



曹力文,冯春燕,温世宝,等.不同包被缓释尿素的瘤胃缓释效果的评价[J].南京农业大学学报,2024,47(1):157-165.

CAO Liwen, FENG Chunyan, WEN Shibao, et al. The rumen slow-release effect of coated urea evaluated by different methods[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2024, 47(1): 157-165.

不同包被缓释尿素的瘤胃缓释效果的评价

曹力文¹,冯春燕²,温世宝²,郑文金¹,申军士^{1*},毛胜勇¹,朱伟云¹

(1.国家动物消化道营养国际联合研究中心/南京农业大学动物科技学院消化道微生物研究室,江苏南京210095;
2.上海美农生物科技股份有限公司,上海201807)

摘要:[目的]本文旨在通过体外批次发酵、瘤胃灌注和持续动态人工瘤胃模拟系统等不同方法评价包被缓释尿素的瘤胃缓释效果。[方法]体外发酵试验:选取1种普通尿素和4种商业包被缓释尿素,体外培养24h,采集不同时间点(0、1、3、6、9、12、24h)发酵液测定氨氮浓度,将筛选出缓释效果最好的缓释尿素用于进一步的研究。瘤胃灌注试验:12只体重(平均27.6kg)相近的安装有瘤胃瘘管的育肥公湖羊,随机平均分为2组,分别向瘤胃中灌注剂量为干物质采食量0.5%的普通尿素或日采食量0.55%的缓释尿素(等氮当量),灌注后不同时间点(0、1、3、6、9、12和24h)采集瘤胃液,测定pH值和氨氮浓度。人工瘤胃试验:在基础日粮中分别添加3.5%的豆粕(普通日粮组)、0.5%的普通尿素(普通尿素组)和0.55%的缓释尿素(缓释尿素组),使用玉米补充普通尿素和缓释尿素组能量的缺乏;试验重复3次,每次持续7d(4d适应期和3d采样期),采样期每天早上投料前后不同时间点采集发酵液和溢流液,测定发酵参数和微生物蛋白浓度。[结果]体外发酵试验:在发酵开始的9、12h,缓释尿素A组的氨氮浓度显著低于普通尿素组和其他3个缓释尿素处理组($P<0.05$)。体内瘤胃灌注试验:在灌注尿素后1h,缓释尿素组瘤胃pH值和氨氮浓度显著低于普通尿素组($P<0.05$),在灌注尿素后6h,缓释尿素组的pH值显著高于普通尿素组($P<0.05$)。人工瘤胃模拟试验:相比于其他2组,日粮添加缓释尿素显著提高了发酵液中丙酸和微生物蛋白的浓度($P<0.05$);相比于普通日粮组,日粮添加缓释尿素显著降低了发酵液pH值($P<0.05$)。[结论]不同包被缓释尿素的瘤胃缓释效果存在差异,体外发酵筛选出的缓释尿素A在动物瘤胃灌注条件下同样表现出较好的缓释效果。在人工瘤胃发酵试验中添加缓释尿素A能够改善瘤胃发酵,促进微生物蛋白的合成,但对生长性能和瘤胃菌群的影响仍需动物饲养试验做进一步的验证。

关键词:包被缓释尿素;体外发酵;瘤胃灌注;持续动态人工瘤胃模拟系统;发酵参数

中图分类号:S826

文献标志码:A

文章编号:1000-2030(2024)01-0157-09

The rumen slow-release effect of coated urea evaluated by different methods

CAO Liwen¹, FENG Chunyan², WEN Shibao², ZHENG Wenjin¹,
SHEN Junshi^{1*}, MAO Shengyong¹, ZHU Weiyun¹

(1. National Center for International Research on Animal Gut Nutrition/Laboratory of Gastrointestinal Microbiology,
College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;
2. Shanghai Menon Animal Nutrition Technology Co., Ltd., Shanghai 201807, China)

Abstract:[Objectives] This study was conducted to evaluate the rumen slow-release effect of coated urea by techniques of *in vitro* batch culture, *in vivo* rumen infusion, and continuous artificial rumen simulation system. [Methods] *In vitro* batch culture: one common urea and four commercial coated slow-release urea were added to *in vitro* ruminal cultures in quadruplicate. Culture samples were collected at 0, 1, 3, 6, 9, 12, 24 h for determination of ammonia concentration, and to evaluate the slow-release effect of different coated urea. Coated urea with the best slow-release effect was selected for further evaluation. *In vivo* rumen infusion: twelve fattening male Hu sheep (mean body weight 27.6 kg) with rumen cannula were randomly assigned to two treatments, and infused with 0.5% (dry matter intake, DMI) of common urea or 0.55% of coated urea respectively. Rumen fluid samples were collected to measure ammonia concentration and pH value. Continuous artificial rumen simulation experiment: three fermenters were assigned to one of three experiment diets: basal diet supplemented with 3.5% soybean meal (BSM), basal diet supplemented with 0.5% common urea (CU), and basal diet supplemented with 0.55% coated slow-release urea (SRU) respectively. The energy deficiency in CU and SRU group was

收稿日期:2023-01-15

基金项目:国家自然科学基金项目(32272897)

*通信作者:申军士,副教授,研究方向为反刍动物营养与瘤胃发酵调控, E-mail: shenjunshi@njau.edu.cn。

supplemented with ground corn. The rumen simulation system with three fermenters was used in three replicated periods of 7 d each (4 d for adaptation and 3 d for sampling). Fermenter liquid and overflow liquid were collected at different time points after mooning feeding to determine fermentation parameters and microbial protein concentration. [Results] The results of *in vitro* batch culture showed that the ammonia concentration of slow-release urea A was lower than common urea and three other coated urea at 9 and 12 h after fermentation ($P < 0.05$). *In vivo* rumen infusion experiment; compared with common urea group, the ammonia concentration and pH value were greatly reduced in slow-release urea at 1 h after infusion ($P < 0.05$). While the pH value in slow-release urea was significantly higher than that in common urea at 6 h after infusion ($P < 0.05$). Continuous rumen simulation experiment; slow-release urea addition significantly increased propionic acid and microbial protein concentration compared with the other two groups ($P < 0.05$), and decreased the pH value compared with urea group ($P < 0.05$). [Conclusions] This study demonstrated that the slow-release effect of different coated urea was different, and slow-release urea A had the best rumen slow-release effect. The slow-release urea screened by *in vitro* batch culture also showed good slow-release effect under the condition of *in vivo* rumen infusion. Diets with slow-release urea A supplementation could improve rumen fermentation and increase microbial protein synthesis in rumen continuous simulation system, but its release effect needs to be further verified by animal feeding experiment.

