

# 利用体外法研究纳米氧化锌的添加对瘤胃发酵的影响

陈俊材 王 威 王之盛\*

(四川农业大学动物营养研究所, 动物抗病营养教育部重点实验室, 雅安 625014)

**摘要:** 为探究饲料添加纳米氧化锌对瘤胃发酵的影响, 本试验通过体外发酵法研究了纳米氧化锌不同添加水平(0、50、100、200、400 mg/kg, 干物质基础)对瘤胃培养液 pH、氨态氮(NH<sub>3</sub>-N)、微生物蛋白(MCP)、挥发性脂肪酸(VFA)以及底物有机物发酵率(FOM)的影响。研究发现, 在体外培养条件下, 纳米氧化锌的添加对培养液 pH 无显著影响( $P > 0.05$ ); 与对照组相比, 添加 100 和 200 mg/kg DM 的纳米氧化锌在 6 和 12 h 显著提高了 FOM 和 MCP 及 VFA 浓度( $P < 0.05$ ), 降低了 NH<sub>3</sub>-N 浓度和乙酸/丙酸的比例( $P < 0.05$ )。上述结果表明, 纳米氧化锌的添加在体外培养前期(6~12 h)能够有效地促进瘤胃微生物对饲料有机物的发酵, 增加 MCP 产量, 提高瘤胃发酵的能量利用效率。

**关键词:** 纳米氧化锌; 瘤胃发酵; 体外法

**中图分类号:** S816.72

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1006-267X(2011)08-1415-07

锌是动物体内一种重要的微量元素, 参与了动物体内多种酶的组成, 并且与机体碳水化合物、脂肪、蛋白质的代谢密切相关。锌的摄入不足会影响动物的生长发育, 引起代谢紊乱及生产性能下降。Nunnery 等<sup>[1]</sup>发现饲料中缺锌会对肥育期肉牛的料肉比产生负面影响; 姚军虎等<sup>[2]</sup>研究发现青年奶牛饲料中补锌可促进其生长发育, 提高饲料转化效率。而对于反刍动物而言, 锌的营养意义不仅限于动物机体本身, 对于瘤胃内环境也有重要的作用。1958 年 Hubbert 等<sup>[3]</sup>证明锌是瘤胃微生物生长的必需微量元素之一; 有研究表明, 高剂量锌的添加对瘤胃发酵和瘤胃内纤毛虫数量有所影响<sup>[4]</sup>; Bateman 等<sup>[5]</sup>则指出, 锌能够改变瘤胃发酵模式, 降低乙酸比例。

纳米氧化锌是一种新型的锌源, 与普通锌源相比具有吸收快、生物学利用率高、抗氧化性强等特点。目前纳米氧化锌在单胃动物应用中已有初步研究, 研究结果表明纳米氧化锌具有良好的促

生长和抗氧化作用, 作用效果优于饲料级氧化锌<sup>[6-7]</sup>。但纳米氧化锌在反刍动物上的研究尚未见报道。鉴于此, 本试验利用体外发酵法研究添加不同水平的纳米氧化锌对瘤胃发酵的影响, 为今后纳米氧化锌在反刍动物中的应用提供理论依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 试验材料

纳米氧化锌平均粒径 20 nm。由厦门大学化学系固体表面物理化学国家重点实验室通过均匀沉淀法制备, 并通过 X 射线衍射仪、透射电镜、静态氮气吸附法进行纳米特性表征测定。经原子吸收仪测定该纳米氧化锌样品的锌含量为 77.32%。

### 1.2 试验动物及瘤胃液的采集

选用 3 头体况良好、平均体重为(300 ± 10) kg、安装有永久性瘤胃瘘管的宣汉黄牛作为瘤胃液供体动物。饲料精粗比为 4:6, 每日 08:00 和 16:00

收稿日期: 2011-03-02

基金项目: 现代农业(肉牛)产业技术体系专项经费资助(项目编号: CARS-38)

作者简介: 陈俊材(1987—), 男, 四川成都人, 硕士研究生, 从事反刍动物营养与饲料的研究。E-mail: cjc1949@163.com

\* 通讯作者: 王之盛, 教授, 博士生导师, E-mail: wangzs007@yahoo.com.cn

等量饲喂,自由饮水。在试验当天晨饲前抽取瘤胃液,4层纱布过滤至预热处理后的收集瓶,39℃水浴保温,充入CO<sub>2</sub>厌氧备用。

### 1.3 试验设计

采用单因素5水平试验设计,发酵底物干物质基础上5个纳米氧化锌添加水平分别为0(对照组)、50、100、200、400 mg/kg,每个水平设4个时间点,每个时间点设4个重复,每个重复1支发酵管。

