

JOURNAL OF TAIWAN LIVESTOCK RESEARCH

Vol. 53 No. 2

June 2020

CONTENTS

	Page
1. Effect of dietary supplementation of biotin and organic Zn on hoof health and lactating performance of Holstein cows in hot and humid summer <i>Chun-Ta Chang, Tzong-Faa Shiao, Chia-Jung Li and Churng-Faung Lee</i> .....	64
2. The effect of environmental enrichment on the growth, health and behavior in New Zealand rabbits <i>Pei-Chun Tsai, Ming-Yang Tsai, Herng-Fu Lee and Lih-Ren Chen</i> .....	73
3. Treatment effects of three-step treatment on pig wastewater with different concentrations <i>Tein-Ming Su, Cheng-Hsun Chung, Ting-Hsun Hsiao and Mei-Ping Cheng</i> .....	82
4. Effects of adding <i>Bacillus coagulans</i> in diet on the growth performance, blood biochemical values and fecal microbes of weaned pigs <i>Chin-Meng Wang, You-Jun Lin, Chih-Yin Chen and Fang-Chueh Liu</i> .....	91
5. Effect of dry matter content and inoculants on oat and oat/alfalfa mixture after long-term ensiling <i>Shu-Min Wang, Tsui-Huang Yu and Chia-Sheng Chen</i> .....	99
6. Effect of <i>Ganoderma lucidum</i> supplementation on growth performance and immune response in Holstein bull calves <i>Kuo-Hua Lee, Wen-Hung Lin, Jih-Yi Chen, Yi-Hsuan Chen and Yi-Ming Chen</i> .....	107
7. Odor removal efficiency and microbial profiling of the biofilter <i>Ren-Bao Liaw, Ting-Shun Hsiao and Mei-Ping Cheng</i> .....	116
8. An overview on chicken sex determination mechanism <i>Hsiao-Yun Kuo and I-Heng Chang</i> .....	126

行政院新聞局出版事業登記證局版台省誌字第六七七號  
中華郵政特准掛號認爲新聞紙類

畜產研究

第五十三卷 第二期

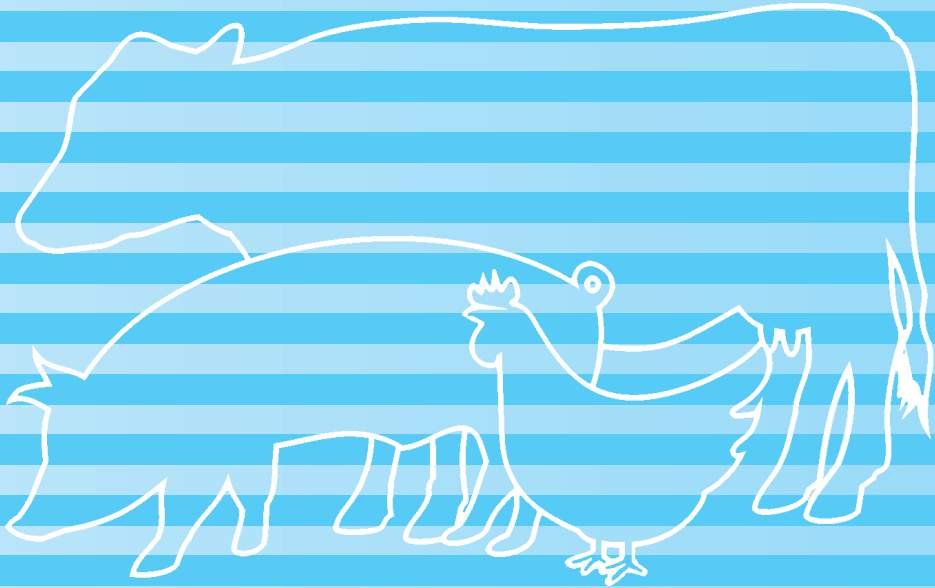
行政院農業委員會畜產試驗所

畜產研究

第五十三卷 第二期 中華民國一〇九年 六月 季 刊

JOURNAL OF  
TAIWAN LIVESTOCK  
RESEARCH

Vol. 53 No. 2 June 2020



ISSN 0253-9209  
DOI: 10.6991/JTLR



GPN: 2005200015  
定價：新臺幣二〇〇元



行政院農業委員會畜產試驗所  
LIVESTOCK RESEARCH INSTITUTE,  
COUNCIL OF AGRICULTURE, EXECUTIVE YUAN

# 畜產研究編審委員會

主任委員：黃振芳

審查委員：丁詩同 方珍玲 王佩華 王尚禮 王淑音 成游貴 朱有田 朱志成  
余 祺 余 碧 吳信志 吳勇初 吳錫勳 李固遠 沈朋志 沈添富  
沈韶儀 阮喜文 周明顯 林俊臣 姜樹興 施宗雄 唐品琦 徐阿里  
徐濟泰 張秀鑾 張菊犁 莊士德 許振忠 許福星 郭猛德 陳仁炫  
陳志峰 陳宗禮 陳明造 陳洵一 陳秋麟 黃文理 黃英豪 葉茂生  
廖宗文 劉登城 劉世賢 鄭裕信 盧虎生 謝清祥 謝豪晃  
(以姓名筆劃為序)

編輯委員：林幼君 林正鏞 張世融 郭卿雲 陳立人 陳佳萱 廖仁寶  
(以姓名筆劃為序)

---

## JOURNAL OF TAIWAN LIVESTOCK RESEARCH

J. F. HUANG, EDITOR-IN-CHIEF,

DIRECTOR GENERAL,

LIVESTOCK RESEARCH INSTITUTE, COUNCIL OF AGRICULTURE

HSINHUA, TAINAN, TAIWAN

### EDITORIAL ADVISORY BOARD:

S. T. DING	C. L. FANG	P. H. WANG	S. L. WANG	S. Y. WANG
Y. K. CHENG	Y. T. JU	C. C. CHU	C. YU	P. YU
H. C. WU	Y. C. WU	H. H. WU	G. Y. LI	P. C. SHEN
T. F. SHEN	S. I. SHEN	S. W. ROAN	M. H. CHOU	C. C. LIN
S. H. CHIANG	C. H. SHIH	P. C. TANG	A. L. HSU	C. T. HSU
H. L. CHANG	C. L. CHANG	S. T. CHUANG	C. C. HSU	F. H. HSU
M. T. KUO	J. H. CHEN	C. F. CHEN	C. L. CHEN	M. T. CHEN
H. I. CHEN	T. L. CHEN	W. L. HUANG	I. H. HWANG	M. S. YEH
C. W. LIAO	T. C. LIU	S. S. LIU	Y. S. CHENG	H. S. LUR
C. H. HSIEH	H. H. HSIEH			

### EDITORS:

Y. C. LIN	C. Y. LIN	S. R. CHANG	C. Y. KUO	L. R. CHEN
C. H. CHEN	R. B. LIAW			



---

## 畜 產 研 究

編 者：行政院農業委員會畜產試驗所

發 行 人：黃振芳

發 行 所：行政院農業委員會畜產試驗所

地 址：臺南市新化區牧場 112 號

電 話：(06) 5911211

網 址：<http://www.tlri.gov.tw>

編輯\印製者：振緯企業有限公司

地 址：臺南市公園路 134 號

電 話：(06) 2288009

出 版 日 期：中華民國 109 年 6 月出版

定 價：新台幣 200 元

展售處：

國家書店松江門市：臺北市中山區松江路 209 號 1 樓

五 南 文 化 廣 場：臺中市北屯區軍福 7 路 600 號

國 家 網 路 書 店：<http://www.govbook.com.tw>

GPN : 2005200015

ISSN : 0253-9209

# 畜產研究

第 53 卷第 2 期

中華民國 109 年 6 月

## 目 錄

	頁
1. 飼糧中補充生物素與有機鋅對濕熱季節荷蘭乳牛蹄部健康與泌乳性能之影響 .....張俊達、蕭宗法、李佳蓉、李春芳	64
2. 環境豐富化對籠飼紐西蘭白兔行為健康與生長性狀之影響 .....蔡佩均、蔡銘洋、李恒夫、陳立人	73
3. 三段式處理對不同濃度養豬廢水之處理效果 .....蘇天明、鍾承訓、蕭庭訓、程梅萍	82
4. 飼糧中添加凝結芽孢桿菌對離乳仔豬生長性能、血液生化值及糞便微生物的影響 .....王錦盟、林幼君、陳致吟、劉芳爵	91
5. 乾物率及不同接種處理對燕麥與燕麥 / 苜蓿混植長期青貯品質的影響 .....王紓愍、游翠凰、陳嘉昇	99
6. 飼糧中添加靈芝對荷蘭種仔公牛生長性能與免疫反應之影響 .....李國華、林文宏、陳志毅、陳怡璇、陳一明	107
7. 生物濾床除臭效率及其微生物分布 .....廖仁寶、蕭庭訓、程梅萍	116
8. 雞隻性別決定機制概論 .....郭曉芸、張以恆	126

# 飼糧中補充生物素與有機鋅對濕熱季節荷蘭乳牛 蹄部健康與泌乳性能之影響<sup>(1)</sup>

張俊達<sup>(2)(4)</sup> 蕭宗法<sup>(2)</sup> 李佳蓉<sup>(2)</sup> 李春芳<sup>(3)</sup>

收件日期：109 年 1 月 21 日；接受日期：109 年 5 月 25 日

## 摘 要

為紓緩荷蘭泌乳牛的熱緊迫，本試驗在探討於熱季高溫濕度指數 (Temperature-humidity index, THI) 環境下，飼糧中補充生物素與有機鋅對荷蘭泌乳牛之蹄部健康、產乳量及血液生化值之改善。試驗於 2019 年 5 月至 8 月的濕熱季節執行，將 24 頭泌乳中期荷蘭乳牛依體重、乳量 (平均 28.8 kg)、胎次 (平均 1.9 胎) 與泌乳天數 (平均 158 天) 逢機分成 2 組群飼。試驗組於基礎飼糧外，每天每頭再補充 10 mg 生物素及 5 g 有機鋅，對照組則不補充上述物質。於試驗開始與之後每 30 天調查牛隻行動分數 (1 至 5 分, locomotion score)、乳成分及血液生化值。試驗結果顯示，試驗期間牛舍內 THI 平均為  $75.2 \pm 1.1$  (屬輕度熱緊迫)。飼糧補充生物素與有機鋅可改善牛隻行動分數 (2.09 vs. 1.64) 與提高牛群隻日產乳量 0.6 – 0.9 kg 之現象，但乳成分及體細胞數等皆未受到影響。在血液生化值方面，飼糧補充生物素與有機鋅有微幅降低餵飼後 30 天、60 天及 90 天之血中麩胺酸草乙酸轉胺酶 (GOT)、麩胺酸丙酮酸轉胺酶 (GPT) 及乳酸鹽脫氫酶 (LDH) 之穩定趨勢。由試驗結果得知，於國內濕熱季節時 (THI 75.2)，飼糧中補充生物素與有機鋅有改善牛隻蹄部健康、產乳量與肝臟健康之趨勢，並具經濟效益。推測在更嚴峻熱緊迫環境時，添加生物素與有機鋅的效益應可更為明確。

關鍵詞：生物素、荷蘭泌乳牛、行動分數、有機鋅、泌乳性能、溫濕度指數。

## 緒 言

溫濕度指數 (Temperature-humidity index, THI) 為結合氣溫及相對濕度之計算值，可用來警示家畜生產業及運輸業者家畜受熱緊迫之狀況 (Harrington and Bowles, 2004)。臺灣夏季常處於高溫與高濕之氣候，因此容易導致牛隻的熱緊迫，研究顯示當 THI 高於 72 時，牛隻即開始受到熱緊迫的影響，其症狀包括降低乾物質採食量、產乳量、泌乳效率及引起代謝擾亂 (Stanley *et al.*, 1975; West, 1995)。Chase (2006) 以 THI 分級家畜受到熱緊迫的程度，THI < 72 為舒適， $72 \leq \text{THI} < 79$  為輕度熱緊迫， $80 \leq \text{THI} < 89$  為中度熱緊迫，THI > 90 為嚴重熱緊迫，隨著 THI 的增高，牛隻受到的熱緊迫影響越高，飼養者需要強化熱緊迫紓解措施以維護家畜健康與生命。

蹄病為目前國內成為牛隻淘汰的三大原因之一 (陳, 2001)。牛隻行動分數是一種分級方式，主要是用來判定牛隻行走時的跛腳程度，在飼養管理上常被作為評估牛隻腳蹄健康的重要指標之一 (Flower and Weary, 2006)。大多數行動分數評分方法使用 3 到 5 個性狀，包括不對稱的步態 (asymmetric gait)、不願承擔重量 (reluctance to bear weight)、背部拱起 (arched back)、頭部擺動 (head bobbing) 和前後腳追蹤點 (tracking up) (Schlageter-Tello *et al.*, 2014)。而生物素在角化過程扮演著重要的元素，且為角化組織 (皮膚、毛髮、腳蹄與腳墊) 形成與完整度所必需 (Higuchi *et al.*, 2003)。飼糧補充生物素與有機鋅對蹄病有改善的效果 (Twardoń *et al.*, 2009)。許多研究已證實生物素的應用可增加產乳量 (Zimmerly and Weiss 2001, Ferreira *et al.*, 2007)。很多研究指出，有機型式微量礦物質的消化吸收會優於無機型式的礦物質 (Osorio *et al.*, 2016)。Smith *et al.* (1999) 指出，使用蛋白鋅 (Zn proteinates) 或鋅與胺基酸螯合物，可明顯促進乳腺上皮細胞的再生能力。飼糧補充有機鋅不會影響乳成分與體細胞數，但是對產乳量有改善之效果 (Cope *et al.*, 2009)。Godara *et al.* (2016) 指出熱緊迫會降低乾物質採食量，因此於熱緊迫期間應提高營養濃

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2639 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所產業組。

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所副所長室。

(4) 通訊作者，E-mail: ctchang@mail.tlri.gov.tw。



度，以盡可能滿足動物所需。Sunil Kumar *et al.* (2011) 指出於熱緊迫期間補充飼料添加物，如礦物質或礦物質與維生素等，將有助於減緩牛隻熱緊迫。

泌乳牛於熱緊迫期間同時補充有機鋅與生物素的研究報告很少，因此為紓緩國內濕熱季節對乳牛群緊迫的負面影響，試驗探討於飼糧中補充生物素與有機鋅，對改善泌乳牛蹄部健康（以行動分數 (locomotion score) 表示）、乾物質採食量及產乳量之效果。

## 材料與方法

本試驗所使用之動物均通過行政院農業委員會畜產試驗所實驗動物照護與使用小組之審核。

### I. 試驗動物環境

試驗期間為 2019 年 5 月至 8 月，使用荷蘭泌乳牛，飼養在行政院農業委員會畜產試驗所產業組乳牛試驗場的水泥地傳統牛舍，提供餵飼走道、牛床與飲水槽設施，試驗區域的長與寬分別為 24 m 與 10 m，每頭牛可活動空間為 8.6 m<sup>2</sup>，試驗期間提供降溫設施包括全日開啟的四臺風扇 (36 吋，2 HP，3 葉片，風量 26,300 m<sup>3</sup>/hr)，使風速 2.5 m/s 以上，風扇置於牛隻採食走道及牛床上方各兩支，而噴水降溫系統則設置在牛隻採食區上方（約牛頸部），於每日 8：00 – 8：30、9：00 – 9：30、10：00 – 10：30、15：50 – 16：20、16：50 – 17：20、17：50 – 18：20、22：00 – 22：30 與 23：00 – 23：30 共 8 次進行，每次 6 循環，每循環 5 分鐘（包括噴水 1 分鐘，停 4 分鐘）。

### II. 試驗動物及飼養管理

選擇泌乳中期荷蘭乳牛 24 頭分兩組進行 90 天飼養試驗，試驗採完全隨機設計並參考牛隻乳量、胎次、泌乳天數及體重分組，試驗開始前對照組牛群性能依序為乳量 28.87 ± 5.89 kg、胎次 1.7 ± 0.5 胎、泌乳天數 152 ± 50 天及體重 611 ± 54.5 kg；處理組則分別為 28.73 ± 4.38 kg、2.1 ± 1.0 胎、163 ± 37 天及 624 ± 67 kg。泌乳牛飼糧（即對照組）則依據 NRC (2001) 推薦給予因應熱緊迫調整飼糧 (Staples, 2007; Das *et al.*, 2016) 以滿足預期之蛋白質、礦物質與維生素需要量進行完全混合日糧 (total mixed ration, TMR) 之配製，飼糧組成包括盤固乾草、苜蓿乾草、玉米青貯料、大豆殼粒、啤酒粕及以玉米—大豆粕穀類精料，飼糧每日配製兩次，分別於上午 7：00 配製 1/3 量及下午 2：30 配製 2/3 量，配製量供應牛群任食，飼糧組成如表 1，另以自動給水槽供乾淨飲水及鹽磚任食。參考 Twardoń *et al.* (2009) 劑量，於每天上午每頭牛不補充為對照組或補充 10 mg 生物素 (ROVMIX biotin) 及 5g 有機鋅（甲硫胺酸螯合鋅、Zinpro-zinc）為試驗組。其中試驗組每天先與 150 g 精料混合後直接給予。本所每年進行兩次護蹄作業。

### III. 測定項目

- (i) 牛舍環境參數：包括溫度、濕度以推算 THI。於牛舍內平均分佈並裝置六組溫濕度感應器 (HOBO pro RH/Temp, Onset Computer Corporation, MA, USA)，於試驗期間連續每隔 0.5 小時測定及記錄溫濕度一次，每週將資料轉錄至電腦中以進行牛舍環境參數的累計與分析，THI 值以 National Oceanic and Atmospheric Administration (1976) 法計算，其公式

$$THI = 9/5 \times T + 32 - 0.55 \times (1 - RH/100) \times (9/5 \times T - 26)$$

其中 T 為氣溫 (°C)，RH 為相對濕度 (%)。

- (ii) 牛隻性能表現

1. 牛隻行動分數：依據 Flower and Weary (2006) 評估方法採五分制，1 分是正常的腳蹄與步態，站立與行走時背脊保持水平一直線；2 分是輕微的蹄病，站立時背脊保持水平一直線，但是行走時背脊線呈現略微彎曲弧線；3 分是中等的蹄病，站立及行走時背脊線呈現彎曲弧線；4 分是典型蹄病，站立（重心前傾）及行走時背脊線呈現彎曲弧線；5 分是嚴重蹄病（跛腳），站立（痛腳不敢著地）及行走時（步伐蹣跚）背脊線呈現明顯彎曲弧線。每 30 天評估一次，每次 2 個測量員進行評估。
2. 產乳量及乳樣分析：每日擠乳兩次，分別為清晨 5：00 與下午 3：30，由電腦記錄個別牛隻泌乳量。試驗期間每 30 天採集參試個別牛隻乳樣三天，混合個別牛各日上下午乳樣後，送至行政院農業委員會畜產試驗所新竹分所 DHI 乳樣檢驗中心，使用丹麥製乳成分與體細胞測定儀 (MilkoScan™ FT+, Denmark) 進行乳脂率、乳糖率、乳蛋白質率、無脂固形物率、總固形物率、尿素氮及體細胞數等分析。
3. 血液生化值分析：試驗期間每 30 天採集個別牛隻血液，以不含抗凝劑之採集管經尾靜脈採集血液 10 mL，靜置後以 3,000 × g 離心 15 分鐘取得血清，冷凍保存供爾後使用。採用 Roche 公司全自動血液分析

儀 (Cobas C-702, Germany) 測定血中葡萄糖、尿素氮、膽固醇、麩胺酸草乙酸轉胺酶 (glutamic oxaloacetic transaminase, GOT)、麩胺酸丙酮酸轉胺酶 (glutamic pyruvic transaminase, GPT)、鹼性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AP)、肌酸磷酸激酶 (creatinine phosphate kinase, CPK) 及乳酸鹽脫氫酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 之濃度或活性。

表 1. 泌乳牛熱季生物素與有機鋅試驗之飼糧組成與成分

Table 1. Diet ingredients and compositions offered to Holstein lactating cows in hot summer for biotin and organic Zn addition experiment

Ingredients	% (Dry matter basis)
Corn silage	23.47
Pangolagrass hay	4.54
Alfalfa hay	6.89
Wet brewer's grains silage	12.10
Soybean hull pellet	16.25
Wheat bran	4.65
Corn, ground	18.40
Soybean meal, 43% CP	9.33
Fish meal, 60% CP	1.03
Molasses	0.62
Salt	0.37
Limestone	0.68
Calcium phosphate, monobasic	0.16
Potassium carbonate	0.37
Sodium bicarbonate	0.52
Urea	0.37
Premix <sup>1</sup>	0.27
Total	100.00
Analyzed values (Dry matter basis)	
DM, %	48.0
CP, %	17.3
NDF, %	40.6
ADF, %	24.9
Ca, %	0.74
P, %	0.42
Estimated NEL, Mcal/kg	1.59

<sup>1</sup> Each kilogram of premix contains: Vit. A, 10,000,000 IU; Vit. D<sub>3</sub>, 1,600,000 IU; Vit. E, 70,000 IU; Fe, 50 g; Cu, 10 g; Zn, 40 g; I, 0.5 g; Se, 0.1 g; and Co, 0.1 g.

#### IV. 統計分析

試驗所得資料以 SAS 套裝軟體 (SAS, 2002) 進行 ANOVA 變方分析，以比較上述各種測定項目在二處理間之差異，試驗設定顯著差異水準為  $P < 0.05$ 。

## 結果與討論

圖 1 為試驗期間 (2019 年 5 月 15 日至 8 月 15 日) 之牛舍內平均溫濕度指數。2019 年 5 月至 8 月是相對比較涼爽的一季，試驗期間 THI 範圍在 71.5 – 78.8，平均僅  $75.2 \pm 1.1$ ，屬於輕度熱緊迫狀況 (Chase, 2006)，且也低於張等 (2018, 2019) 前兩年試驗的牛舍內 THI，2017 年 4 月到 7 月的 THI 為 73.9 – 82.0；2018 年 4 月到 6 月的 THI 為 73.9 – 81.9。對泌乳牛來說，熱緊迫顯著影響其表現，且受影響程度隨 THI 指數的增加而更形嚴重，採食量、乳量及繁殖效率明顯降低，代謝擾亂明顯增加 (Stanley *et al.*, 1975)。張等 (2018) 指出，臺灣南部每年 4 至 7 月份，牛隻皆處於輕度熱緊迫 ( $72 \leq \text{THI} < 79$ ) 至中度熱緊迫 ( $80 \leq \text{THI} < 89$ ) 的狀態。畜舍降溫措施已是國內畜禽飼養管理上

的必備基礎，然研究報告也指出，畜舍的降溫設施可以紓緩但尚無法徹底解決熱緊迫，高溫多濕的環境仍使得牛隻處於熱緊迫狀態 (Shiao *et al.*, 2011)，因此，如何繼續努力降低泌乳牛熱緊迫是國內酪農業者與研究人員仍需面臨的重要挑戰。

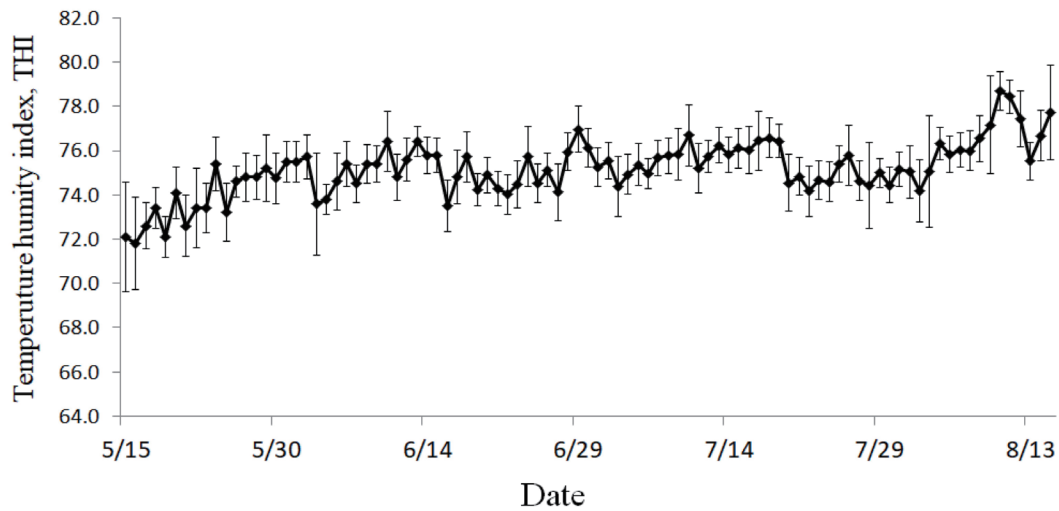


圖 1. 2019 年 5 月至 8 月牛舍內溫濕度指數之變化。

Fig. 1. Daily barn averaged temperature-humidity index from May to August in 2019.

本次試驗參試牛群於試驗開始時的平均行動分數為 1.36 分，範圍約在 1.0 – 1.8 分，表示牛群腳蹄健康狀況尚稱良好，然而隨著季節的逐漸濕熱，影響牛隻的蹄部健康，行動分數增加，尤其是未添加的對照組，牛隻最高分數達 2.6 – 2.8 分。生物素與鋅在牛蹄角化過程中扮演重要的元素。本次試驗中得知，飼糧補充生物素與有機鋅有改善餵飼後 60 天 (1.83 分 vs. 1.56 分) 與 90 天 (2.09 分 vs. 1.64 分) 牛隻行動分數之趨勢 (圖 2)。Twardoń *et al.* (2009) 以荷蘭泌乳牛為試驗，每天每頭補充 10 mg 生物素或同時補充 10 mg 生物素與 5 g 有機鋅 7 個月，指出單獨補充或同時補充皆可改善牛隻蹄潰瘍 (feet ulcer) 及白線病 (white line injury) 等腳蹄疾病，其中以同時補充之效果更為明顯，補充生物素可改善 2.5% 跛腳發生率，同時補充生物素與有機鋅則可減少 5% 之跛腳發生率。本次試驗於飼糧中同時補充生物素 10 mg 與 5 g 有機鋅，也觀察到有減低牛隻行動分數即改善牛隻腳蹄健康的趨勢。

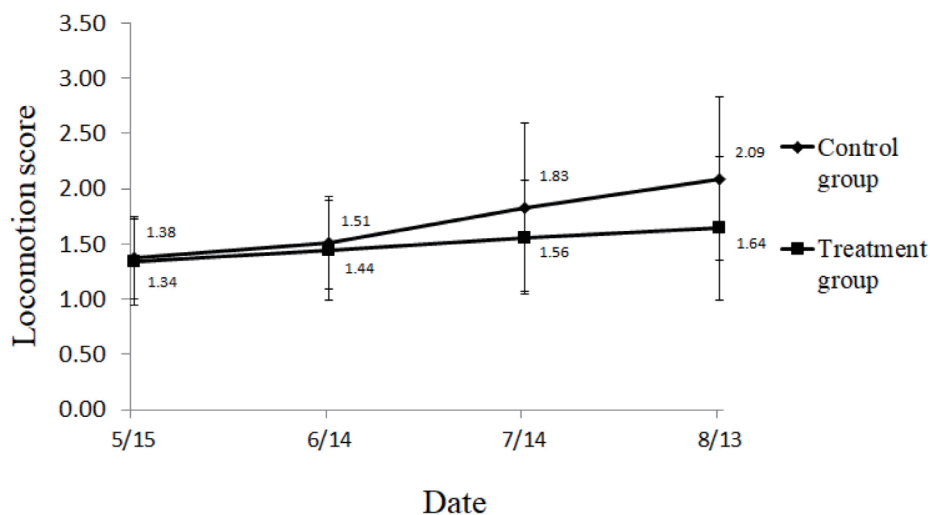


圖 2. 飼糧中補充生物素與有機鋅對熱季 (THI 平均 75.2) 荷蘭泌乳牛行動分數之影響。

Fig. 2. Effect of dietary supplementation of biotin and organic Zn on locomotion scores of Holstein lactating cows in hot season (average THI 75.2).

圖 3 為補充生物素與有機鋅對熱季荷蘭乳牛產乳量之影響，結果顯示補充生物素與有機鋅有增加產乳量之趨勢，其餵飼後 45 – 90 天平均隻日乳量增加 0.62 – 0.91 kg，此與張等 (2019) 與 Kinal *et al.* (2011) 試驗結果一致。張等 (2019) 在熱季補充荷蘭乳牛每天每頭 20 或 40 mg 生物素，觀察到 30 天、60 天及 90 天後有每天增加 0.6 – 0.8



kg 產乳量之趨勢。Kinal *et al.* (2011) 於荷蘭泌乳牛每天每頭補充 10 mg 生物素或同時補充 10 mg 生物素與 5 g 有機鋅 7 個月後，其產乳量皆顯著高於未補充的對照組，特別是每天每頭補充 10 mg 生物素的效果更佳。本次試驗在乳成分方面 (表 2)，舉凡乳脂肪、乳蛋白質、乳糖、無脂固形物、總固形物、乳中尿素態氮及乳體細胞數等乳成分的濃度，皆未受到補充生物素與有機鋅的影響，此結果與飼糧補充有機鋅可改善產乳量但不影響乳成分與體細胞數的結果一致 (Cope *et al.*, 2009)，但未若 Majee *et al.* (2003) 的效果，其指出於飼糧中補充生物素有增加每日產乳量，且有提高乳蛋白質率與乳糖率的效果。從上研究報告所述顯示，泌乳牛飼糧補充生物素有益於產乳量的提升，推測可能與經由其促進瘤胃菌群及增加養分供應有關。

表 2. 飼糧補充有機鋅與生物素對熱季荷蘭乳牛乳成分之影響

Table 2. Effect of dietary supplementation of biotin and organic Zn on milk compositions of Holstein cows in hot summer (average THI 75.2)

Milk compositions	Dietary treatments		P-value
	Control	Treatment	
No.	12	12	
	after 30 days' feeding		
Fat, %	3.42	3.45	0.26
Protein, %	3.24	3.29	0.34
Lactose, %	4.91	4.95	0.81
Solids-not-fat, %	8.68	8.78	0.52
Total solid, %	12.3	12.4	0.75
Urea nitrogen, mg/dL	17.8	18.0	0.89
Somatic cell counts, $\times 10^4$ /mL	19.7	20.4	0.93
	after 60 days' feeding		
Fat, %	3.95	3.86	0.58
Protein, %	3.33	3.32	0.97
Lactose, %	4.70	4.87	0.15
Solids-not-fat, %	8.73	8.89	0.39
Total solid, %	12.7	12.8	0.68
Urea nitrogen, mg/dL	12.3	13.4	0.33
Somatic cell counts, $\times 10^4$ /mL	15.3	13.5	0.68
	after 90 days' feeding		
Fat, %	3.98	3.87	0.63
Protein, %	3.49	3.42	0.75
Lactose, %	4.63	4.68	0.59
Solids-not-fat, %	8.83	8.79	0.89
Total solid, %	12.8	12.7	0.66
Urea nitrogen, mg/dL	14.2	14.8	0.65
Somatic cell counts, $\times 10^4$ /mL	24.7	37.2	0.57

表 3 為飼糧補充生物素與有機鋅 90 天內對熱季荷蘭泌乳牛血液生化值之影響。結果顯示，每頭每天補充生物素 10 mg 與有機鋅 5 g，未對餵飼後 30 天、60 天及 90 天之血中葡萄糖、尿素氮、膽固醇、GOT、GPT、AP、CPK 及 LDH 等產生顯著影響。GOT 與 GPT 為肝細胞損傷 (hepatocellular injury) 的主要兩項指標 (Kauppinen, 1984)。GOT 與 GPT 參與蛋白質代謝過程中胺基的轉換，當牛隻肝臟損傷時，血中的 GOT 與 GPT 活性會升高。通常動物在有氧代謝 (anaerobic metabolism) 下無法提供足夠能量需要，需透過厭氧途徑 (anaerobic pathway) 取得所需能量，期間會伴隨著乳酸的產生與蓄積，同時也會使 LDH 活性增加 (Lai *et al.*, 2009)。本次試驗補充生物素與有機鋅有穩定但微幅降低餵飼後 30、60 及 90 天血中 GOT、GPT 及 LDH 之趨勢，Stojević *et al.* (2005) 指出健康泌乳牛隻 (泌乳期 90 天至泌乳期結束) 之血中 GPT 與 GOT 數值分別為  $44.91 \pm 6.93$  與  $20.08 \pm 3.74$ 。本試驗之牛隻於梅雨季節期間，其血中 GPT 與 GOT 數值分別為 59.9 與 17.9。顯示在高溫溼度指數環境下試驗期間環境條件尚未造成牛群明顯緊迫，此與試驗期間 THI 落於輕度緊迫的結果一致。

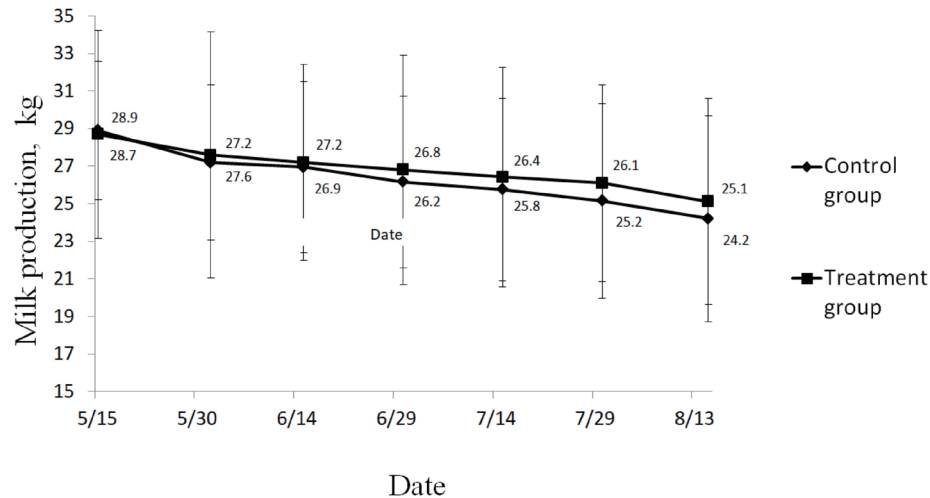


圖 3. 飼糧中補充生物素與有機鋅對熱季 (THI 平均 75.2) 荷蘭乳牛產乳量之影響。

Fig. 3. Effect of dietary supplementation of biotin and organic Zn on milk production of Holstein cows in hot season (average THI 75.2).