Keywords: coated slow-release urea; *in vitro* fermentation; *in vivo* rumen infusion; continuous artificial rumen simulation system; fermentation parameter

随着我国畜牧业的快速发展,优质饲料资源长期短缺,特别是蛋白质饲料资源短缺成为制约我国畜牧业发展的瓶颈。对于反刍动物来说,瘤胃微生物可以利用非蛋白氮作为氮源合成微生物蛋白,微生物蛋白在进入消化道后被消化、吸收,满足反刍动物机体的生长或生产需要^[1-2]。因此,在反刍动物日粮中添加部分非蛋白氮可以达到减少对优质蛋白质饲料原料依赖的目的。尿素因其含氮量高、价格低廉、易于制取等优势,成为非蛋白氮饲料中的主导品种^[3]。但尿素进入瘤胃后很快就会在瘤胃微生物所分泌脲酶的作用下水解为氨和二氧化碳,当日粮中尿素水平过高时,会使产氨的速度超过瘤胃微生物利用氨的速率,造成瘤胃内氨的积累^[4-5]。多余的氨通过瘤胃上皮吸收入血到达肝脏,在肝脏尿素循环的作用下重新转化为尿素,最终大部分随尿液排出体外,造成尿素氮的浪费和对环境的污染^[6-7]。缓释尿素技术可以减缓氨的释放速度,使能氮的释放更加趋于同步,提高瘤胃微生物对尿素氮的利用效率^[8]。包被缓释尿素是目前最新的尿素缓释技术,多使用天然聚合物对尿素进行包被,具有缓释性佳、安全性高、适口性好等优点^[9]。目前市售包被缓释尿素产品众多,但其质量良莠不齐,缓释效果不一。本研究通过体外发酵、体内瘤胃灌注和持续动态人工瘤胃模拟3个试验,逐步模拟真实生产中的瘤胃环境,探究缓释尿素在不同场景中的缓释效果及其对瘤胃氨浓度、发酵参数和微生物蛋白合成的影响,旨在为缓释尿素产品的有效利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 体外发酵试验

1.1.1 试验动物及材料 选取市面常见的1种常规饲料级普通尿素和4种商业包被缓释尿素(A、B、C、D),使用凯氏定氮法测定其含氮量。具体尿素含氮量见表1。发酵底物为4 g全混合饲料(青贮玉米,20%;花生秧,20%;玉米,27%;豆粕,13%;干酒糟及其可溶物(DDGS),11%;麸皮,5%;碳酸氢钠,1%;预混料,3%,以上均为质量分数)。瘤胃液供体为南京农业大学实验动物中心4只体况良好、体重相近(平均25.0 kg)的安装有瘤胃瘘管的公湖羊,日粮为精粗比60:40(质量比)的全混合日粮(日粮组成与发酵底物相同),每日08:00和18:00饲喂,自由饮水。

1.1.2 试验设计 采用单因素试验设计,共分为5个组,每组4个重复。在1 000 mL发酵瓶中分别添加等氮含量的普通尿素和缓释尿素A、B、C、D。具体尿素添加量见表1。

1.1.3 瘤胃液接种和体外培养 晨饲前通过瘤胃瘘管采集瘤胃液,用4层纱布过滤后于39℃保存备用。参照Menke等^[10]的方法配制缓冲液并进行适当改进,将 NH_4HCO_3 替换为等 HCO_3^- 摩尔含量的 NaHCO_3 ,

表1 普通尿素和各缓释尿素的含氮量及添加量

Table 1 Nitrogen content and urea supplementation dose of common urea and slow-release urea

试验材料 Experiment material	含氮量/% Nitrogen content	添加量/g Addition amount
普通尿素 Common urea	45.46	0.369 6
缓释尿素 A Slow-release urea A	41.50	0.404 8
缓释尿素 B Slow-release urea B	41.29	0.406 9
缓释尿素 C Slow-release urea C	41.83	0.401 6
缓释尿素 D Slow-release urea D	41.88	0.401 1

以去除 NH_4HCO_3 分解产氨对发酵液氨浓度的影响。将过滤后的瘤胃液与缓冲液按体积比 10:90 的比例充分混合,取 400 mL 瘤胃液-缓冲液混合液分装于装有底物的 1 000 mL 发酵瓶中,然后将发酵瓶置于 39 °C 恒温培养箱连续培养 24 h。接种瘤胃液全程保持厌氧操作。

1.1.4 样品采集 分别在发酵 0、1、3、6、9、12、24 h 时采集 2 mL 发酵液,保存于-20 °C 冰箱用于氨氮浓度的测定。

1.2 瘤胃灌注试验

1.2.1 试验动物及材料 试验原料为体外发酵试验所用普通尿素和 4 种缓释尿素中缓释效果最好的包被尿素(缓释尿素 A)。灌注对象为 12 只体况良好、体重相近[(27.6±2.37)kg]的安装有瘤胃瘘管的公湖羊,随机平均分为 2 组,分别灌注普通尿素和缓释尿素。湖羊日粮为精粗比 60:40(质量比)的全混合日粮(日粮组成与体外发酵试验的发酵底物相同),每日 08:00 和 18:00 饲喂,自由饮水。