### 1.4 体外培养

体外培养参照 Menke 等<sup>[8]</sup>的方法进行,将配制好的瘤胃缓冲液与瘤胃液按2:1的比例混合制成培养液,通入CO<sub>2</sub>并且放入39℃的水浴摇床上等待培养。准确称取发酵底物500 mg(干物质基础,稻草粉和玉米粉各250 mg,实测锌含量为11.17 mg/kg),置于发酵管底部,加入不同水平的纳米氧化锌,最后加入始终用CO<sub>2</sub>气体饱和的培养液30 mL,置于39℃的水浴摇床中培养。

### 1.5 样品采集

分别在体外培养6、12、24、48 h后终止发酵,收集培养液,4层纱布过滤,即时测定pH,随后于-20℃冻存并在1周内完成氨氮(NH<sub>3</sub>-N)、微生物蛋白(MCP)和挥发性脂肪酸(VFA)的测定。将过滤后的发酵残留物冲洗过后放入65℃烘箱烘干48 h,待测有机物(OM)。

### 1.6 测定指标及方法

pH使用雷磁PHS-3D型pH计测定;NH<sub>3</sub>-N

浓度的测定参照冯宗慈等<sup>[9]</sup>的方法进行;MCP采用Zinn等<sup>[10]</sup>的方法建立,经Makkar等<sup>[11]</sup>改进的嘌呤法进行测定;OM发酵率测定参照杨胜<sup>[12]</sup>的方法进行。

VFA采用瓦里安CP-3800 GC气相色谱仪进行测定,色谱柱为长2 000 mm、内径3 mm的填充柱;柱温140℃,离子化室温230℃;载气(N<sub>2</sub>)流速为45 mL/min,氢气流速为35 mL/min,空气流速为250 mL/min;灵敏度为107,衰减为4,进样量为0.6 μL。

OM发酵率(FOM,%) = 100 × (发酵前OM量 - 发酵后OM量) / 发酵前OM量。

### 1.7 统计分析

试验数据采用SPSS 17.0软件中的ANOVA过程进行方差分析,并用Duncan氏法进行多重比较,结果以平均值±标准差形式表示。

## 2 结果

### 2.1 纳米氧化锌对培养液pH的影响

由表1可知,各个试验组pH水平处于5.82~6.63,属于正常瘤胃pH范围。随着纳米氧化锌添加水平的升高,各时间点瘤胃培养液pH呈现下降趋势,但差异不显著( $P > 0.05$ )。而在同一添加水平下,各个试验组培养液pH均随培养时间延长出现显著下降( $P < 0.05$ )。

表1 不同纳米氧化锌添加水平对各时间点培养液pH的影响

Table 1 Effect of Nano-ZnO supplementation level on pH at different time points *in vitro*

培养时间 Incubation time/h	纳米氧化锌添加水平(干物质基础) Nano-ZnO supplementation levels(DM basis)/(mg/kg)				
	0	50	100	200	400
6	6.63 ± 0.05 <sup>a</sup>	6.61 ± 0.04 <sup>a</sup>	6.57 ± 0.04 <sup>a</sup>	6.57 ± 0.02 <sup>a</sup>	6.59 ± 0.04 <sup>a</sup>
12	6.36 ± 0.03 <sup>b</sup>	6.32 ± 0.04 <sup>b</sup>	6.33 ± 0.07 <sup>b</sup>	6.31 ± 0.03 <sup>b</sup>	6.34 ± 0.04 <sup>b</sup>
24	6.06 ± 0.05 <sup>c</sup>	6.04 ± 0.02 <sup>c</sup>	5.99 ± 0.03 <sup>c</sup>	6.00 ± 0.03 <sup>c</sup>	6.01 ± 0.06 <sup>c</sup>
48	5.85 ± 0.02 <sup>d</sup>	5.83 ± 0.04 <sup>d</sup>	5.82 ± 0.09 <sup>d</sup>	5.84 ± 0.01 <sup>d</sup>	5.83 ± 0.03 <sup>d</sup>

同列或同行数据肩标有不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ );相同小写字母或者不标字母表示差异不显著( $P > 0.05$ )。下表同。

In the same row, values with different small letter superscripts mean significant difference ( $P < 0.05$ ), while with the same or no letter superscripts mean no significant difference ( $P > 0.05$ ). The same as below.