表 3. 飼糧補充生物素與有機鋅對熱季荷蘭泌乳牛血液生化值之影響

Table 3. Effect of dietary supplementation of biotin and organic Zn on blood biochemical profiles of Holstein lactating cows in hot summer (average THI 75.2)

Items	Dietary treatments		P-value
	Control	Treatment	
after 30 days' feeding			
Glucose (mg/dL)	68.4	67.2	0.75
Serum urea nitrogen (mg/dL)	18.5	19.9	0.53
Cholesterol (mg/dL)	216	227	0.54
Glutamic oxaloacetic transaminase (IU/L)	74.0	64.2	0.49
Glutamate-pyruvic transaminase (IU/L)	29.4	27.6	0.74
Alkaline phosphatase (IU/L)	63.4	60.5	0.64
Creatine phosphate kinase (U/L)	218	208	0.85
Lactate dehydrogenase (IU/L)	1,120	1,085	0.54
after 60 days' feeding			
Glucose (mg/dL)	62.1	62.0	0.96
Serum urea nitrogen (mg/dL)	11.1	11.7	0.85
Cholesterol (mg/dL)	150	165	0.42
Glutamic oxaloacetic transaminase (IU/L)	74.8	70.8	0.65
Glutamate-pyruvic transaminase (IU/L)	24.4	21.6	0.22
Alkaline phosphatase (IU/L)	31.9	34.9	0.58
Creatine phosphate kinase (U/L)	228	368	0.44
Lactate dehydrogenase (IU/L)	1,039	976	0.57
after 90 days' feeding			
Glucose (mg/dL)	55.9	59.4	0.11
Serum urea nitrogen (mg/dL)	5.5	5.6	0.56
Cholesterol (mg/dL)	120	134	0.35
Glutamic oxaloacetic transaminase (IU/L)	65.4	59.9	0.55
Glutamate-pyruvic transaminase (IU/L)	21.4	17.9	0.21
Alkaline phosphatase (IU/L)	27.1	31.0	0.42
Creatine phosphate kinase (U/L)	110	107	0.90
Lactate dehydrogenase (IU/L)	979	872	0.23

在經濟效益估算方面，本次試驗所購生物素商品價格大約 672 元 /kg，以每天補充 10 mg (2%，等於每天補充產品 1 g) 的成本約新臺幣 0.34 元，而有機鋅商品價格大約 360 元 /kg，以每天補充 5 g 的成本約新臺幣 1.8 元，增加兩項元素之成本合計為 2.14 元 / 頭，而可增加 0.6 – 0.9 kg 乳量，以每公斤生乳收購價 26.7 元計算 ( 生乳價格會依據涼熱季與乳成分品質而有所差異 )，每天每頭的粗收入增加 14.8 – 22.8 元，因此熱季於乳牛飼糧中補充生物素 ( 10 mg/ 頭 / 天 ) 及有機鋅 ( 5 g/ 頭 / 天 ) 是具有經濟效益的。

## 結 論

熱季高溫多濕環境下 (THI 75.2)，乳量 28 kg 的荷蘭泌乳牛飼糧中，每天每頭補充生物素 10 mg 與有機鋅 5 g，雖未能再提升乳成分與肝臟健康，但有維護牛隻蹄部健康與增加泌乳量效果的趨勢，並具有經濟效益。推測若當熱緊迫更嚴峻時，添加生物素與有機鋅的效益會較為明顯。本試驗之結果可提供酪農改善熱季牛隻飼養管理與營養補充之參考。

## 誌 謝

本試驗承行政院農業委員會經費補助 [108 農科 -2.3.1- 畜 -L1(1)]，試驗期間承畜產試驗所產業組一股同仁的現場飼養管理協助，謹致謝忱。

## 參考文獻

- 陳鵬文。2001。乳牛的蹄病。酪農天地 47：33。
- 張俊達、蕭宗法、王思涵、吳鈴彩、蔡銘洋、李春芳、林義福。2019。飼糧中補充生物素對高溫濕度指數期間荷蘭泌乳牛行動分數與產乳量之影響。臺灣農學會報 20：13-27。
- 張俊達、蕭宗法、王思涵、吳鈴彩、蔡銘洋、李春芳、林義福。2018。飼糧中補充鋅、銅與錳對高溫濕度指數期間荷蘭泌乳牛行動分數與性能表現之影響。畜產研究 51：201-208。
- Chase, L. E. 2006. Climate change impacts on dairy science. In: Climate change and Agriculture: Promoting Practical and Profitable Responses, held at March 7th, Baltimore, MD, USA.
- Cope, C. M., A. M. Mackenzie, D. Wilde and L. A. Sinclair. 2009. Effects of level and form of dietary zinc on dairy cow performance and health. J. Dairy Sci 92: 2128-2135.
- Das, R., L. Sailo, N. Verma, P. Bharti, J. Saikia, Imtiwati, and R. Kumar. 2016. Impact of heat stress on health and performance of dairy animals: A review. Vet. World 9: 260-268.
- Ferreira, G, W. P. Weiss and L. B. Willett. 2007. Changes in measures of biotin status do not reflect milk yield responses when dairy cows are fed supplemental biotin. J. Dairy Sci. 90: 1452-1459.
- Flower, F. C. and D. M. Weary. 2006. Effect of hoof pathologies on subjective assessments of dairy cow gait. J. Dairy Sci. 89: 139-146.
- Harrington, J. A. and Jr. E. Bowles. 2004. A climatology of hourly THI values for livestock producers. 14<sup>th</sup> Conference on Applied Climatology. Poster Session 1-12, The 84<sup>th</sup> AMS Annual Meeting (Seattle, WA).
- Higuchi, H., T. Maeda, K. Kawai, A. Kuwano, M. Kasamatsu and H. Nagahata. 2003. Physiological changes in the concentrations of biotin in the serum and milk and in the physical properties of the claw horn in Holstein cows. Vet. Res. Commun. 27: 407-413.
- Kauppinen, K. 1984. ALAT, AP, ASAT, GGT, OCT, activities and urea and total bilirubin concentrations in plasma of normal and ketotic dairy cows. Zbl. Vet. Med. A31: 567-576.
- Kinal, S., J. Twardoń, M. Bednarski, J. Preś, R. Bodarski, M. Słupczyńska, M. Ochota and G. J. Dejneka. 2011. The influence of administration of biotin and zinc chelate (Zn-methionine) to cows in the first and second trimester of lactation on their health and productivity. Pol. J. Vet. Sci. 14: 103-110.
- Lai, A. Q., Z. S. Wang and A. G. Zhou. 2009. Effect of chromium picolinate supplementation on early lactation performance,

- rectal temperatures, respiration rates and plasma biochemical response of Holstein cows under heat stress. *Pak. J. Nutr.* 8: 940-945.
- Majee, D. N., E. C. Schwab, S. J. Bertics, W. M. Seymour and R. D. Shaver. 2003. Lactation performance by dairy cows fed supplemental biotin and a B-vitamin blend. *J. Dairy Sci.* 86: 2106-2112.
- National Oceanic and Atmospheric Administration. 1976. Livestock hot weather stress. Regional Operations Manual Letter C-31-76. US Dep. Commerce, Natl. Oceanic and Atmospheric Admin., Natl. Weather Service Central Region, Kansas City, Missouri, USA.
- NRC. 2001. Mineral Tolerance of Animals. National Academies Press, Washington, DC.
- Osorio, J. S., E. Trevisi, C. Li, J. K. Drackley, M. T. Socha, and J. J. Loores. 2016. Supplementing Zn, Mn, and Cu from amino acid complexes and Co from cobalt glucoheptonate during the periparturient period benefits postparturient cow performance and blood neutrophil function. *J. Dairy Sci.* 99: 1868-1883.
- SAS. 2002. SAS User's guide: basics, 2002 edition. SAS institute Inc., Cary, NC.
- Schlageter-Tello, A., E. A. M. Bokkers, P. W. G. G. Koerkamp, T. Van Hertem, S. Viazzi, C. E. B. Romanini, I. Halachmi, C. Bahr, D. Berckmans and K. Lokhorst. 2014. Manual and automatic locomotion scoring systems in dairy cows: A review. *Prev. Vet. Med.*, 116: 12-25.
- Shiao, T. F., J. C. Chen, D. W. Yang, S. N. Lee C. F. Lee, and T. K. Cheng. 2011. Feasibility assessment of a tunnel-ventilated, water-padded barn on alleviation of heat stress for lactating Holstein cows in a humid area *J. Dairy Sci.* 94: 5393-5404.
- Shingh Godara, A., S. A. Bhat, R. K. Yogi, S. Devi and S. P. Sahoo. 2016. Feeding strategies to ameliorating the impact of heat stress in bovine. *Internat. J. Sci. Natu.* 7: 25-29.
- Smith, M. R., H. E. Amos and M. A. Froetschel. 1999. Influence of ruminally undegraded protein and zinc methionine on milk production, hoof growth and composition, and selected plasma metabolites of high producing dairy cows. *PAS.* 15: 268-277.
- Stanley, R. W. S. E. Olbich and F. A. Martz. 1975. Effect of roughage level and ambient temperature on milk production, milk composition and ruminal volatile fatty acids. *Trop. Agri.* 52: 213-221.
- Staples, C. R. 2007. Nutrient and feeding strategies to enable cows to cope with heat stress conditions. In 22nd Annu. Southwest Nutr. Manage. Conf., Tempe, AZ. Univ. Ari-zona, Tempe. pp. 93-108.
- Stojević, Z., J. Piršljini, S. Milinković-Tur, M. Zdelar-Tuk, and B. B. Ljubić. 2005. Activities of AST, ALT and GGT in clinically healthy dairy cows during lactation and in the dry period. *Vet Arh.* 75: 67-73.
- Sunil Kumar, B. V., A. Kumar and M. Kataria. 2011. Effect of heat stress in tropical livestock and different strategies for its amelioration. *J. stress physiol. biochem.* 7: 45-54.
- Twardoń, J., S. Kinal, J. Preś, M. Słupczyńska, R. Bodarski, A. Zachwieja, M. Bednarski and M. Ochota. 2009. The influence of biotin and Zn-methionine application on dairy cows hoofs condition. *Electron. J. Pol. Agric. Univ.* 12(4): #18. Available online: <http://www.ejpau.media.pl/volume12/issue4/art-18.html>.
- West, J. W. 1995. Managing and feeding lactating dairy cows in hot weather. Bulletin 956/1995. The University of Georgia in cooperation with Fort Valley State University, the U. S. Department of Agriculture and counties of the state.
- Zimmerly, C. A. and W. P. Weiss. 2001. Effects of supplemental dietary biotin on performance of Holstein cows during early lactation. *J. Dairy Sci.* 84: 498-506.

# Effect of dietary supplementation of biotin and organic Zn on hoof health and lactating performance of Holstein cows in hot and humid summer <sup>(1)</sup>

Chun-Ta Chang <sup>(2) (4)</sup> Tzong-Faa Shiao <sup>(2)</sup> Chia-Jung Li <sup>(2)</sup> and Churng-Faung Lee <sup>(3)</sup>

Received: Jan. 21, 2020; Accepted: May 25, 2020

## Abstract

To relieve the heat stress in lactating cows, this study aims to evaluate the effects of dietary supplementation of biotin and organic zinc on hoof health and lactating performance of Holstein cows in hot summer with high temperature humidity index (THI). The experiment was conducted from May to August 2019 for a period of 90 days. A total of 24 Holstein cows were assigned into two groups by body weight, milk yield (averaged 28.8 kg), parity (1.9 lactation no.) and days in milk (158 d). The cows received basal diet as the control group with additional supplemented of 10 mg of biotin and 5 g of organic zinc daily per head while the treatment group did not receive the aforementioned supplements. Cows' locomotion score (1 to 5 points), milk and blood were measured or sampled every 30 days for hoof health evaluation, milk components and blood biochemical profile analysis. The results showed that the averaged barn THI during the 90 days was  $75.2 \pm 1.1$ , indicating mild stress status. Dietary supplementation of biotin and organic zinc suggested tendency to help retard the locomotion score (2.09 vs. 1.64) and increase milk production by 0.6 – 0.9 kg a day. However, there were no significant difference in milk compositions and milk somatic cell count between the two groups. Blood profile revealed stable trends of marginal decrease in GOT, GPT, and LDH after supplementing biotin and organic Zn for 30 days, 60 days and 90 days. From the above results, it is concluded that diet supplemented with biotin and organic zinc could benefit the hoof health, milk production, and liver health of lactating Holstein cows during the hot and humid summer (THI 75.2). The supplementation also yielded economic return. It is postulated that in a more rigorous THI environment, the effect of supplementation of biotin and organic Zn would be become more apparent.

Key words: Biotin, Holstein cows, Lactating performance, Locomotion score, Organic Zn, Temperature-humidity index.

---

(1) Contribution No. 2639 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Animal Industry Division, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(3) Deputy Director General Office, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(4) Corresponding author, E-mail: ctchang@mail.tlri.gov.tw.



# 環境豐富化對籠飼紐西蘭白兔行為健康 與生長性狀之影響<sup>(1)</sup>

蔡佩均<sup>(2)(5)</sup> 蔡銘洋<sup>(3)</sup> 李恒夫<sup>(4)</sup> 陳立人<sup>(2)</sup>

收件日期：109 年 1 月 8 日；接受日期：109 年 6 月 9 日

## 摘 要

本試驗目的在於建立友善飼養環境的相關數據，減少實驗動物飼養時的緊迫，以確保可靠的動物試驗結果。試驗以 4 週齡兔共 36 隻（公母各半），分別圈養於豐富化兔籠 (EN) 及一般商業飼養籠 (UE) 6 週，以探討不同的飼養環境對兔隻生長、健康與行為方面的影響。試驗結果顯示，商用飼籠組母兔的飼料效率雖然在剛開始的 4 – 5 週、5 – 6 週及 6 – 7 週均顯著 ( $P < 0.05$ ) 優於豐富化兔籠組，不過大於 7 – 8 週後兩組不論公母都無顯著的差異。在血液生理值的分析結果，EN 組公兔血中的血紅素及血球容積比顯著 ( $P < 0.05$ ) 高於 UE 組。血液生化值方面，UE 組公兔血清中的三酸甘油酯顯著 ( $P < 0.05$ ) 高於 EN 組，而 EN 組公兔之麩胺酸丙酮酸轉胺酶 (glutamate pyruvate transaminase, GPT) 及麩胺醯轉胺酶 ( $\gamma$ -glutamyltransferase,  $\gamma$ -GT) 顯著高於 UE 組。行為表現分析方面：EN 組公兔上午時段的休息行為顯著 ( $P < 0.05$ ) 高於 UE 組，然 UE 組公兔之社交、探索及自理行為顯著 ( $P < 0.05$ ) 高於 EN 組，EN 組公兔中午及下午時段的跳躍行為則顯著 ( $P < 0.05$ ) 高於 UE 組；另外 EN 組公兔下午時段飲水行為則顯著 ( $P < 0.05$ ) 高於 UE 組；母兔在兩種環境下結果的則較一致，EN 組中所有時段的跳躍行為均有顯著 ( $P < 0.05$ ) 高於 UE 組的現象。本研究顯示豐富化的飼養環境對兔的生長性能影響不大，但可能影響兔的血液生理值及有助於兔隻展現跳躍行為的表現。

關鍵詞：行為、豐富化、紐西蘭白兔。

## 緒 言

由於動物福祉的意識抬頭，2005 年即有歐盟食品安全局 (European Food Safety Authority, EFSA) 針對兔子健康及福祉進行科學性的發表 (EFSA, 2005)。後續的相關研究指出，商用籠飼系統也許有損兔之福祉，使之無法表現出自然之行為特徵，特別是跳躍、站立及活動力等 (Verga *et al.*, 2006; Morisse *et al.*, 1999)；一般兔商業飼養籠 (unenriched, UE) 只有飼料槽、飲水設備及冰冷的籠架，如此單調的飼養環境常致使兔產生不正常的刻板行為，像是嚙咬兔籠、具攻擊性行為或對周遭事物漠不關心 (Verga *et al.*, 2007)。為減少因缺乏刺激而造成的緊迫及增進動物福祉，在兼顧空間考量及籠內飼養隻數下，必須研究適當的設計以達成豐富化環境的需求。Lang and Hoy (2011) 指出，飼育環境可藉由多種方式進行豐富化 (Princz *et al.*, 2009)，諸如增設飼養籠中躲避及休息的地方，上升的平臺或不同高度的地板；放入豐富化的物品，如木桿、鏡子；提供粗料食品像乾草、乾草塊或咬棒。而以物品來創造豐富化環境，也證實可有效減少攻擊性行為及增進動物福祉 (Dolle Zotte *et al.*, 2009)。國內兔隻生產經常飼養於單調環境及個別籠飼系統，致兔缺乏互動而出現刻板行為。兔子行為之一般觀察可以自理、運動、探索、跳躍、飲食等做為觀察指標 (Ribikauskas *et al.*, 2011)，而健康狀態就以量測血液生理生化值當指標 (Yakubu *et al.*, 2008)。本研究旨在比較兔在一般商業飼養籠及豐富化飼籠 (enriched, EN) 飼養後，其生長性能、血液生理生化值及不同時段行為之差異。

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2640 號。  
(2) 行政院農業委員會畜產試驗所生理組。  
(3) 行政院農業委員會畜產試驗所產業組。  
(4) 行政院農業委員會畜產試驗所營養組。  
(5) 通訊作者，E-mail: pctsai@mail.tlri.gov.tw。

## 材料與方法

### I. 飼養管理

供試紐西蘭白兔係來自於行政院農業委員會畜產試驗所兔舍，飼養於半開放式兔舍，採自然光照，無空調控制溫濕度，籠架長 1.40 公尺，寬 0.43 公尺，高 0.41 公尺；飲水由自動給水裝置供應，飼料則每日餵飼採任飼。飼料配方如蔡等 (2016) 所示，兔之採食量則由供應量與剩料進行估算。兔籠籠底為網狀格，以利於飼養管理。根據前人研究指出以鐵網、塑膠、橡膠等不同的籠底材質，對紐西蘭白兔的生長性能沒有顯著的影響 (Trocino *et al.*, 2004; Princz *et al.*, 2008; Abdelfattah *et al.*, 2013)，本試驗中採用橡膠材質籠底 (圖 1)，雙層籠架亦以橡膠材質架設。

### II. 試驗設計

試驗以 4 週齡離乳紐西蘭白兔仔兔 12 隻，公母各半，同性別每 3 隻關一籠，再次分成兩種處理組，一為豐富化兔籠組 (EN 組)：內含 2 層籠架、 $\Gamma$ 型木塊 (arcade 17-2, TAPVEI, Estonia) 與磨牙棒 (growing sticks 798, 應億企業有限公司, 臺灣)，第二層籠架長 0.70 公尺，寬 0.43 公尺，將籠子隔出約上 0.20 公尺，下 0.21 公尺高度，故豐富化籠架會多出 0.30 平方公尺的底面積；另為商業飼養籠組 (UE 組)，籠內無 2 層籠架及其他特殊設施 (如圖 1，只有飲水器及飼料槽)。試驗採三重複進行，每次試驗重複為期 6 週，共使用 36 隻兔子。



圖 1. 豐富化兔籠 (左) 及商業飼養籠 (右) 配置圖。豐富化兔籠組有 2 層籠架及  $\Gamma$  型木塊與磨牙棒 (如白圈所示) 供玩耍及啃咬；商業飼養籠則無左圖 2 層籠架及其他的配備。

Fig. 1. Configuration of enriched cages (Left) and unenriched cages (Right). There are 2 layers of wire floors,  $\Gamma$  shaped woodblock and two wooden teething rusk sticks for playing and gnawing in enriched cages. There is no such facilities in the commercial cage.

### III. 行為觀察

兔的行為觀察為期 6 週，每週觀察 3 天。每天分成上午時段 (08 – 10)、中午時段 (12 – 14) 及下午時段 (16 – 18) 等三個時間點；前 10 分鐘觀察記錄採食、休息、飲水，後 10 分鐘觀察記錄包括社交、探索、跳躍及自理等行為表現。舉凡採食、休息、飲水、社交、探索、跳躍及自理 (如圖 2) 等，採用監視系統 (HB-DH4295-H, 輝光科技, 臺灣) 以錄影—放影方式記錄並用人工判別分析兔隻行為分類，並記錄兔隻行為頻度。頻度的計算是以欄為單位，算 1 欄中行為發生的比例，例如 1 欄有 3 隻兔子，10 分鐘內有 1 隻兔子在喝水，則此時段喝水頻度 (frequency) 紀錄為 0.33，2 隻喝水則為 0.67，3 隻都在喝水則為 1，依此類推。採食及飲水皆在觀察員確實看到咀嚼飼料及使用自動給水裝置才計數；休息則要完全躺臥 (圖 2) 才符合；社交要兩隻以上兔子產生互動才計數，而其餘探索、跳躍及自理行為態樣則參照圖 2。

### IV. 生長性能紀錄

自 4 週齡起，兔隻每週秤重為期 6 週，並記錄每欄飼料採食量，以計算增重及飼料效率。

### V. 血液與血清生理值與生化值分析

試驗結束採集所有兔子頸靜脈血液，委託祐健醫事檢驗所檢測全血血液生理值，包括白血球 (white blood cells, WBC)、紅血球 (red blood cells, RBC)、血紅素 (hemoglobin, Hgb)、血球容積比 (hematocrit, Hct)、平均紅血球容積 (mean corpuscular volume, MCV)、平均紅血球血紅素 (mean corpuscular hemoglobin, MCH)、平均紅血球血紅素濃度 (mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC) 及血小板 (platelets, PLT)。另進行血清生化值分析，包括葡萄糖 (glucose, Glu)、總蛋白 (total protein, TP)、白蛋白 (albumin, Alb)、球蛋白 (globulin)、血清尿素氮 (serum



urea nitrogen, SUN)、總膽固醇 (total cholesterol, TChol)、三酸甘油酯 (triglyceride, TG)、麩胺酸草醯乙酸轉胺酶 (glutamate oxaloacetate transaminase, GOT)、麩胺酸丙酮酸轉胺酶 (glutamate pyruvate transaminase, GPT)、鹼性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP)、麩胺醯轉胺酶 ( $\gamma$ -glutamyltransferase,  $\gamma$ -GT)、乳酸脫氫酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、肌酸激酶 (creatine phosphokinase, CPK) 等。



圖 2. 紐西蘭白兔行為分類定義包括：1. 採食、2. 飲水、3. 休息、4. 社交、5. 探索、6. 自理及 7. 跳躍。

Fig. 2. New Zealand rabbit behavior patterns, including: 1. Eating, 2. Drinking, 3. Resting, 4. Social activity, 5. Exploring, 6. Self-Grooming, and 7. Jumping.

## VI. 統計分析

每處理共進行三重複試驗，試驗結果以 SAS (2009) 套裝軟體 (SAS 9.3) 進行統計分析，使用一般線性模式程序 (general linear model procedure, GLM) 進行變方分析，再以最小平方平均法 (least square means, LSMEANS) 比較其差異。

## VII. 實驗動物核准編號

本研究涉及之動物試驗係於行政院農業委員會畜產試驗所執行，動物之使用、飼養及實驗內容皆依據行政院農業委員會畜產試驗所實驗動物照護及使用小組審查同意進行 (動物實驗申請表暨同意書編號：106-1)。

# 結 果

## I. 行為觀察

不同籠飼環境下三個時段的兔之行為表現觀察結果如表 1 到 3 所示。結果顯示 EN 組的公兔於上午 (8 – 10) 時段的休息行為表現頻度顯著高於 UE 組 ( $0.74 \pm 0.29$  vs.  $0.66 \pm 0.3$ ,  $P < 0.05$ )；而 UE 組的社交行為表現頻度 ( $0.12 \pm 0.07$  vs.  $0.07 \pm 0.19$ )、探索行為表現頻度 ( $0.43 \pm 0.35$  vs.  $0.32 \pm 0.33$ ) 及自理行為表現頻度 ( $0.48 \pm 0.31$  vs.  $0.38 \pm 0.31$ ) 均顯著高於 EN 組 ( $P < 0.05$ )。在中午 (12 – 14) 時段，EN 組公兔的跳躍行為顯著高於 UE 組 ( $0.02 \pm 0.08$  vs.  $0.00 \pm 0.00$ ,  $P < 0.05$ )。而在下午 (16 – 18) 時段，EN 組公兔的飲水行為表現頻度 ( $0.14 \pm 0.23$  vs.  $0.09 \pm 0.17$ ) 和跳躍行為表現頻度 ( $0.14 \pm 0.25$  vs.  $0.03 \pm 0.12$ ) 均顯著高於 UE 組 ( $P < 0.05$ )。

在母兔方面，不論是上午、中午或下午時段，EN 組的跳躍行為表現頻度均顯著高於 UE 組 ( $0.10 \pm 0.21$  vs.  $0.06 \pm 0.19$ ,  $0.01 \pm 0.07$  vs.  $0.00 \pm 0.02$ ,  $0.13 \pm 0.21$  vs.  $0.03 \pm 0.10$ ) ( $P < 0.05$ )。而其餘六種行為在各個觀察時段的表現頻

度則均無顯著差異。

結果顯示，除了 EN 組公兔的上午時段例外，EN 組的公母兔，在其他各個時段的跳躍行為表現頻度均顯著多於 UE 組 ( $P < 0.05$ )。另外上午時段公兔 EN 組休息頻度顯著高於 UE 組 ( $P < 0.05$ )，反之，公兔 UE 組的社交、探索及自理行為表現頻度則顯著高於 EN 組 ( $P < 0.05$ )。下午時段，EN 組公兔之飲水行為頻度表現顯著多於 UE 組 ( $P < 0.05$ )。在各個觀察時段，母兔只有跳躍行為在兩組間有顯著差別 ( $P < 0.05$ )，其餘之行為發生頻度並無顯著之差異。

表 1. 不同籠飼環境差異對不同性別兔上午之行為表現的影響

Table 1. Effects of different caged environments and sex on behavior patterns of rabbit in the morning

Time period	Behavior	Male		Female	
		EN	UE	EN	UE
08 – 10	Eating	0.12 ± 0.19	0.12 ± 0.19	0.10 ± 0.18	0.11 ± 0.18
	Drinking	0.05 ± 0.13	0.06 ± 0.13	0.05 ± 0.12	0.04 ± 0.12
	Resting	0.74 ± 0.29 <sup>a</sup>	0.66 ± 0.30 <sup>b</sup>	0.72 ± 0.29 <sup>a</sup>	0.72 ± 0.31 <sup>a</sup>
	Social activity	0.07 ± 0.19 <sup>b</sup>	0.12 ± 0.24 <sup>a</sup>	0.07 ± 0.19 <sup>b</sup>	0.08 ± 0.21 <sup>b</sup>
	Exploring	0.32 ± 0.33 <sup>b</sup>	0.43 ± 0.35 <sup>a</sup>	0.35 ± 0.33	0.38 ± 0.35
	Jumping	0.11 ± 0.22 <sup>a</sup>	0.07 ± 0.21 <sup>ab</sup>	0.10 ± 0.21 <sup>a</sup>	0.06 ± 0.19 <sup>b</sup>
	Self-rooming	0.38 ± 0.31 <sup>b</sup>	0.48 ± 0.31 <sup>a</sup>	0.46 ± 0.31 <sup>a</sup>	0.46 ± 0.33 <sup>a</sup>

<sup>a, b</sup> Means within the same row with different superscripts differ significantly ( $P < 0.05$ ).

EN: enriched cage, UE: unenriched cage.

Behavior was quantified by number. For example, there are three rabbits in one cage, if one rabbit drinks,  $1/3 = 0.33$  was recorded as drinking behavior frequency and so on.

表 2. 不同籠飼環境差異對不同性別兔中午時行為表現的影響

Table 2. Effects of different caged environments and sex on behavior patterns of rabbit at midday

Time period	Behavior	Male		Female	
		EN	UE	EN	UE
12 – 14	Eating	0.10 ± 0.17	0.11 ± 0.17	0.12 ± 0.18	0.11 ± 0.18
	Drinking	0.03 ± 0.10	0.04 ± 0.12	0.05 ± 0.12	0.03 ± 0.09
	Resting	0.93 ± 0.16	0.94 ± 0.16	0.97 ± 0.65	0.92 ± 0.17
	Social activity	0.02 ± 0.08	0.02 ± 0.09	0.01 ± 0.05	0.02 ± 0.09
	Exploring	0.12 ± 0.19	0.15 ± 0.22	0.13 ± 0.20	0.12 ± 0.19
	Jumping	0.02 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.01 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.02 <sup>b</sup>
	Self-rooming	0.20 ± 0.24	0.22 ± 0.24	0.21 ± 0.24	0.20 ± 0.22

<sup>a, b</sup> Means within the same row with different superscripts differ significantly ( $P < 0.05$ ).

EN: enriched cage, UE: unenriched cage.

Behavior was quantified by number. For example, there are three rabbits in one cage, if one rabbit drinks,  $1/3 = 0.33$  was recorded as drinking behavior frequency and so on.

表 3. 不同籠飼環境差異對不同性別兔黃昏時行為表現的影響

Table 3. Effects of different caged environments and sex on behavior patterns of rabbit at dusk

Time period	Behavior	Male		Female	
		EN	UE	EN	UE
16 – 18	Eating	0.27 ± 0.25	0.26 ± 0.26	0.29 ± 0.25	0.27 ± 0.24
	Drinking	0.14 ± 0.23 <sup>a</sup>	0.09 ± 0.17 <sup>b</sup>	0.13 ± 0.20 <sup>ab</sup>	0.13 ± 0.20 <sup>ab</sup>
	Resting	0.71 ± 0.30	0.68 ± 0.32	0.69 ± 0.29	0.68 ± 0.29
	Social activity	0.07 ± 0.17	0.10 ± 0.20	0.07 ± 0.18	0.08 ± 0.17
	Exploring	0.34 ± 0.33	0.37 ± 0.34	0.34 ± 0.32	0.37 ± 0.32
	Jumping	0.14 ± 0.25 <sup>a</sup>	0.03 ± 0.12 <sup>b</sup>	0.13 ± 0.21 <sup>a</sup>	0.03 ± 0.10 <sup>b</sup>
	Self-rooming	0.34 ± 0.32	0.38 ± 0.32	0.38 ± 0.29	0.39 ± 0.29

<sup>a, b</sup> Means within the same row with different superscripts differ ( $P < 0.05$ ).

EN: enriched cage, UE: unenriched cage. Behavior was quantified by number. For example, there are three rabbits in one cage, if one rabbit drinks,  $1/3 = 0.33$  was recorded as drinking behavior frequency and so on.

## II. 生長性能表現

不同籠飼環境下兔之生長性能表現如表 4 所示。結果顯示，不同的籠飼環境對 4 到 10 週齡的公兔之生長性能沒有明顯的影響。而 UE 組母兔的飼料效率，不論是 4－5、5－6 或 6－7 週齡時均顯著優於 EN 組 ( $P < 0.05$ )。然而，在大於 8 週齡後，兩組間的飼料效率就不再有顯著差別；且在試驗期間，不同籠飼環境下母兔其他的性能表現，不論是各週齡的體重、日增重、攝食量都無顯著差異。亦即，經過 6 週試驗結果顯示，豐富化飼養環境對兔的體重、平均日增重、平均飼料效率、攝食量等生長性能表現方面，與一般商業飼養環境相較並無顯著之差異。

表 4. 不同籠飼環境差異對不同性別兔生長性能的影響

Table 4. Effects of different caged environments and sex on growth performance of rabbit

Weeks of age	Male		Female	
	EN	UE	EN	UE
Feed intake, g/day				
4－5	81.3 ± 17.6	76.8 ± 16.1	106.4 ± 32.2	79.0 ± 22.5
5－6	94.6 ± 5.6	96.1 ± 10.1	113.0 ± 17.5	98.4 ± 17.8
6－7	112.4 ± 34.0	102.4 ± 15.2	111.2 ± 19.2	106.6 ± 31.8
7－8	112.4 ± 3.7	114.0 ± 2.7	113.2 ± 25.1	106.8 ± 8.5
8－9	123.2 ± 48.6	114.1 ± 13.6	119.5 ± 31.6	122.9 ± 23.2
9－10	107.1 ± 25.9	87.5 ± 26.0	101.4 ± 29.7	96.8 ± 18.8
Body weight, g				
4	734 ± 96	734 ± 94	725 ± 98	724 ± 99
5	1,022 ± 158	1,008 ± 178	1,034 ± 137	1,039 ± 162
6	1,328 ± 156	1,309 ± 169	1,307 ± 151	1,324 ± 201
7	1,577 ± 197	1,559 ± 207	1,529 ± 187	1,570 ± 256
8	1,769 ± 150	1,805 ± 198	1,800 ± 147	1,778 ± 236
9	2,030 ± 193	1,986 ± 230	1,918 ± 270	1,955 ± 222
10	2,153 ± 235	2,040 ± 316	2,036 ± 323	2,054 ± 271
Daily weight gain, g				
4－5	41.2 ± 10.1	39.1 ± 12.8	44.1 ± 7.5	44.9 ± 10.6
5－6	46.2 ± 7.2 <sup>a</sup>	43.0 ± 7.0 <sup>ab</sup>	39.1 ± 4.3	40.7 ± 6.0 <sup>ab</sup>
6－7	35.6 ± 6.9	35.7 ± 7.0	31.7 ± 6.4	35.3 ± 8.4
7－8	38.9 ± 8.5	35.1 ± 11.1	35.8 ± 10.6	35.1 ± 3.1
8－9	33.0 ± 10.7	27.6 ± 5.8	32.3 ± 7.4	28.8 ± 15.2
9－10	25.3 ± 10.0	23.5 ± 6.0	25.8 ± 8.8	23.9 ± 8.9
Avg.	36.7 ± 8.9	34.0 ± 8.3	34.8 ± 7.5	34.8 ± 8.7
Feed conversion rate, g/g				
4－5	2.01 ± 0.23 <sup>ab</sup>	2.09 ± 0.48 <sup>ab</sup>	2.48 ± 0.87	1.76 ± 0.16 <sup>b</sup>
5－6	2.07 ± 0.33 <sup>c</sup>	2.29 ± 0.40 <sup>bc</sup>	2.90 ± 0.37	2.42 ± 0.14 <sup>b</sup>
6－7	3.03 ± 0.46 <sup>b</sup>	2.94 ± 0.55 <sup>b</sup>	3.58 ± 0.67	3.01 ± 0.18 <sup>b</sup>
7－8	3.09 ± 1.16	3.61 ± 1.38	3.48 ± 1.07	3.03 ± 0.32
8－9	3.95 ± 0.82	4.19 ± 0.68	3.93 ± 1.28	4.49 ± 1.21
9－10	4.69 ± 1.43	4.93 ± 2.01	4.46 ± 1.52	4.81 ± 1.71
Avg.	3.14 ± 0.73	3.34 ± 0.92	3.47 ± 0.96	3.25 ± 0.62

<sup>a, b, c</sup> Means within the same row with different superscripts differ significantly ( $P < 0.05$ ).

EN: enriched cage, UE: unenriched cage.

## III. 血液生理值分析

飼養於不同籠飼環境下兔之血液生理值分析結果如表 5 所示。其中，僅 EN 組公兔之 Hgb ( $13.3 \pm 0.7$  gm% vs.  $11.8 \pm 1.7$  gm%) 與 Hct ( $44.1 \pm 1.6$  % vs.  $38.8 \pm 5.6$  %) 之測值均顯著高於 UE 組 ( $P < 0.05$ )。母兔之各種血液生理學量測值在各組間則沒有顯著的差異。推測其可能之原因，係 EN 組公兔表現有較多跳躍活動所導致的結果 (Harcourt-Brown, 2014)。



表 5. 不同籠飼環境差異對不同性別兔血液生理學的影響

Table 5. Effects of different caged environments and sex on rabbit hematology

Items	Male		Female	
	EN	UE	EN	UE
WBC, $\mu\text{L}$	8,046 $\pm$ 1,231	10,183 $\pm$ 1,995	9,512 $\pm$ 3,570	9,680 $\pm$ 3,533
RBC, M/ $\mu\text{L}$	6.45 $\pm$ 0.24	5.85 $\pm$ 1.00	5.91 $\pm$ 0.53	5.98 $\pm$ 0.53
Hgb, gm%	13.3 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	11.8 $\pm$ 1.7 <sup>b</sup>	12.3 $\pm$ 1.3 <sup>ab</sup>	12.5 $\pm$ 0.8 <sup>ab</sup>
Hct, %	44.1 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>	38.8 $\pm$ 5.6 <sup>b</sup>	40.7 $\pm$ 3.7 <sup>ab</sup>	42.0 $\pm$ 2.6 <sup>ab</sup>
MCV, fl	68.4 $\pm$ 2.8	66.7 $\pm$ 3.7	69.1 $\pm$ 4.7	70.4 $\pm$ 3.0
MCH, pg	20.5 $\pm$ 0.8	20.3 $\pm$ 1.0	20.7 $\pm$ 1.2	21.0 $\pm$ 0.8
MCHC, %	30.1 $\pm$ 1.1	30.4 $\pm$ 0.7	30.1 $\pm$ 0.8	29.9 $\pm$ 0.5
PLT, $\times 10^3/\mu\text{L}$	413 $\pm$ 102	461 $\pm$ 247	414 $\pm$ 240	340 $\pm$ 183

<sup>a, b</sup> Means within the same row with different superscripts differ significantly ( $P < 0.05$ ).

EN: enriched cage, UE: unenriched cage.

#### IV. 血清生化值分析

飼養於不同籠飼環境下兔之血清生化值分析結果如表 6 所示。其中 UE 組公兔血清中的 TG (232  $\pm$  144 mg/dL vs. 122  $\pm$  45 mg/dL) 顯著高於 EN 組 ( $P < 0.05$ )；而 EN 組公兔血清中的 GPT (49.1  $\pm$  14 U/L vs. 32.0  $\pm$  14.3 U/L) 與  $\gamma$ -GT (10.00  $\pm$  3.00 U/L vs. 6.22  $\pm$  2.49 U/L) 則均顯著高於 UE 組 ( $P < 0.05$ )。在母兔方面，EN 組與 UE 組間之各項血清生化值並無顯著的差異。在這項試驗分析中，UE 組公兔血清中的 TG 高於 EN 組，可能是 UE 組的活動力較 EN 組低，導致血脂代謝較慢 (Harcourt-Brown, 2014)。另外，GPT 及  $\gamma$ -GT 數值雖然通常被視為肝損傷的指標 (Harcourt-Brown, 2014)，然而，在激烈運動後也會造成血液 GPT 數值上升 (Mashiko *et al.* 2004)，故在 EN 組公兔 GPT 值高於 UE 組的情形，亦可能與 EN 組公兔的活動力頻度表現較高有關。然  $\gamma$ -GT 數值雖在正常範圍內，但在 EN 組公兔顯著高於 UE 組的原因則未明。

表 6. 不同籠飼環境差異對不同性別兔血清生化值的影響

Table 6. Effects of different caged environments and sex on rabbit hematochemistry

Items	Male		Female	
	EN	UE	EN	UE
Glu, mg/dL	137 $\pm$ 12	129 $\pm$ 6	134 $\pm$ 15	134 $\pm$ 7
TP, g/dL	5.64 $\pm$ 0.56	5.06 $\pm$ 0.99	5.14 $\pm$ 0.64	5.50 $\pm$ 0.66
Alb, g/dL	4.53 $\pm$ 0.55	3.76 $\pm$ 1.11	3.97 $\pm$ 0.76	4.29 $\pm$ 0.74
Globulin, g/dL	1.11 $\pm$ 0.16	1.30 $\pm$ 0.41	1.18 $\pm$ 0.22	1.21 $\pm$ 0.48
Alb/Globulin	3.82 $\pm$ 1.23	3.23 $\pm$ 1.61	3.50 $\pm$ 0.96	4.04 $\pm$ 1.60
SUN, mg/dL	13.7 $\pm$ 1.5	16.0 $\pm$ 5.1	15.9 $\pm$ 5.2	16.3 $\pm$ 5.3
TChol, mg/dL	66.8 $\pm$ 16.8	82.8 $\pm$ 17.9	74.3 $\pm$ 22.3	88.2 $\pm$ 41.5
TG, mg/dL	122 $\pm$ 45 <sup>b</sup>	232 $\pm$ 144 <sup>a</sup>	127 $\pm$ 49 <sup>b</sup>	153 $\pm$ 121 <sup>ab</sup>
GOT, U/L	20.9 $\pm$ 7.4	16.1 $\pm$ 2.8	18.4 $\pm$ 5.5	16.3 $\pm$ 2.7
GPT, U/L	49.1 $\pm$ 14.0 <sup>a</sup>	32.0 $\pm$ 14.3 <sup>b</sup>	45.7 $\pm$ 20.4 <sup>ab</sup>	40.8 $\pm$ 11.0 <sup>ab</sup>
ALP, IU/L	202 $\pm$ 46	127 $\pm$ 61	145 $\pm$ 74	207 $\pm$ 122
$\gamma$ -GT, U/L	10.00 $\pm$ 3.00 <sup>a</sup>	6.22 $\pm$ 2.49 <sup>b</sup>	7.00 $\pm$ 2.35 <sup>b</sup>	8.33 $\pm$ 3.28 <sup>ab</sup>
LDH, U/L	174 $\pm$ 82	153 $\pm$ 47	168 $\pm$ 33	140 $\pm$ 46
CPK, U/L	1,230 $\pm$ 758	844 $\pm$ 298	939 $\pm$ 217	853 $\pm$ 280

<sup>a, b</sup> Means within the same row with different superscripts differ significantly ( $P < 0.05$ ).