1.2.2 试验设计 采用单因素试验设计,试验分为 2 个处理,分别灌注普通尿素(普通尿素组)和缓释尿素 A(缓释尿素组)。普通尿素灌注剂量为湖羊日均干物质采食量的 0.5%(统计试验前 7 d 动物的采食量来计算确定尿素灌注量)。灌注剂量见表 2。普通尿素和缓释尿素灌注剂量计算公式如下:

普通尿素组:灌注剂量(g)=日均干物质采食量(kg)×1 000×0.5%;

缓释尿素组:灌注剂量(g)=普通尿素组灌注剂量(g)×45.46%(普通尿素含氮量)/41.5%(缓释尿素 A 含氮量)。

表 2 育肥湖羊日均采食量和尿素灌注剂量

Table 2 Dry matter intake and urea infusion dose of fattening Hu sheep

普通尿素组 Common urea(CU)			缓释尿素组 Slow-release urea(SRU)		
体重/kg Body weight	日均干物质采食/kg Dry matter intake per day	灌注剂量/g Infusion dose	体重/kg Body weight	日均干物质采食/kg Dry matter intake per day	灌注剂量/g Infusion dose
29.05	0.81	4.03	27.35	0.97	5.28
25.60	0.65	3.23	32.20	0.97	5.30
26.75	0.83	4.17	27.30	0.82	4.48
25.20	0.62	3.11	26.15	0.61	3.33
27.40	0.83	4.14	27.45	0.71	3.86
30.45	1.05	5.23	25.90	0.68	3.73

1.2.3 尿素灌注和样品采集 晨饲后 2 h(10:00)通过瘤胃瘘管将尿素颗粒直接投入瘤胃内,并将尿素颗粒和瘤胃内容物充分混匀。在灌注前 0 h 和灌注后 1、3、6 h 分别采集 50 mL 瘤胃液,用 pH 计测定 pH 值后保存于-20 °C 冰箱,用于氨氮浓度的测定。

1.3 人工瘤胃试验

1.3.1 人工瘤胃装置运行参数 本研究所用持续动态人工瘤胃系统由沈维军等^[11]在 2012 年研制的基础上改进而来,包括发酵装置、溢流装置、液体供应组件、数据检测组件和主控机构 5 部分。参照伍梦楠等^[12]的方法设置运行参数。

1.3.2 瘤胃液来源及材料 试验原料为体外发酵试验所用普通尿素和 4 种缓释尿素中缓释效果最好的包被尿素(缓释尿素 A)。瘤胃液采自北京畜牧兽医所昌平基地内 3 只体况良好的荷斯坦奶牛。奶牛日粮为精粗比 50:50(质量比)的全混合日粮(青贮玉米,50%;豆粕,9.5%;棉籽,4.5%;菜粕,2%;DDGS,5%;喷浆玉米皮,2.4%;玉米粉,22.5%;石粉,0.7%;食盐,0.5%;氧化镁,0.3%;磷酸氢钙,0.3%;脂肪粉,1%;小苏打,0.8%;预混料,0.5%,以上均为质量分数)。每日 09:00 和 21:00 两次添加日粮作为发酵底物。

1.3.3 试验设计 试验共分为 3 个发酵处理组,分别为:基础日粮+豆粕(普通日粮组)、基础日粮+普通尿素(普通尿素组)和基础日粮+缓释尿素(缓释尿素组),使用玉米补充普通尿素和缓释尿素组能量的缺乏。试验共重复进行 3 次,每次发酵持续 7 d,前 4 d 为适应期,后 3 d 为采样期。试验日粮配方见表 3。发酵过程始终保持在 39 °C 恒温下进行,缓冲液以 60 mL·h⁻¹ 的恒定速率流入发酵罐内,每日 09:00 和 21:00 向发酵罐中加入 20 g 饲料。

1.3.4 瘤胃液接种 试验开始前 24 h 将机器调试完好并在每个发酵罐中放入 500 mL 发酵缓冲液并预热,发酵缓冲液参照 McDougall^[13]经典配方配制。晨饲后 2 h 通过瘤胃瘘管采集瘤胃液,使用 4 层纱布过滤后倒入保温壶进行保温并迅速带回实验室接种。向每个发酵罐中加入 500 mL 过滤后的瘤胃液,接种完成后立即加入 20 g 饲料。

表3 试验日粮原料组成和营养组成

Table 3 Ingredient and nutrient composition of the experimental diets

原料组成 Ingredients composition	普通			营养组成 Nutrient composition	普通		
	日粮组 SBM ¹	尿素组 CU	缓释 尿素组 SRU		日粮组 SBM	尿素组 CU	缓释 尿素组 SRU
青贮玉米 Corn silage	25.00	25.00	25.00	粗蛋白 Crude protein	15.66	15.64	15.65
苜蓿干 Alfalfa hay	15.00	15.00	15.00	瘤胃可降解蛋白 Rumen degraded protein ³	11.09	11.48	10.96
燕麦干草 Oat hay	4.00	4.00	4.00	瘤胃不可降解蛋白 Rumen undegraded protein ³	6.23	5.82	6.36
全棉籽 Whole cottonseed meal	4.00	4.00	4.00	中性洗涤纤维 Neutral detergent fiber	27.90	28.58	28.14
甜菜粕 Sugar beet meal	4.00	4.00	4.00	酸洗洗涤纤维 Acid detergent fiber	15.37	15.91	15.12
玉米 Corn grain	21.00	24.00	23.95	粗脂肪 Crud fat	3.9	3.72	3.96
大麦 Barley	4.00	4.00	4.00	粗灰分 Ash	7.41	7.16	7.12
豆粕 Soybean meal	13.00	9.50	9.50	泌乳净能 Net energy lactation ³	7.28	7.28	7.28
膨化大豆 Puffed soybeans	2.50	2.50	2.50				
干玉米酒精糟及其可溶物 Distillers dried grains with solubles(DDGS)	3.75	3.75	3.75				
脂肪粉 Fat powder	0.50	0.50	0.50				
磷酸氢钙 CaHPO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.25	0.25				
石粉 Stone powder	1.00	1.00	1.00				
食盐 Salt	0.50	0.50	0.50				
小苏打 NaHCO ₃	0.75	0.75	0.75				
氧化镁 MgO	0.25	0.25	0.25				
1%预混料 1% premix	0.50	0.50	0.50				
普通尿素 Common urea ²		0.50					
缓释尿素 Slow-release urea ²			0.55				

注:1) BSM:普通日粮组(基础日粮+豆粕);2)普通尿素、缓释尿素含氮量分别为45.5%、41.5%;3)瘤胃可降解蛋白、瘤胃不可降解蛋白和泌乳净能为估算值,其余为实测值,泌乳净能的单位为MJ·kg⁻¹。

Note:1) BSM:Basal diet+soybean meal;2)The nitrogen content of control urea and slow-release urea are 45.5% and 41.5%, respectively;3)Rumen degraded protein, rumen undegraded protein and net energy for lactation are estimated values, and the rest are measured values;the net energy lactation unit is MJ·kg⁻¹.