### 2.2 纳米氧化锌对培养液NH<sub>3</sub>-N浓度和MCP合成的影响

各个试验组NH<sub>3</sub>-N浓度随着时间的变化均表

现出相似的规律:随着发酵时间的延长,NH<sub>3</sub>-N浓度逐渐升高;在6~12 h内,上升幅度较小,12 h后出现大幅度上升,见表2。同一时间点,在纳米氧

化锌添加水平在 0 ~ 200 mg/kg 时,随着纳米氧化锌添加水平的升高  $\text{NH}_3\text{-N}$  浓度呈现降低趋势;当纳米氧化锌添加水平为 400 mg/kg 时, $\text{NH}_3\text{-N}$  浓度出现升高。并且在 6 h 时,400 mg/kg 添加水平试验组与对照组的差异达到显著水平 ( $P < 0.05$ )。

由表 3 可知,纳米氧化锌的添加明显提高了 MCP 的合成量,且与对照组相比,纳米氧化锌添加

水平为 200 mg/kg 试验组在 6 和 12 h 时对 MCP 合成量的提高均达到显著水平 ( $P < 0.05$ ),提高量达 15% 以上;当添加量达到 400 mg/kg 时,MCP 合成量开始出现下降。在相同添加水平下,随着培养时间的增加,MCP 合成量呈现先升高后降低的规律性变化,各试验组的变化规律相似。

表 2 不同纳米氧化锌添加水平对各时间点培养液  $\text{NH}_3\text{-N}$  浓度的影响  
Table 2 Effect of Nano-ZnO supplementation level on  $\text{NH}_3\text{-N}$  concentration

培养时间 Incubation time/h	纳米氧化锌添加水平(干物质基础) Nano-ZnO supplementation levels(DM basis)/(mg/kg)					mg/dL
	at different time points <i>in vitro</i>					
	0	50	100	200	400	
6	10.81 ± 0.54 <sup>b</sup>	10.57 ± 0.48 <sup>b</sup>	10.24 ± 0.80 <sup>ab</sup>	9.44 ± 1.08 <sup>a</sup>	13.25 ± 0.45 <sup>c</sup>	
12	12.23 ± 1.28	12.48 ± 0.74	11.87 ± 0.96	11.17 ± 1.25	12.47 ± 1.71	
24	23.12 ± 1.48	22.81 ± 1.61	22.85 ± 1.35	22.64 ± 0.91	25.39 ± 0.73	
48	33.73 ± 0.89	32.10 ± 2.24	31.85 ± 1.12	31.15 ± 1.28	32.67 ± 1.37	

表 3 不同纳米氧化锌添加水平对各时间点培养液 MCP 产量的影响  
Table 3 Effect of Nano-ZnO supplementation level on MCP yield at

培养时间 Incubation time/h	纳米氧化锌添加水平(干物质基础) Nano-ZnO supplementation levels(DM basis)/(mg/kg)					mg/mL
	different time points <i>in vitro</i>					
	0	50	100	200	400	
6	17.42 ± 0.85 <sup>a</sup>	19.07 ± 0.68 <sup>abc</sup>	19.43 ± 1.41 <sup>bc</sup>	20.48 ± 0.50 <sup>c</sup>	18.61 ± 1.27 <sup>ab</sup>	
12	18.51 ± 0.98 <sup>a</sup>	19.71 ± 0.23 <sup>a</sup>	20.06 ± 1.04 <sup>ab</sup>	21.67 ± 1.58 <sup>b</sup>	19.90 ± 1.30 <sup>ab</sup>	
24	14.95 ± 1.30	15.52 ± 0.45	15.36 ± 0.98	15.26 ± 0.44	15.19 ± 0.96	
48	10.64 ± 1.10	11.42 ± 1.89	11.02 ± 1.90	12.71 ± 1.25	10.32 ± 0.65	

### 2.3 纳米氧化锌对底物有机物发酵率的影响

在 6 h,纳米氧化锌添加水平为 0 ~ 200 mg/kg 时,底物有机物发酵率随着添加量的增加从 6.19% 上升到 15.48% ( $P < 0.05$ ),并且在 200 mg/kg 时达到最大值;而当添加量达到 400 mg/kg 时,底物有机物发酵率出现了下降,见表 4。12、24、48 h 时不同水平纳米氧化锌的添加,底物有机物发酵率呈现出相似的变化规律,但是没有达到差异显著水平 ( $P > 0.05$ )。