EN: enriched cage, UE: unenriched cage.

## 討 論

4 週齡離乳紐西蘭白兔仔兔在 EN 與 UE 之環境下飼養 6 週之試驗結果，顯示在豐富度有差異的飼養環境下，不同時段的行為表現有所差異。不論公母兔的跳躍的行為在 EN 均多於 UE；母兔其他行為並無顯著差異，但在公兔，則顯現出飼養環境豐富化程度不同對於各個時段之跳躍、休息、社交、探索、飲水及自理等行為發生的影響，如上午時段 EN 公兔休息頻度較 UE 高，可能是跳躍活動較多也增加休息的頻率，而同個時段，令人意外地 UE 的社交、探索及自理頻度高於 EN，可能因該時段 EN 公兔跳躍與休息行為頻度增加，減少其他行為的頻度，且 UE 少了一層籠架，地板空間較少，故兔子互相接觸即社交行為相對增加。

儘管兔子是典型的實驗動物，但該物種的時間生物學研究仍處於起步階段。依照本試驗的觀察結果，供試之紐西蘭白兔活動頻度最高的時段是在黃昏 (16 – 18)。Jilge (1991) 指出在未隔音的動物房中，家畜於外部噪音升高時，他們的運動能力、糞便排泄、食物及水分攝入均表現出升高現象。當外部嘈雜聲的小時數與光照時間相吻合 (均為 12 小時) 時，53.3% 兔子行為表現出主要的晝夜規律，20.0% 兔子則無光亮或黑暗時間之差異，而 26.7% 兔子通常具有夜間行為。相反地，在適當隔音的實驗室晝夜光照條件設定為 12:12 時，兔之活動在黑暗期中之運動能力、硬糞便排泄、攝食物、飲水和排尿顯著比未隔音者更高。然而，當進食時間發生在光照時間中時 (如 12 小時中的 4 個小時)，這五種行為出現大多數都集中在有餵食的時間，故試驗兔隻活動的時間幾乎完全是在白天 (Jilge, 1991)。因此，雖然兔的內源性本質是夜間活動的動物 (Kenndy and Hudson, 2016)，但在光照期間外來噪音或定期進食可以使兔子轉變成以日間活動為主 (Jilge, 1991)；此與本所飼養兔隻之環境未隔音且白天餵飼情況相似。由此可知，本試驗在白天觀察的三個時段已符合兔隻行為觀測的代表性。

不同形式的兔籠對於公兔的整體生長性能表現，包括攝食量、日增重、飼料效率與體重均沒有顯著的影響。飼養於商業飼養籠組的母兔之飼料效率雖然在剛開始的 4 – 5 週、5 – 6 週及 6 – 7 週均顯著優於豐富化兔籠組，不過到了 7 – 8 週後兩組不論公母都無顯著差異。

不同形式的兔籠僅對公兔的血液生理學及血液生化學數值表現有所影響，經過豐富化籠飼 6 週的公兔，血液中的 Hgb、Hct、GPT 值顯著高於商業飼養籠組 (兩組均在正常範圍內)。一般在營養條件無差別的狀態下，Hgb、Hct 的上升，經常被解讀為有脫水的情形造成，惟此豐富化環境下的公兔飲水及跳躍的頻率大多都高於商業飼養籠組或無差別，爰可排除脫水因素，又運動鍛鍊可以刺激 GPT 值上升 (Mashiko *et al.*, 2004)，故似可將 Hgb、Hct 及 GPT 在豐富化飼籠組上升歸因於公兔活動力 (跳躍行為) 增加。另外商業飼養籠組的公兔血液 TG 值顯著高於豐富化兔籠組，此似乎亦因為商業飼籠組的公兔運動量較少所致，因運動量增加可以加速血脂的代謝而降低 TG (Harcourt-Brown, 2014)。豐富化兔籠組之  $\gamma$ -Gt 測值較高，但仍落在正常的生理數值範圍內，其致使之原因目前未明。

若以病理學的角度探討，鄭 (1992) 研究指出若兔隻感染球蟲時，血中 TG 濃度在第 9 天會上升，一直到第 40 天都持續維持高值 (因膽管遭到寄生蟲破壞)，同時，血中 TChol、GPT、GOT 及 TP 數值也是持續維持高數值，且血中 Glu 及 Alb 會驟降。但本試驗公兔中只有 GPT 在豐富化兔籠組顯著比商業飼養籠組高 (兩組均在正常範圍內) 而 TG 反而是商用飼籠組顯著高於豐富化兔籠組，而血中 TChol、GOT、TP、Glu 與白蛋白之數值兩組無顯著差異，與該文獻研究結果不相符合，故可以排除球蟲感染的干擾因子。

## 結 論

本研究結果顯示，EN 的配置對於公兔及母兔的影響顯示出不同的態樣，這些數值可以讓國內飼養業者及兔隻試驗使用者當作參考，期能藉由豐富化的配置來提升兔子的飼養環境及動物福祉，讓兔子在減少緊迫的環境下使其充分顯現出品種特性及正常行為表現，確保兔隻試驗準確及可信度。

## 誌 謝

試驗期間承本組兔舍柯瑋玲小姐協助試驗資料整理，另陳念琪小姐與謝火塗先生協助飼養管理，特此誌謝。

## 參考文獻

- 蔡銘洋、柯瑋玲、謝昭賢、吳錫勳。2016。建立最少疾病兔生產供應之研究。畜產研究 49：35-41。
- 鄭漢文。1992。試驗感染 Eimeristidae 兔隻之血液化學成分之變化。碩士論文。國立中興大學。
- Abdelfattah, E., M. Karousa, E. Mahmoud, S. EL-Laithy, G. El-Gendi and N. Eissa. 2013. Effect of cage floor type on behavior and performance of growing rabbits. J. Vet. Adv. 3: 34-42.
- Dolle Zotte, A., Z. Princz, Sz. Metzger, A. Szabó, L. Radai, E. Nemeth, Z. Orova and Z. Szendrő. 2009. Response of fattening rabbits reared under different housing conditions. 2. Carcass and meat quality. Livest. Sci. 122: 39-47.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2005. The impact of the current housing and husbandary systems on the health and welfare of farmed domestic rabbits. EFSA Journal 267: 137.
- Harcourt-Brown, F. (Ed.) 2014. Textbook of rabbit medicine. 2<sup>nd</sup> ed. Butterworth-Heinemann. Alden Press. Oxford.
- Jilge, B. 1991. The rabbit: a diurnal or a nocturnal animal. J. Exp. Anim Sci. 34: 170-183.
- Kennedy, G. A. and R. Hudson. 2016. Phase response curve to 1 h light pulses for the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). Chronobiol Int. 33: 1120-1128.
- Lang, C. and S. Hoy. 2011. Investigations on the use of an elevated platform in group caged by growing rabbits. World Rabbit Sci. 19: 95-101.
- Mashiko, T., T. Umeda, S. Nakaji and K. Sugawara. 2004. Effect of exercise on the physical condition of college rugby players during summer training camp. Br. J. Sport Med. 38: 186-190.
- Morisse, J. P., E. Boilletot and A. Martrenchar. 1999. Preference testing in intensively kept meat production rabbits for straw on wire grid floor. Appl. Anim. Behav. Sci. 64: 71-80.
- Princz, Z., A. Dalle Zotte, I. Radnai, E. Biró-Németh, Z. Matics, Z. Gerencser, I. Nagy and Z. Szendrő. 2008. Behaviour of growing rabbits under various housing condition. Appl. Anim. Behav. Sci. 111: 342-356.
- Princz, Z., A. Dalle Zotte, Sz. Metzger, I. Radnai, E. Biró-Németh, Z. Orova and Z. Szendrő. 2009. Response of fattening rabbits reared under different housing conditions. Live performance and health status. Livest. Sci. 121: 86-91.
- Ribikauskas, V., D. Ribikauskienė and I. Skurdenienė. 2010. Effect of housing system (wire cage versus group housing) and in-house air quality parameters on the behaviour of fattening rabbits. World Rabbit Sci. 18: 243-250.
- SAS. 2009. SAS User's guide: Statistics. SAS Inst., Cary, NC. USA.
- Trocino, A., G. Xiccato, P. I. Queaque and A. Sartori. 2004. Group housing of growing rabbits: effect of stocking density and cage floor on performance, welfare and meat quality. Proceedings of the VIII World Rabbit Congress in Plebla, Mexico, 2004. pp. 1277-1282.
- Verga, M., F. Luzi and C. Carenzi. 2007. Effects of husbandry systems on physiology and behaviour of farmed and laboratory rabbits. Horm. Behav. 52: 122-129.
- Verga, M., F. Luzi and Z. Szendrő. 2006. Behaviour of growing rabbits. In: Recent Advances in Rabbit Sciences. eds. Maertens, L. and Coudert, P. ILVO. Melle. pp. 91-97.
- Yakubu, A., M. M. Adua and H. Adamude. 2008. Welfare and haematological indices of weaner rabbits as affected by stocking density. IX World Rabbit Congress in Verona, Italy, 2008. pp. 1269-1274.

# The effect of environmental enrichment on the growth, health and behavior in New Zealand rabbits <sup>(1)</sup>

Pei-Chun Tsai <sup>(2)(5)</sup> Ming-Yang Tsai <sup>(3)</sup> Heng-Fu Lee <sup>(4)</sup> and Lih-Ren Chen <sup>(2)</sup>

Received: Jan. 8, 2020; Accepted: Jun. 9, 2020

## Abstract

The study aims to establish data related to the friendly feeding environment and relieve stress on animals during the experiment, thereby to assure reliable animal test results. The study was conducted on 36 rabbits aged 4 weeks (half of which was male and the other half female), raised in enriched cages (EU) and un-enriched cages (UE) for 6 weeks to investigate the influence of rabbit growth, health and behavior in different feeding environments. The results showed that in spite of the significantly better feeding efficiency of the UE female rabbit group than the EN rabbit group between 4 – 5 week, 5 – 6 week and 6 – 7 week at the beginning, there was no significant difference between the two groups, regardless of male or female, after 7 – 8 week. The analysis of hematology assay indicated that the volumes of hemoglobin (Hgb) and hemotocrit (Hct) in male EN rabbits are significantly higher than those of UE group ( $P < 0.05$ ). In serum biochemistry assay, the levels of triglyceride (TG) are significant higher in male UE rabbits than that of EN group ( $P < 0.05$ ), but the levels of GOT and r-GT are significant higher in EN group than in UE group ( $P < 0.05$ ). For the results of behavior assay, more male rabbits rested in EN group than in UE group in the morning ( $P < 0.05$ ); however, the behaviors of social activity, exploration and self-grooming in UE male rabbits were more significant than those in EN group ( $P < 0.05$ ). More male rabbits were hopping in the EN group than in the UE group at noontime and in the afternoon ( $P < 0.05$ ); In addition, rabbits in EN group consumed more water than those in UE group in the afternoon ( $P < 0.05$ ). Female rabbits showed consistent behavior in different time periods, however, more female rabbits were in EN group were hopping more than the ones in UE group ( $P < 0.05$ ) at all time. In conclusion, enriched cage environment has more influence on the physiological values of blood and hopping behavior but not on the growth of rabbits.

Key words: Behavior, Enrichment, New Zealand rabbit.

---

(1) Contribution No. 2640 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Physiology Division, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(3) Animal Industry Division, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(4) Nutrition Division, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(5) Corresponding author, E-mail: pctsai@mail.tlri.gov.tw.



# 三段式處理對不同濃度養豬廢水之處理效果<sup>(1)</sup>

蘇天明<sup>(2)(4)</sup> 鍾承訓<sup>(2)</sup> 蕭庭訓<sup>(2)</sup> 程梅萍<sup>(3)</sup>

收件日期：109 年 1 月 20 日；接受日期：109 年 6 月 9 日

## 摘 要

養豬場沖洗水用量愈少，廢水量相對減少，但廢水中污染物的濃度將隨之提高。為降低養豬場廢水量，本試驗旨在探討不同濃度之養豬廢水經過三段式處理後，對各處理階段水質之影響。試驗期間共使用平均體重 52.9 – 112 kg 的 LD (藍瑞斯 ♀ × 杜洛克 ♂) 閹公豬 20 頭，飼養於代謝架上任飼，每日收集個別豬隻糞便及尿液分別秤重後混合，依重量比調製糞尿：水 = 1 : 1 (A 組)、1 : 2.5 (B 組) 及 1 : 5 (C 組) 等 3 種不同濃度廢水後，以三段式處理系統模槽進行約 11.5 日處理，調查各處理階段水質變化。結果 A、B 及 C 三組經固液分離後廢水的化學需氧量 (chemical oxygen demand, COD) 分別為 12,360、7,080 及 4,770 mg/L，經厭氧再經曝氣處理後則為 1,810、728 及 358 mg/L；三組廢水經固液分離後廢水的生化需氧量 (biochemical oxygen demand, BOD) 分別為 3,130、2,050 及 1,290 mg/L，經厭氧再經曝氣處理後則為 357、114 及 55 mg/L，A 組和 B 組的 COD 和 BOD 濃度未能符合養豬廢水放流水標準，顯示處理較高濃度的廢水須有較長的水力停留時間。因此，後續將探討延長厭氧及好氣處理階段的水力停留時間對水質淨化效果。

關鍵詞：生長肥育豬、三段式處理系統、廢水濃度、水質。

## 緒 言

臺灣地區河川坡陡流急，水資源蓄存不易。經濟部水利署 (2019a) 指出，臺灣地區從民國 38 年到 106 年期間的年平均降雨量為 2,511 毫米，而民國 106 年的年降雨量雖達 936 億立方公尺，但年入海水量為 619 億立方公尺，約 66% 雨水入海。經濟部水利署 (2019b) 水資源供需統計表登載，臺灣地區 106 年農業用水量約 118 億立方公尺，占年總用水量 70% 以上，而畜牧業年總用水量為 6,596 萬立方公尺，分別約占年總用水量及農業用水量的 0.07% 及 0.56%。由於水資源蓄存利用不易，且隨著氣候變遷、極端氣候的影響下，水資源欠缺問題更將日趨嚴重。另依據行政院環境保護署 (2018) 修正發布的事業及污水下水道系統水污染防治費收費辦法規定，畜牧業放流水已從民國 106 年開始依照放流量及其水質徵收水污染防治費，豬隻節水飼養刻不容緩。

臺灣省畜產試驗所 (1993) 以體重 100 kg 的肉豬為一個動物單位 (animal unit, AU)，每日糞 (1.7 kg)、尿 (3.3 L) 排泄量合計 5 kg/AU、豬舍沖洗水則以糞尿排泄量 5 倍估算，獲得每頭每日的廢水產生量為 30 L，作為規劃實地面豬場三段式廢水處理設施的設計參數；估計原廢水在固液分離階段可以去除 0.1 kg/day/AU (含水率 65%) – 0.2 kg/day/AU (含水率 85%) 的固形物，廢水經固液分離後的生化需氧量 (BOD) 和懸浮固體 (suspended solids, SS) 濃度分別低於 5,000 與 4,700 mg/L，經厭氧處理後分別低於 800 與 700 mg/L，再經好氣處理後可符合 BOD 80 mg/L 與 SS 150 mg/L 之放流水標準 (行政院環境保護署，2019)。夏 (2001) 指出，以飼養 100 頭母豬規模的一貫作業豬場 (在養頭數約 1,000 頭) 而言，實地面豬舍每日需用水量約 189 m<sup>3</sup>，條狀地面用水量則約需 113 m<sup>3</sup>，條狀地面每日需用水量約為實地面豬舍的 60%。實地面結構的豬舍，豬隻糞、尿皆存積在床面上，為了維持豬舍清潔通常會每日清洗，而條狀地面豬舍 (泛指能使豬糞、尿下掉到糞尿溝機會的地面結構) 由於部分糞、尿已下掉到糞尿溝，將可減少清洗頻率，如果再利用處理後之回收水沖洗糞尿溝，更能大幅減少用水量。蘇等 (2016, 2018) 將肉豬飼養於實地

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2641 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所經營組。

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所主任秘書室。

(4) 通訊作者，E-mail: tmsu@mail.tlri.gov.tw。



面 (SOF 組)、部分條狀地面 (PSF 組) 或全條狀地面 (TSF 組) 等 3 種地面結構豬欄，結果地面結構對生長肥育期豬隻的採食量和飼料效率皆無顯著影響。在熱季 (蘇等, 2016) 生長期豬隻 PSF 及 TSF 組沖洗水量分別為 SOF 組的 84.1% 及 42.8%，廢水量則為 SOF 組的 85.0% 及 48.5%。肥育期 PSF 及 TSF 組沖洗水量分別為 SOF 組的 74.3% 及 35.1%，廢水量則為 SOF 組的 64.8% 及 37.7%。蘇等 (2018) 在涼季於相同豬舍進行的研究，也得到一致的結果。顯示在豬舍設置部分條狀地面或全條狀地面，可有效節省豬舍的沖洗水量及減少廢水產量，但廢水的化學需氧量 (COD)、BOD 和 SS 濃度也會因而提高。

在水資源欠缺及水污染防治費徵收等多項因素驅使下，節水養豬是產業永續經營必走的路徑。養豬用水減量後，廢水濃度勢必提高，宜探討依照目前的三段式處理模式及水力停留時間來處理高濃度廢水，可否符合法令規範及可行的因應方式，以供業者參酌應用。因此，本試驗參考蘇等 (2016, 2018) 試驗結果，模擬豬隻飼養在實地面 (SOF 組)、部分條狀地面 (PSF 組) 及全條狀地面 (TSF 組) 之糞尿與豬舍沖洗水量比例調製三種濃度原廢水，應用三段式處理模槽，探討各階段處理之水質變化。

## 材料與方法

### I. 試驗動物飼養

在 2015 年 5 月至 9 月期間，使用平均體重 52.9 kg 的 LD (Landrace ♀ × Duroc ♂) 肉豬共 20 頭，分批飼養於代謝架上，在豬隻平均體重 112 kg 時下代謝架。每日餵飼飼糧 (表 1) 2 次，以隔餐飼料槽中無剩餘料為度，飲用水充分供應。試驗動物飼養於行政院農業委員會畜產試驗所經營組豬場內，動物之使用、飼養及實驗內容，經「行政院農業委員會畜產試驗所實驗動物照護及使用小組」審查同意。

表 1. 試驗飼糧組成

Table 1. The compositions of experimental diet

Items	% (dry matter basis)
<b>Ingredients</b>	
Corn meal, CP 7.8%	73.32
Soybean meal, CP 43.8%	19.00
Molasses	2.00
Wheat bran	3.00
Limestone, pulverized	1.00
Dicalcium phosphate	1.00
Choline chloride, 50%	0.08
Salt	0.40
Vitamin premix <sup>1</sup>	0.10
Mineral premix <sup>2</sup>	0.10
Total	100.00
<b>Calculated value</b>	
Digestible energy, kcal/kg	3,369
<b>Analyzed (n = 4)</b>	
Crude protein, %	15.50
Cu, mg/kg	11.7
Zn, mg/kg	88.6

<sup>1</sup> Vitamin premix provided per kilogram of diet as following: Vitamin A, 6000 IU; Vitamin D<sub>3</sub>, 800 IU; Vitamin B<sub>12</sub>, 0.02 mg; Vitamin E, 20 IU; Vitamin K<sub>3</sub>, 4 mg; Riboflavin, 4 mg; Pantothenic acid, 16 mg; Niacin, 30 mg; Pyridoxine, 1 mg; Folic acid, 0.5 mg; and Biotin, 0.1 mg.

<sup>2</sup> Mineral premix provided per kilogram of diet as following: Fe (FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O), 140 mg; Cu (CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O), 7 mg; Mn (MnSO<sub>4</sub>), 20 mg; Zn (ZnO), 70 mg; and I (KI), 0.45 mg.

## II. 糞尿收集及處理

試驗期間每日收集個別豬隻糞便及尿液，分別秤重後混合，以人工攪拌均勻後，依重量比分別以 1:1 (A 組)、1:2.5 (B 組) 及 1:5 (C 組)，加入平日供應沖洗豬舍的農塘水，模擬豬隻飼養在全條狀地面 (TSF 組)、部分條狀地面 (PSF 組) 及實地面 (SOF 組) 之糞尿量與農塘水量比例，調製 3 種不同濃度廢水之後，進行三段式廢水處理流程 (圖 1)，每處理 2 重複。



圖 1. 廢水處理流程。A：糞尿收集；B：固液分離；C：厭氧處理；D：好氣處理。

Fig. 1. The wastewater treatment process. A: Manure collection; B: Solid-liquid separation; C: Anaerobic treatment; D: Aerobic treatment.

## III. 廢水處理流程

- (i) 調製後的廢水以間隙 0.20 mm 之不銹鋼材質分離桶進行固液分離。
- (ii) 收集固液分離後之處理水注入三槽式厭氧發酵模槽 (槽體容積：長 × 寬 × 深 = 200 cm × 30 cm × 40 cm；有效容積：長 × 寬 × 深 = 196.5 cm × 29.0 cm × 35.5 cm  $\approx$  202 L)，每槽注入 20 L/day，水力停留時間 (hydraulic retention time, HRT) 約 10 天。
- (iii) 收集厭氧處理後之處理水，以蠕動馬達輔以定時器 (每 4 小時進水 3 L；進水 3 小時停 1 小時、進水量約 1 L/hr)，注入以曝氣器輔以曝氣條通入空氣之曝氣槽 (槽體容積：長 × 寬 × 深 = 30 cm × 30 cm × 40 cm；有效容積：長 × 寬 × 深 = 28 cm × 28 cm × 35 cm  $\approx$  27.4 L)，HRT 約 1.5 日。

## IV. 調查與分析項目

- (i) 豬隻上代謝架及下架時分別磅重，記錄每日採食量，計算在代謝架上期間之生長性能。
- (ii) 每日收集豬隻糞便及尿液，每週採集糞便 1 次，分析銅 (copper, Cu) 及鋅 (zinc, Zn) 濃度。測定固液分離後固形物的含水率並秤重。
- (iii) 系統穩定後，每 2 週分析各處理組固液分離後、厭氧處理後和好氣處理後水質中 COD、BOD、SS、總氮 (total nitrogen, TN)、總磷 (total phosphorus, TP)、Cu 及 Zn 濃度 1 次。

## V. 分析分法

- (i) 水質 pH 值及電導度測定：分別依照行政院環境保護署公告之 NIEA W424.53A (2019) 及 NIEA W203.51B (2001) 方法進行分析。
- (ii) 水質 COD、BOD 及 SS 濃度測定：分別依照行政院環境保護署公告之 NIEA W515.54A (2007)、NIEA W510.55B

(2011) 及 NIEA W210.57A (2006c) 方法進行分析。

(iii) 水質總氮濃度

1. 水中凱氏氮、氨氮、硝酸鹽氮及亞硝酸鹽氮之測定，分別參照行政院環境保護署環境檢驗所 NIEA W451.51A (2006a)、NIEA W448.51B (2005a)、NIEA W419.51A (2006b) 及 NIEA W418.53C (2015) 方法分析之。

2. 總氮：參照行政院環境保護署環境檢驗所 NIEA W423.52C (2004) 方法計算之。水中總氮濃度 = 水中硝酸鹽氮濃度 + 水中亞硝酸鹽氮濃度 + 水中凱氏氮濃度。

(iv) 水質總磷濃度：依照行政院環境保護署公告之 NIEA W444.51C (2005b) 方法分析之。

(v) 尿液及水質 Cu 及 Zn 濃度分析：將樣品定量 50 mL 後加入 3 N 的鹽酸 10 mL，以錶玻璃覆蓋置 350°C 電熱板進行酸解，再經過濾及定量後，以原子吸收光譜儀測定之。

(vi) 糞便 Cu 及 Zn 濃度分析：樣品經水分測定後，取樣放入灰化爐 (NEYTECH-2-525)，在 550 – 650°C 溫度下灰化約 6 小時。樣品灰化、冷卻後，加入 3 N 的鹽酸 10 mL，以錶玻璃覆蓋置 350°C 電熱板進行酸解、過濾並定量後，以原子吸收光譜儀 (Atomic absorption spectrometer Z8100, Hitachi) 測定之。

## VI. 統計分析

試驗豬隻生長性能及糞尿排泄量平均值及標準偏差以 Excel 2007 計算。其他分析資料利用 SAS 統計分析套裝軟體的一般線性模式程序 (general linear model procedure) 進行變方分析 (SAS, 2002)，再以特奇公正顯著差異測驗法 (Tukey's honest significant difference, HSD)，檢定各處理組間的差異顯著性 ( $\alpha = 0.05$ )。

## 結果與討論

### I. 豬隻生長性能及糞尿排泄量

試驗期間 (2015 年 5 – 9 月) 共使用平均體重 52.9 kg 的豬隻 20 頭，分批飼養於代謝架上，上架期間平均約 70 日，在平均體重 112 kg 時下架，期間的平均日增重、採食量及飼料效率 (增重 / 採食量) 分別為 0.85 kg/d、2.38 kg/d 及 0.36 (表 2)。蘇等 (2016) 在熱季 (6 – 9 月) 使用平均體重 48.3 kg 的 LD 肉豬飼養至平均體重 115 kg，結果各處理組的平均日增重、採食量與飼料效率分別為 0.70 – 0.77 kg/d、2.28 – 2.49 kg/d 與 0.31 – 0.32。蘇等 (2012a) 在熱季 (5 – 8 月) 使用平均體重 30 kg 的 LYD 肉豬飼養至平均體重 110 kg，結果各處理組的日增重、採食量及飼料效率分別為 0.78 – 0.81 kg/d、2.33 – 2.69 kg/d 及 0.30 – 0.34。本試驗獲致之生長性能結果與蘇等 (2016) 及蘇等 (2012a) 皆相近。

表 2. 試驗豬隻生長性能及糞尿排泄量 (n = 20)

Table 2. The growth performance and manure excretion of experimental pigs

Items	Mean	SD	Range
Initial body weight, kg	52.9	7.8	43.2 – 74.3
Final body weight, kg	112	11	101 – 135
Test days, day	69	10	57 – 87
Gain, kg/day	0.85	0.07	0.75 – 0.98
Intake, kg/day	2.38	0.13	2.03 – 2.58
Feed efficiency, gain/intake	0.36	0.02	0.34 – 0.39
Fecal volume, kg/day	0.79	0.14	0.61 – 1.18
Moisture content, %	65.3	4.4	55.2 – 73.2
Cu <sup>1</sup> , mg/kg	101	8	828 – 116
Zn <sup>1</sup> , mg/kg	825	58	704 – 914
Urine volume, kg/day	4.20	0.63	3.16 – 5.29
Cu, mg/kg	0.74	0.46	0.26 – 2.11
Zn, mg/kg	5.41	2.37	2.53 – 13.09

<sup>1</sup> dry matter basis.



本試驗主要是要獲取足夠的豬隻糞尿以進行廢水處理實驗，豬隻飼養頭數及糞尿排泄量係參考蘇等 (2009) 估計。蘇等 (2009) 指出，體重 50 及 100 kg 的豬隻糞便排泄量與含水率分別為 816 及 980 g/d 與 76.6 及 67.7%，尿液量則為 3,390 及 3,960 g/d，而本試驗豬隻糞便、尿液平均排泄量及糞便含水率分別為 0.79、4.20 kg/d 及 65.3%，除了豬隻適應階段 (上架後約 7 天) 外，皆足供調製試驗所需之廢水使用。

糞便 (乾基) 的 Cu 與 Zn 濃度分別為 101 與 825 mg/kg，而尿液則僅 0.74 與 5.41 mg/kg，顯示飼糧中未被豬隻利用的 Cu 和 Zn 主要係由糞便排出 (蘇等, 2012b; Underwood, 1977)。本試驗飼糧 (乾基) Cu 和 Zn 含量分別為 11.7 和 109 mg/kg (表 1)，而糞便 Cu 與 Zn 含量則為 101 與 825 mg/kg，分別為飼糧的 8.66 倍和 7.60 倍。蘇等 (2012b) 使用 4 種不同 Cu 及 Zn 含量或型式 (硫酸鹽型式與蛋白質螯合型式) 的飼糧餵飼生長肥育期豬隻，結果糞便 Cu 及 Zn 的含量隨著飼糧的 Cu 及 Zn 添加量增加而顯著提高，而硫酸鹽型式與蛋白質螯合型式的 Cu 及 Zn 添加量相同時，糞便的 Cu 及 Zn 含量無顯著差異。

## II. 不同濃度廢水各處理階段水質變化

本試驗係使用平常供應沖洗豬舍的農塘水來調製試驗用廢水，在試驗期間農塘水的 COD、BOD、SS、TN、TP、Cu 和 Zn 濃度，以及 pH 值和 EC 分別為 32 mg/L、8 mg/L、4 mg/L、0.84 mg/L、1.42 mg/L、0.01 mg/L 和 4 mg/L，以及 7.43 與 0.11 mS/cm。A 組 (糞尿：農塘水 = 1：1)、B 組 (糞尿：農塘水 = 1：2.5) 和 C 組 (糞尿：農塘水 = 1：5) 調製完成的廢水，固液分離的固形物以 A 組顯著較 B 組及 C 組為多，B 組固形物的分離量也較 C 組為多 ( $P < 0.05$ )，而各組固形物的含水率相近 (表 3)。

經固液分離後，各組廢水的 pH 值皆在 8.5 以上，A 組的 COD、BOD 與 SS 濃度及 EC 皆顯著較 B 組及 C 組為高，而 B 組也較 C 組為高 ( $P < 0.05$ )，銅和鋅濃度則以 A 組顯著較 C 組為高 (表 3)。廢水再經約 10 天的厭氧處理後，各組廢水的 pH 值降到約 7.7，A 組的 EC 顯著較 B 組和 C 組為高，Cu 和 Zn 濃度也較 B 組和 C 組為高 ( $P < 0.05$ )。A 組水質的 BOD 和 SS 濃度分別為 960 mg/L 和 910 mg/L，明顯較臺灣省畜產試驗所 (1993) 預期之水質 BOD 和 SS 濃度分別低於 800 mg/L 和 700 mg/L 為高。再經過 1.5 天的好氣處理後，pH 值皆在 8.0 以上，A 組的 EC 顯著較 B 組和 C 組為高。A 組的 COD、BOD 和 SS 濃度，以及 B 組的 COD 和 BOD 濃度皆高於現行放流水標準 (行政院環境保護署, 2019)。因此，高濃度廢水可能必須延長厭氧及好氣處理的水力停留時間，以符合法令規範。

經過三段式處理後，A 組的 TN 濃度顯著高於 B 組和 C 組 (表 3)，而各組間總磷濃度皆相近。蔡及周 (2005) 研究指出，養豬廢水經三段式處理後的放流水含有 227 – 254 mg/L 的總氮和 25 – 29 mg/L 的磷酸態磷，曾等 (2003) 也指出，處理後的放流水氮和磷的濃度分別在 200 – 400 mg/L 和 20 – 100 mg/L，本試驗在好氣處理後 C 組的總氮和總磷濃度分別為 324 和 44 mg/L，與曾等 (2003) 的研究結果相似。陳等 (2010) 調查彰化芳苑地區 2 家養豬場經過固液分離的廢水中 Cu 和 Zn 濃度，平均分別為 5.0 – 12.0 mg/L 和 19.6 – 36.5 mg/L，本試驗各組經固液分離後 Zn 的濃度皆明顯較陳等 (2010) 所調查的數值為高。經過三段式處理後，A 組的 Cu 濃度也較 C 組為高 ( $P < 0.05$ )，而各組 Cu 和 Zn 濃度皆符合 3.0 mg/L 以下及 5.0 mg/L 以下之現行放流水標準。

本試驗 C 組係模擬實地面豬舍每日沖水 1 次，糞尿排泄量與沖洗水比例 1：5 之設計，與臺灣省畜產試驗所 (1993) 以 1 頭體重 100 kg 的豬為 1 個動物單位，糞尿排泄量 5 kg/day/AU、以 5 倍的水沖洗後，每個動物單位每日產生 30 L 的廢水，作為規劃廢水處理設施設計參數相似。臺灣省畜產試驗所 (1993) 估計原廢水可以固液分離去除 0.1 kg/day/AU (含水率 65%) – 0.2 kg/day/AU (含水率 85%) 的固形物，換算為乾物量約 30 – 35 g/day/AU，本試驗豬隻糞尿排泄量 (表 2) 與臺灣省畜產試驗所 (1993) 估計量相近，C 組每日共需用糞尿：沖洗水 = 1：5 之廢水 40 L，即約需使用 1.3 頭豬的糞尿來調製，固液分離去除了含水率 77.3% 的固形物 1.36 kg/日，換算為乾物量約 0.31 kg/日，即每頭豬固液分離的乾物量約 238 g/日，約為臺灣省畜產試驗所 (1993) 估計量的 6.81 – 7.95 倍，應與本試驗固液分離係使用固液分離桶，其間隙 (0.20 mm) 較一般豬場使用的固液分離機 (間隙多在 0.5 – 0.75 mm) 為小有關。臺灣省畜產試驗所 (1993) 估計廢水經固液分離後的 BOD 與 SS 濃度分別低於 5,000 與 4,700 mg/L，經厭氧處理後分別低於 800 與 700 mg/L，再經好氣處理後可符合 BOD 80 mg/L 與 SS 150 mg/L 之放流水標準。本試驗 C 組經固液分離、厭氧處理和好氣處理後 BOD 與 SS 分別為 1,294 與 1,854 mg/L、210 與 104 mg/L 和 55 與 29 mg/L，皆低於較臺灣省畜產試驗所 (1993) 估計值，此與固液分離去除的乾物量應有關係。顯示，固液分離階段去除較多的固形物，有助於三段式處理的水質淨化效果。

## III. 各處理階段 COD、BOD 及 SS 處理效率

C 組廢水經三段式處理後 COD、BOD 及 SS 的去除率皆較 A 組為高 ( $P < 0.05$ )。臺灣省畜產試驗所 (1993) 估計厭氧處理和好氣處理階段的去除率分別為 85 和 90%，而本試驗 C 組除了厭氧處理階段的 SS 去除率外，皆

無法達到其預估之去除率，推測與 C 組經固液分離後的水質，即較臺灣省畜產試驗所 (1993) 估算的水質明顯為低有關。整體而言，A 組、B 組和 C 組固液分離後的廢水，經過厭氧處理和好氣處理後，COD 的去除率皆達 84% 以上，而除了 A 組 (86.6%) 外，BOD 和 SS 的去除率皆達 90% 以上 (表 4)。

表 3. 不同濃度養豬廢水各處理階段之水質

Table 3. Water qualities of pig wastewater at different concentration during the module of three-step treatment system

Items	Group A <sup>1</sup>	Group B	Group C	SE
Solid-liquid separation (n = 18)				
Solid weight, kg/d	3.40 <sup>a</sup>	2.03 <sup>b</sup>	1.36 <sup>c</sup>	0.12
Moisture, %	76.9	76.3	77.3	0.5
Solid dry matter, kg/d	0.80 <sup>a</sup>	0.48 <sup>b</sup>	0.31 <sup>c</sup>	0.03
After solid-liquid separation (n = 9)				
COD, mg/L	12,360 <sup>a</sup>	7,080 <sup>b</sup>	4,770 <sup>c</sup>	630
BOD, mg/L	3,130 <sup>a</sup>	2,050 <sup>b</sup>	1,290 <sup>c</sup>	210
SS, mg/L	5,580 <sup>a</sup>	2,870 <sup>b</sup>	1,850 <sup>b</sup>	350
TN, mg/L	2,200 <sup>a</sup>	1,681 <sup>b</sup>	939 <sup>c</sup>	114
TP, mg/L	1,164 <sup>a</sup>	640 <sup>b</sup>	385 <sup>b</sup>	71
Cu, mg/L	1.24 <sup>a</sup>	0.90 <sup>ab</sup>	0.58 <sup>b</sup>	0.11
Zn, mg/L	84.52 <sup>a</sup>	50.31 <sup>ab</sup>	44.90 <sup>b</sup>	11.43
pH value	8.64	8.71	8.70	0.03
EC, mS/cm	11.20 <sup>a</sup>	6.32 <sup>b</sup>	5.25 <sup>b</sup>	0.53
After anaerobic stage (n = 9)				
COD, mg/L	3,420 <sup>a</sup>	1,590 <sup>b</sup>	790 <sup>c</sup>	150
BOD, mg/L	960 <sup>a</sup>	350 <sup>b</sup>	210 <sup>c</sup>	50
SS, mg/L	910 <sup>a</sup>	270 <sup>b</sup>	100 <sup>c</sup>	180
TN, mg/L	1,910	1,340	1,200	217
TP, mg/L	103	101	94	8
Cu, mg/L	0.34 <sup>a</sup>	0.11 <sup>b</sup>	0.08 <sup>b</sup>	0.07
Zn, mg/L	7.60 <sup>a</sup>	4.92 <sup>b</sup>	4.34 <sup>b</sup>	0.42
pH value	7.63 <sup>b</sup>	7.63 <sup>b</sup>	7.76 <sup>a</sup>	0.02
EC, mS/cm	12.75 <sup>a</sup>	8.60 <sup>b</sup>	6.63 <sup>c</sup>	0.24
After aerobic stage (n = 9)				
COD, mg/L	1,810 <sup>a</sup>	728 <sup>b</sup>	358 <sup>c</sup>	98
BOD, mg/L	357 <sup>a</sup>	114 <sup>b</sup>	55 <sup>b</sup>	28
SS, mg/L	185 <sup>a</sup>	67 <sup>b</sup>	29 <sup>c</sup>	9
TN, mg/L	816 <sup>a</sup>	460 <sup>b</sup>	324 <sup>c</sup>	23
TP, mg/L	32	30	44	4
Cu, mg/L	0.16 <sup>a</sup>	0.06 <sup>ab</sup>	0.05 <sup>b</sup>	0.03
Zn, mg/L	3.30	2.74	2.14	0.53
pH value	8.50 <sup>a</sup>	8.44 <sup>a</sup>	8.07 <sup>b</sup>	0.05
EC, mS/cm	9.08 <sup>a</sup>	5.76 <sup>b</sup>	4.36 <sup>c</sup>	0.18

<sup>1</sup> Three different concentrations of wastewater were made up by mixing manure and water at 1:1 (Group A), 1:2.5 (Group B) and 1:5 (Group C) by weights.