1.3.5 样品采集 采样期每日09:00加料前后选择不同时间点进行采样。在加料前(0 h)和加料后1、2、4、7、12 h分别采集发酵液20 mL,用pH计测定pH值后保存于-20℃冰箱,用于氨氮浓度的测定。于加料前(0 h)和加料后4 h额外采集20 mL发酵液,保存于-20℃冰箱,用于挥发性脂肪酸浓度的测定。于加料前(0 h)和加料后12 h分别采集10 mL溢流液,保存于-20℃冰箱,用于微生物蛋白浓度的测定。

1.4 发酵参数的测定

尿素含氮量的测定:参照张丽英^[14]的方法,取适量尿素加入10 mL浓硫酸,420℃消煮3 h后使用凯氏定氮仪测定样品含氮量。饲料常规成分的测定:将饲料样在65℃环境下烘干,粉碎后过40目筛,参照张丽英^[14]的方法,在(105±2)℃烘箱中将饲料样烘干至恒重,以测定饲料中水分含量;取适量饲料样进行消煮后使用凯氏定氮仪测定饲料中粗蛋白含量;采用索氏脂肪提出器用乙醚抽提饲料样以测定饲料中粗脂肪含量;将饲料样放入马弗炉中经550℃灼烧以测定饲料中粗灰分含量;分别将中性洗涤剂 and 酸性洗涤剂加入纤维分析仪中测定饲料中中性洗涤纤维和酸性洗涤纤维含量。氨态氮浓度的测定:取发酵液样品流水解冻,参照Chaney等^[15]的方法,以氯化铵为标准品,用比色法进行氨态氮浓度的测定。挥发性脂肪酸的测定:参照秦为琳^[16]的方法进行挥发性脂肪酸的测定。取待测样品,经流水解冻后,4℃,12 000 r·min⁻¹离心10 min,上清液经0.22 μm针式过滤器过滤后使用气相色谱仪(岛津GC-2014C)进行测定,其中柱温130℃,汽化温度180℃,检测温度180℃,压力为60 kPa,氢气压力为50 kPa,氧气压力50 kPa。

1.5 数据处理与分析

体外发酵试验数据使用SPSS 23.0软件进行分析,因时间和处理的交互作用显著,通过单因素方差分析(ANOVA)检验比较每个时间点的组间差异,再使用LSD法进行多重比较。瘤胃灌注试验数据使用SPSS 23.0软件进行分析,因时间和处理的交互作用显著,通过独立样本t检验比较每个时间点两组间的差异。人工瘤胃试验的数据采用SAS 9.4软件混合模型进行分析,处理、采样时间和采样时间与处理的交互作用作为固定效应。 $P \leq 0.05$ 表示差异显著, $0.05 < P \leq 0.1$ 表示有趋势。

2 结果与分析

2.1 不同缓释尿素在体外发酵中的氨释放速率

由图 1 可知:在体外发酵的前 12 h,不同处理组的氨释放速率不同。在发酵 3 h 时,缓释尿素 A 组和缓释尿素 C 组的氨态氮浓度均显著低于普通尿素组($P<0.05$)。在发酵的 9、12 h,缓释尿素 A 组和缓释尿素 D 组的氨态氮浓度均显著低于其他 3 组($P<0.05$),且缓释尿素 A 组的氨态氮浓度显著低于缓释尿素 D 组($P<0.05$)。

2.2 尿素灌注对湖羊瘤胃氨态氮浓度和 pH 值的影响

如图 2-a 所示:向瘤胃灌注尿素后,2 组的氨态氮浓度均呈现先升高后降低的趋势,相比于普通尿素组,缓释尿素组的氨态氮浓度变化曲线较为平缓。灌注后 1 h 时,普通尿素组的氨态氮浓度达到最高且显著高于缓释尿素组($P<0.05$)。灌注后 3 h 时,缓释尿素组的氨态氮浓度达到最高且数值上高于普通尿素组,但差异不显著($P>0.05$)。

如图 2-b 所示:灌注尿素后普通尿素组的 pH 值呈现先升高后降低的趋势,而缓释尿素组的 pH 值升高后保持在相对稳定的范围内。灌注 1 h 时普通尿素组的 pH 值达到最高,显著高于缓释尿素组($P<0.05$),灌注 6 h 时普通尿素组 pH 值降至最低且显著低于缓释尿素组($P<0.05$)。