### 2.4 纳米氧化锌对培养液 VFA 浓度的影响

随着纳米氧化锌添加水平的升高,各时间点培养液的总 VFA(TVFA)、乙酸、丙酸和丁酸浓度均呈现先升高后降低的规律性变化;并且在 6 h

时,各水平添加纳米氧化锌均显著提高了乙酸、丙酸、丁酸以及 TVFA 的浓度 ( $P < 0.05$ ),其余各培养时间点虽然 VFA 浓度都有上升的趋势,但均未达到差异显著水平 ( $P > 0.05$ ),见表 5。在同一纳米氧化锌添加水平下,TVFA、乙酸、丙酸和丁酸浓度随培养时间的延长均呈现逐渐上升的变化规律,在培养前期即 12 h 前升高幅度较大,而 12 h 后趋于平稳,且各试验组变化趋势相似。

同时从表 5 还可以得出,在培养前期纳米氧化锌的添加显著降低了培养液乙酸/丙酸的比值 ( $P < 0.05$ ),在添加量为 200 mg/kg 时乙酸/丙酸的比值达到最低。

表 4 不同纳米氧化锌添加水平对各时间点底物有机物发酵率的影响

Table 4 Effect of Nano-ZnO supplementation level on the fermentation of organic matter substrates at different time points *in vitro*

%

培养时间 Incubation time/h	纳米氧化锌添加水平(绝干基础) Nano-ZnO supplementation levels(DM basis)/(mg/kg)				
	0	50	100	200	400
	6	6.19 ± 1.05 <sup>a</sup>	9.60 ± 1.76 <sup>b</sup>	12.05 ± 0.86 <sup>c</sup>	15.48 ± 1.47 <sup>d</sup>
12	30.06 ± 0.71 <sup>b</sup>	30.37 ± 1.34 <sup>b</sup>	32.03 ± 0.99 <sup>b</sup>	32.17 ± 0.05 <sup>b</sup>	28.87 ± 0.32 <sup>a</sup>
24	44.67 ± 1.33	45.39 ± 1.13	45.73 ± 1.21	46.58 ± 1.62	44.05 ± 1.69
48	53.32 ± 1.02	53.72 ± 0.84	53.71 ± 1.16	54.93 ± 0.81	53.57 ± 1.39

表 5 不同纳米氧化锌添加水平对各时间点培养液中 VFA 浓度的影响

Table 5 Effect of Nano-ZnO supplementation level on VFA concentration at different time points *in vitro*

