn calves. *Pratacultural Science*, 2017, 34(10): 2141—2148.
陈昊, 刘婷, 吴建平, 等. 牛至精油对新生犊牛生长发育和血液免疫的影响. *草业科学*, 2017, 34(10): 2141—2148.
- [9] Yao X X, Wu J P, Liu T, *et al.* Effects of adding the oregano essential oil to the total mixed ration on production performance and incidence of hoof disease of lactating Holstein dairy cows. *Pratacultural Science*, 2016, 33(2): 299—304.
姚喜喜, 吴建平, 刘婷, 等. 全混合日粮中添加牛至精油对泌乳期荷斯坦奶牛生产性能和蹄病发生率的影响. *草业科学*, 2016, 33(2): 299—304.
- [10] Simitzis P E. Enrichment of animal diets with essential oils—a great perspective on improving animal performance and quality characteristics of the derived products. *Medicines*, 2017, 4(2): 35—56.
- [11] Patra A K, Yu Z. Effects of essential oils on methane production and fermentation by, and abundance and diversity of rumen microbial populations. *Applied & Environmental Microbiology*, 2012, 78(12): 4271—4280.
- [12] Rogério M C, de Castro E M, Martins E C, *et al.* Economical and financial analysis of lamb finishing fed with diets formulated according to the NRC (1985) and the NRC (2007). *Tropical Animal Health & Production*, 2012, 45(1): 259—266.
- [13] Menke K H, Steingass H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*, 1988, 28: 7—55.
- [14] Zhang L Y. *Quality analysis of feed and feed technology testing (3th Edition)*. Beijing: China Agricultural University Press, 2007: 49—78.
张丽英. *饲料分析及饲料质量检测技术(第 3 版)*. 北京: 中国农业大学出版社, 2007: 49—78.
- [15] Tilley J M A, Terry R A. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage grass. *Grass and Forage Science*, 2010, 18(2): 104—111.
- [16] Broderick G A, Kang J H. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and *in vitro* media. *Journal of Dairy Science*, 1980, 63(1): 64—75.
- [17] Zhou Z, Meng Q, Yu Z. Effects of methanogenic inhibitors on methane production and abundances of methanogens and cellulytic bacteria in *in vitro* ruminal cultures. *Applied & Environmental Microbiology*, 2011, 77(8): 2634—2639.
- [18] Xue H F, Meng Q X. Recent nutritional advances of neutral detergent fiber in dairy cow. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2007, 19(1): 454—458.
薛红枫, 孟庆翔. 奶牛中性洗涤纤维营养研究进展. *动物营养学报*, 2007, 19(1): 454—458.
- [19] Castillejos L, Calsamiglia S, Ferret A. Effect of essential oil active compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow in *in vitro* systems. *Journal of Dairy Science*, 2006, 89(7): 2649—2658.
- [20] Jin E W, Wang J Q, Bu D P, *et al.* Effects of essential oil on rumen fermentation and methanogenesis *in vitro* gas production. *Journal of China Agricultural University*, 2013, 18(3): 120—127.
金恩望, 王加启, 卜登攀, 等. 利用体外产气法研究植物精油对瘤胃体外发酵和甲烷生成的影响. *中国农业大学学报*, 2013, 18(3): 120—127.
- [21] Zhang R, Zheng C, Yan X G, *et al.* Effects of oregano essential oil on ruminal fermentation characteristics and ruminal degradability of diet nutrients in sheep. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2018, 30(10): 4181—4189.
张然, 郑琛, 闫晓刚, 等. 牛至油对绵羊瘤胃发酵特性及饲料营养物质瘤胃降解率的影响. *动物营养学报*, 2018, 30(10): 4181—4189.
- [22] Tian L X. Effects of yucca extract on milk performance, immune function and ammonia emission in dairy cattle. Hohhot: In-

- ner Mongolia Agricultural University, 2014: 3—6.
- 田丽新. 丝兰提取物对奶牛产奶性能、免疫功能和氨气排放的影响. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2014: 3—6.
- [23] Zhang H, Tong J J, Song M W, *et al.* Regulation of plant extracts on rumen fermentation, performance and methane production in ruminants and its mechanisms. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2018, 30(6): 2027—2035.