<sup>a, b, c</sup> Means with in same row without the same superscripts differ ( $P < 0.05$ ).



表 4. 不同濃度養豬廢水在厭氧及好氣處理階段的水質處理效率 (n = 9)

Table 4. Removal efficiencies of pig wastewater at different concentrations on the anaerobic and aerobic stages

Items	Group A <sup>1</sup>	Group B	Group C	SE
Removal rate of anaerobic stage (%)				
COD	71.1 <sup>b</sup>	74.0 <sup>ab</sup>	81.2 <sup>a</sup>	2.3
BOD	64.6 <sup>b</sup>	76.4 <sup>ab</sup>	79.4 <sup>a</sup>	3.7
SS	86.1	89.0	94.4	2.7
Removal rate of aerobic stage (%)				
COD	46.6	49.2	50.2	3.2
BOD	64.7	61.0	63.2	4.0
SS	43.3 <sup>b</sup>	63.3 <sup>a</sup>	69.8 <sup>a</sup>	4.5
Total removal rate (%)				
COD	84.5 <sup>b</sup>	88.5 <sup>ab</sup>	91.6 <sup>a</sup>	1.2
BOD	86.6 <sup>b</sup>	93.0 <sup>a</sup>	95.1 <sup>a</sup>	1.4
SS	96.6 <sup>b</sup>	97.3 <sup>b</sup>	98.3 <sup>a</sup>	0.2

<sup>1</sup> Described as in Table 3.<sup>a, b</sup> Means within same row without the same superscripts differ ( $P < 0.05$ ).

豬隻節水飼養是養豬產業永續經營後續必循路徑，惟試驗結果發現，A 組（糞尿：農塘水 = 1：1）廢水經過固液分離、厭氧處理 10 日和好氣處理 1.5 日後，水質仍高於放流水標準。蘇等 (2016, 2018) 指出，全條狀地面及部分條狀地面豬舍的廢水量，僅約實地面豬舍的 37 – 53% 及 60 – 85%，顯示養豬場若由實地面豬舍改建為條狀地面豬舍，其廢水處理設施應尚有餘裕容積以延長水力停留時間。因此，後續在廢水處理技術方面，將先從延長厭氧處理及好氣處理階段的水力停留時間著手，期望高濃度廢水經過三段式處理後可符合放流水標準。另外，近年來在農政及環保機關通力合作下，已訂定了多項畜牧廢水再利用法令，將厭氧處理後或再經過好氣處理的廢水施灌於農地再利用，亦屬可行之途徑。

## 參考文獻

- 行政院環境保護署。2018。事業及污水下水道系統水污染防治費收費辦法。https://oaout.epa.gov.tw/Law/Law\_Content.aspx?id=FL040165。
- 行政院環境保護署。2019。放流水標準。https://law.moj.gov.tw/LawClass/LawAll.aspx?pcode=O0040004。
- 行政院環境保護署環境檢驗所。2001。水中導電度測定方法—導電度計法。https://www.epa.gov.tw/niea/CEF7F53949423F26。
- 行政院環境保護署環境檢驗所。2004。水中總氮檢測方法。https://www.epa.gov.tw/niea/3F83B9E9B37CAB8D。
- 行政院環境保護署環境檢驗所。2005a。水中氨氮檢測方法—靛酚比色法。https://www.epa.gov.tw/niea/4034F5B8E3A33B00。
- 行政院環境保護署環境檢驗所。2005b。水中總磷之手動消化流動注入分析法—比色法。https://www.epa.gov.tw/niea/EF23E2B52E6F2345。
- 行政院環境保護署環境檢驗所。2006a。水中凱氏氮檢測方法。https://www.epa.gov.tw/niea/A77EA35EE03E009A。
- 行政院環境保護署環境檢驗所。2006b。水中硝酸鹽氮檢測方法—分光光度計法。https://www.epa.gov.tw/niea/A2C719F96BBB14FD。
- 行政院環境保護署環境檢驗所。2006c。水中總溶解固體及懸浮固體檢測方法—103℃ – 105℃ 乾燥。http://www.niea.gov.tw/niea/WATER/W21057A.htm。
- 行政院環境保護署環境檢驗所。2007。水中化學需氧量檢測方法—重鉻酸鉀迴流法 (NIEA W515.54A)。http://www.niea.gov.tw/niea/WATER/W51554A.htm。
- 行政院環境保護署環境檢驗所。2011。水中生化需氧量檢測方法 (NIEA W510.55B)。http://www.niea.gov.tw/niea/WATER/W51054B.htm。

- 行政院環境保護署環境檢驗所。2015。水中亞硝酸鹽氮檢測方法－比色法。<https://www.epa.gov.tw/niea/A02878363E409CE6>。
- 行政院環境保護署環境檢驗所。2019。水之氫離子濃度指數 ( pH 值 ) 測定方法－電極法。<https://www.epa.gov.tw/niea/E6CD30848FCE3378>。
- 經濟部水利署。2019a。中華民國 107 年水利統計，壹、水資源運用。[https://www.wra.gov.tw/News\\_Content.aspx?n=2953&s=19176](https://www.wra.gov.tw/News_Content.aspx?n=2953&s=19176)。
- 經濟部水利署。2019b。106 年水資源供需統計表－修正表。[https://www.wra.gov.tw/News\\_Content.aspx?n=2945&s=7394](https://www.wra.gov.tw/News_Content.aspx?n=2945&s=7394)。
- 臺灣省畜產試驗所。1993。豬糞尿處理設施工程設計、施工手冊 ( 修訂本 )。臺灣省畜產試驗所專輯第 21 號，第 C－F 頁。
- 夏良宙。2001。豬舍設備。畜牧要覽養豬篇 ( 增修版 )。中國畜牧學會，臺北市，第 285-292 頁。
- 曾四恭、吳建輝、鄭榮春、郭猛德、馬冀芳。2003。生物處理法去除養豬廢水中氮之研究 ( 上 )。飼料營養雜誌 11：66-75。
- 陳琦玲、郭鴻裕、周明顯、徐慶霖、張簡水紋、廖崇億、張筱瑜、蔡震達。2010。以槽車載運固液分離後養豬廢水再利用試驗計畫 ( 芳苑案 )。期末報告。
- 蔡孟潔、周楚洋。2005。豬糞尿水之生物去氮除磷。農業機械學刊 14：1-12。
- 蘇天明、李免蓮、吳遵文、蕭庭訓、李恒夫、廖宗文、郭猛德。2009。不同體重肉豬糞尿排泄量及其成分調查。中畜會誌 38：97-107。
- 蘇天明、劉士銘、李恒夫、蕭庭訓、廖宗文、郭猛德。2012a。不同型式銅鋅及其用量之飼糧對生長肥育豬生長性能及屠體性狀之影響。畜產研究 45：55-66。
- 蘇天明、劉士銘、李恒夫、蕭庭訓、廖宗文、郭猛德。2012b。不同銅鋅濃度飼糧對生長肥育豬糞便及堆肥中銅鋅濃度之影響。畜產研究 45：107-120。
- 蘇天明、翁義翔、鍾承訓、鄭閔謙、蕭庭訓、程梅萍。2016。地面結構對熱季豬隻生長性能及豬舍用水量、廢水量之影響。畜產研究 49：26-34。
- 蘇天明、翁義翔、鍾承訓、蕭庭訓、程梅萍。2018。地面結構對涼季豬隻生長性能與豬舍廢水量。畜產研究 51：75-83。
- SAS. 2002. SAS procedure guide for personal computers. Version 6th Ed. SAS Institute Inc. Cary, NC. U.S.A.
- Underwood, E. J. 1977. Trace elements in human and animal nutrition (4th ed.), Western Australia.

# Treatment effects of three-step treatment on pig wastewater with different concentrations <sup>(1)</sup>

Tein-Ming Su <sup>(2)(4)</sup> Cheng-Hsun Chung <sup>(2)</sup> Ting-Hsun Hsiao <sup>(2)</sup> and Mei-Ping Cheng <sup>(3)</sup>

Received: Jan. 20, 2020; Accepted: Jun. 9, 2020

## Abstract

The reduction of flushing water reduces wastewater in pig farms but will increase the concentration of pollutants in wastewater relatively. The study aims to investigate the effect of wastewater concentration on the water quality at different treatment stages after the three-step treatment process, in order to reduce the wastewater product from pig farms. A total of 20 LD (Landrace ♀ × Duroc ♂) castrated boars with an average body weight between 52.9 to 112 kg were fed ad libitum in individually metabolism cages, while feces and urines of individual pigs were collected separately, weighed and recorded after mixture daily. Three pollutants concentrations of wastewater were made up by mixing manure and water at 1:1 (group A), 1:2.5 (group B) and 1:5 (group C) by weight ratio, then processed with a module of three-step treatment system with a treatment period for about 11.5 days to measure the changes in water quality at each processing stage. The results showed that the wastewater of group A contained higher ( $P < 0.05$ ) concentrations of chemical oxygen demand (COD), biochemical oxygen demand (BOD) and suspended solids (SS) in each treatment stage than those of groups B and C. Group A wastewater had higher electrical conductivity (EC) and concentration of copper and zinc than those of group C ( $P < 0.05$ ). The CODs of the three groups A, B and C of wastewater having undergone solid-liquid separation were 12,360, 7,080 and 4,770 mg/L, respectively, and 1,810, 728 and 358 mg/L, after the three-step treatment process. The BODs of the three groups of wastewater after solid-liquid separation were 3,130, 2,050 and 1,290 mg/L, respectively, and 357, 114 and 55 mg/L, after the three-step treatment. The concentrations of COD and BOD in groups A and B failed to meet the standards for pig wastewater discharge, indicating that the treatment of higher concentrations of wastewater requires a longer hydraulic retention time (HRT). Therefore, further research will be conducted to investigate the effect of extending the HRT of anaerobic and aerobic processing on the purification of water quality.

Key words: Grower-finisher pig, Three-step treatment system, Wastewater concentration, Water quality.

---

(1) Contribution No. 2641 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Livestock Management Division, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(3) Chief Secretary Office, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(4) Corresponding author, E-mail: tmsu@mail.tlri.gov.tw.

# 飼糧中添加凝結芽孢桿菌對離乳仔豬生長性能、血液生化值及糞便微生物的影響<sup>(1)</sup>

王錦盟<sup>(2)(4)</sup> 林幼君<sup>(3)</sup> 陳致吟<sup>(2)</sup> 劉芳爵<sup>(2)</sup>

收件日期：109 年 1 月 8 日；接受日期：109 年 6 月 15 日

## 摘 要

本試驗旨在探討飼糧中添加凝結芽孢桿菌 (*Bacillus coagulans*) 對離乳仔豬生長性能、血液生化值及糞便微生物的影響。試驗以 32 頭 4 週齡 (藍瑞斯 × 杜洛克) 離乳仔豬為試驗動物，以體重為區集，再隨機分為 2 組，分別為對照組與處理組，處理組飼糧中額外添加凝結芽孢桿菌，使飼糧中濃度達  $10^8$  CFU/kg。試驗期間測定飼料採食量、體重、血液血球相與生化值及糞便菌相。結果顯示，經 4 週飼料與水任食飼養，兩組之仔豬隻日飼料採食量分別為 0.866 及 0.863 kg，隻日增重則分別為 0.249 及 0.262 kg，在飼料採食量與增重方面均無顯著差異。飼糧中添加凝結芽孢桿菌組可以改善飼料利用效率 (體增重 / 飼料採食量) 6.2%，分別為 0.286 及 0.305，在統計上具顯著之趨勢 ( $P = 0.10$ )，在八週齡時達顯著水準 (0.283 及 0.325； $P < 0.05$ )。兩組之嗜中性白血球與淋巴球的比值相近，顯示飼糧添加凝結芽孢桿菌對降低離乳仔豬的緊迫無顯著影響，或是仔豬處於低緊迫的情況。兩組之糞便中病原性大腸桿菌、非病原性大腸桿菌群、革蘭氏陰性菌及乳酸菌之菌數量均亦相近。綜上所述，飼糧中添加凝結芽孢桿菌未能有明顯改善離乳仔豬之飼料採食量與日增重之效果，惟可以改善飼料利用效率，在仔豬八週齡時最明顯。

關鍵詞：離乳仔豬、凝結芽孢桿菌、生長表現。

## 緒 言

減少畜禽飼料中抗生素生長促進劑的使用為國際之趨勢，我國亦逐年減少飼料中抗生素生長促進劑的品項，因此有開發「抗生素生長促進劑替代品」的必要性。

益生菌 (probiotics) 早在數百年前，歐洲人便以優酪乳或發酵乳的形式食用，但是當時並不了解它對健康的效益。一直到 1908 年，由俄國諾貝爾獎得主 Elie Metchnikoff 首次描述益生菌的效益，他指出發酵牛乳中所含的乳酸菌對人體的健康具有益處。Lilly and Stilwell (1965) 進一步將益生菌定義：任何可以促進腸道菌種平衡，增加人體健康效益的微生物。一般常見的益生菌可區分為細菌及真菌兩大類。益生菌的特性需能抵抗胃酸與膽鹽的破壞，低或無病原性，能定殖於腸壁細胞及能在腸道上進行繁殖，才能產生良好的作用 (Fuller, 1992)。

芽孢桿菌屬於中度嗜熱菌，固態發酵耐受溫度可達 50 – 55℃，可以降低其在發酵生產過程被其他微生物污染的風險 (Abdel-Banat *et al.*, 2010; Lidan *et al.*, 2013)。一般微生物並無法有效分解五碳醣，微生物利用磷酸酮醇酶 (phosphoketolase) 代謝路徑發酵五碳醣時，可以產生等當量之醋酸與左旋乳酸，但是其產生效率大約 60%，不過芽孢桿菌，將五碳醣或六碳醣透過五碳糖磷酸途徑 (pentose-phosphate pathway) 水解產生左旋乳酸與醋酸，其效率接近 100% (Patel *et al.*, 2006)。因此，若將凝結芽孢桿菌 (*Bacillus coagulans*) 添加於飼料中，應可分解飼料中木質纖維素，利用固態發酵水解五碳醣與六碳醣，產生左旋乳酸，供作腸道中有機酸的來源，協助達到維持仔豬腸道健康的目的，同時增加飼料中纖維之利用，降低飼養成本。

一般而言，益生菌主要定殖在動物的消化道中，其中小腸部分的數量最多，主要的作用在抑制腸道致病菌與維持消化道機能等。因此添加於飼料中之益生菌須能耐酸與耐膽鹽，才能通過胃酸與膽鹽的作用到達小腸，才有機會

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2642 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所產業組。

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所營養組。

(4) 通訊作者，E-mail: cmwang@mail.tlri.gov.tw。



進行定殖於腸道的作用 (Fuller, 1992)。大腸部位之微生物菌相，對豬隻健康扮演非常重要的角色，主要由於微生物產生之短鏈脂肪酸，可降低腸道中的 pH 值，避免有害微生物的作用 (Blottiere *et al.*, 2003; Biagi *et al.*, 2006)。

本試驗嘗試以篩選自豬隻糞便的凝結芽孢桿菌，作為飼料添加物之益生菌菌種來源，進行仔豬飼料添加物之飼養試驗，評估在仔豬飼糧中添加凝結芽孢桿菌對仔豬生長表現的影響。

## 材料與方法

本試驗於行政院農業委員會畜產試驗所產業組的試驗豬舍進行，試驗動物之使用、飼養管理及試驗內容，經畜產試驗所實驗動物管理小組以畜試動字第 108019 號申請核准在案。

### I. 凝結芽孢桿菌來源

以篩選自豬隻糞便的凝結芽孢桿菌，經菌種鑑定、耐酸 (pH 2)、耐膽鹽 (2%)、耐高溫 (90°C) 及產孢能力測試後，選取凝結芽孢桿菌 S10 菌株進行發酵，生產飼料添加物。

### II. 動物試驗

以 4 週齡二品種雜交離乳仔豬 (L × D) 32 頭為試驗動物，依相近體重分群並逢機為對照組與處理組，離乳平均體重分別為  $6.79 \pm 1.27$  與  $7.15 \pm 1.33$  kg (mean ± SD)。仔豬飼養於傳統高床保育豬舍，每組 4 重複，每欄 4 頭 (公母各半)，每欄面積 2.55 平方公尺。對照組仔豬給飼試驗基礎保育豬飼糧 (表 1)，處理組分組後，立即給飼額外添加凝結芽孢桿菌粉之飼糧，飼料中凝結芽孢桿菌濃度為  $10^8$  CFU/kg。試驗為期 4 週，試驗於仔豬 8 週齡結束。試驗於夏季進行，試驗期間採任食，每日補充飼料 2 次。以乳頭式或碗式飲水器給水，每欄 2 個飲水器，不限給水。每週測定仔豬的飼料採食量及體重，以評估飼糧中添加凝結芽孢桿菌對離乳仔豬生長表現的影響。

### III. 血液生化值及糞便菌相檢測

在試驗結束時，豬隻以人工固定後，由頸靜脈採集 2 管血液各 5 mL，一管進行血液常規分析，另一管經 3,000 rpm/15 min 離心後，取血清進行血液生化值檢測。以血液分析儀 (XT-1800i Hematology Analyzer Sysmex Corporation, Co., Japan) 進行全血細胞計數 (complete blood count) 檢測。以血清生化分析儀 (Hitachi 7170, Japan) 輔以 Wako 公司所生產之套組進行測定血清生化學檢測，包括：血紅素 (hemoglobin, Hgb)、血球容積比 (hematocrit, Hct)、平均紅血球容積 (mean corpuscular cell volume, MCV)、平均紅血球血紅素 (mean corpuscular hemoglobin, MCH)、平均紅血球血紅素濃度 (mean corpuscular cell hemoglobin concentration, MCHC)、總蛋白 (total protein, TP)、尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN)、肌酸酐 (creatinine, CREA)、總膽固醇 (total cholesterol, T-Chol)、三酸甘油酯 (triglyceride, TG) 等。

於 8 週齡試驗結束時，每欄採集 10 g 以上的仔豬新鮮糞便樣品 1 份，保存於 4°C，送實驗室，再取 1 g 糞便進行菌相檢測。檢測使用 Chromagar (CHROMagar company, France) 方法檢測糞便中病原性大腸桿菌 (*Escherichia coli*)、非病原性大腸桿菌群 (coliform)、革蘭氏陰性菌 Gram-negative bacteria 及乳酸菌 (*Lactobacillus*) 之菌數 (劉等, 2017)。

### IV. 統計分析

本試驗採隨機完全區集設計 (randomized completely block design, RCBD)，試驗資料使用 SAS 統計套裝軟體 (Statistical Analysis System. SAS, 2002)，利用一般線性模式程序 (General Linear Model Procedure) 進行變方分析，並以 least squares means 比較處理組間之差異顯著性。分析模式： $Y_{ijk} = \mu + B_i + T_j + \varepsilon_{ijk}$ ； $i = 1, 2, 3, 4$ ； $j = P, Q$ 。上式中  $B_i$  代表區集 (block) 效應，仔豬初體重依每欄平均體重分為 1、2、3 及 4 級。 $T_j$  代表處理 (treatment) 效應，P 為對照組，Q 為處理組， $\varepsilon_{ijk}$  則為機差效應。

## 結果與討論

### I. 生長表現

#### (i) 飼料採食量

飼糧中添加凝結芽孢桿菌對仔豬全期飼料採食量無顯著影響 (表 2)，對照組與處理組之隻日飼料採食量分別為 0.866 及 0.863 kg，且各週之飼料採食量亦無顯著差異。依據 Pu *et al.* (2018) 於飼料中添加芽孢桿

菌，可增加仔豬的隻日飼料採食量 (0.406 vs. 0.486 kg)。吳等 (2019) 在離乳仔豬 5 至 7 週齡飼料中添加凝結芽孢桿菌，可顯著提高添加組的全期隻日飼料採食量 (0.40 vs. 0.50 kg)。本試驗未得到相同結果，惟本試驗前三週 (5 至 7 週齡) 對照組及處理組的隻日飼料採食量較吳等 (2019) 為高，分別為 0.674 及 0.673 kg。推測本試驗仔豬的飼養環境適當且無疾病的發生，使對照組即具有良好的飼料採食量，因此飼料中添加凝結芽孢桿菌已無再提升飼料採食量的空間，以致本試驗未得到提高仔豬飼料採食量的結果。

## (ii) 增重

一般而言，益生菌可作為飼料中促進生長抗生素添加物的替代品，可能與腸道微生物群的改善有關。部分益生菌可產生多種酵素，幫助仔豬消化飼料，進而改善仔豬的增重、飼料採食量與飼料利用效率。Guerra *et al.* (2006) 的結果指出，仔豬飼料中添加乳酸桿菌，具有可提升仔豬日增重的效果。飼料中添加乳酸桿菌的代謝產物，亦具有提升仔豬日增重的結果 (Thu *et al.*, 2011)。根據 Pu *et al.* (2018) 指出，凝結芽孢桿菌可以改善腸粘膜屏障的完整性，以減緩大腸桿菌的攻擊，促進仔豬的生長表現和減輕腹瀉。

吳等 (2019) 在離乳仔豬 5 至 7 週齡飼料中添加凝結芽孢桿菌，有提高添加組仔豬日增重的趨勢。本試驗處理組之隻日增重為 0.262 kg 也高於對照組的 0.249 kg，惟不具顯著差異性。對照組及處理組 5 至 8 週齡各週之日增重亦無顯著差異，另一方面，兩組之 5 週齡隻日增重均為負值，分別為 -0.003 及 -0.011 kg/day/piglet，顯示離乳對仔豬的緊迫影響嚴重，而飼料中添加凝結芽孢桿菌對仔豬離乳後第一週的日增重無顯著助益。

表 1. 基礎飼糧組成

Table 1. Basal diet composition

Ingredients	%
Yellow corn meal	67.71
Soybean meal	19.00
Fish meal	5.00
Skimmed milk powder	2.00
Whey powder	2.00
Soy bean oil	1.00
Salt	0.50
Dicalcium phosphate	1.60
Limestone, pulverized	0.80
Choline chloride, 50%	0.10
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O, 99%	0.04
Premix-Vit <sup>1</sup>	0.15
Premix-Min <sup>2</sup>	0.10
Total	100.00
Calculated values	
Crude protein, %	17.40
ME, kcal/kg	3,217
Calcium, %	0.94
Total phosphorus, %	0.73
Available phosphorus, %	0.57
Lysine, %	1.13

<sup>1</sup> Vitamin premix provided per kilogram of diet: vitamin A, 9,000 IU; vitamin D<sub>3</sub>, 600 IU; vitamin E, 60 IU; vitamin K, 3 mg; vitamin B<sub>1</sub>, 3 mg; vitamin B<sub>2</sub>, 9 mg; vitamin B<sub>6</sub>, 4.5 mg; vitamin B<sub>12</sub>, 0.045 mg; calcium pantothenate, 45 mg; folic acid, 0.9 mg and biotin, 0.3 mg.

<sup>2</sup> Mineral premix provided per kilogram of diet: Cu, 5 mg; Mn, 6 mg; Co, 0.35 mg; Zn, 40 mg; I, 0.2 mg; Se 0.1 mg and Fe, 80 mg.

表 2. 飼糧中添加凝結芽孢桿菌對離乳仔豬生長表現之影響

Table 2. Effects of addition of *Bacillus coagulans* in diet on growth performances of weaned pigs

Group	Control	Bacillus coagulans added*	SE	P value
	Feed intake (kg/piglet/day)			
5 <sup>th</sup> -wk-old	0.278	0.265	0.033	NS
6 <sup>th</sup> -wk-old	0.592	0.591	0.045	NS
7 <sup>th</sup> -wk-old	1.152	1.163	0.067	NS
8 <sup>th</sup> -wk-old	1.441	1.433	0.095	NS
Whole period	0.866	0.863	0.048	NS
	Body weight gain (kg/piglet/day)			
5 <sup>th</sup> -wk-old	-0.003	-0.011	0.014	NS
6 <sup>th</sup> -wk-old	0.197	0.210	0.026	NS
7 <sup>th</sup> -wk-old	0.391	0.385	0.016	NS
8 <sup>th</sup> -wk-old	0.411	0.465	0.033	NS
Whole period	0.249	0.262	0.114	NS
	Feed efficiency (Body weight gain/Feed intake)			
5 <sup>th</sup> -wk-old	-0.008	-0.055	0.053	NS
6 <sup>th</sup> -wk-old	0.333	0.338	0.022	NS
7 <sup>th</sup> -wk-old	0.338	0.333	0.012	NS
8 <sup>th</sup> -wk-old	0.283	0.325	0.008	P < 0.05
Whole period	0.286	0.305	0.005	(P = 0.10)

\* The concentration of added *Bacillus coagulans* in the treatment diet was 10<sup>8</sup> CFU/kg.

NS, not significant.

### (iii) 飼料利用效率

對照組及處理組之飼料利用效率 (gain/feed) 分別為 0.286 及 0.305，添加凝結芽孢桿菌組改善 6.2%，在統計上具顯著之趨勢 (P = 0.10)。由於第 5 至 7 週齡兩組之飼料利用效率均無顯著差異，第 8 週齡添加凝結芽孢桿菌組之飼料利用效率 (0.325) 顯著優於對照組 (0.283) (P < 0.05)，以致處理組全期之飼料利用效率有改善的趨勢。

前人研究顯示，於仔豬飼糧中添加枯草桿菌 MA139 或乳酸桿菌或液化澱粉芽孢桿菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 或芽孢桿菌，對離乳仔豬飼料利用效率均無顯著影響 (Guo *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2008; 曾等, 2017; Wu *et al.*, 2018)。此結果與 Pu *et al.* (2018) 之結果指出，添加芽孢桿菌對經過大腸桿菌攻毒仔豬的飼料效率，有改善的效果，同時可減少仔豬發生下痢的比例，並指出芽孢桿菌可以改善腸粘膜屏障的完整性，以減緩大腸桿菌的攻擊，促進仔豬的生長表現和減輕腹瀉。本試驗由於 7 週齡時兩組之飼料利用效率均大於 0.33，8 週齡時處理組維持於 0.325，相對的，對照組飼料利用效率變差，降至 0.283。此結果與 Pu *et al.* (2018) 添加芽孢桿菌可改善飼料利用效率之結果類似。

## II. 八週齡仔豬血液組成

試驗結束時，對照組與處理組的全血細胞計數結果如表 3。Ježek *et al.* (2018) 對屠宰前肉豬之紅血球測定範圍為 4.3 – 7.0 M cell/uL。本試驗血球檢測方面，對照組紅血球 5.85 M cell/uL 顯著高於處理組的 5.40 M cell/uL (P < 0.05)，惟數值介於 4.3 – 7.0 M cell/uL (Ježek *et al.*, 2018) 之間，顯示兩組仔豬紅血球數值均在一般正常範圍內。Ježek *et al.* (2018) 指出屠宰前肉豬之嗜鹼性球範圍為 0 – 2%。本試驗對照組嗜鹼性球 0.51% 顯著高於處理組的 0.36% (P < 0.05)，惟數值介於 0 – 2% (Ježek *et al.*, 2018) 之間，顯示兩組仔豬嗜鹼性球之比率均在一般正常範圍內。

皮質類固醇 (Corticosteroids) 是有效的短期壓力指標，而嗜中性白血球與淋巴球比值 (NET/LYM) 是良好的

中長期壓力指標，緊迫會提高母豬血液中嗜中性球與淋巴球的比值 (Quiñonero *et al.*, 2009)，本試驗對照組及處理組之的 NET/LYM 比值分別為 0.791 及 0.709，兩者不具顯著差異性，顯示飼糧添加凝結芽孢桿菌對降低離乳仔豬的緊迫並不明顯。在血液生化學檢測方面，兩組間各項檢測值均無顯著差異。

表 3. 飼糧中添加凝結芽孢桿菌對 8 週齡仔豬血液生化值之影響

Table 3. Effects of addition of *Bacillus coagulans* in diet on hematological profile of the 8-wk-old weaned pigs

Group	Control	<i>Bacillus coagulans</i> added*	SE	P value
No.	16	16		
WBC, cell/uL	16,538	15,794	1,444	NS
RBC, M cell/uL	5.85	5.40	0.15	*
PLT, 10 <sup>3</sup> /uL	435.38	433.50	38.27	NS
NET, %	40.53	37.72	2.56	NS
LYM, %	52.45	53.99	2.42	NS
MON, %	5.18	6.36	0.53	NS
EOS, %	1.33	1.58	0.205	NS
BASO, %	0.51	0.36	0.33	P < 0.05
NET/LYM	0.79	0.71	0.18	NS
Hgb, gm%	9.94	9.43	0.22	NS
Hct, %	37.34	35.46	0.81	NS
MCV, fL	64.11	65.44	0.90	NS
MCH, pg	17.05	17.60	0.24	NS
MCHC, %	26.63	26.92	0.31	NS
TP, g/dL	5.07	5.03	0.08	NS
BUN, mg/dL	8.44	8.26	0.63	NS
CREA, mg/dL	0.80	0.70	0.03	NS
T-Chol, mg/dL	67.02	63.44	3.36	NS
TG, mg/dL	24.88	21.03	1.67	NS

\* Same as table 2.

WBC, white blood cells; RBC, red blood cells; PLT, platelets; NET, neutrophils; LYM, lymphocytes; MON, mononuclear balls; EOS, eosinophilic white blood cells; BASO, basophilic white blood cells. Hgb, hemoglobin; Hct, hematocrit; MCV, mean corpuscular cell volume; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular cell hemoglobin concentration; TP, total protein; BUN, blood urea nitrogen; CREA, creatinine; T-Chol, total cholesterol; TG, triglyceride. NS, not significant.

### III. 八週齡仔豬糞便菌相

離乳仔豬給飼含凝結芽孢桿菌飼糧 4 週後，各組糞便中的大腸桿菌、非病原性大腸桿菌群、革蘭氏陰性菌及乳酸菌數，均無顯著差異 (表 4)。芽孢桿菌可能改變腸道 pH 或引起敏感細胞離子流失，而發揮其抗微生物的活性 (Riazi *et al.*, 2012)。依據 Lievin *et al.* (2000) 指出，雙歧桿菌可於宿主腸道中產生有機酸，如醋酸及乳酸，酸化腸道環境並有助於抑制腸道中病原菌生長。Choi *et al.* (2011) 指出益生菌可增加腸道中有益微生物，並減少有害微生物菌落。Pu *et al.* (2018) 之結果亦顯示，飼糧中同時添加苯甲酸與芽孢桿菌，對大腸桿菌攻毒之仔豬糞便中大腸桿菌數無顯著影響，但在飼糧中同時添加苯甲酸、芽孢桿菌及牛至油 (oregano oil)，則可顯著降低仔豬糞便中大腸桿菌數。本試驗結果與 Pu *et al.* (2018) 之結果類似，離乳仔豬給飼含凝結芽孢桿菌飼糧 4 週後，檢測糞便中的菌相，各組間均無顯著差異。推測單純一種益生菌的添加，可能較不易得到糞便中菌相改變的結果。



表 4. 飼糧中添加凝結芽孢桿菌對 8 週齡仔豬糞便中菌相之影響

Table 4. Effects of addition of *Bacillus coagulans* in diet on microbial colonies in the feces of the 8-wk-old weaned pigs

Group	Control (log CFU/g)	<i>Bacillus coagulans</i> added* (log CFU/g)	SE	P value
<i>Escherichia coli</i>	6.67	7.04	0.47	NS
Coliforms	4.70	5.99	0.43	NS
Gram-negative bacteria	6.54	5.55	0.60	NS
<i>Lactobacillus</i>	10.55	10.63	0.12	NS

\* Same as table 2.

NS, not significant.

## 結 論

在離乳仔豬飼糧中添加凝結芽孢桿菌，對仔豬飼料採食量與增重均無顯著影響，但飼料利用效率則有改善的趨勢。仔豬血液中之嗜中性白血球與淋巴球的比值相近，且腸道菌相亦無差異，顯示飼糧中添加凝結芽孢桿菌，對降低 8 週齡仔豬的緊迫無顯著效果，或者本試驗環境與飼養管理狀況良好，對仔豬並未造成緊迫影響。

## 誌 謝

試驗期間承畜產試驗所產業組二股全體同仁協助及營養組蕭合芬小姐進行樣品分析，謹此誌謝。

## 參考文獻

- 吳鈴彩、林幼君、張俊達、王錦盟、劉芳爵。2019。飼料添加芽孢桿菌對離乳仔豬生長表現的影響。畜產研究 52：108-113。
- 洪鈴柱、李恒夫、邱智偉、蘇天明。2011。畜試黑豬一號血液學調查。畜產研究 44：301-310。
- 曾國富、林志勳、余祺、方文德、龔琳舒。2017。液化澱粉芽孢桿菌對離乳仔豬生長性能、腸道菌相及血液免疫球蛋白之影響。中畜會誌 46：311-319。
- 劉芳爵、鍾承訓、林幼君。2017。液態與凝膠化仔豬人工乳對哺乳仔豬之生長性狀、免疫球蛋白含量及糞便微生物數量之影響。畜產研究 50：244-249。
- Abdel-Banat, B. M. A., H. Hoshida, A. Ano, S. Nonklang and R. Akada. 2010. High temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast. Appl. Microbiol. Biotechnol. 85: 861-867.
- Biagi, G., A. Piva, M. Moschini, V. E. ezzali and F. X. Roth. 2006. Effect of gluconic acid on piglet growth performance, intestinal microflora, and intestinal wall morphology. J. Anim. Sci. 84: 370-378.
- Blottiere, H. M., B. Buecher, J. P. Galmiche and C. Cherbut. 2003. Molecular analysis of the effect of short-chain fatty acids on intestinal cell proliferation. Proc. Nutr. Soc. 62: 101-106.
- Cao, J., F. Guo, L. Zhang, B. Dong, and L. Gong. 2014. Effects of dietary Selenomethionine supplementation on growth performance, antioxidant status, plasma selenium concentration, and immune function in weaning pigs. J. Anim. Sci. Biotechnol. 5: 46-52.
- Choi, J. Y., P. L. Shinde, S. L. Ingale, J. S. Kim, Y. W. Kim, K. H. Kim, I. K. Kwon and B. J. Chae. 2011. Evaluation of multi-microbe probiotics prepared by submerged liquid or solid substrate fermentation and antibiotics in weaning pigs. Livest. Sci. 138: 144-151.
- Fuller, R. 1992. History and development of probiotics. In: Probiotics. Springer, Dordrecht, Germany. pp. 1-8.
- Guerra, N. P., P. F. Bernardez, J. Mendez, P. Cachaldora and L. P. Castroa. 2006. Production of four potentially probiotic

- lactic acid bacteria and their evaluation as feed additives for weaned piglets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 134: 89-107.
- Guo, X. H., D. F. Li, W. Q. Lu, X. S. Piao and X. L. Chen. 2006. Screening of bacillus strains as potential probiotics and subsequent confirmation of the in vivo effectiveness of *Bacillus subtilis* MA139 in pigs. *Antonie van Leeuwenhoek* 90: 139-146.
- Ježek, J., J. Starič, M. Nemec, M. Nemec, J. Plut, O. I. Golinar, M. Klinkon and M. Štukelj. 2018. The influence of age, farm, and physiological status on pig hematological profiles. *J. Swine Health Prod.* 26: 72-78.
- Lidan, Y., X. Zhou, M. S. B. Hudari, Z. Li and J. C. Wua. 2013. Highly efficient production of L-lactic acid from xylose by newly isolated *Bacillus coagulans* C106. *Bioresour. Technol.* 132: 38-44.
- Lievin, V., I. Peiffer, S. Hudault, F. Rochat, D. Brassart, J. R. Neeser and A. L. Servin. 2000. Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal will microflora exert antimicrobial activity. *Gut* 47: 646-652.
- Lilly, D. M. and R. H Stillwell. 1965. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science* 147: 747-748.
- Patel, M. A., M. S. Ou, R. Harbrucker, H. C. Aldrich, M. L. Buszko, L. O. Ingram and K. T. Shanmugam. 2006. Isolation and characterization of acid-tolerant, thermophilic bacteria for effective fermentation of biomass-derived sugars to lactic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 3228-3235.
- Pu, J., D. Chen, G. Tian, J. He, P. Zheng, X. B. Mao, J Yu, Z. Q. Huang, L. Zhu, J. Q. Luo, Y. H. Luo and B. Yu. 2018. Protective effects of benzoic acid, *Bacillus coagulans*, and oregano oil on intestinal injury caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* in weaned piglets. *Biomed Res. Int. Aug.* 27: Article ID 1829632, pp. 12.
- Quiñonero, J., C. GarcíaSantamaría, E. MaríaDolores and E. Armero. 2009. Physiological indicators of stress in gestating sows under different cooling systems. *Pesq. agropec. bras., Brasília*, 44: 1549-1552.
- Riazi, S., S. E. Dover and M. L. Chikindas. 2012. Mode of action and safety of lactosporin, a novel antimicrobial protein produced by *Bacillus coagulans* ATCC 7050. *J. Appl. Microbiol.* 113: 714-722.
- SAS Institute, 2002. Guide for Personal Computers. Version 8.0.1, SAS Inst. Inc., Cary, NC. USA.
- Thu, T. V., T. C. Loh, H. L. Foo, H. Yaakub and M. H. Bejo. 2011. Effects of liquid metabolite combinations produced by *Lactobacillus plantarum* on growth performance, faeces characteristics, intestinal morphology and diarrhoea incidence in postweaning piglets. *Trop. Anim. Health Prod.* 43: 69-75.
- Wu, T., Y. Zhang, Y. Lv, P. Li, D. Yi, L. Wang, D. Zhao, H. Chen, J. Gong and Y. Hou. 2018. Beneficial impact and molecular mechanism of *Bacillus coagulans* on piglets' intestine. *Int J Mol Sci.* 19: 2084; doi:10.3390/ijms19072084.
- Yu, H. F., A. N. Wang, X. J. Li and S. Y. Qiao. 2008. Effect of viable *Lactobacillus fermentum* on the growth performance, nutrient digestibility and immunity of weaned pigs. *J. Anim. Feed Sci.* 17: 61-69.