项目 Items	培养时间 Incubation time/h	纳米氧化锌添加水平(绝干基础) Nano-ZnO supplementation levels(DM basis)/(mg/kg)				
		0	50	100	200	400
		总 VFA	6	45.79 ± 3.22 <sup>a</sup>	54.85 ± 4.63 <sup>b</sup>	62.35 ± 5.31 <sup>c</sup>
TVFA/(mmol/L)	12	70.05 ± 5.52	73.42 ± 1.89	77.76 ± 9.58	77.61 ± 10.71	72.26 ± 11.05
	24	75.98 ± 4.55	78.55 ± 9.02	85.16 ± 11.02	86.39 ± 8.33	81.98 ± 6.12
乙酸 Acetate/ (mmol/L)	48	84.15 ± 5.74	84.63 ± 4.33	93.19 ± 6.42	91.78 ± 4.63	90.69 ± 6.32
	6	29.38 ± 2.02 <sup>a</sup>	33.49 ± 3.11 <sup>ab</sup>	37.17 ± 2.96 <sup>bc</sup>	38.14 ± 2.38 <sup>c</sup>	32.68 ± 1.55 <sup>a</sup>
	12	42.99 ± 3.29	44.90 ± 1.36	46.22 ± 5.75	46.78 ± 6.77	45.22 ± 7.29
	24	47.49 ± 2.93	49.38 ± 5.37	53.10 ± 6.76	53.26 ± 5.28	51.02 ± 4.00
丙酸 Propionate/ (mmol/L)	48	51.17 ± 3.51	52.02 ± 2.92	57.26 ± 3.56	55.82 ± 2.96	56.05 ± 4.43
	6	11.92 ± 0.84 <sup>a</sup>	14.99 ± 1.23 <sup>b</sup>	17.57 ± 1.54 <sup>c</sup>	18.89 ± 1.02 <sup>c</sup>	13.91 ± 0.76 <sup>b</sup>
	12	18.86 ± 1.67	20.27 ± 0.59	22.14 ± 2.82	21.44 ± 3.06	18.89 ± 2.86
	24	19.82 ± 1.45	20.59 ± 2.21	22.68 ± 3.10	23.10 ± 2.28	21.34 ± 1.74
丁酸 Butyrate/ (mmol/L)	48	22.43 ± 1.51	22.71 ± 1.57	24.92 ± 1.96	24.95 ± 1.08	23.87 ± 1.65
	6	4.49 ± 0.36 <sup>a</sup>	6.36 ± 0.54 <sup>b</sup>	7.60 ± 0.83 <sup>c</sup>	7.41 ± 0.15 <sup>c</sup>	6.14 ± 0.89 <sup>b</sup>
	12	8.19 ± 0.67	8.25 ± 0.16	9.40 ± 2.35	9.39 ± 0.95	8.15 ± 10.80
	24	8.67 ± 0.29	8.58 ± 1.47	9.37 ± 1.21	9.74 ± 1.81	9.63 ± 0.87
乙酸/丙酸 Acetate/propionate	48	10.57 ± 0.94	9.90 ± 0.17	10.75 ± 1.43	10.99 ± 0.59	10.76 ± 0.56
	6	2.46 ± 0.02 <sup>c</sup>	2.23 ± 0.03 <sup>c</sup>	2.12 ± 0.03 <sup>b</sup>	2.01 ± 0.06 <sup>a</sup>	2.34 ± 0.03 <sup>d</sup>
	12	2.28 ± 0.06 <sup>c</sup>	2.22 ± 0.02 <sup>b</sup>	2.09 ± 0.01 <sup>a</sup>	2.18 ± 0.02 <sup>b</sup>	2.39 ± 0.04 <sup>d</sup>
	24	2.39 ± 0.04 <sup>b</sup>	2.39 ± 0.02 <sup>b</sup>	2.34 ± 0.03 <sup>ab</sup>	2.30 ± 0.03 <sup>a</sup>	2.39 ± 0.04 <sup>b</sup>
	48	2.27 ± 0.04 <sup>a</sup>	2.29 ± 0.02 <sup>ab</sup>	2.27 ± 0.02 <sup>ab</sup>	2.23 ± 0.02 <sup>a</sup>	2.34 ± 0.03 <sup>b</sup>

### 3 讨论

#### 3.1 不同水平纳米氧化锌对培养液 pH 的影响

pH 是反映瘤胃内部环境与发酵水平的一项综合性指标,它受饲料类型、唾液分泌、瘤胃代谢产物的吸收与外排等多种因素的影响。通常认为正常的瘤胃 pH 变化范围为 6~7,而当 pH 低于 6 时,纤维分解菌和原虫数量将减少,甚至消失<sup>[13]</sup>。

Calsamiglia 等<sup>[14]</sup>也研究发现,当 pH 低于 5.7 时,饲料中纤维素和蛋白质的降解率就会降低。在本试验中除 48 h 时间点外,各试验组 pH 均大于 6,随着纳米氧化锌添加水平的升高有降低的趋势,但是相互之间差异不显著,这可能是由于纳米氧化锌促进微生物发酵产生更多的 VFA 而导致 pH 降低,但同时由于人工瘤胃缓冲液较强的缓冲作用导致未达到差异显著水平。由于本次试验采用

不连续体外发酵,不能及时排除代谢产物以及VFA的大量沉积,所以各试验组培养液pH随培养时间的延长而出现显著下降( $P < 0.05$ ),在48h时下降至6以下。这也提示我们,作为不连续体外发酵装置,培养时间不宜超过24h,否则瘤胃微生物生长受到抑制,甚至出现溶菌现象,影响指标的测定。