- 张华, 童津津, 孙铭维, 等. 植物提取物对反刍动物瘤胃发酵、生产性能及甲烷产量的调控作用及其机制. *动物营养学报*, 2018, 30(6): 2027—2035.
- [24] Han Q P, Zhang P H, Luo L, *et al.* Effects of wheat bran and bean hull as adsorption substrates for soybean molasses on the ruminal environment of dairy cows. *Pratacultural Science*, 2016, 33(12): 2559—2564.
- 韩奇鹏, 张佩华, 罗玲, 等. 不同来源吸附载体大豆糖蜜对奶牛瘤胃内环境的影响. *草业科学*, 2016, 33(12): 2559—2564.
- [25] Xu F H. Research on the effect of oregano oil and main components on rumen fermentation characteristics and methane production. Yanbian: Yanbian University, 2014: 15—17.
- 徐方华. 牛至油及主要成分对瘤胃发酵特性和甲烷产量影响的研究. 延边: 延边大学, 2014: 15—17.
- [26] Lin B. Effect of essential oil and their components combination added with fumarate on *in vitro* rumen fermentation and nutrient digestibility in Hu sheep. Hangzhou: Zhejiang University, 2011.
- 林波. 挥发油及其活性成分组合与富马酸钠共同添加对体外瘤胃发酵和湖羊养分消化的影响. 杭州: 浙江大学, 2011.
- [27] Patra A K, Yu Z. Essential oils affect populations of some rumen bacteria *in vitro* as revealed by microarray (Rumen Bact Array) analysis. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 297—310.
- [28] Li Y F, Hao J X, Ma Y Y, *et al.* Nutritive value evaluation of different types of feeds by *in vitro* ruminal fermentation method. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2013, 25(10): 2403—2413.
- 李袁飞, 郝建祥, 马艳艳, 等. 体外瘤胃发酵法评定不同类型饲料的营养价值. *动物营养学报*, 2013, 25(10): 2403—2413.
- [29] Noorian S E, Roozbenan Y. The influence of *Echium amoenum* extract on *in vitro* ruminal fermentation, protozoa population and reduction of methane production. *Iranian Journal of Animal Science*, 2012, 43(2): 287—296.
- [30] Flythe M D. The antimicrobial effects of hops (*Humulus lupulus* L.) on ruminal hyper ammonia production bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 2009, 48(6): 712—717.
- [31] McIntosh F M, Williams P, Losa R, *et al.* Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. *Applied & Environmental Microbiology*, 2003, 69(8): 5011—5014.
- [32] Hao Z L, Liu S M, Meng X Z. Ruminant nutrition. Lanzhou: Gansu Ethnic Publishing House, 2000: 3—4.
- 郝正里, 刘世民, 孟宪政. 反刍动物营养学. 兰州: 甘肃民族出版社, 2000: 3—4.
- [33] Chaudhary P P, Goel N, Baker G, *et al.* Influence of essential oils supplementation on rumen fermentation profile and ruminal microbial population *in vitro*. *Journal of Science*, 2016, 1(4): 25—34.
- [34] Oskoueian E, Abdullah N, Oskoueian A. Effects of flavonoids on rumen fermentation activity, methane production, and microbial population. *BioMed Research International*, 2013, 13(6): 9—24.
- [35] Qiao S M, Qiao J Y, Tan Z L. An overview on methane biochemistry mechanism and regulation in ruminants. *China Herbivore Science*, 2014, 34(1): 44—48.
- 乔升民, 乔君毅, 谭支良. 反刍动物瘤胃甲烷生成机制及调控措施研究进展. *中国草食动物科学*, 2014, 34(1): 44—48.
- [36] Cobellis G, Trbalzamarinucci M, Yu Z. Critical evaluation of essential oils as rumen modifiers in ruminant nutrition: A review. *Science of the Total Environment*, 2016, 103(12): 545—546.
- [37] Bhatta R. Reducing enteric methane emission using plant secondary metabolites//Springer. Climate change impact on livestock: Adaptation and mitigation. India: Springer, 2015: 273—284.