# Effects of adding *Bacillus coagulans* in diet on the growth performance, blood biochemical values and fecal microbes of weaned pigs <sup>(1)</sup>

Chin-Meng Wang <sup>(2)(4)</sup> You-Jun Lin <sup>(3)</sup> Chih-Yin Chen <sup>(2)</sup> and Fang-Chueh Liu <sup>(2)</sup>

Received: Jan. 8, 2020; Accepted: Jun. 15, 2020

## Abstract

The purpose of this study aims to evaluate the effect of dietary supplementation of *Bacillus coagulans* on growth performance, blood biochemical values and fecal microbial of weaned pigs. Thirty-two weaned pigs (Landrace × Duroc) at 4-wks of age were used and grouped in two by weight as the control and treatment groups. *Bacillus coagulans* was added in the diet for the treatment group with the concentration of  $10^8$  CFU/kg. Feed intake, body weight gain, blood cells, biochemical values, and fecal microbial were measured during the study period. The results showed that feed intake of piglets in the two groups was 0.866 and 0.863 kg/piglet/day, respectively, and the body weight gain was 0.249 and 0.262 kg/piglet/day, respectively, which did not show significant difference in feed intake and weight gain *Bacillus coagulans* added to feed improved the feed efficiency (body weight gain/feed intake), up 6.2% and resulting in 0.286 and 0.305 in the groups, respectively. The statistical significance ( $P = 0.10$ ) reached significance level by the 8 weeks of age (0.283 and 0.325;  $P < 0.05$ ). The ratios of neutrophil to lymphocytes between the two groups were close, with no indication of significant influence of adding *Bacillus coagulans* to the feed in order to reduce stress on weaned pigs, or placing weaned pigs under more stressed conditions. The bacterial counts of *Escherichia coli*, Coliforms, Gram-negative bacteria, and *Lactobacillus* colonies in the feces of the two groups were also close. In conclusion, the addition of *Bacillus coagulans* in diet could not significantly improve the feed intake and daily weight gain in weaned pigs, which however can improve the feed efficiency, especially when piglets are 8-week old.

Key words: Weaned piglet, *Bacillus coagulans*, Growth performance.

---

(1) Contribution No. 2642 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Animal Industry Division, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(3) Nutrition Division, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(4) Corresponding author, E-mail: cmwang@mail.tlri.gov.tw.

# 乾物率及不同接種處理對燕麥與燕麥 / 苜蓿 混植長期青貯品質的影響<sup>(1)</sup>

王紓愍<sup>(2)(3)</sup> 游翠凰<sup>(2)</sup> 陳嘉昇<sup>(2)</sup>

收件日期：109 年 4 月 24 日；接受日期：109 年 7 月 1 日

## 摘 要

本研究目的為探討不同接種條件對低、高乾物率的燕麥 (29.8%、50.7%) 與燕麥 / 苜蓿混植 (33.8%、62.6%) 青貯 18 個月的影響。接種處理包括下列 7 種：對照 (不接種)、處理 A (接種 *Lactobacillus acetotolerans* SOR-4,  $4 \times 10^6$  cfu/kg)、處理 B (接種 *Lactobacillus buchneri* TNC-5,  $2 \times 10^8$  cfu/kg)、處理 C (接種 *Lactobacillus plantarum* L10531,  $2 \times 10^6$  cfu/kg)、處理 D (接種商業菌劑, *L. plantarum*, *Lactobacillus casei*,  $2 \times 10^8$  cfu/kg)、處理 E (接種商業菌劑 + *L. acetotolerans* SOR-4)、處理 F (接種商業菌劑 + *L. buchneri* TNC-5)。材料密封於真空袋, 每處理 4 重複, 貯放於室內。由變方分析結果, 材料、乾物率及接種為青貯發酵重要影響因子, 且因子間有交感效應。4 批材料的整體表現 (pH 值、發酵品質、青貯評分) 以乾物率 33.8% 的燕麥 / 苜蓿表現最佳、依次為乾物率 50.7% 的燕麥及 62.6% 的燕麥 / 苜蓿, 乾物率 29.8% 的燕麥平均表現則為最差。大部分狀況下, 接種表現均優於對照。接種處理中以接種 *L. acetotolerans* SOR-4、商業菌劑與同時接種二者的平均表現較佳, 而接種 *L. buchneri* TNC-5 的表現較差, 顯示對燕麥及燕麥 / 苜蓿的長期保存效果而言, 以同質乳酸發酵菌較佳, 另 *L. acetotolerans* SOR-4 具開發為青貯菌劑的應用潛力。

關鍵詞：燕麥、苜蓿、青貯、接種。

## 緒 言

苜蓿與燕麥為國內進口乾草的重要品項, 也是行政院農業委員會畜產試驗所 (簡稱畜試所) 為提高熱帶牧草蛋白質含量與冬季牧草不足而持續研究的主題之一 (蕭等, 2003; 陳等, 2011; 朱等, 2018)。雖然燕麥已在中部地區進行較大規模的試作並估算生產效益 (梁等, 2018), 畜試所恆春分所多年的研究也顯示苜蓿可以在南臺灣生長良好 (王等, 2010; 王等, 2018), 然而國產燕麥、苜蓿在現場實際應用上仍然不多, 主要是國內耕地比較效益與調製不易等問題, 限制了農民投入的意願。

苜蓿與燕麥可以調製為乾草及青貯草, 但在臺灣的不穩定氣候下以青貯調製較宜。青貯發酵與乾燥是保存牧草營養的二大方法, 一般而言, 乾草調製的乾物損失主要發生在收穫刈割至乾燥期間, 特別是因為淋雨造成的直接養分流失與延長乾燥時間後的品質損失, 影響尤其顯著。以苜蓿而言, 葉片在乾燥過程的掉落及長時間田間曝曬都顯著降低營養價值 (Rotz and Muck, 1994), 而燕麥則較易因莖秆乾燥不足而在倉儲時發霉。相對而言, 青貯是藉微生物發酵產酸, 降低材料的 pH 值以抑制不良微生物的活動, 而達到保存的目的, 其調製過程的田間損失較低, 可以避免牧草為了等待合適收穫乾燥時期而過度生長 (老化), 減少田間作業時間以及降低氣候不穩定之風險 (Rotz and Muck, 1994; Ohmomo *et al.*, 2002)。

青貯方法一類是將牧草刈割細切後裝填至青貯槽、青貯袋 (香腸袋) 或青貯桶等容器內, 利用裝填擠壓動作將空氣排出, 之後再將容器密封就能保存牧草營養, 如玉米青貯料。另外則是採用膠膜捆包的方式, 在草捆外以 PE 膠膜捆包 4 – 6 層也可以達到青貯保存的目的。通常, 牧草表面菌相控制在適當的含水率與無氧環境下, 能自然誘發乳酸菌成為優勢菌種 (Ni *et al.*, 2017), 但對部分水溶性碳水化合物含量較低及酸鹼緩衝能力強之材料, 則接種乳

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2643 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所恆春分所。

(3) 通訊作者, E-mail: smwang@mail.tlri.gov.tw。



酸菌可以顯著改善青貯發酵，減少乾物損失，甚至增進適口性 (游等, 2012; 王等, 2017; 王等, 2018; Ohmomo *et al.*, 2002)。青貯是各種微生物與欲保存之牧草材料間交互作用後的結果，控制良好時能達到良好的營養保存，但含水率與菌相無法配合時則可能產生極大的乾物損失。不同牧草種類、收穫成熟度及萎凋狀況會產生特定的含水率與菌相，必須依可以採行的青貯調製方式，決定收穫含水率以獲得較佳的保存效果 (Rotz and Muck, 1994; Borreani, *et al.*, 2017)，通常槽式青貯的乾物率在 30% 上下，而膠膜捆包則需較高的乾物率。另青貯時間也會對青貯反應有明顯的影響，王等 (2008; 2012; 2014) 進行全株水稻、高水分玉米粒及青割玉米的青貯研究發現，青貯時間拉長容易發生乳 / 乙酸比降低，及丁酸上升等反應，但較少針對長期青貯條件進行的研究。

本研究討論乾物率及接種對燕麥與燕麥 / 苜蓿混植長期青貯的影響，企圖以多種條件及 18 個月的長期青貯，探討不同接種菌株的表現潛力及其可能應用，以提供調製參考。

## 材料及方法

### I. 材料

材料收穫自畜試所恆春分所田間，105 年 3 月 1 日分別收穫燕麥及燕麥 / 苜蓿混植，每種材料攤開在蔭棚下萎凋，於萎凋 4 小時及 24 小時後進行青貯。

### II. 青貯處理

青貯時材料均勻分為 7 堆，分別進行下列處理：接種水 (對照, CK)、接種處理 A (自篩菌株 *L. acetotolerans* SOR-4,  $4 \times 10^6$  cfu/kg)、接種處理 B (自篩菌株 *L. buchneri* TNC-5,  $2 \times 10^8$  cfu/kg)、接種處理 C (自篩菌株 *L. plantarum* L10531,  $2 \times 10^6$  cfu/kg)、接種處理 D (商業菌劑，畜試所恆春分所技轉菌株，*L. plantarum*, *L. casei*,  $2 \times 10^8$  cfu/kg)、接種處理 E (商業菌劑 + *L. acetotolerans* SOR-4)、接種處理 F (商業菌劑 + *L. buchneri* TNC-5)。接種處理之菌株均為畜試所恆春分所自行培養，因此每種處理的接種菌數不完全一致。處理後將材料混合均勻，置於真空塑膠袋中，每袋 1 kg，添加 1 mL 水或菌株處理，密封。每處理 4 重複。貯存 18 個月後開封，測定青貯發酵品質。

### III. 分析方法

- (i) 試驗材料組成分析：前述各試驗材料於試驗前各自取樣，於 80°C 烘乾後磨粉，粗蛋白質 (crude protein, CP) 含量依照 AOAC (1984) 之方法測定；酸洗纖維 (acid-detergent fiber, ADF)、中洗纖維 (neutral-detergent fiber, NDF) 則依照 van Soest (1991) 方法以濾袋法測定 (Ankom 200)，每一樣品重複 2 次。本試驗所有材料之營養組成如表 1。

表 1. 燕麥及燕麥 / 苜蓿萎凋不同時間後的乾物率及化學組成

Table 1. Dry matter content and chemical compositions of oat and oat/alfalfa after wilting for different hours

Forage	Wilting	Dry matter	Crude protein	Neutral detergent fiber	Acid detergent fiber
	Hr.	%	-----	% dry base -----	
Oat	4	29.8	15.45	60.73	35.81
	24	50.7	16.74	59.02	36.91
Oat/alfalfa	4	33.8	18.48	53.49	28.95
	24	62.6	16.50	55.68	33.26

- (ii) 半乾青貯品質分析：pH 值為 20 g 新鮮青貯料加蒸餾水 180 mL，打碎過濾後以酸鹼度計測定之值。乳酸、丁酸、丙酸及乙酸之測定以氣相層析儀依 Jones and Kay (1976) 的方法進行，將前述青貯萃取液經過陽離子管柱，洗出液以 0.05 N tetrabutyl ammonium hydroxide (TBAH) 滴定至 pH 為 8，70°C 下烘乾，加入定量丙酮溶解，並依 TBAH 滴定量，加入適量 benzyl bromide 與揮發性脂肪酸反應，樣品製備完成，再以氣相層析儀 (Shimadzu, GC-2014) 分析含量。依青貯料中乳酸、丁酸及乙酸當量分別占測定乙酸、丙酸、丁酸與乳酸四者總當量之百分比進行評分，再將 3 項總加所得即為青貯品質評分 (Flieg's score)，評分 40 以下表示青貯失敗、40 – 60 分為可接受、60 – 80 分為好的青貯、80 分以上為發酵優良的青貯。
- (iii) 統計：試驗結果以 SAS 軟體 (2002) 之 GLM procedure 進行變方分析，主效應為材料、含水率 (萎凋處理)

及接種，各主效應均為固定型，以鄧肯氏法 (Duncan's test) 測驗接種處理間的差異顯著性。

## 結 果

### I. 材料特性與青貯品質變方分析

本試驗材料青貯前的營養組成見表 1，萎凋 4 小時燕麥及燕麥 / 苜蓿的乾物率在 30% 上下，萎凋 24 小時二者的乾物率分別為 50.7% 及 62.6%，造成二種材料乾物率差異應與苜蓿萎凋時失水率較高有關。燕麥 / 苜蓿混植的粗蛋白質含量僅略高於燕麥，中、酸洗纖維含量則略低於燕麥，因收穫材料中燕麥的占比較高 (約占 2/3)。由變方分析表 (表 2) 乾物率高低及接種兩因子對 pH 值有顯著影響，材料因子不顯著，但材料與乾物率、材料與接種及乾物率及接種有顯著交感效應；青貯品質評分則是接種影響顯著，以及材料及乾物率、材料與接種及乾物率及接種間交感效應顯著；乙酸含量則除材料及乾物率交感不顯著外，其餘各因子均影響顯著；乳酸含量則材料因子不顯著外其餘各因子都影響顯著。分析顯示，材料、乾物率及接種是影響青貯的重要因子，且因子間有交互作用。

表 2. 乾物率及接種對燕麥、燕麥 / 苜蓿青貯品質影響之變方分析表

Table 2. Analysis of variance for the silage quality of oat and oat/alfalfa silages affected by different dry matter contents and inoculation treatments

Source of variance	df	Mean square					
		pH	Flieg's score	Acetic acid	Propionic acid	Butyric acid	Lactic acid
Dry matter (DM)	1	4.39**	21.0	259.5**	0.50	3.26*	161.7**
Inoculants (I)	6	0.51**	1,941.9**	5.2**	0.14	0.80	22.6**
Materials (M)	1	0.44	8.4	18.2**	0.68**	3.82*	0.1
M × DM	1	0.92**	8,142.9**	0.7	0.72*	3.12*	47.4**
M × I	6	0.23**	545.7**	3.4**	0.13	0.82	8.2**
DM × I	6	0.78**	1,570.1**	4.4**	0.09	0.62	14.3**
M × DM × I	6	0.12	158.0	4.4**	0.10	0.70	3.2**
Error	67	0.05	80.9	0.22	0.08	0.31	0.5

\* P < 0.05.

\*\* P < 0.01.

### II. 接種處理在不同乾物率與材料下的表現

表 3 為低乾物率燕麥在不同接種條件下的青貯發酵表現。不接種者在青貯 18 個月後發酵產酸以乙酸為主，另接種 *L. buchneri* TNC-5 (處理 B)、*L. plantarum* L10531 (處理 C) 及商業菌 + *L. buchneri* TNC-5 (處理 F) 等處理發酵產酸也以乙酸為主，且有大於 0.5% 以上的高量丁酸產生，表現不佳。各處理中表現最佳者為接種 *L. acetotolerans* SOR-4 (處理 A)，其 pH 值 3.86、青貯評分 95，乳酸含量為 8.66%，顯著 (P < 0.05) 優於其他各種處理，其次為接種商業菌 + *L. acetotolerans* SOR-4 (處理 E) 與接種商業菌 (處理 D) 兩處理，其 pH 分別為 4.43 及 4.77，乳酸含量分別為 4.93% 及 3.20%，乙酸含量分別為 4.03% 及 5.32%，發酵評分分別在好及可接受等級。

表 4 為高乾物率燕麥的青貯表現。對照處理表現最差，發酵產酸以乙酸為主，但青貯評分 47 仍在可接受的等級，接種處理中以接種 *L. buchneri* TNC-5 的評分 55 最低，乙酸含量與乳酸含量相近，其他接種處理的發酵產酸都以乳酸為主，青貯發酵品質在好至優等級。各處理中接種商業菌及 *L. acetotolerans* SOR-4 二組的乳酸含量分為 2.97% 及 2.84%，顯著 (P < 0.05) 高於對照組及接種 *L. buchneri* TNC-5 組之 0.84% 及 1.10%。

表 5 為低乾物率燕麥 / 苜蓿之青貯表現，除接種 *L. buchneri* TNC-5 與接種商業菌 + *L. buchneri* TNC-5 二處理的表現為可接受等級外，其他所有處理的青貯發酵品質都在好至優的等級，其中對照、接種 *L. acetotolerans* SOR-4、接種商業菌 + *L. acetotolerans* SOR-4 三組的 pH 值分別為 4.40、4.08 及 4.26；乳酸含量分別為 5.10%、5.94% 及 5.94%；青貯評分分別為 82.7、87.3 及 82.3，表現極佳。

表 6 為高乾物率燕麥 / 苜蓿之青貯表現，以青貯評分而言，所有處理青貯評分介於 41.5 – 67.0 都在可接受

至好的等級，但由產酸量來看，則發現整體發酵量不高，乙酸含量介於 0.28 – 0.57% 間，乳酸含量介於 0.05 – 0.64% 間，明顯低於前述三組實驗，顯示微生物的活動受限，應與含水率偏低與植體酸鹼緩衝能力較高有關。

表 3. 接種對於低乾物率燕麥之青貯品質影響

Table 3. Effect of inoculants on silage quality of oat with low dry matter content

Treatment*	Dry matter	pH	Flieg's score	Acetic acid	Propionic acid	Butyric acid	Lactic acid
	%			% DM			
Control	23.9 <sup>b</sup>	4.59 <sup>de</sup>	48.0 <sup>cd</sup>	8.28 <sup>a</sup>	0.03	0.05 <sup>b</sup>	0.21 <sup>c</sup>
A	26.8 <sup>a</sup>	3.86 <sup>c</sup>	94.8 <sup>a</sup>	1.50 <sup>d</sup>	0.03	0.10 <sup>b</sup>	8.66 <sup>a</sup>
B	23.8 <sup>b</sup>	5.40 <sup>a</sup>	24.3 <sup>e</sup>	4.60 <sup>bc</sup>	0.80	2.26 <sup>a</sup>	0.34 <sup>de</sup>
C	25.4 <sup>ab</sup>	5.07 <sup>abc</sup>	35.5 <sup>de</sup>	5.44 <sup>b</sup>	0.68	0.66 <sup>ab</sup>	0.54 <sup>de</sup>
D	25.5 <sup>ab</sup>	4.77 <sup>bcd</sup>	53.0 <sup>bc</sup>	5.32 <sup>b</sup>	0.02	0.05 <sup>b</sup>	3.20 <sup>c</sup>
E	26.2 <sup>ab</sup>	4.43 <sup>d</sup>	66.3 <sup>b</sup>	4.03 <sup>c</sup>	0.04	0.06 <sup>b</sup>	4.93 <sup>b</sup>
F	24.5 <sup>ab</sup>	5.13 <sup>ab</sup>	30.3 <sup>e</sup>	4.84 <sup>bc</sup>	0.58	1.58 <sup>ab</sup>	1.56 <sup>d</sup>

\*Control: no inoculation, A: inoculated with *L. acetotolerans* SOR-4, B: inoculated with *L. buchneri* TNC-5, C: inoculated with *L. plantarum* L10531, D: inoculated with commercial inoculant, E: inoculated with commercial inoculant and *L. acetotolerans* SOR-4, F: inoculated with commercial inoculant and *L. buchneri* TNC-5.

a, b, c, d, e Means in the same column with different superscripts differ ( $P < 0.05$ ).

表 4. 接種對於高乾物率燕麥之青貯品質影響

Table 4. Effect of inoculants on silage quality of oat with high dry matter content

Treatment*	Dry matter	pH	Flieg's score	Acetic acid	Propionic acid	Butyric acid	Lactic acid
	%			% DM			
Control	48.4 <sup>bc</sup>	5.65 <sup>a</sup>	47.3 <sup>d</sup>	1.23 <sup>ab</sup>	0.016 <sup>c</sup>	0.054	0.84 <sup>b</sup>
A	48.6 <sup>bc</sup>	4.77 <sup>b</sup>	72.3 <sup>abc</sup>	1.16 <sup>abc</sup>	0.023 <sup>bc</sup>	0.078	2.84 <sup>a</sup>
B	50.2 <sup>b</sup>	4.76 <sup>b</sup>	55.3 <sup>cd</sup>	1.28 <sup>ab</sup>	0.028 <sup>b</sup>	0.020	1.10 <sup>b</sup>
C	53.4 <sup>a</sup>	5.08 <sup>b</sup>	84.0 <sup>ab</sup>	0.56 <sup>c</sup>	0.029 <sup>b</sup>	0.019	1.57 <sup>ab</sup>
D	48.2 <sup>bc</sup>	4.51 <sup>b</sup>	92.5 <sup>a</sup>	0.84 <sup>bc</sup>	0.026 <sup>b</sup>	0.017	2.97 <sup>a</sup>
E	50.0 <sup>bc</sup>	5.04 <sup>b</sup>	81.3 <sup>ab</sup>	0.78 <sup>bc</sup>	0.032 <sup>b</sup>	0.015	1.78 <sup>ab</sup>
F	47.3 <sup>c</sup>	4.90 <sup>b</sup>	65.3 <sup>bcd</sup>	1.50 <sup>a</sup>	0.045 <sup>a</sup>	0.061	2.07 <sup>ab</sup>

\*The same as Table 3.

a, b, c, d Means in the same column with different superscripts differ ( $P < 0.05$ ).

表 5. 接種對於低乾物率燕麥 / 苜蓿之青貯品質影響

Table 5. Effect of inoculants on silage quality of oat/alfalfa with low dry matter content

Treatment*	Dry matter	pH	Flieg's score	Acetic acid	Propionic acid	Butyric acid	Lactic acid
	%			% DM			
Control	33.0 <sup>a</sup>	4.40 <sup>bc</sup>	82.7 <sup>a</sup>	2.11 <sup>c</sup>	0.014 <sup>a</sup>	0.055	5.10 <sup>ab</sup>
A	31.4 <sup>bc</sup>	4.08 <sup>d</sup>	87.3 <sup>a</sup>	2.29 <sup>c</sup>	0.010 <sup>ab</sup>	0.006	5.94 <sup>a</sup>
B	30.5 <sup>c</sup>	4.63 <sup>a</sup>	51.3 <sup>c</sup>	4.84 <sup>a</sup>	0.015 <sup>a</sup>	0.013	1.84 <sup>d</sup>
C	31.4 <sup>bc</sup>	4.33 <sup>bc</sup>	69.0 <sup>b</sup>	3.84 <sup>b</sup>	0.011 <sup>ab</sup>	0.011	4.41 <sup>ab</sup>
D	32.8 <sup>a</sup>	4.53 <sup>ab</sup>	62.3 <sup>bc</sup>	3.93 <sup>b</sup>	0.000 <sup>b</sup>	0.012	3.98 <sup>bc</sup>
E	32.1 <sup>ab</sup>	4.26 <sup>cd</sup>	82.3 <sup>a</sup>	2.55 <sup>c</sup>	0.013 <sup>a</sup>	0.037	5.94 <sup>a</sup>
F	30.9 <sup>bc</sup>	4.62 <sup>a</sup>	53.5 <sup>c</sup>	5.06 <sup>a</sup>	0.004 <sup>ab</sup>	0.012	2.98 <sup>cd</sup>

\*The same as Table 3.

a, b, c, d Means in the same column with different superscripts differ ( $P < 0.05$ ).

表 6. 接種對於高乾物率燕麥 / 苜蓿之青貯品質影響

Table 6. Effect of inoculants on silage quality of oat/alfalfa with high dry matter content

Treatment*	Dry matter	pH	Flieg's score	Acetic acid	Propionic acid	Butyric acid	Lactic acid
	%			----- % DM -----			
Control	60.7 <sup>c</sup>	5.25 <sup>a</sup>	41.5 <sup>d</sup>	0.32 <sup>b</sup>	0.039 <sup>ab</sup>	0.009	0.05 <sup>c</sup>
A	63.3 <sup>a</sup>	5.17 <sup>ab</sup>	43.8 <sup>cd</sup>	0.28 <sup>b</sup>	0.035 <sup>b</sup>	0.006	0.07 <sup>c</sup>
B	61.8 <sup>bc</sup>	4.78 <sup>d</sup>	53.0 <sup>abcd</sup>	0.57 <sup>a</sup>	0.040 <sup>ab</sup>	0.005	0.40 <sup>ab</sup>
C	62.2 <sup>ab</sup>	5.08 <sup>ab</sup>	51.8 <sup>bcd</sup>	0.32 <sup>b</sup>	0.037 <sup>ab</sup>	0.008	0.22 <sup>bc</sup>
D	62.3 <sup>ab</sup>	5.06 <sup>ab</sup>	67.0 <sup>a</sup>	0.32 <sup>b</sup>	0.037 <sup>ab</sup>	0.006	0.41 <sup>ab</sup>
E	62.1 <sup>ab</sup>	5.00 <sup>bc</sup>	61.8 <sup>ab</sup>	0.39 <sup>b</sup>	0.045 <sup>a</sup>	0.009	0.45 <sup>ab</sup>
F	61.0 <sup>bc</sup>	4.83 <sup>cd</sup>	57.5 <sup>ab</sup>	0.55 <sup>a</sup>	0.046 <sup>a</sup>	0.012	0.64 <sup>a</sup>

\*The same as Table 3.

a, b, c, d Means in the same column with different superscripts differ ( $P < 0.05$ ).

## 討 論

青貯調製的原則解釋起來很簡單，然而實際上發生的青貯過程卻非常複雜，且受到多項因子的影響，如材料收穫條件、含水率、水溶性碳水化合物含量、植體酸鹼緩衝能力及表面菌相等，且因子間並非獨立，一項的改變會讓其他的條件也跟著改變，因此其表現的結果會非常多變。由表 3 至表 6 顯示，低、高乾物率燕麥與低、高乾物率燕麥 / 苜蓿 4 組試驗的結果非常不同，以對照組而言，表現最佳者為低乾物率燕麥 / 苜蓿 (33.8%)、次為高乾物率燕麥 (50.7%)、低乾物率燕麥 (29.8%)，最差為高乾物率燕麥 / 苜蓿 (62.6%)，其乳酸含量分別為 5.1% (表 5)、0.84% (表 4)、0.21% (表 3) 及 0.05% (表 6)。乾物率 30% 左右的燕麥是一般認為適當的青貯條件，朱等 (2018) 的研究即顯示在相似條件下青貯 2 個月的燕麥青貯料乳酸含量介於 3% – 5% 間，而本實驗的含量僅 0.21% (表 3)，相差極大，由於同處理之乙酸含量為 8.28% (表 3)，推測可能與長時間青貯 (18 個月) 下發生異質乳酸發酵有關 (Rotz and Muck, 1994; Borreani *et al.*, 2017)；而低乾物率的燕麥 / 苜蓿 (33%) 在長時間青貯下仍維持在優良狀態的原因不明，是否與材料中含有有豆科致緩衝能力較高、發酵較慢、或者具有特殊菌相等有關，須進一步實驗檢測。Ni *et al.* (2017) 以變性梯度凝膠電泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 及次世代定序 (next-generation sequencing, NGS) 兩種方法，檢測義大利黑麥草、青割玉米及苜蓿青貯前後的菌相變化，發現青貯前、後與牧草間有明顯差異，且無法以牧草青貯前的菌相預測其青貯料的菌相；經 2 個月青貯，各種青貯料的菌相均以乳酸菌為主，但不同牧草的主要菌種類別不同，義大利黑麥草以球菌之明串珠菌及小球菌屬 (*Leuconostoc* spp. and *Pediococcus* spp.) 為主，青割玉米以乳酸桿菌屬 (*Lactobacillus* spp.) 為主，而苜蓿則以腸球菌屬 (*Enterococcus* spp.) 為主。另 Rotz and Muck (1994) 及 Ohmomo *et al.* (2002) 均表示自然發酵下，青貯前期發酵以球菌為主而後期則以乳酸桿菌為主，因球菌耐酸性較差。另 Zhou *et al.* (2016) 對青貯玉米表面菌相的研究發現，不同貯存溫度下的優勢乳酸菌種不一；Borreani *et al.* (2017) 表示不同含水率下表面菌相的優勢族群不同。

本試驗計有 6 種接種處理：3 組接種單一菌株分別為：處理 A (*L. acetotolerans* SOR-4)、處理 B (*L. buchneri* TNC-5) 及處理 C (*L. plantarum* L10531)，接種 2 種菌株者為處理 D (商業菌劑，*L. plantarum*、*L. casei*)，及接種 3 種菌株的處理 E (*L. plantarum*、*L. casei*、*L. acetotolerans* SOR-4) 及處理 F (*L. plantarum*、*L. casei*、*L. buchneri* TNC-5)。各處理在不同乾物率及材料下的表現不一致，整體而言，以處理 A、D、E 的表現較佳，而處理 B、C 及 F 的發酵結果較不理想。接種表現似與接種菌株本身表現能力的關係較高，而與菌種類別多寡關係較小。本試驗中所採用的菌株均為畜試所恆春分所自行篩選保存。其中 *L. plantarum*、*L. casei* 及 *L. buchneri* 是一般青貯菌劑常用的菌種 (Ohmomo *et al.*, 2002; Holzer *et al.*, 2003; Nishino and Touno, 2005)，*L. plantarum* 為同質乳酸發酵菌，添加目的在增加乳酸菌對好氧菌的養分競爭，促進乳酸發酵減少養分消耗；*L. buchneri* 為異質乳酸發酵菌，添加的目的在提高青貯料的乙酸含量，增加開封後穩定性，而 *L. acetotolerans* 則未見之用於已開發的青貯菌劑中。由本試驗結果，接種中加入 *L. buchneri*、TNC-5 的反應較不理想，不僅乳 / 乙酸比低，同時有增加丁酸含量的趨勢 (表 3)，推測可能在長期貯存下，接種異質發酵菌的乳酸產生量較低，無法抑制丁酸菌的活動。另處理 C (*L. plantarum* L10531) 與商業菌劑相較表現較差，可能與接種量較低及該菌株的個體特性有關，另商業菌劑中尚可能包含 *L. casei* 與 *L. plantarum* 的協作效果。*L. acetotolerans* 是一種耐乙酸、耐酒精能力極強的同質乳酸菌，常被視為啤酒或米酒的污染菌，一



般被認為不易培養 (Entan *et al.*, 1986; Piao *et al.*, 2019)，然而在多篇青貯相關研究中發現 *L. acetotolerans* 在青貯料的表面菌相中出現頻繁 (Li and Nishino, 2011; Muck, 2013; Han *et al.*, 2014; Ni *et al.*, 2017; Han *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2019)，但研究者們尚未能提出其重要性或意義。Han *et al.* (2014) 及 Han *et al.* (2018) 表示 *L. acetotolerans* 出現於所有青貯完全混合日糧 (TMR) 及窖式玉米青貯採樣之中，同時餵飼的乳牛糞便中也有 *L. acetotolerans* 出現，顯示其可能具耐消化能力。

藉助進步的新儀器與分析方法，已能逐步釐清青貯發酵的參與微生物、發酵產物與材料及青貯條件差異下的各種反應變動 (Muck, 2013; Zhou, *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2019)，這些研究結果可以讓研究人員更加清楚青貯過程，雖然已知材料狀態、調製方法、菌種添加等與青貯反應彼此之間都有緊密的關聯，但仍不易準確預測結果，試驗結果為所有效應的綜合反應。

## 結 論

對燕麥及燕麥 / 苜蓿的長期保存效果而言，較佳的乾物率區間應介於 34 — 51% 間，接種同質乳酸發酵菌可以維持較佳的發酵狀態，另 *L. acetotolerans* SOR-4 具開發為青貯菌劑的應用潛力。

## 參考文獻

- 王紓愍、陳嘉昇、謝文彰、游翠鳳、劉信宏。2008。成熟度、接種處理與青貯保存時間對全株水稻青貯品質的影響。畜產研究 41：153-162。
- 王紓愍、陳嘉昇、游翠鳳、劉信宏。2010。豆科牧草與綠肥作物之氮產量與季節性變動畜產研究 43：339-350。
- 王紓愍、游翠鳳、陳嘉昇。2012。不同材料高水分玉米的青貯發酵。畜產研究 45：355-368。
- 王紓愍、陳嘉昇。2014。堆積、裝填密度與貯存時間對玉米青貯料發酵品質及開封後穩定性的影響。畜產研究 47：187-194。
- 王紓愍、游翠鳳、劉信宏、陳嘉昇。2017。接種與萎凋對盤固草 / 苜蓿混植草青貯發酵的影響。畜產研究 50：134-139。
- 王紓愍、游翠鳳、陳嘉昇。2018。接種菌株對苜蓿半乾青貯適口性的影響。畜產研究 51：286-292。
- 朱明宏、王紓愍、游翠鳳、陳嘉昇。2018。黑燕麥在不同收穫期之芻料產量、品質及青貯調製研究。畜產研究 51：16-23。
- 陳嘉昇、王紓愍、游翠鳳、劉信宏。2011。低肥料投入的有機芻料生產研究—指草屬 (*Digitaria*) 牧草與苜蓿 (*Medicago sativa*) 混植。畜產研究 44：37-50。
- 梁世祥、葉益男、王思涵、蕭振文、徐濟泰、吳榮杰。2018。臺灣冬季裡作栽培芻料用燕麥活化休耕地之經濟效益評估。畜產研究 51：217-223。
- 游翠鳳、王紓愍、劉信宏、陳嘉昇。2012。青貯菌劑的篩選及對苜蓿半乾青貯品質的影響。畜產研究 45：209-216。
- 蕭素碧、林正斌、許進德。2003。臺灣引進豆科牧草產量與品質之評估。畜產研究 36：45-52。
- A.O.A.C. 1984. Official methods of analysis. 14<sup>th</sup> ed. Assoc. Offic. Anal. Chem., Washington DC.
- Borreani, B., G., E. Tabacco, R. J. Schmidt, B. J. Holmes and R. E. Muck. 2017. Silage review: factors affecting dry matter and quality losses in silages. J. Dairy Sci. 101: 3952-3979.
- Entan, E., H. Masai and K. Suzuki. 1986. *Lactobacillus acetotolerans*, a new species from fermented vinegar broth. Int. J. Syst. Bacteriol. 36: 544-549.
- Han, H., Y. Ogata, Y. Yamamoto, S. Nagao and N. Nishino. 2014. Identification of lactic acid bacteria in the rumen and feces of dairy cows fed total mixed ration silage to assess the survival of silage bacteria in the gut. J. Dairy Sci. 97: 5754-5762.
- Han, H., C. Wang, Y. Li, Q. Xu, G. Li, T. T. Minh and N. Nishino. 2018. Identification of lactic acid bacteria in the feces of dairy cows fed whole crop maize silage to assess the survival of silage bacteria in the gut. Anim. Sci. J. 89: 97-104.
- Holzer, M., E. Mayrhuber, H. Danner and R. Braun. 2003. The role of *Lactobacillus buchneri* in forage preservation. Trends in Biotech. 21: 282-287.

- Jones, D. W. and J. J. Kay. 1976. Determination of volatile fatty acid C1-C6 and lactic acid in silage juice. *J. Sci. Food Agric.* 27: 1005-1014.
- Li, Y. and N. Nishino. 2011. Monitoring the bacterial community of maize silage stored in a bunker silo inoculated with *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri*. *J. Appl. Microb.* 110: 1561-1570.
- Muck, R. E. 2013. Recent advances in silage microbiology. *Agri. Food Sci.* 22: 3-15.
- Ni, K., T. T. Minh, T. T. M. Tu, T. Tsuruta, H. Pang and N. Nishino. 2017. Comparative microbiota assessment of wilted Italian ryegrass, whole crop corn, and wilted alfalfa silage using denaturing gradient gel electrophoresis and next-generation sequence. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101: 1385-1394.
- Nishino, N. and Touno, E. 2005. Ensiling characteristics and aerobic stability of direct-cut and wilted grass silages inoculated with *Lactobacillus casei* or *Lactobacillus buchneri*. *J. Sci. Food Agric.* 85: 1882-1888.
- Ohmomo, S., O. Tanaka, H. K. Kitamoto and Y. Cai. 2002. Silage and microbial performance, old story but new problems. *JARQ* 36: 59-71.
- Piao, M., Y. Wang, F. Wang, T. Zhen and Y. Deng. 2019. Induction of viable but putatively non-culturable *Lactobacillus acetolerans* by thermosonication and its characteristics. *LWT-Food Sci. Tech.* 109: 313-318.
- Rotz, C. A. and R. E. Muck. 1994. Changes in forage quality during harvest and storage. In : Forage quality, evaluation, and utilization. Eds. Fahey, Jr. G. C., M. Collins, D. R. Mertens and L. E. Moser. American Society of Agronomy, Inc. Madison, pp. 828-868.
- SAS. 2002. SAS version 9.00. Statistical Analysis Institute, Inc., Cary. N.C. USA.
- van Soest, P. J., J. B. Robertson and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74: 3583-3597.
- Xu, D., W. Ding, W. Ke, F. Li, P. Zhang and Xusheng Guo. 2019. Modulation of metabolome and bacteria community in whole crop corn silage by inoculating homo-fermentative *Lactobacillus plantarum* and hetero-fermentative *Lactobacillus buchneri*. *Front. Microbiol.* 9: 1-14.
- Zhou, Y., P. Drouin and C. Lafreniere. 2016. Effect of temperature (5-25°C) on epiphytic lactic acid bacteria populations and fermentation of whole-plant corn silage. *J. Appl. Microbiol.* 121: 657-671.