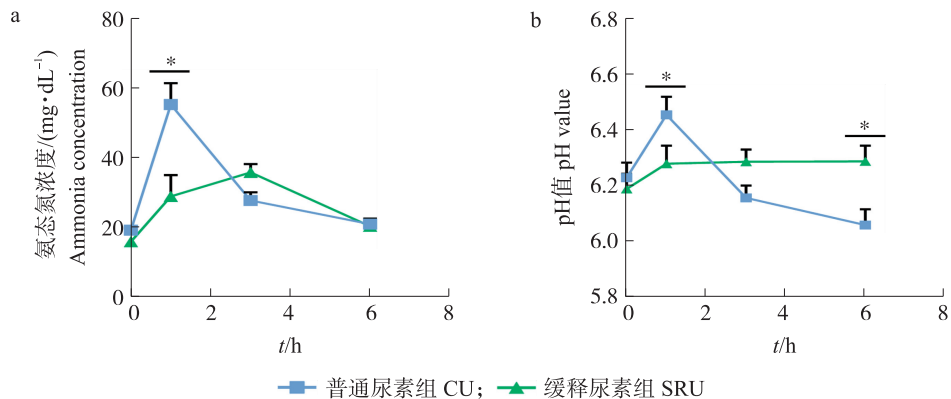


图 2 尿素灌注对育肥湖羊瘤胃氨态氮浓度(a)和 pH 值(b)动态变化的影响

Fig. 2 Effects of urea infusion on the dynamic change of rumen ammonia concentration(a) and pH value(b) in fattening Hu sheep

2.3 不同处理对持续动态人工瘤胃发酵参数的影响

如图 3-a 所示:3 个处理组的氨态氮浓度在 09:00 投料后均有先升高后降低的变化趋势。相比于普通日粮组,普通尿素组和缓释尿素组发酵罐内的氨态氮浓度均提高,但差异不显著($P>0.05$)。3 个处理组的氨态氮浓度均在发酵 1 h 时达到最高,在发酵 7 h 时降至最低。不同的是,在 0~12 h 时相比于普通日粮组和普通尿素组,缓释尿素组的氨氮浓度变化幅度较小。

如图 3-b 所示:不同处理组的 pH 值变化趋势基本相同,随着发酵时间的延长,pH 值先下降后升高。3 个处理的 pH 值均在发酵 4 h 时降至最低,随后缓慢升高,在 12 h 时升至最高。如表 4 所示:经过 7 d 的发酵,普通尿素组的 pH 值显著高于缓释尿素组($P<0.05$)。

如表 4 所示:相比于普通日粮组和普通尿素组,缓释尿素组的微生物蛋白和丙酸浓度显著升高($P<0.05$),总挥发性脂肪酸和丁酸的浓度有提高,但差异不显著($P>0.05$)。3 组间乙酸、异丁酸、戊酸、异戊酸的浓度差异不显著($P>0.05$)。

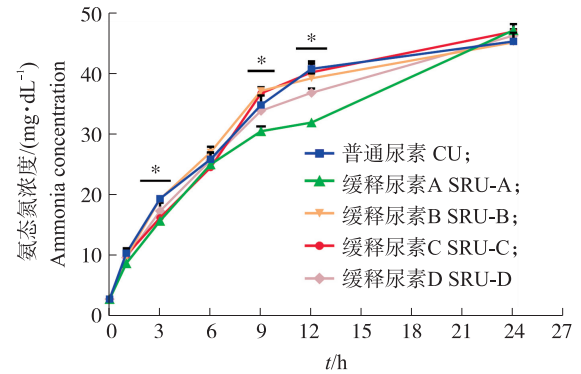


图 1 不同处理对体外发酵氨态氮浓度动态变化的影响
Fig. 1 Effects of different treatments on dynamic change of ammonia concentration in the *in vitro* cultures

* $P<0.05$. The same as follows.

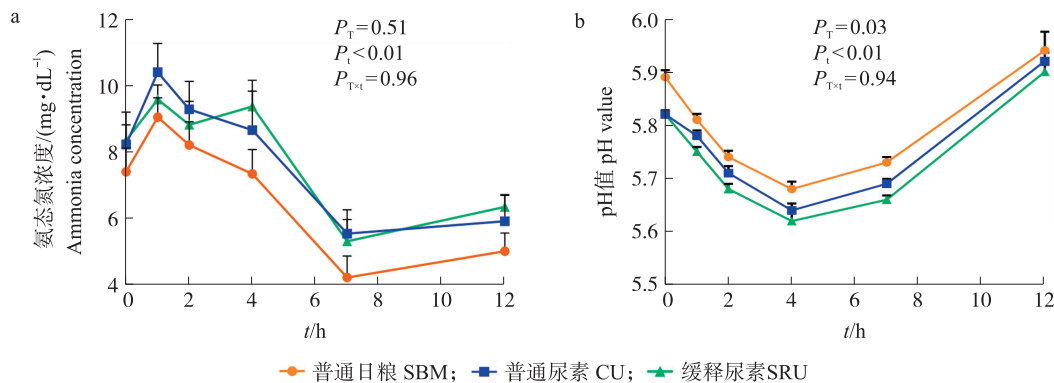


图 3 不同处理对持续动态人工瘤胃模拟系统氨态氮浓度(a)和 pH 值(b)动态变化的影响

Fig. 3 Effects of the different treatments on dynamic change of ammonia concentration(a) and pH value(b) in continuous artificial rumen simulation system

$P_T, P_t, P_{T \times t}$ 分别为各处理组、时间点和处理与时间交互作用的 P 值。下同。

$P_T, P_t, P_{T \times t}$ represent the P -value of treatment, time, and the interaction between treatment and time, respectively. The same below.

表 4 缓释尿素添加对持续动态人工瘤胃模拟系统发酵参数动态变化的影响

Table 4 Effects of slow-release urea supplementation on dynamic change of fermentation characteristics in continuous artificial rumen simulation system