### 3.2 不同水平纳米氧化锌对培养液NH<sub>3</sub>-N浓度和MCP合成的影响

NH<sub>3</sub>-N是瘤胃氮代谢的一个中间产物,是瘤胃微生物生长的重要氮源,由于体外培养没有瘤胃壁对NH<sub>3</sub>-N的吸收、分泌等的影响,所以它的浓度主要取决于2个方面:一方面是瘤胃微生物降解饲料中的含氮化合物为NH<sub>3</sub>-N的能力,另一方面是瘤胃微生物利用NH<sub>3</sub>-N合成MCP的能力。Arelovich等<sup>[15]</sup>研究发现,锌的添加能够抑制瘤胃内脲酶活性,加锌后2h使瘤胃NH<sub>3</sub>-N浓度显著下降。而在本试验中,在培养前期,当纳米氧化锌的添加量在200mg/kg以下时明显地降低了培养液的NH<sub>3</sub>-N浓度,这可能还与瘤胃微生物对NH<sub>3</sub>-N利用率的提高有关:因为从本试验纳米氧化锌对MCP合成影响的试验结果来看,在培养前期纳米氧化锌显著提高了MCP的合成( $P < 0.05$ );并且在6、12和24h各个试验组的NH<sub>3</sub>-N浓度也都处于最佳浓度范围6.3~27.5mg/dL<sup>[16]</sup>,所以纳米氧化锌是促进了瘤胃微生物的生长,提高了瘤胃微生物对NH<sub>3</sub>-N的利用率,从而NH<sub>3</sub>-N浓度出现下降。这与前人报道饲料中添加锌能够减少瘤胃氨的浓度、促进MCP的合成<sup>[17]</sup>、提高瘤胃NH<sub>3</sub>-N利用效率<sup>[18]</sup>的结论一致。Kennedy等<sup>[19]</sup>推测锌可能在微生物附着在饲料表面的过程中扮演着重要角色,这也可能是锌增加瘤胃微生物蛋白产量的原因之一,但还需要进一步的研究。而当纳米氧化锌添加水平达到400mg/kg时,NH<sub>3</sub>-N浓度出现上升,MCP合成量开始下降,说明高浓度的纳米氧化锌可能抑制了瘤胃微生物生长,从而使NH<sub>3</sub>-N的吸收与利用效率开始降低,NH<sub>3</sub>-N开始积累导致其浓度上升。

而从同一添加水平不同培养时间来看,在培养24h后,培养液NH<sub>3</sub>-N浓度出现大幅上升,MCP合成量也开始出现下降。这可能是由于在体外培养条件下,瘤胃微生物的增殖主要在前12h,这个时期MCP合成量增加,NH<sub>3</sub>-N的产生与利用

也处于一个相对平衡的状态;24h以后可能由于发酵管和代谢产物积累的限制,微生物增殖进入平台期并开始出现溶菌现象。张吉鹏等<sup>[20]</sup>也发现体外培养条件下,MCP产量在24h后开始下降。NH<sub>3</sub>-N的浓度在培养后期上升则主要可能是一方面由于瘤胃微生物对NH<sub>3</sub>-N的利用率下降,引起NH<sub>3</sub>-N的累积;另一方面由于细菌溶菌或者纤毛虫的吞噬作用而释放的<sup>[21]</sup>。这也可能是纳米氧化锌的添加在培养24h后没有显著效果的原因:纳米氧化锌能够在前期促进瘤胃微生物迅速增殖,产生更多的VFA和MCP,而微生物在进入增殖的平台期后无法继续增殖,进而与对照组差异逐渐减小。

### 3.3 不同水平纳米氧化锌对底物有机物发酵率和培养液VFA浓度的影响

有机物发酵率与瘤胃微生物的活动密切相关,锌的添加能够通过促进瘤胃微生物的生长,从而提高饲料有机物发酵率。Bateman等<sup>[22]</sup>报道,500mg/kg的锌的添加能够增加尼龙袋中豆饼蛋白质的消失速率。王峰等<sup>[23]</sup>发现饲料中添加锌在6和48h时明显提高了尼龙袋中玉米有机物的降解率。本试验结果也表明,纳米氧化锌的添加显著地提高了6和12h底物有机物的发酵率( $P < 0.05$ ),这与采用普通无机锌试验结果一致。而Froetschel等<sup>[4]</sup>发现1142mg/kg锌的添加对饲料有机物消化率没有影响( $P > 0.05$ ),这可能与锌的过量添加有关。