# Effect of dry matter content and inoculants on oat and oat/alfalfa mixture after long-term ensiling <sup>(1)</sup>

Shu-Min Wang <sup>(2)(3)</sup> Tsui-Huang Yu <sup>(2)</sup> and Chia-Sheng Chen <sup>(2)</sup>

Received: Apr. 24, 2020; Accepted: Jul. 1, 2020

## Abstract

The purpose of this study aims to investigate the effect of different inoculants on four-set materials ensiling, including oat with dry matter content 29.8% and 50.7%, and oat/alfalfa mixture with dry matter content 33.8% and 62.6%, respectively, for a period of 18 months. The inoculation includes the following 7 treatments: control (no inoculant), Treatment A (inoculated with *Lactobacillus acetotolerans* SOR-4,  $4 \times 10^6$  cfu/kg), Treatment B (inoculated with *Lactobacillus buchneri* TNC-5,  $2 \times 10^8$  cfu/kg), Treatment C (inoculated with *Lactobacillus plantarum* L10531,  $2 \times 10^6$  cfu/kg), Treatment D (inoculated with commercial inoculant, *L. plantarum* and *Lactobacillus casei*,  $2 \times 10^8$  cfu/kg), Treatment E (inoculated with commercial inoculant and *L. acetotolerans* SOR-4) and Treatment F (inoculated with commercial inoculant and *L. buchneri* TNC-5). The material was treated and sealed in a vacuum bag separately, with four replications per treatment. From the results of variance analysis, material, it showed that dry matter content and inoculation were important factors that affected silage fermentation. In addition, there were interaction effects among these factors. The overall performance (including pH, fermentation quality and Flieg's score) of oat/alfalfa with dry matter content 33.8% was the best among these four-set materials, followed by those of oat with dry matter content 50.7% and oat/alfalfa with dry matter content 62.6%. The overall performance of oat with dry matter content 29.8% showed the worst performance. In most conditions, the fermentation quality of inoculations was better than that of control. However, the treatments inoculated with *L. acetotolerans* SOR-4, commercial inoculant, and commercial inoculant with *L. acetotolerans* SOR-4 had better silage quality. On the contrary, the effect inoculated with *L. buchneri* TNC-5 was poor. The results of this study showed that oats and oats/alfalfa inoculated with homo-fermentative inoculant performed better during the long-period preservation. Further, *L. acetotolerans* SOR-4 had the potential for developing as the silage additive.

Key words: Oat, Alfalfa, Ensiling, Inoculation.

---

(1) Contribution No. 2643 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Hengchun Branch, COA-LRI, Pingtung 94644, Taiwan, R. O. C.

(3) Corresponding author, E-mail: ctchang@mail.tlri.gov.tw.

# 飼糧中添加靈芝對荷蘭種仔公牛生長性能 與免疫反應之影響<sup>(1)</sup>

李國華<sup>(2)(4)</sup> 林文宏<sup>(3)</sup> 陳志毅<sup>(2)</sup> 陳怡璇<sup>(2)</sup> 陳一明<sup>(2)</sup>

收件日期：109 年 1 月 8 日；接受日期：109 年 7 月 17 日

## 摘 要

為研發具提升仔牛免疫力之飼糧添加物，本試驗在探討飼糧中添加靈芝 (*Ganoderma lucidum*) 對荷蘭種仔公牛之生長性能與免疫反應的影響。將約 8 週齡已斷乳之 24 頭荷蘭種仔公牛隨機分成兩組，分別於飼糧中添加 0 (對照組，平均體重 75.1 kg) 或每天每頭添加 10 g 靈芝 (試驗組，平均體重 74.8 kg)，試驗為期 8 週，每頭牛採個別飼養，精料、百慕達乾草及乾淨飲水皆任食。在試驗前及試驗後進行仔公牛體重、體高、體長、胸圍、精料採食量、乾草採食量、血清生化值、淋巴細胞增生能力指數及牛流行熱抗體力價之量測。試驗結果顯示，飼糧中添加靈芝 8 週有提升仔公牛增重之趨勢 ( $P = 0.09$ )，在日增重方面，試驗組為  $0.81 \pm 0.10$  kg/head；對照組則為  $0.74 \pm 0.09$  kg/head。另在仔公牛體高、體長及胸圍方面，兩組間無差異。試驗組之隻日精料採食量及乾草採食量分別為  $3.65 \pm 0.24$ 、 $0.78 \pm 0.17$  kg；對照組則為  $3.45 \pm 0.25$ 、 $0.71 \pm 0.16$  kg。其餵飼 8 週後之血清生化檢測值未受到試驗處理影響，天門冬胺酸轉胺酶與血中尿素氮之平均值，對照組與試驗組皆在正常值範圍內，而試驗組比對照組有高的淋巴細胞增殖能力指數 ( $4.25 \pm 0.63$  vs.  $2.23 \pm 0.32$ ,  $P < 0.01$ )。在牛流行熱抗體力價方面，試驗組也比對照組有較高的抗體力價 ( $1.55 \pm 0.22$  vs.  $1.13 \pm 0.29$ ,  $P < 0.01$ )。綜上，飼糧添加靈芝可提升仔公牛之免疫細胞活力，未來靈芝有潛力做為良好的仔牛免疫調節飼糧添加物。

關鍵詞：仔公牛、生長性能、免疫反應、靈芝。

## 緒 言

仔牛的育成率攸關乳牛場繁殖的命脈，仔牛的飼養期約為 6 個月，包括哺乳期與生長期，新生仔牛經過約 2 個月之哺乳期後會進行斷乳，再進入另一仔牛生長期直至 6 月齡左右，此飼養過程，仔牛因為受到環境的適應性、斷乳、飼糧轉換及社會位序的改變等因子的影響，造成仔牛極大的緊迫，在此緊迫壓力下就容易發生仔牛消化系統與呼吸系統的疾病 (例如下痢與肺炎)，嚴重時甚至引發死亡 (吳，2002)，造成酪農嚴重的經濟損失。當仔牛下痢或肺炎時可以使用抗生素針劑來控制細菌感染及治療疾病。然而，近年來因應人類食物鏈而生的食安意識備受全球重視與關注，特別是抗生素使用不當所衍生之藥物殘留與抗藥性病原菌產生等公衛議題 (Van Boeckel *et al.*, 2015; Martin *et al.*, 2015)，因此如何減少抗生素使用量儼然成為全球畜產發展之重要趨勢 (Mathew *et al.*, 2007)。植物性飼料添加物或簡稱植生素，包括植物粉末、萃取物及植化物，可作為保健用飼料添加物。近年來，以中藥草為來源的植生素作為保健飼料添加物的研究更是發展蓬勃。

回顧我國傳統的中藥草應用於人類和動物的疾病治療，已超過二千年的歷史 (Sun *et al.*, 2013)，近來年有許多研究報告指出中藥草對動物健康深具功效潛能，例如：Abdallah *et al.* (2019) 研究指出，傳統中藥草副產物含有大量的生物活性化合物，可作為飼料添加物並提升動物健康。另應用中藥草於羔羊與豬隻之生長性能的研究，結果顯示中藥草可提升羔羊與豬隻之飼糧消化率和生長效益 (Du *et al.*, 2018)。李等 (2007) 之研究報告指出複方中藥草—蒲公英散 (含蒲公英 (*Taraxacum mongolicum*)、紫花地丁 (*Viola patrinii*)、金銀花 (*Lonicera japonica* Thunb.)、青皮 (*Citri reticulatae viride pericarpium*) 及甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fischer) 添加於飼糧供高體細胞數牛隻採食，可降低牛乳

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2644 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所新竹分所。

(3) 中華大學財務管理學系兼任助理教授。

(4) 通訊作者，E-mail: khlee@mail.tlri.gov.tw。



體細胞數進而提升生乳品質與乳房健康。靈芝為我國傳統醫藥史上記載最久的藥用真菌之一，且靈芝的品種甚多，其中最著名也最被廣泛研究的品種是 *Ganoderma lucidum*。靈芝具有多種功效，最常被提及的是提升免疫能力與抗癌的功能，其中多醣體 (polysaccharides) 成分具有潛在的抗腫瘤活性 (Gao *et al.*, 2005; Kladar *et al.*, 2016; Carrieri *et al.*, 2017)。研究報告亦指出，靈芝具有增強免疫能力的作用，能誘導本體產生抗體及增強自然殺手細胞之活性或吞噬細胞激素如腫瘤壞死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 等，對外來癌細胞能加以抑制，對正常細胞則具有保護作用，亦可以直接誘導人類乳腺癌 MCF-7 細胞之凋亡 (Gao *et al.*, 2005)。靈芝的化學成分多達一百五十多種，概括分為多醣 (polysaccharide) 類、核苷 (nucleoside) 類、呋喃 (furan) 類、甾醇 (sterols) 類、生物鹼 (alkaloid) 類、三萜 (triterpene) 類與多胺基酸 (amino acid) 類 (包含蛋白質、酵素) 等七大類，另外還有一些微量的元素，如鋅、錳、鎳等，尤其是鎳元素更常被提到它的藥效。最重要的藥理活性成分靈芝多醣體和三萜類化合物 (triterpenoids)，三萜類化合物已被報告具有保肝、抗高血壓和降低膽固醇等作用。靈芝多醣體，尤其是  $\beta$ -D- 葡聚糖 (beta-D-glucan) 具有抗腫瘤及抗血管增生之免疫調節作用 (Gao *et al.*, 2005)。此外，世界衛生組織 (World Health Organization, WHO) 建議全世界的會員國，主動地提升自己本國傳統的自然醫學的研究 (Kamboj, 2003)。粘等 (2011) 添加 0.2% 靈芝於飼糧中餵飼哺乳期仔豬，雖不影響其育成率及生長性能外，但可提升仔豬細胞性免疫能力 (包括淋巴細胞增殖能力及豬瘟中和抗體力價)。此外，研究報告指出靈芝水萃物作為乳牛飼料添加物時，可以增強乳牛免疫力和抗氧化能力 (Liu *et al.*, 2015)。Li *et al.* (2015) 指出於豬隻飼糧中添加靈芝，雖無提升育肥豬的生長性能，但可促進豬隻健康與提高豬肉品質。Lee *et al.* (2018) 添加靈芝於飼糧中餵飼保育期仔豬，結果顯示可提升豬隻之免疫力與育成率。此外，Liu *et al.* (2016) 研究報告指出，飼料中添加破壁靈芝孢子粉 200 mg/kg 給新生肉雞 (broiler) 吃 44 天後，結果顯示有提升生長性能及免疫調節能力。另國內仍面臨牛流行熱疫病之威脅，根據家畜衛生試驗所資料顯示造成牛流行熱疫病發生的主因為牛隻免疫接種率低、抗體力價 (小於 32 倍) 不足防禦野外病毒感染及環境緊迫因素讓牛隻無法有良好免疫力。根據李等 (2008) 牛流行熱市售疫苗免疫反應之研究報告指出，除不同疫苗廠牌與生產批次外，仔牛移行抗體的高低亦會影響疫苗注射後之抗體力價，當移行抗體高於 10 倍 ( $1.00 \log_{10}$ ) 以上時，接受疫苗注射 4 週後未能有良好免疫反應，當移行抗體低於 7.3 倍 ( $0.86 \log_{10}$ ) 以下時，接受疫苗注射 3 週後可激發免疫反應。由於靈芝功效性廣，除可提供人類健康管理之選擇與應用外，值得進一步研究應用於畜禽產業做為提升免疫力之飼糧添加物。因此，本試驗探討於飼糧中添加靈芝對荷蘭種仔公牛生長性能與免疫反應之影響。

## 材料與方法

本試驗所使用之動物均通過行政院農業委員會畜產試驗所新竹分所實驗動物照護與使用小組 (Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC) 之審核。

### I. 試驗動物及飼養管理

使用荷蘭種乳公牛，飼養在行政院農業委員會畜產試驗所新竹分所傳統牛舍，選擇 8 週齡左右且體重相近 (約 70 kg) 之荷蘭種乳公牛 24 頭，逢機均分為兩組，每天每頭添加 0 g (對照組,  $n = 12$ ) 或 10 g 靈芝 (子實體階段) (試驗組,  $n = 12$ )，試驗組之靈芝於每天早上提供精料時混合其中後餵飼。試驗設計採完全逢機試驗為期 8 週，每頭試驗牛飼養於同一棟牛舍之個別牛欄 (長 160 cm、寬 140 cm 及高 120 cm)，依飼養管理標準作業流程照顧，提供以磨碎玉米為主之精料 (表 1) 任食，並由獸醫師檢視仔牛每天採食精料的情形及健康狀況，固定於每天早上 8 時及下午 2 時各給予 2 – 3 kg 精料，會在給予後觀察牛隻有無突然短時間內大量採食精料，以避免牛隻過量採食引發鼓脹現象，並且在下次給予精料前秤重所剩之精料以紀錄牛隻的採食量。另百慕達乾草與乾淨飲水亦任食。乳公牛於 8 週齡時施打第 1 劑牛流行熱疫苗 (新北市，行政院農業委員會家畜衛生試驗所)，12 週齡時施打第 2 劑，以補強牛隻之免疫反應。挑選靈芝 (苗栗縣，和生技有限公司) 作為試驗材料，靈芝產自南投縣，以太空包人工培養 3 個月之菌體走絲期，菌體靈芝再經 1.5 個月之成長後即予採收，將整株靈芝 (子實體及梗) 經烘乾、研磨、過細目篩及收集研末。靈芝粉末分析其所含之總醣量 (粗多醣體) 為  $88.12 \pm 0.27$  mg/g，其營養成分：每 100 g 含蛋白質 5.6 g、脂肪 0.6 g、碳水化合物 70.8 g、灰分 22.0 g、鈉 < 5 mg、熱量 311.0 大卡。

### II. 測定項目

- 生長性能分析：於試驗前一天與試驗結束後一天量測所有牛隻之體重、體高 (wither height)、體長 (body length) 及胸圍 (heart girth)。記錄每頭牛每天之精料與乾草採食量。
- 血球性狀及血清生化值分析測定：於試驗採樣期間，從牛隻的頸靜脈處經 75% 酒精棉擦拭消毒後，以 18 號

針頭及無菌之兩種真空採血管 (一管含有 EDTA 抗凝血劑, 另一管則不含任何抗凝血劑) 進行採血, 分別各採約 9 mL 血液於採血管內, 將含 EDTA 抗凝血劑之採血管輕微與血液搖勻後置入冷藏箱待進行全血之檢驗。以自動血液檢測儀 (MEK-6400, NIHON KOHDEN Inc., Japan) 分析白血球數、紅血球數與血小板數, 以評估靈芝對乳牛血球組成的影響。另一不含任何抗凝血劑之採血管則靜置 10 分鐘後, 離心  $2,000 \times g$ 、15 分鐘, 分離血清於血清瓶中, 並保存至  $-20^{\circ}\text{C}$  的冰箱, 直到要進行血清生化值與牛流行熱中和抗體力價分析時才解凍使用。以血清生化儀 (VITROS Chemistry System DT60 and DTSC, Johnson & Johnson Inc., USA) 分析天門冬胺酸轉胺酶 (aspartate aminotransferase, AST) 與血中尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 的濃度, 以評估靈芝對牛隻之肝與腎功能參考指數的影響。牛流行熱血清中和抗體力價分析: 於 8 週齡及 16 週齡採所有牛隻樣品送行政院農業委員會家畜衛生試驗所檢測牛流行熱抗體力價。

表 1. 生長期荷蘭仔公牛飼糧添加靈芝試驗之精料組成與營養成分

Table 1. Ingredients and nutrient composition of the concentrate for 8-wk-old Holstein bull calves used in *Ganoderma lucidum* (GL) supplementation experiment

Ingredients	%, as feed basis
Corn, ground	60.0
Soybean meal	31.3
Molasses	5.0
Dicalcium phosphate	0.8
Sodium bicarbonate	0.4
Vitamin premix <sup>1</sup>	0.3
Mineral premix <sup>2</sup>	0.2
Total	100.0
Analyzed value (%, as feed basis)	
Analyzed crude protein, %	17.0
Estimated NEg <sup>3</sup> , Mcal/kg	1.7

<sup>1</sup> Each kilogram of vitamin premix contains: Vitamin A, 10,000,000 IU; Vitamin D<sub>3</sub>, 1,600,000 IU; and Vitamin E, 70,000 IU.

<sup>2</sup> Each kilogram of mineral premix contains: Fe, 50 g; Zn, 40 g; I, 0.5 g; Se, 0.1 g; Cu, 10 g; and Co, 0.1 g.

<sup>3</sup> NEg value is calculated according to NRC (2001).

(iii) 淋巴細胞增殖反應分析 (peripheral lymphocyte proliferation assay): 從牛隻的頸靜脈處經 75% 酒精棉擦拭消毒後, 以 18 號針頭及無菌之採血管 (內含 EDTA 抗凝血劑) 進行採血, 採 9 mL 血液後輕微混合, 離心  $1,000 \times g$ 、15 分鐘, 使用無菌長針抽取白血球層之白血球於含培養液 RPMI 1640 (Cat.# 11875, Gibco) 之無菌離心管中, 再置於 96 微量培養盤中, 將白血球數調整為  $10^5$  個 / 孔, 加入  $10 \mu\text{g/mL}$  伴刀豆球蛋白 (concanavalin A, ConA, Sigma) 刺激, 於  $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  環境下培養 24 小時後, 每孔加入  $20 \mu\text{L}$  MTT 試劑 (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma), 繼續培養 4 小時, 加入  $200 \mu\text{L}$  dimethyl sulfoxide (DMSO, Wako), 室溫下靜置 30 分鐘後, 以波長 570 nm 測定其吸光值。

### III. 統計分析

依試驗所得之數據, 以單因子變方分析, 並使用一般線性模式程序 (general linear model procedure, GLM), 進行變方分析, 當  $P < 0.05$  表差異顯著,  $P < 0.01$  表差異極顯著 (SAS, 2002)。

## 結果與討論

飼糧添加靈芝對荷蘭種仔公牛生長性能之影響如表 2。試驗結果顯示, 飼糧中添加靈芝 8 週有提升乳公牛增重之趨勢 ( $P = 0.09$ ), 在隻日增重方面, 試驗組為  $0.81 \pm 0.10 \text{ kg}$ ; 對照組則為  $0.74 \pm 0.09 \text{ kg}$ 。飼糧添加靈芝對荷蘭乳公牛體型之影響如表 3, 在試驗前後每頭牛隻平均增加體高、體長及胸圍方面, 對照組依序為  $7.2 \pm 3.0$ 、 $11.2 \pm 2.9$  及  $13.4 \pm 3.7 \text{ cm}$ , 試驗組為  $8.0 \pm 1.7$ 、 $11.7 \pm 2.6$  及  $13.8 \pm 5.1 \text{ cm}$ , 兩組無顯著差異存在。試驗組之隻日精料採食量

及乾草採食量分別為  $3.65 \pm 0.24$  及  $0.78 \pm 0.12$  kg；對照組則為  $3.45 \pm 0.25$  及  $0.71 \pm 0.12$  kg，兩組無顯著差異存在。依據作者於 2014 年執行「應用中草藥提升荷蘭乳公牛生長性能之評估」計畫之試驗結果顯示，每頭飼糧添加中藥草複方 A (10 g，包括靈芝、白朮及炙甘草等) 之試驗組有提升年輕荷蘭種公牛總增重 ( $45.4 \pm 5.0$  vs.  $38.1 \pm 11.8$  kg) 表現之趨勢。故本試驗在飼糧添加靈芝的劑量設計為每日每頭 10 g，從試驗結果顯示未有顯著提升牛隻增重的表現。

表 2. 飼糧添加靈芝對荷蘭種仔公牛增重與採食量之影響

Table 2. Effects of *Ganoderma lucidum* (GL) supplementation on body weight change and diet intake of the Holstein bull calves

Items	Control	GL supplementation	P value
No.	12	12	-
Initial body weight, kg/head	$76.8 \pm 3.3$	$76.5 \pm 2.6$	0.79
Final body weight, kg/head	$118.3 \pm 8.1$	$122.0 \pm 7.7$	0.27
Body weight gain, kg/head	$41.6 \pm 5.1$	$45.5 \pm 5.6$	0.09
Daily gain, kg/head	$0.74 \pm 0.09$	$0.81 \pm 0.10$	0.09
Daily concentrate intake, kg/head	$3.45 \pm 0.25$	$3.65 \pm 0.24$	0.05
Daily hay intake, kg/head	$0.71 \pm 0.12$	$0.78 \pm 0.15$	0.27

The data were given as mean  $\pm$  SD.

All performance traits were not affected by GL supplementation ( $P > 0.05$ ).

飼糧添加靈芝對荷蘭種仔公牛血液生化檢測值之影響如表 4。結果顯示，在血清生化指數之肝與腎 (AST 及 BUN) 功能參考指數方面，對照組試驗前 AST 及 BUN 平均值依序為  $41.8 \pm 12.5$  U/L 及  $6.3 \pm 1.5$  mg/dL，試驗後則依序為  $42.4 \pm 13.1$  U/L 及  $5.7 \pm 1.0$  mg/dL；試驗組試驗前 AST 及 BUN 平均值依序為  $42.3 \pm 10.0$  U/L 及  $5.7 \pm 1.6$  mg/dL，試驗後則依序為  $40.2 \pm 10.5$  U/L 及  $5.2 \pm 1.1$  mg/dL。雖然試驗組 AST 降幅為 2.1 U/L，而對照組之升幅為 0.6 U/L，但兩組間無統計上之差異，在試驗前與後兩組平均 AST 及 BUN 值皆在正常值範圍內 (AST: 21-100 U/L, BUN: 2.9-8.9 mg/dL) (沈，1987)，顯示餵食靈芝的試驗組牛隻在肝腎功能參考指數上沒有立即的影響。本試驗結果與 Lee *et al.* (2018) 之研究結果相類似，試驗期間使用靈芝後的離乳豬其平均 AST 及 BUN 值皆在正常值範圍內。肝臟扮演體內有毒化合物的代謝和解毒作用的角色，當肝臟受傷發炎時，血清中之 AST 和丙胺酸胺基轉移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 濃度上升 (Hsu *et al.*, 2008)。Kim *et al.* (1999) 之研究報告顯示靈芝萃取物具護肝之功能，Zhang *et al.* (2002) 之研究結果指出靈芝多醣體具護肝之作用，可顯著減輕小鼠之肝臟腫脹，降低血清中 ALT 和一氧化氮 (NO) 的產生。但本試驗未能顯現有護肝之效果，可能是試驗牛隻所處之環境及飼養因子較單純良好，因此對其肝功能參考指數之影響未能顯現。

表 3. 飼糧添加靈芝對荷蘭種仔公牛體型之影響

Table 3. Effects of *Ganoderma lucidum* (GL) supplementation on body types of the Holstein bull calves

Item	Control (n = 12)			GL supplementation (n = 12)			
	Before	After	Difference	Before	After	Difference	P value
Wither height (cm)	$85.0 \pm 1.7$	$92.2 \pm 4.0$	$7.2 \pm 3.0$	$85.2 \pm 2.3$	$92.7 \pm 4.1$	$7.5 \pm 2.6$	0.78
Body length (cm)	$84.1 \pm 2.5$	$95.3 \pm 3.2$	$11.2 \pm 2.9$	$84.3 \pm 2.1$	$95.8 \pm 4.3$	$11.7 \pm 2.6$	0.66
Heart girth (cm)	$98.6 \pm 1.2$	$112.0 \pm 3.6$	$13.4 \pm 3.7$	$98.0 \pm 1.9$	$111.8 \pm 5.7$	$13.8 \pm 5.1$	0.82

The data were given as mean  $\pm$  SD.

All performance traits were not affected by GL supplementation ( $P > 0.05$ ).

<sup>1</sup> Difference = After trial – Before trial.

多醣體是由 10 多個單糖體鍵結而成為一種天然的巨分子聚合物，具有廣泛的生物活性 (Chen and Huang, 2018)。食用蘑菇多醣體是多醣體家族的成員之一，由於食用蘑菇多醣體屬天然之化合物且具有各種生物活性和低毒性的特性，所以非常適合被開發為功能性食品和營養保健品 (Giavasis, 2014)。一些食用蘑菇多醣體 (包含靈芝)



的作用機制被認為是透過多元管道與標的物來調節身體的免疫功能，包括參與細胞的活性調節、細胞表面特異性受體的結合、激活各種細胞信號轉導途徑及刺激細胞因子或抗體分泌 (Jiang *et al.*, 2010)。靈芝使用在治療疾病與調節身體平衡 (Li and Xu, 2011; Zhao, 2013; Ahmad, 2018) 已超過 2,000 年的歷史，中國古代醫學學者認為靈芝具有「扶正固本」的活性，這表示靈芝可以增強身體抵抗力，鞏固患者的體質 (Lin and Zhang, 2004)。目前的研究已經發現靈芝多醣體主要表現在免疫細胞之調節功能，包括 T 細胞、B 細胞、巨噬細胞、樹突細胞和自然殺手細胞 (Xu *et al.*, 2011; Batra *et al.*, 2013; Zhao, 2013)。Huang *et al.* (2019) 研究報告指出靈芝多醣體和豬苓 (*Polyporus umbellatus*) 多醣體的組合物增強了小鼠腹腔巨噬細胞的吞噬功能及自然殺手細胞的活性。

飼糧添加靈芝對荷蘭種仔公牛血液細胞增殖能力之影響如表 4。在體外試驗，細胞增殖能力檢測結果，顯示 8 週齡時 (試驗前)，對照組得到的細胞增殖能力指數為  $2.12 \pm 0.38$ ，試驗組則為  $2.08 \pm 0.45$ ，二組間無差異存在；當試驗進行到 16 週齡時 (試驗後)，對照組得到的細胞增殖能力指數為  $2.23 \pm 0.32$ ，試驗組則為  $4.25 \pm 0.63$ ，試驗組與對照組之間有極顯著差異存在 ( $P < 0.01$ )，顯示試驗組有較佳之淋巴細胞增殖能力。本試驗結果與 Lee *et al.* (2018) 之結果相類似，使用靈芝添加於離乳豬飼糧中能促進淋巴細胞之增殖，添加靈芝的試驗組比無添加靈芝的對照組可提升淋巴細胞增殖能力指數達 3.5。Van der Hem *et al.* (1995) 發現一種從靈芝萃取純化而來的蛋白質 LZ-8，LZ-8 對小鼠脾臟細胞及人類單核細胞具備有絲分裂之免疫刺激功能。從靈芝的子實體中發現了另一種多醣體 (PS-G)，能夠激活巨噬細胞及活化 T 細胞的增殖 (Wang *et al.*, 1997)。巨噬細胞具吞噬作用是身體防禦異物入侵的主要機制之一 (Hirayama *et al.*, 2017)，被激活的巨噬細胞會參與炎症反應 (Li *et al.*, 2019)，增強吞噬作用、釋放 TNF- $\alpha$  等細胞激素 (Sun *et al.*, 2017) 及協助病原體的清除 (Chanmee *et al.*, 2014)。此外，Zhang *et al.* (2002) 之研究顯示，靈芝內含之 GLIS (proteoglycan，一種具生物活性的多醣) 成分會刺激小鼠脾臟淋巴細胞之活化、增殖與分化。以上數據與本試驗的結果相似，顯示靈芝促進了血液中淋巴細胞增殖的潛力，推測可能與靈芝內含之 LZ-8、PS-G 及 GLIS 相關。

表 4. 飼糧添加靈芝對荷蘭種仔公牛血清生化值、淋巴細胞增殖指數及牛流行熱抗體力價之影響

Table 4. Effects of *Ganoderma lucidum* (GL) supplementation on clinical blood biochemical values, peripheral lymphocyte proliferation index and bovine ephemeral fever (BEF) antibody titer of Holstein bull calves

Item	Control (n = 12)		GL supplementation (n = 12)		Normal range <sup>1</sup>
	Before	After	Before	After	
AST (U/L)	$40.2 \pm 10.5$	$42.4 \pm 13.1$	$42.3 \pm 10.0$	$40.2 \pm 10.5$	21 – 94
BUN (mg/dL)	$6.3 \pm 1.5$	$5.7 \pm 1.0$	$5.7 \pm 1.6$	$5.2 \pm 1.1$	2.9 – 8.9
Peripheral lymphocyte proliferation index	$2.12 \pm 0.38$	$2.23 \pm 0.32^a$	$2.08 \pm 0.45$	$4.25 \pm 0.63^b$	—
BEF antibody titer ( $\log_{10}$ )	$0.58 \pm 0.15$	$1.13 \pm 0.29^a$	$0.58 \pm 0.20$	$1.55 \pm 0.22^b$	—

The data were given as mean  $\pm$  SD.

AST: aspartate aminotransferase; BUN: blood urea nitrogen.

<sup>1</sup> 沈永紹。1987。獸醫實驗診斷學提要。

<sup>a, b</sup> Means in the same raw with different superscripts differ ( $P < 0.05$ ).

結果顯示，靈芝有較佳之牛流行熱抗體力價表現，試驗組平均牛流行熱抗體力價由  $0.58 \pm 0.20$  上升至  $1.55 \pm 0.22$ ；對照組則由  $0.58 \pm 0.15$  升至  $1.13 \pm 0.29$  (表 4)。本試驗仔牛在 8 週齡之牛流行熱 (移行) 抗體力價為 0.58，與李等 (2008) 所指出當移行抗體低於 0.86 以下時接受疫苗注射 3 週後可激發免疫反應之結果相似，兩組牛隻再次接受疫苗補強後抗體力價皆有上升。國外研究報告指出靈芝多醣體，具許多調節免疫系統之功能，例如：抗原呈現細胞、T 細胞與 B 細胞、自然殺手細胞及嗜中性顆粒球 (Wang *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2002)。根據 Zhang *et al.* (2002) 之研究報告指出，靈芝 GLIS 成分特別會對 B 細胞產生刺激而被活化，不僅促使 B 細胞的形態變大，還能刺激 B 細胞之表面抗原分化簇 (cluster of differentiation, CD) 71 和 CD25 醣蛋白分子的表現，並提升了高免疫球蛋白 (抗體) 合成的數量。本試驗組牛隻有較佳之抗體力價，推測可能與靈芝內含之 GLIS 成分相關。臺灣酪農業過去曾爆發過 6 次牛流行熱大流行，造成相當大的經濟損失，近年來由於牛流行熱在臺灣呈現週期性發生，儼然已成為常在性疾病，以往好發於夏到秋季，但是受極端氣候的影響現在臺灣全年均有可能發生牛流行熱。根據 Liao *et al.* (1998) 及丁等 (2002) 之研究發現牛流行熱疫情爆發的時刻，正好是牛隻血清中和抗體力價最沒有保護力的時間點，其中又以 6 到 24 個月齡的牛隻最易受到感染而發病，所以防治牛流行熱除加強防治病媒蚊外，更需藉助疫苗免疫牛隻以產生高抗體保護力方能有效對抗病毒的感染。本試驗顯示，飼糧添加靈芝的試驗組仔公牛有較佳的牛流行熱抗體力價表現，未來可評估將靈芝添加物應用於 6 到 24 個月齡牛隻，配合牛流行熱疫苗施打計畫，期能產生高抗體保護力。



價達有效防治牛流行熱之目的。

靈芝多用於人類的身體保健，因其價格不菲且鮮少應用於家畜等經濟動物。本試驗考量產業應用的可行性，採用價格較便宜之靈芝下腳品（經烘乾研磨成粉狀 760 元/kg）做為試驗材料，以及應用於體重較輕的生長期仔公牛，除相對每日餵食靈芝的劑量（10 g）相對較少外，也考量此生長期的仔牛因為受到飼養環境的適應性、斷乳、飼糧轉換及社會位序的改變等因子的影響，易發生緊迫、免疫力下降、抵抗力差及生病等（例如下痢及肺炎），當染病嚴重時會引發死亡（吳，2000），估算成本每頭牛每天花費 7.6 元，試驗為期 56 天計花費 425.6 元。由本試驗結果顯示，飼糧添加靈芝對荷蘭種仔公牛可促進淋巴細胞增殖及活化免疫抗體產生之效果，藉以提升體內細胞性防禦，發揮細胞毒殺作用來清除外源性病原，達保護動物健康之目的，未來如應用於提升乳牛場仔牛健康及育成率，對經濟效益的表現有其潛能。

## 結 論

研發無抗生素之畜禽飼養模式已成為一種趨勢，中藥草多元應用於畜牧產業，可創造產品之差異性，將可成為消費者的另一選項，靈芝富含多醣體具多種免疫調節之功能，本試驗結果顯示，使用靈芝添加於荷蘭種仔公牛飼糧中，能促進體內淋巴細胞增殖與牛流行熱中和抗體產生，確有提升免疫力之效果，建議靈芝可做為飼糧添加物添加於生長期仔牛飼糧中，以提升仔牛之免疫力。

## 誌 謝

本試驗承蒙行政院農業委員會之科技計畫經費之支持、行政院農業委員會家畜衛生試驗所之牛流行熱抗體檢測、本分所獸醫團隊及全體員工之支持與協助，讓試驗能如期完成，特此致謝。

## 參考文獻

- 丁履紉、李敏旭、郭舒亭、鄭明珠、蕭終融。2002。牛流行熱疫情監控及免疫適期之探討。行政院農業委員會家畜衛生試驗所，新北市，第 1-8 頁。
- 吳永惠。2002。牛病學。藝軒圖書出版社，臺北市，第 154-159 頁。
- 沈永紹。1987。獸醫實驗診斷學提要。華香園出版社，臺北市，第 310-311 頁。
- 李國華、葉家舟、陳志毅、郭桑硯、李素珍、張菊犁、季昭華。2007。應用抗炎複方蒲公英散降低牛乳體細胞數。畜產研究 40：279-287。
- 李明昌、陳世平、丁履紉、鄭益謙。2008。牛流行熱市售疫苗免疫反應之研究。行政院農業委員會動植物防疫檢疫局，臺北市，第 1-11 頁。
- 粘碧珠、李國華、葉家舟、林文宏、胡見龍、陳志毅、賈玉祥、張菊犁、林祥生、季昭華。2011。飼糧中添加靈芝對哺乳仔豬免疫力之探討。臺灣獸醫誌 37：104-110。
- Ahmad, M. F. 2018. *Ganoderma lucidum*: Persuasive biologically active constituents and their health endorsement. Biomed. Pharmacother. 107: 507-519.
- Abdallah, A., P. Zhang, Q. Zhong and Z. Sun. 2019. Application of traditional Chinese herbal medicine by-products as dietary feed supplements and antibiotic replacements in animal production. Curr. Drug Metab. 20: 54-64.
- Batra, P., A. K. Sharma and R. Khajuria. 2013. Probing Lingzhi or Reishi medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (higher Basidiomycetes): A bitter mushroom with amazing health benefits. Int. J. Med. Mushrooms 15: 127-143.
- Carrieri, R., R. Manco, D. Sapio, M. Iannaccone, A. Fulgione, M. Papaiani, B. de Falco, L. Grauso, P. Tarantino, F. Ianniello, V. Lanzotti, E. Lahoz and R. Capparelli. 2017. Structural data and immunomodulatory properties of a water-soluble heteroglycan extracted from the mycelium of an Italian isolate of *Ganoderma lucidum*. Nat. Prod. Res. 31: 2119-2125.
- Chanmee, T., P. Ontong, K. Konno and N. Itano. 2014. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. Cancer 6: 1670-1690.