项目 Item	普通日粮 SBM	普通尿素 CU	缓释尿素 SRU	标准误 SE	P_T	P_t	$P_{T \times t}$
pH 值 pH value	5.80 ^a	5.76 ^{ab}	5.74 ^b	0.013	0.03	<0.01	0.94
氨态氮浓度/(mmol·L ⁻¹) Ammonia concentration	6.86	7.99	7.95	0.985	0.51	<0.01	0.96
总挥发酸浓度/(mmol·L ⁻¹) Total VFA concentration	130.1	129.9	137.7	3.528	0.29	<0.01	0.63
乙酸浓度/(mmol·L ⁻¹) Acetate concentration	72.44	71.95	69.99	2.439	0.48	<0.01	0.66
丙酸浓度/(mmol·L ⁻¹) Propionate concentration	26.77 ^b	26.36 ^b	28.38 ^a	0.689	<0.01	<0.01	0.61
丁酸浓度/(mmol·L ⁻¹) Butyrate concentration	21.93	22.96	29.55	4.064	0.28	<0.01	0.16
异丁酸浓度/(mmol·L ⁻¹) Isobutyrate concentration	1.18	1.19	1.18	0.074	0.98	0.04	0.92
戊酸浓度/(mmol·L ⁻¹) Valerate concentration	2.98	2.83	3.42	0.213	0.21	<0.01	0.04
异戊酸浓度/(mmol·L ⁻¹) Isovalerate concentration	4.85	4.58	5.15	0.673	0.78	<0.01	0.25
微生物蛋白浓度/(mg·dL ⁻¹) Microbial protein concentration	4.94 ^b	5.03 ^b	5.67 ^a	1.662	<0.01	0.60	0.43

注:同行不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

Note: Different small letters in the same row indicate significant differences at 0.05 level.

3 讨论

尿素在瘤胃微生物分泌脲酶的作用下,进入瘤胃后首先分解为氨,随后被瘤胃微生物利用合成微生物蛋白,因此直接测定发酵体系内的氨态氮浓度即可体现尿素分解程度,评估其缓释效果。体外发酵试验周期短,样本容量大,且之前的研究发现体外培养法评估缓释尿素的缓释效果具有较高的准确性^[17]。不过由于产物抑制、挥发性脂肪酸积累导致 pH 值下降等原因,经一定时间培养后会有微生物的活力下降、组成变化等问题,故体外发酵不能完全代表反刍动物瘤胃内发酵的情况。因此本研究首先通过体外发酵法评估了几种不同缓释尿素,并筛选出缓释效果最好的缓释尿素产品,随后通过瘤胃灌注法,将缓释尿素注射到育肥湖羊瘤胃内,评估其在瘤胃环境中的缓释效果。相比于普通尿素,缓释尿素能够降低瘤胃内氨态氮浓度,瘤胃内环境的改变会影响瘤胃内菌群结构^[18-19],瘤胃菌群结构的变化又会导致微生物发酵产物的差异^[20]。而短期发酵难以体现添加尿素对瘤胃发酵的影响,因此在体外发酵试验和瘤胃灌注试验中仅针对氨态氮浓度进行了测定。持续动态人工瘤胃装置可以满足长期发酵要求,能够实现发酵底物和缓冲液的连续进入和排出,且发酵参数接近活体反刍动物瘤胃内发酵状况^[11]。因此本研究通过持续动态人工瘤胃装置探究日粮添加缓释尿素对微生物蛋白合成和瘤胃发酵的影响。

维持瘤胃内适宜的氨态氮浓度能够改善瘤胃发酵,促进微生物蛋白的合成,提高动物机体对尿素氮的利用效率,减少粪尿中氮排泄引起的环境污染^[21]。体外发酵试验结果显示在体外发酵 3、9 和 12 h 的氨态氮浓度具有显著差异,说明 4 种缓释尿素在体外发酵前 12 h 的缓释效果不同。其中缓释尿素 A 具有最好的缓释效果,部分缓释尿素的尿素分解速度与普通尿素相近,可能是缓释尿素包被材料和包被技术的不同

导致其缓释效果的差异。每 100 mL 瘤胃液或 100 g 内容物每小时可以将 80~100 mg 尿素转化为氨^[22],这一速率远高于本研究中的尿素水解速率,在本研究中所有处理组的尿素完全水解都需要 24 h。这可能与瘤胃液接种量较少有关,初始微生物数量较少,因此需要更长的时间来分解高剂量的尿素。此外本研究添加尿素剂量超过实际生产中所添加的浓度,大量尿素分解产生的高氨浓度会抑制尿素酶的活性^[23],这也可能在一定程度上降低了尿素的分解速度。最终根据体外发酵过程中分解产氨速度,本研究筛选出缓释尿素 A 进行后续试验。

本研究瘤胃灌注试验结果与预期相符,相比于普通尿素,缓释尿素降低了瘤胃内的尿素分解速度,这与 Sinclair 等^[23]在羊的瘤胃原位降解试验中得出的结果一致,说明缓释尿素能够同步氨与可发酵碳水中能量的释放,以提高尿素氮的利用效率。灌注后普通尿素组的最大氨态氮浓度超过最佳瘤胃细菌生长值(19.32 mg·dL⁻¹)的 2 倍^[25],虽然仍低于氨中毒的标准^[26],但会导致大量的氨来不及被瘤胃微生物利用就随粪尿排出体外,造成尿素氮的浪费。此外,本研究发现相比于普通尿素,缓释尿素维持了瘤胃内 pH 值的稳定,这是由于缓释尿素能够持续分解产氨,尿素分解产生的氨为弱碱性且可以中和瘤胃发酵产生的酸,从而缓解瘤胃 pH 值的降低的问题^[27]。普通尿素在瘤胃内快速分解产氨使瘤胃 pH 值在短时间内快速升高,而 pH 值的升高会促进瘤胃内游离氨浓度的升高和瘤胃上皮对氨的吸收,增加反刍动物氨中毒的风险^[28-29]。以上结果说明,相比于普通尿素,缓释尿素能够维持瘤胃内氨态氮浓度和 pH 值的稳定,这与前人关于缓释尿素研究得出的结果一致^[23]。