本研究发现纳米氧化锌的添加在6h时显著提高了培养液VFA浓度,在12、24、48h有提高VFA浓度的趋势,并且在试验全期明显降低乙酸/丙酸的比例。而Bateman等<sup>[17]</sup>发现硫酸锌的补饲使乙酸比例下降,但是对TVFA的浓度没有影响,Arelovich等<sup>[18]</sup>的研究也表明饲料中添加氯化锌,对TVFA浓度没有显著影响。这与本试验结果略有不同,可能是因为纳米氧化锌同时具备氧化锌和纳米材料双重特性,纳米氧化锌具有小尺寸效应、表面效应等纳米材料特殊的性质,有极强的自由扩散能力,是普通氧化锌的105~109倍<sup>[24]</sup>,有着比普通锌源更高的生物学利用效率。

VFA是反刍动物的主要能量来源,也是瘤胃微生物增殖的主要碳架来源,并且丙酸转化成能量的效率要高于乙酸和丁酸<sup>[25]</sup>,所以纳米氧化锌的添加降低了乙酸/丙酸的比例,从而提高了瘤胃

发酵的能量利用效率。Arelovich 等<sup>[15]</sup>推测锌对瘤胃微生物的作用方式可能与离子载体类似,在瘤胃中通过抑制某些革兰氏阴性菌及瘤胃产氢微生物的活动提高丙酸的比例。本试验结果表明纳米氧化锌也可能引起了瘤胃微生物区系的变化,从而对 VFA 的生成产生影响,这还有待于进一步的研究。

#### 4 结论

在本试验体外培养条件下,添加纳米氧化锌在培养前期(6~12 h)可以促进瘤胃发酵,提高有机物发酵率、MCP 产量和 VFA 浓度,降低乙酸/丙酸及 NH<sub>3</sub>-N 浓度;其中以 200 mg/kg 添加水平效果最佳。

#### 参考文献:

- [ 1 ] NUNNERY G A, VASCONCELOS J T, PARSONS C H, et al. Effects of source of supplemental zinc on performance and humoral immunity in beef heifers [J]. *Journal of Animal Science*, 2007, 85 (9): 2304 - 2313.
- [ 2 ] 姚军虎,曹斌云,窦铖,等. 锌对青年牛生长发育的影响[J]. *西北农业大学学报*, 1996, 24 (4): 55 - 58.
- [ 3 ] HUBBERT F J, CHEN S, BURROUGHS W. Mineral requirement of rumen microorganisms for cellulose digestion *in vitro* [J]. *Journal of Animal Science*, 1958, 17: 559 - 568.
- [ 4 ] FROETSCHER M A, MARTIN A C, AMOS H E, et al. Effects of zinc sulfate concentration and feeding frequency on ruminal protozoal numbers, fermentation patterns and amino acid passage in steers [J]. *Journal of Animal Science*, 1990, 68 (9): 2874 - 2884.
- [ 5 ] BATEMAN J, WILLIAMS C C, HUANG Y H, et al. Effects of supplemental zinc in high quality diets on ruminal fermentation and degradation of urea *in vitro* and *in vivo* [J]. *The Professional Animal Scientist*, 2002, 18 (4): 363 - 367.
- [ 6 ] 王之盛,况应谷,任守国,等. 纳米氧化锌对仔猪生产性能和粪便微生物群落的影响[J]. *中国畜牧杂志*, 2006, 42 (9): 22 - 24.
- [ 7 ] 田丽娜,朱风华,任慧英,等. 纳米氧化锌对肉仔鸡抗氧化性能的影响[J]. *动物营养学报*, 2009, 21 (4): 534 - 539.
- [ 8 ] MENKE K H, STEINGASS H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid [J]. *Animal Research and Development*, 1988, 28: 7 - 55.
- [ 9 ] 冯宗慈,高民. 通过比色法测定瘤胃液氨氮含量方法的改进[J]. *内蒙古畜牧科学*, 1993, 4: 40 - 41.
- [ 10 ] ZINN R A, OWENS F N. A rapid procedure for purine measurement and its use for estimating net ruminal protein synthesis [J]. *Canadian Journal of Animal Science*, 1986, 66: 157 - 166.
- [ 11 ] MAKKAR H P S, BECKER K. Purine quantification in digesta from ruminants by spectrophotometric and HPLC methods [J]. *British Journal of Nutrition*, 1999, 81: 107 - 112.
- [ 12 ] 杨胜. 饲料分析及饲料质量检测技术 [M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1991: 17 - 28.
- [ 13 ] BROWN M S, PONCE C H, PULIKANTI R, et al. Adaptation of beef cattle to high-concentrate diets: performance and ruminal metabolism [J]. *Journal of Animal Science*, 2006, 84: E25 - E33.
- [ 14 ] CALSAMIGLIA S, FERRET A, DEVANT M, et al. Effects of pH and pH fluctuations on microbial fermentation and nutrient flow from a dual-flow continuous culture system [J]. *Journal of Dairy Science*, 2002, 85 (3): 574 - 579.
- [ 15 ] ARELOVICH H M, OWENS F N, HORN G W, et al. Effects of supplemental zinc and manganese on ruminal fermentation, forage intake, and digestion by cattle fed prairie hay and urea [J]. *Journal of Animal Science*, 2000, 78 (11): 2972 - 2979.
- [ 16 ] ALLISON M N, SMITH R H. Biosynthesis of amino acids by ruminal microorganisms [J]. *Journal of Animal Science*, 1967, 29: 797 - 807.
- [ 17 ] ZEREBCOV P I, NABIEV N H. Effect of different amounts of Zn on N and carbohydrate metabolism in the rumen of cattle [J]. *Nutrition Abstract Research*, 1971, 41: 130.
- [ 18 ] ARELOVICH H M, LABORDE H E, AMELA M I, et al. Effects of dietary addition of zinc and (or) monensin on performance, rumen fermentation and digesta kinetics in beef cattle [J]. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2008, 6 (3): 362 - 372.
- [ 19 ] KENNEDY D W, CRAIG W M, SOUTHERN L L, et al. Ruminal distribution of zinc in steers fed a polysaccharide complex or zinc oxide [J]. *Journal of Animal Science*, 1993, 71 (5): 1281.
- [ 20 ] 张吉鹏,邹庆华,钟小军. 稻草添补矮象草体外发酵组合效应的综合评定研究 [J]. *中国畜牧杂志*, 2008, 44 (21): 38 - 41.