- Chen, F. and G. Huang. 2018. Preparation and immunological activity of polysaccharides and their derivatives. *Int. J. Biol. Macromol.* 112: 211-216.
- Du, Z., N. Risu, G. Gentu, Y. Jia and Y. Cai. 2018. Growth performance, apparent digestibility, and N balance in Mongolian lambs and hogs fed diets supplemented with a Chinese traditional herbal medicine complex. *Anim. Sci. J.* 89: 1451-1458.
- Gao, Y., H. Gao, E. Chan, W. Tang, A. Xu, H. Yang, M. Huang, J. Lan, X. Li, W. Duan, C. Xu and S. Zhou. 2005. Antitumor activity and underlying mechanisms of Ganopoly, the refined polysaccharides extracted from *Ganoderma lucidum*, in mice. *Immunol. Invest.* 34: 171-198.
- Giavasis, I. 2014. Bioactive fungal polysaccharides as potential functional ingredients in food and nutraceuticals. *Curr. Opin. Biotechnol.* 26: 162-173.
- Hirayama, D., T. Iida and H. Nakase. 2017. The phagocytic function of macrophage-enforcing innate immunity and tissue homeostasis. *Int. J. Mol. Sci.* 19: 92-98.
- Hsu, C. H., K. C. Hwang, Y. H. Chiang and P. Chou. 2008. The mushroom *Agaricus blazei* Murill extract normalizes liver function in patients with chronic hepatitis B. *J. Altern. Complement Med.* 14: 29930-29936.
- Huang, Q., L. Li, H. Chen, Q. Liu and Z. Wang. 2019. GPP (composition of *Ganoderma lucidum* poly-saccharides and *Polyporus umbellatus* poly-saccharides) enhances innate immune function in mice. *Nutrients* 11: 1480-1489.
- Jiang, M. H., L. Zhu and J. G. Jiang. 2010. Immunoregulatory actions of polysaccharides from Chinese herbal medicine. *Expert Opin. Ther. Targets.* 14: 1367-1402.
- Kamboj, V. P. 2003. Herbal medicine. *Current Sci.* 78: 35-39.
- Kim, D. H., S. B. Shim, N. J. Kim and I. S. Jang. 1999. Beta-glucuronidase-inhibitory activity and hepatoprotective effect of *Ganoderma lucidum*. *Biol. Pharm. Bull.* 22: 162-164.
- Kladar, N. V., N. S. Gavarić and B. N. Božin. 2016. Ganoderma: insights into anticancer effects. *Eur. J. Cancer Prev.* 25: 462-471.
- Lee, K. H., P. C. Nien, T. C. Chen, C. C. Yeh, J. Y. Chen, W. H. Lin, T. T. Lee, Y. S. Jea and C. H. Chi. 2018. Dietary supplementation of *Ganoderma lucidum* powder enhances survival and immunocompetence of weaning pigs. *Taiwan Vet. J.* 44: 1-8.
- Li, X. and W. Xu. 2011. TLR4-mediated activation of macrophages by the polysaccharide fraction from *Polyporus umbellatus* (Pers.) fries. *J. Ethnopharmacol.* 135: 1-6.
- Li, X. L., L. P. He, Y. Yang, F. J. Liu, Y. Cao and J. J. Zuo. 2015. Effects of extracellular polysaccharides of *Ganoderma lucidum* supplementation on the growth performance, blood profile, and meat quality in finisher pigs. *Livestock Sci.* 178: 187-194.
- Li, Q. Z., Y. Z. Chang, Z. M. He, L. Chen and X. W. Zhou. 2019. Immunomodulatory activity of *Ganoderma lucidum* immunomodulatory protein via PI3K/Akt and MAPK signaling pathways in RAW264.7 cells. *J. Cell Physiol.* 234: 23337-23348.
- Lin, Z. B. and H. N. Zhang. 2004. Anti-tumor and immunoregulatory activities of *Ganoderma lucidum* and its possible mechanisms. *Acta. Pharmacol. Sin.* 25: 1387-1395.
- Liao, Y. K., Y. Inaba, N. I. Li, C. Y. Chain, S. L. Lee and P. P. Liou. 1998. Epidemiology of bovine ephemeral fever virus infection in Taiwan. *Microbiol. Res.* 153: 289-295.
- Liu, T., Q. Ma, L. Zhao, R. Jia, J. Zhang, C. Ji and X. Wang. 2016. Protective effects of sporoderm-broken spores of *Ganoderma lucidum* on growth performance, antioxidant capacity and immune function of broiler chickens exposed to low level of aflatoxin B1. *Toxins* 8: 278-290.
- Liu, Y., C. Zhao, D. Lin, H. Lan and Z. Lin. 2015. Effects of *Ganoderma lucidum* spent mushroom substrate extract on milk and serum immunoglobulin levels and serum antioxidant capacity of dairy cows. *Trop. J. Pharm. Res.* 14: 1049-1055.
- Martin, M. J., E. T. Sapna and B. N. Thomas. 2015. Antibiotics overuse in animal agriculture: a call to action for health care providers. *Am. J. Public Health* 105: 2409-2410.
- Mathew A. G., R. Cissell and S. Liamthong. 2007. Antibiotic resistance in bacteria associated with food animals: a United States perspective of livestock production. *Foodborne Pathog. Dis.* 4: 115-133.
- National Research Council. 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle, 7<sup>th</sup> ed. National Academy Press. Washington, D. C. USA.

- SAS. 2002. SAS version 9.00. Statistical Analysis Institute. Inc., Cary, N. C. USA.
- Sun, L. X., Z. B. Lin, J. Lu, W. D. Li, Y. D. Niu, Y. Sun, C. Y. Hu, G. Q. Zhang and X. S. Duan. 2017. The improvement of M1 polarization in macrophages by glycopeptide derived from *Ganoderma lucidum*. Immunol. Res. 65: 658-665.
- Sun, Z. K., H. Q. Yang and S. Di. 2013. Traditional Chinese medicine: a promising candidate for the treatment of Alzheimer's disease. Transl. Neurodegener. 2: 6-12.
- Van, Boeckel T. P., C. Brower, M. Gilbert, B. T. Grenfell, S. A. Levin, T. P. Robinson, A. Teillant and R. Laxminarayanb. 2015. Global trends in antimicrobial use in food animals. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 112: 5649-5654.
- Van der Hem, L. G., J. A. van der Vliet, C. F. Bocken, K. Kino, A. J. Hoitsma and W. J. Tax. 1995. Ling Zhi-8: studies of a new immunomodulating agent. Transplantation 60: 438-443.
- Wang, S. Y., M. L. Hsu, H. C. Hsu, C. H. Tzeng, S. S. Lee, M. S. Shiao and C. K. Ho. 1997. The anti-tumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes. Int. J. Cancer 70: 699-705.
- Xu, Z., X. Chen, Z. Zhong, L. Chen and Y. Wang. 2011. *Ganoderma lucidum* polysaccharides: immunomodulation and potential anti-tumor activities. Am. J. Chin. Med. 39: 15-27.
- Zhang, J., Q. Tang, M. Zimmerman-Kordmann, W. Reutter and H. Fan. 2002. Activation of B lymphocytes by GLIS, a bioactive proteoglycan from *Ganoderma lucidum*. Life Sci. 71: 623-638.
- Zhao, Y.Y. 2013. Traditional uses, phytochemistry, pharmacology, pharmacokinetics and quality control of *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fries: A review. J. Ethnopharmacol. 149: 35-48.

# Effect of *Ganoderma lucidum* supplementation on growth performance and immune response in Holstein bull calves <sup>(1)</sup>

Kuo-Hua Lee <sup>(2) (4)</sup> Wen-Hung Lin <sup>(3)</sup> Jih-Yi Chen <sup>(2)</sup> Yi-Hsuan Chen <sup>(2)</sup> and Yi-Ming Chen <sup>(2)</sup>

Received: Jan. 8, 2020; Accepted: Jul. 17, 2020

## Abstract

This study analyzes the effects of *Ganoderma lucidum* (GL) supplementation on the growth performance and immune response in Holstein bull calf. A total of 24 Holstein bull calves weaned at 8 weeks old were randomly divided into two groups. Calves received diets adding 0 (control group) or 10 g GL powder (treatment group) daily for 8 weeks. The calves were fed individually with all fine feed, Bermuda hay and clean water. At the start and end of the experiment diet intake, body weight, wither height, body length, heart girth, peripheral lymphocyte proliferation index, the blood biochemical parameters and bovine ephemeral fever (BEF) antibody titer were analyzed. The results showed that calves fed GL powder had the significantly ( $P < 0.01$ ) increased peripheral lymphocyte proliferation index ( $4.25 \pm 0.63$  vs.  $2.23 \pm 0.32$ ) and BEF antibody titer ( $1.55 \pm 0.22$  vs.  $1.13 \pm 0.29$ ), compared to the control group. However, the diet intake, body weight, wither height, body length, heart girth, aspartate aminotransferase (AST) and blood urea nitrogen (BUN) were not significantly different between control group and treatment group. In conclusion, the addition of *Ganoderma lucidum* in the diet could enhance the activity of the immune cells of Holstein bull calves. In the future, *Ganoderma lucidum* may be used as an immunity enhancing supplement for calves.

Key words: Bull calf, Growth performance, Immune response, *Ganoderma lucidum*.

---

(1) Contribution No. 2644 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Hsinchu Branch, COA-LRI, Miaoli 36841, Taiwan, R. O. C.

(3) Adjunct Assistant Professor, Department of Finance, Chung Hua University.

(4) Corresponding author, E-mail: khlee@mail.tlri.gov.tw.



# 生物濾床除臭效率及其微生物分布<sup>(1)</sup>

廖仁寶<sup>(2)(4)</sup> 蕭庭訓<sup>(2)</sup> 程梅萍<sup>(3)</sup>

收件日期：109 年 5 月 5 日；接受日期：109 年 7 月 31 日

## 摘 要

本研究目的為探討生物濾床於箱型送風式堆肥舍應用之除臭效果與其微生物組成。生物濾床分為 4 組，分別為 A 組：蛇木屑；B 組：蛇木屑混合堆肥；C 組：蛇木屑與調濕；D 組：蛇木屑混合堆肥與調濕，進行生物濾床入、出口異味檢測與濾床樣品微生物鑑定。試驗結果顯示，4 組在試驗 220 天期間，氨氣的去除率皆接近 100%，且無顯著差異。處理後排出氣體之異味則分別為 55.4、55.5、44.2 及 42.4 OU/m<sup>3</sup>，以調濕處理組較低。由 4 處理組濾料之 16S rRNA 基因序列分析結果顯示，各組之細菌皆以 *ProteoBacteria* 菌門為主，分別佔 64.3、63.2、72.4 及 65.2%。其中 D 組尚有 *Bacteroidetes*、*AcidoBacteria*、*Firmicutes* 等 3 個菌門細菌，並分別為 *Sphingobacteriales*、*Acidobacteriales*、*Bacillales* 菌科，多樣性較為豐富。古細菌分析方面，僅在 D 組發現，為 *Euryarchaeota* 菌門、*Methanomicrobia* 菌目甲烷菌。且在 D 組中亦可發現屬於 *Rhizobiales* 菌科、*Pseudolabrys* 菌屬之固氮菌與 *Nitrosomonadales* 菌科、*Nitrospira* 菌屬之硝化菌，這些微生物可能參與生物濾床之氮循環作用，達到去除堆肥異味中氨氣之效果。綜合上述，以 D 組為較佳的除臭應用選擇。

關鍵詞：除臭、生物濾床、微生物。

## 緒 言

畜禽舍與堆肥場產生之異味等空氣污染問題，常是畜牧場與堆肥場遭到鄰近民眾或環保團體抗爭與檢舉之原因，而異味物質包括揮發性有機酸、甲基胺、氨氣、硫化物等 (National Research Council, 2003; Feilberg *et al.*, 2010)，其中氨氣為主要的指標氣體 (UNECE/LRTAP, 2012)，其為無色、有毒、具腐蝕性惡臭成分的化合物 (USEPA, 1995)。一般常用來降低畜禽舍與堆肥場空氣異味濃度的處理方式，有物理法、化學法、生物法或複合法 (Alkokaik, 2009; 程等, 2010; 蕭等, 2014; 劉等, 2019)。複合物理性與生物性的處理方法，具成本低、效率佳之優點 (程等, 2010)。

生物濾床可設計成為一種複合物理性與生物性的處理方法，將相關微生物固著於具吸附污染物質能力的濾料上，進行連續性的分解作用，以降低污染物濃度 (Jaber *et al.*, 2014)。以酸性泥炭土與豬糞堆肥串聯的生物濾床系統，去除畜殖堆肥場異味，發現進流三甲基胺與氨氣的去除率達 85% 以上 (高等, 1996)。另將具除臭能力的 *Arthrobacter* sp. 植種於顆粒活性炭上，並填充於生物濾床，用以處理養豬廢棄物所產生的三甲基胺與氨氣，結果顯示去除率分別達 96.8 與 97.2% (Ho *et al.*, 2008)。以具調濕功能的生物濾床，進行氨氣移除試驗，期間保持濾料 pH 值小於 7.5，水分含量大於 35%，並於濾料中植種氨氧化菌，結果發現氨氣總去除率為 99.9%，異味之去除率為 96%，且生物濾床較木屑脫臭槽具有較高之經濟效益 (程等, 2010)。Das *et al.* (2019) 利用生物炭與堆肥組成的生物濾床，進行硫化氫的去除試驗，在空床停留時間為 119 s 的操作條件下，其最大的去除能力為 33 gm<sup>-3</sup>h<sup>-1</sup>、去除效率超過 99%。若以完全腐熟的堆肥當作生物濾床的填充濾料，進行乳牛糞堆肥排氣中氨氣去除試驗，結果顯示去除率可達 97.8%，但氮素損失亦達 6.5% (Zhong *et al.*, 2020)。另有研究利用腐熟堆肥當作生物濾床填充濾料，用以去除堆肥過程中排出的硫化氫，發現濾料吸附能力是去除硫化氫的主要因子，貢獻了 64.2% 的去除效率，而微生物活性則貢獻了 35.8% (Yuan *et al.*, 2019)。

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2645 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所經營組。

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所主任秘書室。

(4) 通訊作者，E-mail: liawrb@mail.tlri.gov.tw。

本研究為探討生物濾床應用除臭模式，將試驗設計成 4 種處理組，包括蛇木屑組、蛇木屑混合堆肥組、蛇木屑與調濕組及蛇木屑混合堆肥與調濕組。分析各組的氨氣與異味去除效率，並以分子生物學方法進行各組微生物組成之分析，期望找出較佳的應用模式，並推廣應用於相關產業。

## 材料與方法

### I. 濾床模型試驗

應用先前研究結果所設計之 4 個圓柱型模型濾床，連接至送風式的箱型堆肥舍，其中 C、D 組模型槽連接具有 0.7 mm 噴頭之調濕設備 (程等, 2010)，利用水分天平快速檢測濾材樣品水分含量，並使其水分含量保持在約 60%。A、C 組填充濾料為蛇木屑，B、D 組填充濾料為蛇木屑混合堆肥。雞及豬糞堆肥依一般堆肥程序進行送風 (2 min/30 min)，並監測堆肥深度 10 cm 與 30 cm 的溫度，當 10 cm 溫度下降至 45℃ 以下時，則進行翻堆，翻堆時間如圖 1 所示；而產生之臭氣則由與送風機同步之鼓風機抽出後，經分配及經由流量計調整流量後送入 4 個模型濾床，使空床停留時間 (empty bed retention time) 皆為 60 s。定期分析各處理組濾床進氣中與排氣中之氨氣濃度，以計算氨氣之去除效率。

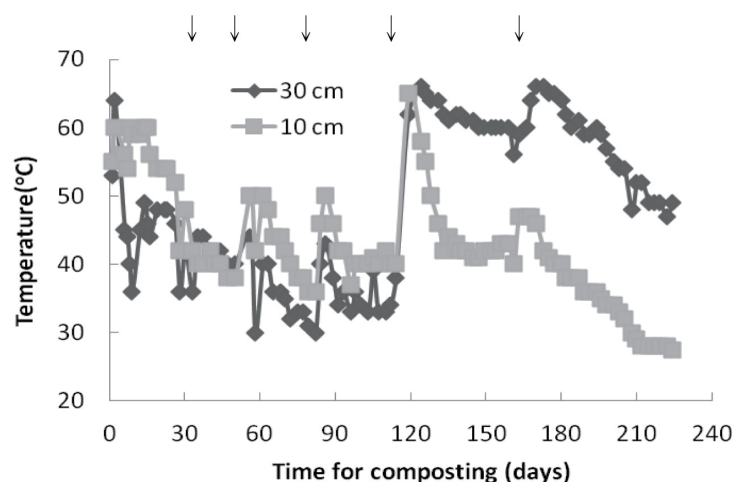


圖 1. 箱型送風式堆肥舍堆肥深度 10 cm 與 30 cm 的溫度。箭頭所指為翻堆時間。

Fig. 1. Composting temperatures at depths of 10 cm and 30 cm in an aerated and in-vessel composting house. Arrows mean the days of turning.

### II. 氨氣分析方法

排氣中氨氣濃度測定採用空氣中氨氣之檢測方法—靛酚 / 分光光度計法 (NIEA A426.71B)；進氣中氨氣濃度以氣體檢知器 (GV-100S, Gastec, Japan) 與北川式氣體檢知管 (No. 105SD, Kitagawa, Japan) 測定。

### III. 異味官能測定

以環保署公告之異味污染物官能測定法—三點比較式嗅袋法 (NIEA A201.14A) 進行異味測定。

### IV. 統計分析

利用 SAS 統計分析系統 (SAS, 1988) 之一般線性模式程式 (general linear model procedure, GLM) 進行氨氣去除效率數據變異分析，並以鄧肯氏多次變域法 (Duncan's multiple range test)，比較處理間之差異顯著性。

### V. 菌數分析

取濾料樣品 10 g 溶於 100 mL 無菌水中，震盪 1 h 後，連續以無菌水稀釋，取稀釋液 0.1 mL 塗抹於固態培養基。培養基成分、培養時間、溫度，則參考室內空氣中總細菌數檢測方法 NIEA E301.11C (行政院環保署環境檢驗所, 2008a)，與室內空氣中總真菌數檢測方法 NIEA E401.11C (行政院環保署環境檢驗所, 2008b)。自營性氨氧化菌菌數測定則參照 Schmidt and Besler (1982) 之方法，取 10 g 樣品加入 100 mL 無菌水作成懸浮液，以無菌水 10 倍連續稀釋，每一稀釋度取 1 mL 菌液於液態培養基中 (每 L 含量： $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.5 mg,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  13.4 ng,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  40 ng, Bromothymol blue 2 ng,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.204 mg,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2.46 ng, EDTA- $\text{Na}_2$  3.31 ng,

NaMo $\cdot$ 2H $_2$ O 0.1 ng, MnCl $_2$  0.2 ng, CoCl $_2$   $\cdot$  6H $_2$ O 0.002 ng, ZnSO $_4$   $\cdot$  7H $_2$ O 0.1 ng, CuSO $_4$   $\cdot$  5H $_2$ O 0.02 ng), 進行 3 重複, 連續 6 週測定亞硝酸及硝酸呈色反應, 結果穩定後以對照表計算菌數。

## VI. 濾料菌相分析

試驗第 180 天採各組濾料樣品, 每組採 5 點樣品共約 100 g 混合均勻後, 秤取 10 g 樣品, 加 100 mL 無菌水, 100 rpm 下震盪 30 min 後, 以 5,000 rpm 轉速離心後, 沉澱物以 DNA 萃取套組 (PowerSoil<sup>®</sup> DNA Isolation Kit, Mobio Lab. Co.) 萃取 DNA, 並參考先前實驗室建立之方法進行 (廖等, 2017)。有關細菌、古細菌及真菌專一之 16S 或 18S rRNA 基因片段選殖、定序及序列處理與比對分析, 則參考廖等 (2009) 所建立的操作流程進行。

# 結果與討論

## I. 氨氣去除效率

試驗所用之箱型送風式堆肥舍共有 2 槽, 試驗 1 至 110 天 (即第 1 批) 2 槽皆堆置雞糞堆肥, 第 111 天至 220 天 (即第 2 批) 堆置豬糞堆肥, 其溫度變化如圖 1。堆肥中心溫度在第 1 次翻堆後, 皆可達 60°C, 顯示發酵作用正常進行。

而第 1 批雞糞堆肥在發酵第 2 天產生氨氣濃度最高, A、B、C、D 組分別為 3,000、3,500、2,900、2,800 ppm (圖 2 左); 第 2 批豬糞堆肥產生之氨氣最高在第 8 天, 分別為 150、140、110、80 ppm (圖 2 右), 雞糞堆肥在發酵過程中產生氨氣濃度較高。C、D 組經過調濕處理, 氨氣濃度略低於 A、B 組, 表示噴霧調濕可去除部分氨氣, 惟經測定各組生物濾床樣品, 各組水分含量約為 60%。經過生物濾床反應後, 排出氣體中的氨氣濃度則大幅降低 (圖 3), 平均值分別為 0.096、0.100、0.100、0.093 ppm, 組間無顯著差異, 皆在 1 ppm 以下, 低於周界氨氣排放標準值—固定污染源空氣污染物排放標準 (行政院環保署, 2013)。整理多篇探討畜牧場空氣品質及污染物削減效率的文獻 (Van der Heyden *et al.*, 2015), 結果發現雞舍內氨氣為 1—50 ppm; 豬舍內則為 2—87 ppm, 以椰殼、泥炭 (peat)、木片 (wood chip) 等為濾料的生物濾床處理豬舍氨氣, 在空床停留時間 2.6—40 s 條件下, 去除率為 -40—90%; 而雞舍異味在空床停留時間 3 s 條件下, 去除率為 -60—93% (平均值為 62%), 去除率差異甚大。相對而言, 使用腐熟堆肥作為濾料有較為一致的氨氣去除效果。Pagans *et al.* (2005) 利用腐熟堆肥當作生物濾床的濾料, 在氨氣承載率為 846—67,100 mg NH $_3$  m $^{-3}$  biofilter h $^{-1}$  的操作條件下, 生物濾床的整體氨氣移除效率可達 95.9%, 亦可發現, 在堆肥溫度較高時, 氨氣的釋放量較多。同樣地, Zhong *et al.* (2020) 以完全腐熟的堆肥當作生物濾床的填充濾料, 進行乳牛糞堆肥排氣中氨氣去除試驗, 結果顯示去除率可達 97.8%, 但氮素損失亦達 6.46%。因此, 利用腐熟的堆肥當作生物濾床的填充濾料, 可以有效降低堆肥過程排放氣體中氨氣的濃度。此外, 利用纖維素當作生物濾床襯墊, 以垂直或水平型式的生物濾床結合排氣系統及廢水循環的處理方式, 皆可有效降低豬舍內氨氣濃度, 去除效率分別為 98.5% 與 98.7% (Febrisiantosa *et al.*, 2019)。

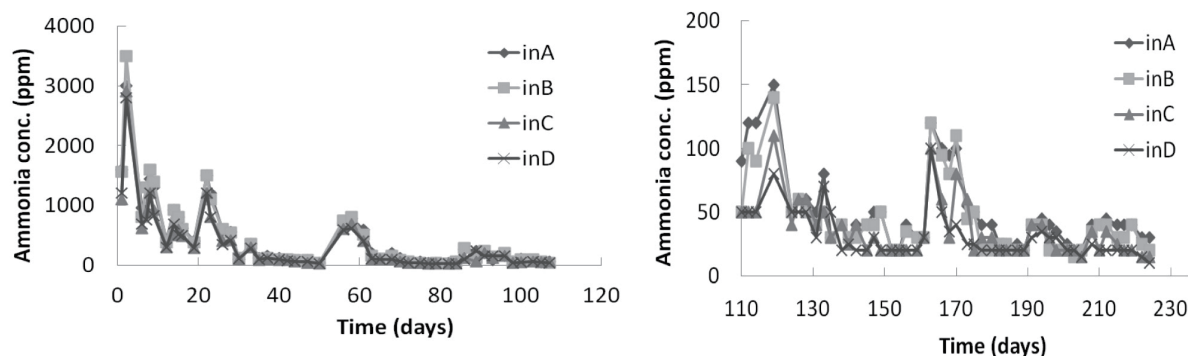


圖 2. 生物濾床進氣中的氨氣濃度。

左圖：雞糞堆肥；右圖：豬糞堆肥。A 組：蛇木屑；B 組：蛇木屑混合堆肥；C 組：蛇木屑與調濕；D 組：蛇木屑混合堆肥與調濕。

Fig. 2. The ammonia concentrations detected in the inlet gas from biofilters.

Left: chicken manure compost; Right: swine manure compost. A: Biofilter composed of fern chips; B: Biofilter composed of fern chips and matured compost; C: Biofilter composed of fern chips and humidified; D: Biofilter composed of fern chips and matured compost and humidified.

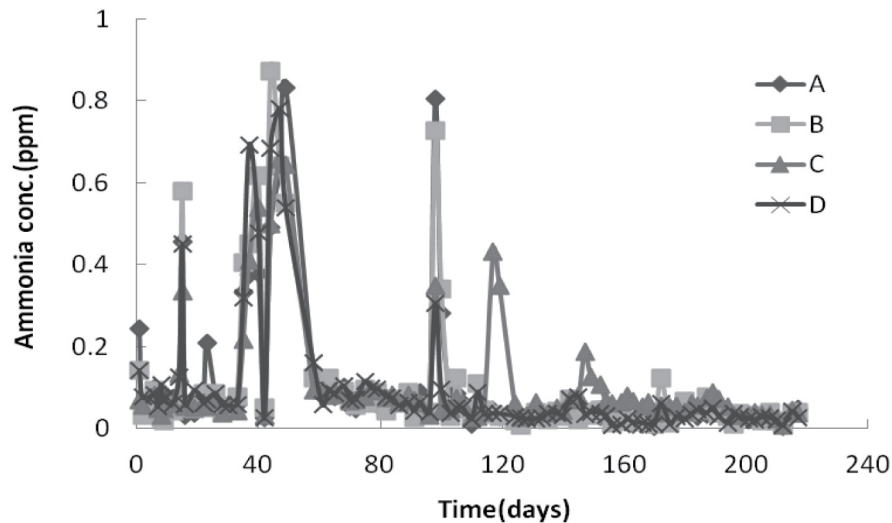


圖 3. 各組生物濾床排氣中的氨氣濃度。

A 組：蛇木屑；B 組：蛇木屑混合堆肥；C 組：蛇木屑與調濕；D 組：蛇木屑混合堆肥與調濕。

Fig. 3. The ammonia concentrations detected in the outlet gas from the biofilters.

A: Biofilter composed of fern chips; B: Biofilter composed of fern chips and matured compost; C: Biofilter composed of fern chips and humidified; D: Biofilter composed of fern chips and matured compost and humidified.

## II. 異味去除效率

表 1 為各組生物濾床進氣及排氣中之異味，在第一批雞糞堆肥翻堆後（第 9、26、56、84 天）進氣中異味皆大於檢測範圍 ( $3,000 \text{ OU/m}^3$ )，僅在第 84 天經噴霧後，異味降為  $634 \text{ OU/m}^3$ 。而在翻堆前，發酵作用趨於緩和時（第 19、54、79 天），未經噴霧之 A、B 組進氣異味為  $736.4 - 1,605.0 \text{ OU/m}^3$ ，而經噴霧之 C、D 組進氣異味為  $484.3 - 813.7 \text{ OU/m}^3$ ，由上述資料比較推得噴霧可以有效降低異味。在經過生物濾床作用後，A、B、C、D 組異味之平均值分別為  $55.4$ 、 $55.5$ 、 $44.2$ 、 $42.4 \text{ OU/m}^3$ ，其中 C、D 組較 A、B 組低，但無統計分析之顯著差異性。

表 1. 各處理組進氣及排氣中異味檢測值

Table 1. The odor of inlet and outlet gas among all treatment groups

Day	Inlet odor ( $\text{OU/m}^3$ )		Outlet odor ( $\text{OU/m}^3$ )			
	A, B	C, D	A	B	C	D
9	>3,000.0	>3,000.0	40.5	78.2	30.0	54.6
19	1000.0	813.7	22.9	48.4	15.1	36.6
26	>3,000.0	>3,000.0	24.2	100.0	20.9	25.1
54	736.4	484.3	16.3	30.0	25.1	50.1
56	>3,000.0	>3,000.0	120.2	44.7	47.0	54.6
79	1605.0	666.5	66.6	81.3	63.4	58.3
84	>3,000.0	634.0	81.4	54.6	44.7	36.6
113	1,247.4	545.9	73.6	44.7	99.3	30.2
157	447.5	100.0	48.4	30.0	66.7	48.2
205	2,289.3	2,290.9	59.5	43.4	30.0	30.0
Average			55.4	55.5	44.2	42.4

A: Biofilter composed of fern chips; B: Biofilter composed of fern chips and matured compost; C: Biofilter composed of fern chips and humidified; D: Biofilter composed of fern chips and matured compost and humidified.

本試驗之生物濾床去除異味效率大多為 90% 以上，而文獻中指出以質譜氣相層析儀 (GC-MS) 測定畜牧場異味物質約有 300 種化合物，經過兩種生物濾床處理分別剩下 45 與 30 種化合物，以官能測定法生物濾床去除率



為 82 – 99% (Luo and Agnew, 2001)。而以椰子纖維加泥炭 (1 : 1) 濾料去除豬舍異味平均去除率為 81% (31.6 – 96.7%) (Hartung *et al.*, 2001)；以大於 20 mm 木片當作濾料時，豬舍異味與氨氣去除效率分別為 77 – 95% 及 53 – 93% (Sheridan *et al.*, 2002)；以糞尿堆肥及椰子殼 1 : 1 作為濾料，去除牛糞堆肥產生之氨氣，在試驗 19 天期間，去除率可達 100% (Hong and Park, 2005)。有關畜牧場異味處理效率文獻 (Van der Heyden *et al.*, 2015)，結果發現雞舍內異味為 278 – 3,032 OU/m<sup>3</sup>；豬舍內則為 517 – 18,063 OU/m<sup>3</sup>，以生物濾床處理豬舍異味在空床停留時間 2.6 – 40.0 s 條件下，去除率為 -5 – 95%，差異甚大；而雞舍異味在空床停留時間 3 s 條件下，去除率為 46 – 92%。另有研究以 2 份軟木、樹皮與 1 份堆肥混合後當作生物濾床填充物，進行去除商業鴨舍異味評估試驗，結果發現試驗期整體平均異味去除效率高達 95 ± 3% (Lau and Cheng, 2007)。這些試驗雖濾料、空床停留時間、進氣異味濃度等條件各不相同，但與本研究皆有相似之結果，即當濾料中添加微生物 (堆肥) 時，便可更有效降低畜牧生產所產生之異味。

### III. 菌相分析

以培養計數法測定濾料中活菌數，D 組在真菌數  $12.0 \pm 1.6 \times 10^5$  CFU/g (CFU: colony forming unit) 及細菌數  $30.0 \pm 12.0 \times 10^5$  CFU/g 皆高於其他各組 (表 2)。此外，以 MPN 法 (MPN: most probable number) 測定濾料中自營性氨氧化菌數，D 組亦明顯高於他組。D 組濾料較適合微生物之生長，其中自營性氨氧化菌數較其他組明顯高出 100 倍以上，以微生物生長的狀況評估，D 組對異味物質尤其氨氣應有較佳之去除效果。

表 2. 生物濾床濾料中之真菌、細菌及氨氧化菌數

Table 2. Number of fungi, *Bacteria*, and ammonia oxidizing *Bacteria* in the media of biofilters

No. of microorganisms	A	B	C	D
Fungi ( $\times 10^5$ CFU/g)	$4.3 \pm 4.9$	$9.0 \pm 9.5$	$3.4 \pm 5.7$	$12.0 \pm 1.6$
Bacteria ( $\times 10^5$ CFU/g)	$5.0 \pm 1.5$	$5.5 \pm 1.9$	$2.1 \pm 1.3$	$30.0 \pm 12.0$
Ammonia oxidizing bacteria (MPN/g)	92	46,000	150	4,600,000

A: Biofilter composed of fern chips; B: Biofilter composed of fern chips and matured compost; C: Biofilter composed of fern chips and humidified; D: Biofilter composed of fern chips and matured compost and humidified. CFU: colony forming unit. MPN: most probable number.

進一步分析，濾料中微生物的種類，由四組濾料之小次單位核糖體核糖核酸 (small subunit ribosomal RNA, ssu rRNA) 基因序列分析結果顯示，各組之細菌皆以 *ProteoBacteria* 菌門為主 (表 3)，分別佔 64.3、63.2、72.4 及 65.2%。其中 D 組尚有 *Bacteroidetes*、*AcidoBacteria*、*Firmicutes* 3 個菌門細菌，分別為 *Sphingobacteriales*、*Acidobacteriales*、*Bacillales* 菌科，菌屬則有 *Thermobacillus* 與 *Nitrosospira*，多樣性較豐富。另僅在 D 組發現古細菌，屬於 *Euryarchaeota* 菌門、*Methanomicobia* 目之甲烷菌。D 組中之固氮菌 *Rhizobiales Pseudolabrys* 菌屬及硝化菌 *Nitrosomonadales* 菌科 *Nitrosospira* 菌屬，可能參與生物濾床之氮循環作用，達到去除堆肥異味中氨氣之效果。

Yin and Xu (2009) 探討生物濾床填充堆肥或污泥作為濾料對氨氣去除的效果，發現去除效率分別為 97 – 99% 與 95 – 99%，且以變性梯度凝膠电泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 分析技術比較不同樣品間的條帶差異，並以定序方式解析所代表的可能微生物種類，以堆肥為濾料之生物濾床，其中之優勢菌為 *Nitrosospira* sp.，然以污泥作為濾料生物濾床中的優勢菌則為 *Nitrosomonas* sp.。Chen and Wu (2010) 利用 DGGE 技術分析濾料中細菌多樣性的差異，結果發現多樣性的高低如下：污水污泥加腐熟堆肥組 > 污水污泥加木片組 > 污水污泥組，且將特異性的 DNA 條帶定序與資料庫比對，所代表的微生物有 *Nitrosomonas* sp.、*Nitrosospira* sp.、*Nitrospira* sp.、*Thermoactinomyces* sp. 及 *Terrabactes* sp.；同樣發現堆肥中的優勢菌門為 *ProteoBacteria*。

在真菌之菌相分布方面，A 組之真菌菌相最為單純，40 個株系僅分成 3 個操作分類單元 (operational taxonomic unit, OTU) (表 4)。其中 95% (38/40) 株系為同一種 OTU，其序列與 *Allomyces macrogynus* 有 92% 相同度。B 組 37 個株系中分屬 19 個 OTUs，*Lacrymaria velutina* 所占的比例最高，為 16%。C 組 38 個株系中分屬 10 個 OTUs，OTU C105 占 58%，其序列與 *Paecilomyces* sp. 和 *Acremonium* sp. 有 99% 相同度。D 組 39 個株系中分屬 10 個 OTUs，OTU D134 占 49%，其序列與 *Stilbella fimetaria*、*Galactomyces geotrichum*、*Neurospora crassa* 有 98% 相同度。目前為止，極少研究探討生物濾床中真菌相與異味去除的相關性。有研究應用接種特定真菌 (*Pleurotus ostreatus* IRAN 1781C) 之生物濾床，以去除空氣中揮發性化合物如甲苯，並發現去除能力較接種特定細菌 (*Pseudomonas putida* PTCC 1694) 之生物濾床為高 (Ghasemi *et al.*, 2020)。一般發現，以生物過濾法處理水

溶性高的低濃度揮發性化合物有較佳的效果，然細菌性生物濾床處理較低水溶性分子的表現，則較真菌性生物濾床為差 (Vergara-Fernández *et al.*, 2018)。Zhang *et al.* (2013) 分析水庫底泥微生物多樣性時，多個樣品中可發現 *A. macrogynus* 為優勢菌種，但此菌扮演的角色與具有的功能則屬未知，更早的研究曾經利用此菌合成幾丁質 (Porter and Jaworski, 1966)。另需關注的菌株為 *G. geotrichum*，此菌具有生物降解與生物修護的特性，可用作有害物質如 DTT 的分解、廢水的處理、乳品的加工，甚至亦可用於生質燃料生產 (Grygier *et al.*, 2017)。因此，生物濾床若含有此類真菌將可能增進異味物質的分解。

表 3. 生物濾床濾料中之細菌與古細菌之分類

Table 3. Classification of *Bacteria* and archaea in the media of biofilters<sup>a</sup>

Group	Domain	Phylum	Order	Genus
A	<i>Bacteria</i> (14) <sup>b</sup>	<i>Bacteroidetes</i> (1)	<i>Sphingobacteriales</i> (1)	<i>Burkholderia</i> (1)
		<i>Verrucomicrobia</i> (2)	<i>Verrucomicrobiales</i> (2)	<i>Hyphomicrobium</i> (1)
		<i>Proteobacteria</i> (9)	<i>Burkholderiales</i> (1)	
			<i>Rhizobiales</i> (1)	
			<i>Rhodospirillales</i> (1)	
B	<i>Bacteria</i> (19)	<i>Firmicutes</i> (3)	<i>Bacillales</i> (3)	<i>Burkholderia</i> (3)
		<i>Bacteroidetes</i> (3)	<i>Sphingobacteriales</i> (2)	
		<i>Proteobacteria</i> (12)	<i>Xanthomonadales</i> (3)	
			<i>Rhizobiales</i> (3)	
			<i>Sphingomonadales</i> (1)	
			<i>Burkholderiales</i> (3)	
C	<i>Bacteria</i> (29)	<i>Firmicutes</i> (1)	<i>Bacillales</i> (1)	<i>Burkholderia</i> (6)
		<i>Acidobacteria</i> (4)	<i>Acidobacteriales</i> (4)	<i>Fulvimonas</i> (1)
		<i>Proteobacteria</i> (21)	<i>Rhodospirillales</i> (3)	
			<i>Xanthomonadales</i> (2)	
			<i>Burkholderiales</i> (8)	
D	<i>Archaea</i> (5)	<i>Euryarchaeota</i> (5)	<i>Methanomicrobia</i> (4)	<i>Methanothrix</i> (3)
				<i>Methanocorpusculum</i> (1)
	<i>Bacteria</i> (23)	<i>Bacteroidetes</i> (2)	<i>Sphingobacteriales</i> (2)	<i>Thermobacillus</i> (1)
		<i>Acidobacteria</i> (2)	<i>Acidobacteriales</i> (2)	<i>Nitrosospira</i> (1)
		<i>Firmicutes</i> (3)	<i>Bacillales</i> (3)	<i>Pseudolabrys</i> (1)
		<i>Proteobacteria</i> (15)	<i>Xanthomonadales</i> (2)	
			<i>Rhodospirillales</i> (1)	
			<i>Rhizobiales</i> (6)	

<sup>a</sup> The confidence threshold for classification in RDP Naive Bayesian rRNA Classifier is 80%.

<sup>b</sup> The number of clones are shown in parentheses. If the clones belonging to the unclassified are not shown in the table.