在前面 2 个试验结果的基础上,本研究又通过体外持续动态人工瘤胃装置模拟真实瘤胃环境,探究缓释尿素的缓释效果和对瘤胃发酵参数、微生物蛋白合成的影响。由于持续动态人工瘤胃装置采用了 1 000 mL 的发酵罐,瘤胃液和缓冲液的接种比例为 1:1,所需瘤胃液剂量较大,因此本试验采取奶牛为瘤胃液供体。本研究发现,虽然不同试验组在发酵过程中的总氨态氮浓度没有显著差异,但缓释尿素组的氨态氮浓度在早晨投料后的 2~4 h 间略有上升,说明缓释尿素延缓了尿素的分解时间,表现出了一定的缓释效果。前人研究发现,适宜的氨态氮浓度有利于瘤胃微生物的生长,提高微生物蛋白的合成效率^[30]。此外,瘤胃中适宜的能氮比可以使微生物获取的能氮更加平缓,充分发挥微生物发酵效率,促进挥发性脂肪酸的合成^[31]。在本研究中,缓释尿素维持了氮的同步释放,促进了微生物的生长,从而提高了微生物蛋白和丙酸的产量。此外,缓释尿素维持了氨态氮浓度的稳定,这可能促进了初级产丙酸菌的增殖,进而导致丙酸浓度的升高^[32]。微生物蛋白和挥发性脂肪酸分别是反刍动物的主要蛋白来源和能量来源^[2,33],其中丙酸作为主要的糖异生前体物,在瘤胃内的利用效率最高^[34]。由此可见,在日粮中添加等氮含量的缓释尿素更有利于获得维持生命和生产所需的能量。健康的反刍动物瘤胃 pH 值为 6.1~6.8,保持动态平衡,以维持瘤胃功能的正常运转^[29]。在本研究中,日粮添加不同类型尿素没有显著影响发酵液 pH 值,但采样期所有试验组发酵液的 pH 值均降至 5.8 以下,低于正常的瘤胃 pH 值范围。发酵液的 pH 值受到碳水化合物发酵产酸、微生物对挥发性脂肪酸的吸收利用和食糜随溢液外流的影响,当挥发性脂肪酸的产量超过微生物的利用能力时,会有一部分挥发性脂肪酸留在发酵罐内,造成发酵罐内挥发性脂肪酸的积累,从而降低发酵液 pH 值^[35]。

综上,本研究选用 3 种方法全面评价了包被缓释尿素在不同环境中的缓释效果,其中体外批次发酵适用于多种缓释尿素产品的缓释效果的初步筛选,瘤胃灌注能准确反映缓释尿素在瘤胃内的缓释效果,持续动态人工瘤胃能一定程度体现缓释尿素对瘤胃发酵的影响。结果显示,不同缓释尿素产品在体外发酵中的缓释效果具有显著差异,包被尿素 A 缓释效果最好;体外发酵筛选出的缓释尿素在体内灌注试验条件下同样具有良好的缓释效果,且能够维持瘤胃内氨态氮浓度和 pH 值的稳定;持续人工动态瘤胃装置试验发现缓释尿素能够改善瘤胃发酵,促进微生物蛋白的合成。总的来说,缓释尿素能够降低尿素分解速度,维持适宜的瘤胃氨态氮浓度和 pH 值,提高尿素氮的利用效率,但对生长性能和瘤胃菌群的影响仍需动物饲养试验做进一步的验证。

参考文献 References:

- [1] Bach A, Calsamiglia S, Stern M D. Nitrogen metabolism in the rumen[J]. *Journal of Dairy Science*, 2005, 88: E9-E21.
- [2] Tamminga S. A review on environmental impacts of nutritional strategies in ruminants[J]. *Journal of Animal Science*, 1996, 74(12): 3112-3124.