- [21] 匡伟,郭玉华,尹召华,等. 利用体位法研究不同水平维生素 A 对奶牛瘤胃内环境参数的影响[J]. 动物营养学报,2006,18(3):197-202.
- [22] BATEMAN H G, WILLIAMS C C, GANTT D T, et al. Effects of zinc and sodium monensin on ruminal degradation of lysine-HCl and liquid 2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid [J]. Journal of Dairy Science, 2004, 87(8):2571-2577.
- [23] 王峰,莫放,黄应祥,等. 肉牛日粮补锌对粗料纤维和玉米有机物瘤胃降解的影响[J]. 中国草食动物, 2008,28(6):10-14.
- [24] 田丽娜,姜建阳,朱风华,等. 纳米氧化锌对肉鸡生长性能和屠宰性能的影响[J]. 中国农学通报, 2009,25(2):1-5.
- [25] SPEARS J W, SCHLEGEL P, SEAL M C, et al. Bioavailability of zinc from zinc sulfate and different organic zinc sources and their effects on ruminal volatile fatty acid proportions [J]. Livestock Production Science, 2004, 90:211-217.

## Effect of Nano-Zinc Oxide Supplementation on Rumen Fermentation *in vitro*

CHEN Juncai WANG Wei WANG Zhisheng\*

(Institute of Animal Nutrition, Sichuan Agricultural University, Key Laboratory for Animal Disease-resistance Nutrition of China Ministry of Education, Ya'an 625014, China)

**Abstract:** This study was carried out to investigate the effect of nano-zinc oxide supplementation on rumen fermentation *in vitro*. Five levels of nano-zinc oxide supplementation were 0, 50, 100, 200, 400 mg/kg of DM, respectively. Culture medium *in vitro* was sampled to determine pH, ammonia nitrogen ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ), microbial crude protein (MCP), volatile fatty acids (VFA) and fermentation of organic matter. Results from this study showed that pH was not affected by adding different levels of nano-zinc oxide ( $P > 0.05$ ). The concentration of VFA and MCP production and the fermentation of organic matter were significantly increased ( $P < 0.05$ ), while the concentration of ammonia nitrogen and the ratio of acetate to propionate were significantly decreased ( $P < 0.05$ ) with the supplementation levels of 100 and 200 mg/kg of nano-zinc oxide at the 6<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> hour of incubation *in vitro*. In conclusion, the supplementation of nano-zinc oxide can improve the growth of ruminal microorganisms, increase the ruminal microbial protein synthesis, and raise the energy utilization efficiency in early phase (6 to 12 h) of incubation *in vitro*. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2011, 23(8):1415-1421]

**Key words:** nano-zinc oxide; rumen fermentation; *in vitro*