- [3] 孙美杰,郑文金,申军士,等. 日粮添加尿素对育肥湖羊空肠菌群结构及氨和尿素转运蛋白表达的影响[J]. 南京农业大学学报,2023,46(2):345-353. DOI:10.7685/jnau.202112046.
Sun M J,Zheng W J,Shen J S, et al. Effects of urea supplementation on jejunal bacterial communities and the mRNA expression of ammonia and urea transporter proteins in fattening Hu lambs[J]. Journal of Nanjing Agricultural University,2023,46(2):345-353(in Chinese with English abstract).
- [4] 孙美杰,姜君,徐诣轩,等. 不同尿素添加水平对育肥湖羊瘤胃发酵及微生物菌群结构的影响[J]. 南京农业大学学报,2022,45(2):323-332. DOI:10.7685/jnau.202106001.
Sun M J,Jiang J,Xu Y X, et al. Effects of incremental urea supplementation in diet on rumen fermentation and microbial communities in fattening Hu lambs[J]. Journal of Nanjing Agricultural University,2022,45(2):323-332(in Chinese with English abstract).
- [5] Hume I D,Moir R J,Somers M. Synthesis of microbial protein in the rumen. I. Influence of the level of nitrogen intake[J]. Australian Journal of Agricultural Research,1970,21(2):283-296.
- [6] Cherdthong A,Wanapat M. Development of urea products as rumen slow-release feed for ruminant production;a review[J]. Australian Journal of Basic and Applied Sciences,2010,4:2232-2241.
- [7] Balasubramanian A,Durairajpandian V,Elumalai S, et al. Structural and functional studies on urease from pigeon pea (*Cajanus cajan*) [J]. International Journal of Biological Macromolecules,2013,58:301-309.
- [8] Joysowal M,Tyagi A K,Tyagi N, et al. Use of slow-release ammonia products in ruminant diet;a review[J]. Journal of Entomology and Zoology Studies,2019,7(2):882-888.
- [9] Carvalho A B,da Silva A L,Silva A M A, et al. Effect of slow-release urea microencapsulated in beeswax and its inclusion in ruminant diets[J]. Small Ruminant Research,2019,179:56-63.
- [10] Menke K H,Raab L,Salewski A, et al. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro* [J]. The Journal of Agricultural Science,1979,93(1):217-222.
- [11] 沈维军,姜雅慧,王加启,等. 固液气分流式瘤胃模拟系统的设计与测试[J]. 农业工程学报,2012,28(3):20-26.
Shen W J,Jiang Y H,Wang J Q, et al. Design and testing of rumen simulation system with discharging solid chime,liquid,and gas respectively[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering,2012,28(3):20-26(in Chinese with English abstract).
- [12] 伍梦楠,沈维军,张佩华,等. 连续培养瘤胃模拟发酵的工作参数设置研究进展[J]. 中国畜牧兽医,2017,44(1):106-112.
Wu M N,Shen W J,Zhang P H, et al. Research progress on working parameters of the continuous culture of rumen simulation system[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine,2017,44(1):106-112(in Chinese with English abstract).
- [13] McDougall E I. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva[J]. Biochemical Journal,1948,43(1):99-109.
- [14] 张丽英. 饲料分析及饲料质量检测技术[M]. 3版. 北京:中国农业大学出版社,2007.
Zhang L Y. Feed Analysis and Feed Quality Detection Technology[M]. 3rd ed. Beijing:China Agricultural University Press,2007(in Chinese with English abstract).
- [15] Chaney A L,Marbach E P. Modified reagents for determination of urea and ammonia[J]. Clinical Chemistry,1962,8(2):130-132.
- [16] 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[J]. 南京农学院学报,1982,5(4):110-116. DOI:10.7685/j.issn.1000-2030.1982.04.010.
Qin W L. Determination of rumen volatile fatty acids by means of gas chromatography[J]. Journal of Nanjing Agricultural University,1982,5(4):110-116(in Chinese with English abstract).
- [17] Spanghero M,Nikulina A,Mason F. Use of an *in vitro* gas production procedure to evaluate rumen slow-release urea products[J]. Animal Feed Science and Technology,2018,237:19-26.
- [18] Yan X T,Yan B Y,Ren Q M, et al. Effect of slow-release urea on the composition of ruminal bacteria and fungi communities in yak[J]. Animal Feed Science and Technology,2018,244:18-27.
- [19] Ishaq S L,Yeoman C J,Whitney T R. Ground *Juniperus pinchotii* and urea in supplements fed to Rambouillet ewe lambs Part 2:Ewe lamb rumen microbial communities[J]. Journal of Animal Science,2017,95(10):4587-4599.
- [20] 周力,高占红,张峰硕,等. 小麦型饲料中添加木聚糖酶对藏羊羔羊生长性能、瘤胃挥发性脂肪酸、细菌组成及肉质性状的影响[J]. 东北农业大学学报,2022,53(10):46-55.
Zhou L,Gao Z H,Zhang F S, et al. Effects of adding xylanase in wheat type diet on growth performance,rumen volatile fatty acid,bacterial composition and meat quality trait of Tibetan lamb[J]. Journal of Northeast Agricultural University,2022,53(10):46-55(in Chinese with English abstract).
- [21] 田锦秀,郑楠,王加启,等. 反刍动物包被缓释尿素饲料的研究进展[J]. 动物营养学报,2021,33(12):6656-6665.
Tian J X,Zheng N,Wang J Q, et al. Research progress of coated slow-release urea for ruminants[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition,2021,33(12):6656-6665(in Chinese with English abstract).
- [22] Greenwood J A,Mills J,Tyler P D, et al. Physiological regulation,purification and properties of urease from *Methylophilus methylotrophus* [J]. FEMS Microbiology Letters,1998,160(1):131-135.
- [23] Ribeiro S S,Vasconcelos J T,Morais M G, et al. Effects of ruminal infusion of a slow-release polymer-coated urea or conventional urea on apparent nutrient digestibility, *in situ* degradability, and rumen parameters in cattle fed low-quality hay [J]. Animal Feed Science and Technology,2011,164(1/2):53-61.

- [24] Sinclair L A, Blake C W, Griffin P, et al. The partial replacement of soyabean meal and rapeseed meal with feed grade urea or a slow-release urea and its effect on the performance, metabolism and digestibility in dairy cows[J]. *Animal*, 2012, 6(6): 920-927.
- [25] Mehrez A Z, Ørskov E R, McDonald I. Rates of rumen fermentation in relation to ammonia concentration[J]. *British Journal of Nutrition*, 1977, 38(3): 437-443.
- [26] Lewis D. Ammonia toxicity in the ruminant[J]. *The Journal of Agricultural Science*, 1960, 55(1): 111-117.
- [27] Taylor-Edwards C C, Hibbard G, Kitts S E, et al. Effects of slow-release urea on ruminal digesta characteristics and growth performance in beef steers[J]. *Journal of Animal Science*, 2009, 87(1): 200-208.
- [28] Bartley E E, Davidovich A D, Barr G W, et al. Ammonia toxicity in cattle. I. Rumen and blood changes associated with toxicity and treatment methods[J]. *Journal of Animal Science*, 1976, 43(4): 835-841.
- [29] Van Soest P J. *Nutritional Ecology of the Ruminant*[M]. New York: Cornell University Press, 1994.
- [30] Ceconi I, Ruiz-Moreno M J, DiLorenzo N, et al. Effect of slow-release urea inclusion in diets containing modified corn distillers grains on total tract digestibility and ruminal fermentation in feedlot cattle[J]. *Journal of Animal Science*, 2015, 93(8): 4058-4069.
- [31] Griswold K E, Hoover W H, Miller T K, et al. Effect of form of nitrogen on growth of ruminal microbes in continuous culture[J]. *Journal of Animal Science*, 1996, 74(2): 483-491.
- [32] Chen X, Su X, Li J, et al. Real-time monitoring of ruminal microbiota reveals their roles in dairy goats during subacute ruminal acidosis[J]. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 2021, 7(1): 45.
- [33] Abuefatah K, Zuki A B, Goh Y M, et al. Effects of feeding whole linseed on ruminal fatty acid composition and microbial population in goats[J]. *Animal Nutrition*, 2016, 2(4): 323-328.
- [34] Peng K, Shirley D C, Xu Z J, et al. Effect of purple prairie clover(*Dalea purpurea* Vent.) hay and its condensed tannins on growth performance, wool growth, nutrient digestibility, blood metabolites and ruminal fermentation in lambs fed total mixed rations[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2016, 222: 100-110.
- [35] Arowolo M A, Zhang X M, Wang M, et al. Proper motility enhances rumen fermentation and microbial protein synthesis with decreased saturation of dissolved gases in rumen simulation technique[J]. *Journal of Dairy Science*, 2022, 105(1): 231-241.

责任编辑:周广礼