表 4. 生物濾床濾料中之真菌分類

Table 4. Classification of fungi in the media of biofilters

OTU <sup>a</sup>	Clone no.	Closest species	Identity (%)
A131 <sup>b</sup>	38/40	<i>Allomyces macrogynus</i>	92
A119	1/40	<i>Aspergillus ustuis</i>	100
A117	1/40	<i>Lentomitella cirrhosa</i>	98
B133 <sup>c</sup>	1/37	<i>Mortierella wolffi</i>	97
B132	6/37	<i>Lacrymaria velutina</i>	99
B103	5/37	<i>Psathyrella gracilis</i>	99
B127	3/37	<i>Trichophyton longifusum</i> , <i>Arthroderma uncinatum</i> , <i>Microsporum canis</i> , <i>Penicillium viridicatum</i>	100
B114	1/37	<i>Assulina seminulum</i> , <i>Placocista spinosa</i>	96
B134	3/37	<i>A. macrogynus</i>	92

表 4. 生物濾床濾料中之真菌分類 (續)

Table 4. Classification of fungi in the media of biofilters (continue)

OTU <sup>a</sup>	Clone no.	Closest species	Identity (%)
B144	2/37	<i>Ascobolus crenulatus</i>	99
B110	1/37	<i>Rhizophlyctis rosea</i> , <i>Rhizophydium sphaerotheca</i>	98
B123	1/37	<i>R. rosea</i>	96
B102	1/37	<i>Chamaeota sinica</i> , <i>Tulostoma macrocephala</i>	96
B121	1/37	<i>Candida maltosa</i>	98
B138	4/37	<i>Monacrosporium geophyropagum</i> , <i>Dactylella rhopalota</i> , <i>Arthrobotrys musiformis</i> , <i>Monacrosporium doedycoides</i>	99
B120	1/37	<i>A. unguis</i>	99
B108	1/37	<i>Euglypha rotunda</i>	95
B106	1/37	<i>L. cirrhosa</i>	98
B115	1/37	<i>Hypocrea koningii</i> , <i>Trichoderma viride</i>	99
B107	1/37	<i>Saccharomycopsis selenospora</i> , <i>Arthroascus schoenii</i>	92
B111	2/37	<i>Cordyceps sphecocephala</i> , <i>Hymenostilbe odonatae</i> , <i>Ophiocordyceps tracentri</i> , <i>Myrothecium roridum</i>	98
B116	1/37	<i>Trinema lineare</i>	100
C119 <sup>d</sup>	1/38	<i>Cercomonas phylloplana</i>	94
C105	22/38	<i>Paecilomyces sp.</i> , <i>Acremonium sp.</i>	99
C138	2/38	<i>A. schoenii</i>	91
C125	1/38	<i>Cercomonadida sp.</i>	99
C146	1/38	<i>Rhizophlyctis rosea</i>	97
C113	2/38	<i>Paecilomyces sp.</i> , <i>Acremonium sp.</i>	94
C129	6/38	<i>P. gracilis</i> , <i>L. velutina</i> , <i>Coprinus comatus</i>	99
C123	1/38	<i>Amylocarpus encephaloides</i> , <i>Cryptovalsa ampelina</i>	96
C136	1/38	<i>Galactomyces geotrichum</i>	100
C135	1/38	<i>Bodomorpha sp.</i>	94
D129 <sup>e</sup>	4/39	<i>P. gracilis</i> , <i>L. velutina</i> , <i>Coprinus comatus</i>	99
D134	19/39	<i>Stilbella fimetaria</i> , <i>G. geotrichum</i> , <i>Neurospora crassa</i>	98
D145	4/39	<i>Chaetomium elatum</i> , <i>Trichocladium asperum</i>	99
D143	5/39	<i>Hypocrea pseudokoningii</i> , <i>T. viride</i>	99
D114	1/39	<i>Orbilia auricolor</i> , <i>Monacrosporium geophyropagum</i> , <i>Dactylella rhopalota</i> , <i>Arthrobotrys superba</i>	98
D125	1/39	<i>Rhizophlyctis rosea</i> , <i>Endogone pisiformis</i>	99
D112	1/39	<i>L. cirrhosa</i> , <i>Rhamphoria delicatula</i> , <i>Papulosa amerospora</i>	98
D108	2/39	<i>Amaurascopsis perforatus</i> , <i>Arachniotus littoralis</i>	97
D121	1/39	<i>Paecilomyces sp.</i> , <i>Acremonium sp.</i>	99
D101	1/39	<i>Leuconeurospora pulcherrima</i> , <i>Pseudeurotium spzonatum</i>	99

<sup>a</sup> OUT: operational taxonomic unit.<sup>b, c, d, e</sup> A###, B###, C###, and D### are the representatives for the same OTU, respectively.

## 參考文獻

行政院環保署。2013。固定污染源空氣污染物排放標準。https://oatout.epa.gov.tw/Law/LawContent.aspx?id=FL015350。  
 行政院環保署環境檢驗所。2008a。室內空氣中總細菌濃度檢測方法，NIEA E301.11C。

- 行政院環保署環境檢驗所。2008b。室內空氣中總真菌濃度檢測方法，NIEA E401.11C。
- 高銘木、李春樹、鄭春長、吳新富、蘇振昇。1996。生物濾床去除畜殖堆肥場異味之模廠試驗研究。第十三屆空氣污染控制技術研討會論文集，中華民國環工年會，第 175-179 頁。
- 程梅萍、廖仁寶、蕭庭訓。2010。以生物濾床去除堆肥場異味之研究。畜產研究 43：259-271。
- 廖仁寶、陳若菁、吳明哲、李佳音。2017。乳牛瘤胃細菌多樣性分析與新穎脂解酵素基因篩選。畜產研究 50：124-133。
- 廖仁寶、黃文瑛、吳明哲、李佳音、程梅萍。2009。臺灣水牛瘤胃微生物多樣性分析。畜產研究 42：171-179。
- 劉雅醇、康獻仁、王紓愍、梁筱梅。2019。不同比例稻殼及草炭墊料對白肉雞生長性狀、接觸性皮膚炎及欄舍氨氣濃度之影響。畜產研究 52：241-248。
- 蕭庭訓、黃裕益、沈韶儀、程梅萍。2014。生物濾材去除豬舍氨氣與異味之評估。畜產研究 47：33-42。
- Alkokaik, F. N. 2009. Ozone treatment of animal manure for odor control. American J. Environ. Sci. (China) 5: 765-771.
- Chen, L. and X. W. Wu. 2010. Reduction of ammonia, hydrogen sulfide, and short-chain fatty acids emission during the sewage sludge composting. Clean (Weinh) 38: 998-1005.
- Das, J., E. R. Rene, C. Dupont, A. Dufourny, J. Blin and E. D. van Hullebusch. 2019. Performance of a compost and biochar packed biofilter for gas-phase hydrogen sulfide removal. Bioresour. Technol. 273: 581-591.
- Febrisantosa, A., H. L. Choi, A. Renggan, S. I. A. Sudiarto and J. Lee. 2019. The investigation of combined ventilation-biofilter systems on odor reduction efficiency by using recycled treated wastewater. Asian-Australas. J. Anim. Sci. doi: 10.5713/ajas.19.0777. [Epub ahead of print].
- Feilberg, A., L. Dezhao, A. Adamsen, M. Hansen and K. Jonassen. 2010. Odorant emissions from intensive pig production measured by online proton-transfer-reaction mass spectrometry. Environ. Sci. Technol. 44: 5894-5900.
- Ghasemi, R., F. Golbabaie, S. Rezaei, M. R. Pourmand, R. Nabizadeh, M. J. Jafari and E. Masoorian. 2020. A comparison of biofiltration performance based on *Bacteria* and fungi for treating toluene vapors from airflow. AMB Express 10: 8.
- Grygier, A., K. Myszka and M. Rudzińska. 2017. *Galactomyces geotrichum* - moulds from dairy products with high biotechnological potential. Acta Sci. Pol. Technol. Aliment. 16: 5-16.
- Hartung, E., T. Jungbluth and W. Buscher. 2001. Reduction of ammonia and odor emissions from a piggery with biofilters. Trans. ASAE. 44: 113-118.
- Ho, K., Y. Chung and C. Tseng. 2008. Continuous deodorization and *Bacterial* community analysis of a biofilter treating nitrogen-containing gases from swine waste storage pits. Bioresour. Technol. 99: 2757-2765.
- Hong, J. H., and K. J. Park. 2005. Compost biofiltration of ammonia gas from bin composting. Bioresour. Technol. 96: 741-745.
- Jaber, M. B., B. Anet, A. Amrane, C. Couriol, T. Lendormi, P. L. Cloirec, G. Cogny and R. Fillières. 2014. Impact of nutrients supply and pH changes on the elimination of hydrogen sulfide, dimethyl disulfide and ethanethiol by biofiltration. Chem. Eng. J. 258: 420-426.
- Lau, A. and K. Cheng. 2007. Removal of odor using biofilter from duck confinement buildings. J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard Subst. Environ. Eng. 42: 955-959.
- Luo, J. and M. P. Agnew. 2001. Gas characteristics before and after biofiltration treating odorous emissions from animal rendering processes. Environ. Technol. 22(9): 1091-1103.
- National Research Council. 2003. Air Emissions from Animal Feeding Operations: Current Knowledge, Future Needs. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/10586>.
- Pagans, E., X. Font and A. Sánchez. 2005. Biofiltration for ammonia removal from composting exhaust gases. Chem. Eng. J. 113: 105-110.
- Porter, C. A. and E. G. Jaworski. 1966. The synthesis of chitin by particulate preparations of *Allomyces macrogynus*. Biochemistry 5: 1149-1154.
- SAS. 1988. SAS/STAT 6.03. SAS Institute Inc., Cary, NC. USA.
- Schmidt, E. L. and L. W. Besler. 1982. Nitrifying *Bacteria*. In: Method of soil analysis, Part 2. Chemical and microbiological properties. 2nd ed. ed. Page, A. L., Madison, USA, pp. 1027-1042.
- Sheridan, B., T. Curran, V. Dodd and J. Colligan. 2002. Biofiltration of odour and ammonia from a pig unit-pilot-scale study. Biosyst. Eng. 82: 444-453.
- UNECE/LRTAP. 2012. European Union emission inventory report 1990e2010 under the UNECE Convention on Long-range



- Transboundary Air Pollution (LRTAP). EEA Technical report no 8/2012. European Environment Agency.
- USEPA. 1995. Control and pollution options for ammonia emissions. EPA-4561R-95-002.
- Van der Heyden, C., P. Demeyer and E. I. P. Volcke. 2015. Mitigating emissions from pig and poultry housing facilities through air scrubbers and biofilters: state-of-the-art and perspectives. *Biosyst. Eng.* 134: 74-93.
- Vergara-Fernández, A., S. Revah, P. Moreno-Casas and F. Scott. 2018. Biofiltration of volatile organic compounds using fungi and its conceptual and mathematical modeling. *Biotechnol. Adv.* 36: 1079-1093.
- Yin, J. and W. Xu. 2009. Ammonia biofiltration and community analysis of ammonia-oxidizing *Bacteria* in biofilters. *Bioresour. Technol.* 100: 3869-3876.
- Yuan, J., L. Du, S. Li, F. Yang, Z. Zhang, G. Li and G. Wang. 2019. Use of mature compost as filter media and the effect of packing depth on hydrogen sulfide removal from composting exhaust gases by biofiltration. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 26: 3762-3770.
- Zhang, H., T. Huang and T. Liu. 2013. Sediment enzyme activities and microbial community diversity in an oligotrophic drinking water reservoir, Eastern China. *PLoS ONE* 8: e78571.
- Zhong, X. Z., Z. Y. Sun, S. P. Wang, Y. Q. Tang, K. Kida and A. Tanaka. 2020. Minimizing ammonia emissions from dairy manure composting by biofiltration using a pre-composted material as the packing media. *Waste Manag.* 102: 569-578.

# Odor removal efficiency and microbial profiling of the biofilter <sup>(1)</sup>

Ren-Bao Liaw <sup>(2)(4)</sup> Ting-Shun Hsiao <sup>(2)</sup> and Mei-Ping Cheng <sup>(3)</sup>

Received: May 5, 2020; Accepted: Jul. 31, 2020

## Abstract

The purpose of the study aims to evaluate the odor removal efficiency and microbial composition of biofilters applied to ventilating compost depots. The biofilters were divided into four groups, namely A: fern chips, Group B: mixture of fern chips Group C: matured compost, fern chips with humidifying, and Group D: mixture of fern chips and matured compost with humidifying. The odor of inlet and outlet gas were measured, and the microorganisms in the filter samples were identified. The results showed ammonia removal efficiencies of the all treatments were nearly 100% without significant difference during 220 days of operations. The odor concentrations detected in the outlet of the four treatments were 55.4, 55.5, 44.2 and 42.4 OU/m<sup>3</sup>, respectively, while the latter two biofilters with humidify were lower in odor emission. The data from ssu rRNA gene sequence analysis of the four biofilters showed the phylum *ProteoBacteria* as dominants, which account for 64.3, 63.2, 72.4 and 65.2% of domain *Bacteria* in biofilter A, B, C, D, respectively. In particular, phyla *Bacteroidetes*, *Acidobacteriales*, and *Firmicutes* in biofilter D were classified as orders *Sphingobacteriales*, *Acidobacteriales*, and *Bacillale* with relatively high diversity. The methanogenic archaea classified as phylum *Euryarchaeota* and class *Methanomicrobia* was only found in biofilter D. Moreover, the nitrogen fixation bacterium affiliated to family *Rhizobiales* and genus *Pseudolabrys* and the ammonia oxidizing bacterium affiliated to family *Nitrosomonadales* and genus *Nitrosospira* were also found in biofilter D. Those microorganisms might participate in the nitrogen cycles occurred in the biofilter and help to remove the ammonia produced from the composting process. In summary, D biofilter will be the better choice for odor removal application.

Key words: Odor Removal, Biofilter, Microorganism.

---

(1) Contribution No. 2645 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Livestock Management Division, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(3) Chief Secretary Office, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(4) Corresponding author, E-mail: liawrb@mail.tlri.gov.tw.

# 雞隻性別決定機制概論<sup>(1)</sup>

郭曉芸<sup>(2)(4)</sup> 張以恆<sup>(3)</sup>

收件日期：109 年 5 月 4 日；接受日期：109 年 8 月 3 日

## 摘 要

家禽產業的經營是具有單性別偏好，然而雞之遺傳性別決定系統屬於雌性異基因型組合 (heterozygous system)，無法利用雄性精子篩選的方式達到選性繁殖目的。雞為鳥禽，在演化上介於爬蟲類與哺乳類之間，然而在性別調控上，不具有爬蟲類依環境溫度控制性別的基因表現路徑，染色體上亦無哺乳類動物調控性別的 SRY (sex-determining region of Y chromosome) 基因。越來越多研究指出，鳥類可能具有獨特的性別決定或分化路徑，而其性別決定機制眾說紛紜尚無定論。目前鳥類性別決定之主要假說計有：Z 染色體劑量、W 染色體或雌性相關主導基因及細胞自主作用等，其中並無任一項足可完整解釋鳥類性別決定與分化路徑，但是可以推測每個假說機轉之間相互關聯。雞隻性別形成過程，除在轉錄體層級研究外，表觀遺傳調控 (epigenetic regulation) 亦參與其中，未來可以利用更精確基因編輯 (gene editing) 技術進行更深入的研究探討，以突破目前性別決定與分化理論的瓶頸。

關鍵詞：雞、雌性異配子體系統、性別決定機制。

## 緒 言

雞隻在人類蛋白質供應及疾病動物模式研究上均具有顯著貢獻。畜牧產業中，雞隻供應人類肉與蛋兩大蛋白質食物來源 (Doran *et al.*, 2016)。但這兩種產業生產者對於雞隻性別偏好不同，尤其在雞蛋供應產業上偏好雌性雞隻極為顯著，雄性雞隻的淘汰造成動物福祉與生產成本的問題 (Doran *et al.*, 2018)。如能建立生產單一性別或具提早辨識性別的技術，對家禽產業極有助益。雞隻具有生醫研究應用價值，因為具有較短的生產間隔、生殖細胞易於操作，並且與人類在生理上有部分相似獨特性特質，在發生生物學、幹細胞生物學、毒性測試及人類疾病 (Burt, 2007; Tolosa *et al.*, 2013; Ozgural *et al.*, 2019; Vilches-Moure, 2019) 等研究範疇上，均為有價值的實驗動物模式。如能識明不同性別雞隻對疾病的表現差異，對作為人類疾病模式的參考度將可大幅提高。無論是在畜產應用或生醫研究，雞隻性別辨識與表現差異均為首要技術，而調節孵化雞隻的性別取決於對性別決定機制和性別發育系統之瞭解 (Hirst *et al.*, 2018)，在探究選性原理及性別差異調控因子前，需先確知雞隻性別決定和分化調控基因路徑。本篇專題論著將概述脊椎動物性別決定、鳥類 (雞) 染色體系統與性別決定之主要假說 (表 1)。

## 脊椎動物性別決定與雞性染色體系統

先前研究者認為羊膜脊椎動物的性別均為基因型決定，後來在蜥蜴研究上發現環境孵化溫度與性別比例之間的相關。爬蟲類動物在受精時無法從親代得到性別基因型，這些物種缺乏明顯的異型性染色體 (Dorizzi *et al.*, 1996)，也無法確認性腺的性別。孵化溫度為爬蟲類睪丸發育並抑制卵巢發育或往相反路徑的決定點，以紅耳龜 (*Trachemys scripta*) 為例，孵化溫度為 26°C 時孵化為雄性，孵化溫度為 31°C 為雌性，孵化溫度 29.2°C 則產生大約 1:1 的性別比例 (Crews *et al.*, 1994)。以溫度決定性別的物種會受孵化溫度與持續時間影響，性腺分化早期溫度效應為可逆且可以累積，性別器官發育具有全有全無的特徵 (Crews *et al.*, 1994)。在鳥類與哺乳類動物則沒有上述的溫度決定性別的特徵，而是以具穩定的性染色體同型與異型配子形式，性別比例約為 1:1，符合基因型性別決定模式，即由受精時

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2646 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所生理組。

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所技術服務組。

(4) 通訊作者，E-mail: hykuo@tlri.gov.tw。

短暫時間內染色體遺傳決定後代性別，但鳥類與哺乳類兩者的染色體系統並不相同 (Wilhelm *et al.*, 2007; Major and Smith, 2016)。

表 1. 雞隻性別決定假說摘要

Table 1. Summary of chicken sex determination hypotheses

Hypothesis	Related genes or DNA region	Observation	Reference
(i) Z chromosome dosage compensation	DMRT1	Over-expression results in masculinization of female gonads	Lambert <i>et al.</i> , 2014
	DMRT1	Knockdown results in feminization of male gonads	Smith <i>et al.</i> , 2009
	MHM	Over-expression results in a decline expression of male related genes	Roeszler <i>et al.</i> , 2012
	MHM	Hypermethylation results in an addition expression of male related genes	Itoh <i>et al.</i> , 2011; Rastetter <i>et al.</i> , 2015
(ii) W chromosome or female related dominant genes	HINTW	Highly correlated with ovarian development, may be a candidate gene for female sex determination or a negative regulator of male development	Brenner, 2002; Smith <i>et al.</i> , 2007; Ayers <i>et al.</i> , 2013
	CYP19A1 (aromatase)	Inhibitor results in partial feminization of male gonads	Elbrecht and Smith, 1992
	CYP19A1 (aromatase)	Over-expression results in feminization of male gonads	Vaillant <i>et al.</i> , 2001; Lambeth <i>et al.</i> , 2013
(iii) Cell autonomous	Sex-dimorphic expression genes	Sexual differentiation of some somatic phenotypes cannot be explained by the actions of gonadal steroids	Arnold <i>et al.</i> , 1997
	Sex-dimorphic expression genes	Avian somatic cells possess an inherent sex identity which is cell autonomous	Zhao <i>et al.</i> , 2010

鳥類在演化上比哺乳類更早出現，其性染色體系統為 Z 和 W，不同於哺乳動物的 X 和 Y 染色體系統，兩個物種的性染色體是從不同的體染色體進化而來 (Grave, 2014)。鳥類屬於雌性異型合子系統，母禽性染色體為 ZW，公禽性染色體為 ZZ。以雞為例，其 Z 染色體大小約 82.3 Mb，包含 884 個具蛋白質編碼序列的基因和 348 個非編碼序列基因，如 microRNA 與 lncRNA (Handley *et al.*, 2004)，但多數為與性別無關的管家基因 (housekeeping gene) (Bellott *et al.*, 2010)。在演化上 Z 染色體偏向於保留雄性優勢、性別與繁殖相關的基因 (Mank and Ellegren, 2009; Wright *et al.*, 2012)。W 染色體在演化上可視為 Z 染色體的退化副本 (Mank and Ellegren, 2007; Ayers *et al.*, 2013; Bellott *et al.*, 2017)，在性別決定機制上的證據較無 Z 染色體豐富 (Hirst *et al.*, 2018)，從 W 染色體長度及所含基因數上可見一斑。雞的 W 染色體大小為 Z 染色體的 6%，約 7 Mb，約有 25 至 28 個蛋白質編碼基因和 116 個非編碼 RNA (Bellott *et al.*, 2017) 存在於小部分的偽體染色體區，70% 區域含有 XhoI、EcoRI 和 SspI 類的重複序列 (Saitoh and Mizuno, 1992)，W 染色體上大部分為緊密摺疊的異染色質，轉錄活性很低，極少參與基因表現 (Fridolfsson *et al.*, 1998; Mank and Ellegren, 2007)。

## 鳥禽性別決定假說

### (i) Z 染色體劑量決定 (Z chromosome dosage compensation)

Z 染色體劑量補償為鳥禽性別決定假說之一，Z 染色體基因劑量補償屬於非全面性的，不同於哺乳動物 X 染色體失活的全體性染色體劑量補償系統 (Ellegren *et al.*, 2007; Arnold *et al.*, 2008; Itoh *et al.*, 2011)。X 染色體的劑量補償是指具有 XX 同型合子的雌性，其中一條 X 染色體失去活性的現象，劑量補償效應使雌性與只有一條 X 染色體的雄性基因表現量一致。然而在雄性 ZZ 的染色體上，卻沒有完全遵循劑量補償原則，僅部分 Z 染色體失去活性。非全面性的劑量補償表示 Z 染色體上的某些基因於雌 (ZW)、雄 (ZZ) 之間表現量不均等，雄性 Z 染色體部分基因表現量可為雌性的 1.5 至 2 倍。這個特性有可能造成體內不同組織的性別決定與性別發育的差異 (Zhang *et al.*, 2010; Wright *et al.*, 2012; Ayers *et al.*, 2013)，而這些沒有遵守劑量補償原則的基因，有可能是性別決



定的候選基因 (Hirst *et al.*, 2018)。比較雞隻 Z 染色體與 W 染色體上同源基因於雌、雄個體內的基因劑量總表現，可以再排除總劑量相似的基因，將性別決定候選基因的範圍更為縮小 (Bellott *et al.*, 2017; Hirst *et al.*, 2018)。其中包含於發育睪丸中表現的 DMRT1 (Doublesex and Mab-3 transcription factor 1) 基因和影響 DMRT1 表現的 MHM (male hypermethylated) 區域。

DMRT1 在脊椎動物為保守序列 (conserved sequence)，是一種 Zinc finger 轉錄因子，具保守性的 DNA 結合位置 (DNA-binding motif)，稱為 DM domain。雞之 DMRT1 基因位於 Z 染色體上，在生殖細胞和體細胞中都有表現，但在雄性性腺中表現量明顯較其他組織為高 (Omotehara *et al.*, 2014)。許多證據都支持 DMRT1 是鳥禽之 Z 染色體劑量性別決定因素的假說，且可確認其為雄鳥性器官發育不可或缺的基因之一。在雞雄性胚胎的基因剔除與 RNA 干擾研究中，如抑制 DMRT1 基因表現，左側性腺會出現雌性特異組織特徵、雌性特異基因 CYP19A1 表現上升、雄性睪丸索 (testis cord) 形成紊亂、雄性睪丸發育特異基因 SOX9 基因表現下降等現象，也就是雄性性腺在型態結構和基因表現上雌性化 (Smith *et al.*, 2009)，也增加 DMRT1 在雞隻睪丸發育中為必要因子的證據。同時，於雌性性腺中引入外源性 DMRT1 基因，使得 DMRT1 表現量較正常雌性性腺更為增加，造成雌性性腺特異型態皮質發育延遲，雄性化的睪丸索組織型態出現。在形態分化前也可觀察到與哺乳動物 SRY 基因相關的 SOX9 基因在雞隻雌性胚胎中有局部明顯的表現，並且會誘導雄性 Z 染色體連鎖基因 HEMGN 表現以及降低雌性特異基因 CYP19A1 的表現 (Lambeth *et al.*, 2014)。這些結果均可表明 DMRT1 在雄性和雌性中缺乏完全的劑量補償效應，而使其在雌、雄個體上具有劑量差異，造成不同路徑的性腺分化、基因表現及後續性別發育。

另一個在 Z 染色體上值得注意的 DNA 區域為 2.2 kb 的 MHM 區域，在染色體上的位置與 DMRT1 基因相鄰。MHM 區域轉錄出的非編碼 RNA 為 DMRT1 的抑制物，在雌性雞隻 Z 染色體上，MHM 區域的附近為補償作用基因，具高度 H4K16 位點之組蛋白乙醯化，推測 MHM 可能在局部劑量補償效應中發揮功用，並具有顯著的低度甲基化，使得雌性雞隻中和 MHM 相鄰的基因表現提高至與雄性雞隻表現量相似或更高 (Bisoni *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2019)。雌性雞隻 MHM 區域的 DNA 可轉錄成長非編碼 RNA，結合於 DMRT1 基因上而抑制了部分 DMRT1 生成 (Teranishi *et al.*, 2001)，造成雌性雞隻 DMRT1 基因表現較雄性雞隻低，而不致誘發雄性性腺發育路徑。低度甲基化的區域通常與調節訊號、啟動子或增強子等有關 (Elango and Yi, 2008)，也可推測雌性雞隻 MHM 低甲基化的特性，可能與調節雌性特異表現或功能高度相關 (Sun *et al.*, 2019)。在雞隻雄性 Z 染色體上，MHM 區域 DNA 呈現甲基化 (Sun *et al.*, 2019)，降低了 MHM 區域非編碼 RNA 的生成，而減少了 DMRT1 基因表現的抑制，使得雄性的兩條 Z 染色體均有 DMRT1 表現，雖然兩條 Z 染色體之 MHM 區域甲基化程度不盡相同 (Itoh *et al.*, 2011)，但仍會促使下游的 SOX9、AMH 及 HEMGN 等雄性特異基因表現，同時抑制 FOXL2、CYP19A1、 $\beta$ -catenin 等雌性分化相關基因，使得性腺分化朝向雄性發育路徑 (Rastetter *et al.*, 2015)。與哺乳類動物的 XIST 相似 (Briggs and Reijo Pera, 2014)，MHM 區域在性腺性別分化中具關連性 (Teranishi *et al.*, 2001; Roeszler *et al.*, 2012; Caetano *et al.*, 2014)，MHM 的全面性過表現會使兩種性別的雞胚胎均發育異常，並且會顯著降低性腺上 DMRT1 表現 (Roeszler *et al.*, 2012)。鳥類之 Z 染色體基因劑量效應影響性別發育雖有其原理，但劑量閥值與其他控制基因的關係為何，都是需要後續研究與探討的議題。

## (ii) W 染色體關鍵基因與雌性相關基因 (W chromosome or female related dominant genes)

大多數 W 染色體上的基因為劑量敏感，需與 Z 染色體上的同源基因有相似劑量的基因表現而被保留下來，這些基因通常與轉錄、轉譯、蛋白質降解及訊號傳遞相關 (Bellott *et al.*, 2017)。這些基因遵守了劑量補償原則，在雌、雄鳥體內劑量總體表現上較無差異，理論上不會被視為性別決定的候選基因 (Hirst *et al.*, 2018)。值得注意的是 W 染色體上的 HINTW 基因 (W-chromosome HINT gene)，雖然與 Z 染色體上的同源基因 HINT1 (histidine triad nucleotide-binding protein 1) 同為 HIT (histidine triad) 家族，但序列明顯不同，缺乏 HINT 下游酵素活性結構域 (domain) (Brenner, 2002; Parks *et al.*, 2004; Moriyama *et al.*, 2006)。在孵化初期至性腺分化前，即可在雌性胚胎內偵測到大量 HINTW 表現 (Zhang *et al.*, 2010)，且其基因表現遍布雞胚胎各組織 (O'Neill *et al.*, 2000)。HINTW 通過異源二聚化 (heterodimerization) 干擾 HINT 功能 (Pace and Brenner, 2003)，推測與卵巢發育呈現高度相關，並可能是雌性性別決定候選因子或為雄性發育的負向調控因子 (Pace and Brenner, 2003; Moghadam *et al.*, 2012; Ayers *et al.*, 2013; Bellott *et al.*, 2017)。

HINTW 與 DMRT1 相同，都在性腺開始分化前就已可測得基因表現，而為鳥類性別決定候選因子之一。但除了在性腺中表現，HINTW 也在胚胎時期泄殖系統外的組織中廣泛表現，提供了性別可以透過遺傳及激素決定外，推測也能影響其他組織的分化 (Smith *et al.*, 2007)。雌鳥在低劑量 DMRT1 表現下性腺分化為卵巢，但是否全由 Z 染色體決定，或為 W 染色體上的基因參與了 Z 染色體甲基化表現而促進了卵巢發育，則需要更多證據予

以證實 (Teranishi *et al.*, 2001)。以哺乳類動物分析染色體非整倍體之個體後，發現了 SRY 基因對哺乳類動物性別決定之重要性，然目前雞隻研究中，染色體非整倍體的發生率極低或具有高度致死性 (Graves, 2003)，均使得研究者無法獲得足夠的非整倍體個體，造成無法更快速而進一步瞭解雞性別決定樣貌。

另一個與雌性特異性有關的基因 CYP19A1，下游所製造的芳香酶 (aromatase)，此種含細胞色素 P450 的酵素能將雄性激素轉化為雌性激素。此基因於性腺分化開始時，僅在雌性性腺中能測得表現，可推測為影響後續卵巢分化發育的因子 (Elbrecht and Smith, 1992; Vaillant *et al.*, 2001)。雞胚胎早期如以 Fadrozole 等環化酵素抑制劑來抑制芳香酶的表現，會導致雌性性腺部分雄性化，形成雄性的雙側睪丸和外部表型 (Elbrecht and Smith, 1992; Vaillant *et al.*, 2001)，這結果與早期觀察到的雄性雞隻有著雌性雞隻羽毛的研究相同，後者為芳香酶基因變異造成 (George *et al.*, 1990; McPhaul *et al.*, 1991)。另外，雄性雞胚胎時期給予外源性芳香酶，亦可使雄性胚胎左性腺外部皮層增厚、髓質增厚伴有腔隙並發育成卵巢組織，右性腺退化，DMRT1 和 SOX9 等雄性基因表現下降，FOXL2 和 RSPO1 等雌性基因表現上升等雌性化特徵 (Lambeth *et al.*, 2013)。另外值得注意的是，當受到外源因素干擾時，性腺的表型或基因表現受影響，而與原遺傳性別不一致 (雄性性腺雌性化或相反)，但在表觀遺傳調控上傾向與原遺傳決定的性別一致，例如在 ZZ 雄性雞胚胎性腺雌性化實驗中，在上述的表型與基因表現均雌性化的情形下，CYP19A1 啟動子於外源性刺激引起 DNA 甲基化和組蛋白離胺酸甲基化時，仍保有部分雄性化的特徵 (Ellis *et al.*, 2012)，這對永久性的性別逆轉研究上提供一個可行的研究方向。

### (iii) 細胞自主 (cell autonomous)

1970 年代所認知的鳥類之性別決定機制與其他脊椎動物相同 (Jost *et al.*, 1973)，當時認為是由性染色體上的基因表現誘導二態性的胚胎性腺 (dimorphic embryonic gonads) 分化成卵巢或睪丸，同時分泌激素使動物體其他部位的發育是與性腺相同的性別特徵。許多物種性腺分化為睪丸或卵巢之前，胚胎發育中的基因表現為性別二態性 (Renfree and Short, 1988; Dewing *et al.*, 2003; Bermejo-Alvarez *et al.*, 2010)。Arnold *et al.* (1997) 率先提出於鳥類中性別差異發育具有直接性的細胞自主作用，而激素為間接關係，甚至兩性別性腺差異可視為性別分化表型的其中之一 (Hirst *et al.*, 2018)。而雞胚胎性腺分化前，已可測得雌雄特異的基因表現，但此時性腺尚未分化，更無性激素產生 (O'Neill *et al.*, 2000; Scholz *et al.*, 2006)，這結果支持了細胞自主作用原理。2010 年 Zhao 等人提供了分子和胚胎學證據，表示胚胎性別決定早於性腺發育，而實際上可能是細胞自主作用，更給了這個現象一個名詞，提出細胞自主性別認同 (cell autonomous sex identity, CASI) 假說。CASI 是從觀察三隻罕見的雌雄同體雞隻開始，這些雞隻一側身體為雞冠、肉垂、尾羽、胸肌發達之公雞表型，另側身體為雞冠、肉垂、胸肌較小之母雞表型，且從公雞表型端取得的細胞性染色體為 ZZ，但從母雞表型端取得的細胞性染色體則非完全為 ZW 基因型 (Zhao *et al.*, 2010)，顯示雌雄同體外表型不是因為性激素參與差異所引起，而且外表型與性腺性別並不相對應。

同時，在異性胚胎嵌合體研究上也可推斷出相同結論。將性腺分化前的雌性性腺中胚層組織移植到雄性性腺組織上，另一方面也將性腺分化前的雄性性腺中胚層組織移植到雌性性腺組織上，性腺分化成為原先移植組織性別，而非移入宿主性別 (Zhang *et al.*, 2010)。分析胚胎發育第 3.5 天雄性和雌性胚胎中基因表現，發現在性腺形成或性別分化之前，許多基因表現有具雄性或雌性偏向，且這樣的性別表現差異基因，大多來自於 Z 染色體連鎖基因 (Zhang *et al.*, 2010)，這種 Z 基因劑量不平衡，在性腺性別分化為卵巢或睪丸之前就出現 (Ellegren *et al.*, 2007)，亦為支持細胞自主性發育提供了有力證據 (Hirst *et al.*, 2018)。這些研究結果均顯示鳥禽細胞具有先天性別表型潛力，且涉及直接的遺傳效應，也就是細胞自主性發育 (Zhao *et al.*, 2010)，將傳統基因表現導致性腺分化及激素分泌，使身體發育與性腺性別相同的特徵之因果關係做了修正。

## 結 論

雞為鳥禽，在演化上介於爬蟲動物和哺乳動物之間，保留兩者部分特徵，不但具有兩者之遺傳要素，對激素的感受也極為敏感，是適合研究脊椎動物性別決定、分化和演化的動物模式。鳥類性別決定機制尚未定論，主要的假說為 Z 染色體連鎖基因劑量使得雄性雞隻分化、W 染色體基因主導雌性雞隻分化，以及個體細胞自主作用。這些假說之間也許並非單獨存在，而是有極高的機率各自對鳥類性別決定機制有一定程度貢獻且互相關聯。鳥類性腺的分化分子途徑，在雄性可藉由綜觀雄性特異基因 DMRT1、SOX9、PGDS 和 AMH 的表現或活性，以及雌性特異基因 FOXL2、CYP19A1 和 RSPO1 / WNT4 等上、下游路徑之關聯得窺一二。未來更可利用日益精進發展的技術，針對候選基因調控路徑精準分析，以更完整雞隻性別相關機制的全貌。

## 未來研究方向

基因功能性及相關基因劑量研究目前普遍利用 RCAS 病毒 (Lambeth *et al.*, 2013; Lambeth *et al.*, 2014) 或電穿孔技術 (Ayers *et al.*, 2015; Hirst *et al.*, 2017) 進行雞隻胚胎基因表現抑制或外源表現等試驗，但 in-ovo CRISPR / Cas9 方式的介導的基因編輯技術是目前發展最快速的技術 (Morin *et al.*, 2017; Chojnacka-Puchta and Sawicka, 2020)，可更精確地進行基因剔除與插入等研究。這些基因抑制、剔除或過表現的技術用於轉錄體和表觀遺傳等基因組分析，將可對鳥類性別決定和性腺分化的主要調控路徑有更深入的了解。性別決定機制與關鍵基因對於性腺發育初期至為重要，後續相關分化基因及成年後維持性別表型基因，在性別維持上扮演舉足輕重的角色，為未來相關研究重點項目。

## 參考文獻

- Arnold, A. P. 1997. Sexual differentiation of the zebra finch song system: positive evidence, negative evidence, null hypotheses and a paradigm shift. *J. Neurobiol.* 33: 572-584.
- Arnold, A. P., Y. Itoh and E. Melamed. 2008. A bird's-eye view of sex chromosome dosage compensation. *Annu. Rev. Genome Hum. Genet.* 9: 109-127.
- Ayers, K. L., A. D. Cutting, K. N. Roeszler, A. H. Sinclair and C. A. Smith. 2015. DMRT1 is required for Mullerian duct formation in the chicken embryo. *Dev. Biol.* 400: 224-236.
- Ayers, K. L., C. A. Smith and L. S. Lambeth. 2013. The molecular genetics of avian sex determination and its manipulation. *Genesis* 51: 325-336.
- Bannister, S. C., C. A. Smith, K. N. Roeszler, T. J. Doran, A. H. Sinclair and M. L. Tizard. 2011. Manipulation of estrogen synthesis alters MIR202\* expression in embryonic chicken gonads. *Biol. Reprod.* 85: 22-30.
- Bellott, D. W., H. Skaletsky, T. J. Cho, L. Brown, D. Locke, N. Chen, S. Galkina, T. Pyntikova, N. Koutseva, T. Graves, C. Kremitzki, W. C. Warren, A. G. Clark, E. Gaginskaya, R. K. Wilson and D. C. Page. 2017. Avian W and mammalian Y chromosomes convergently retained dosage-sensitive regulators. *Nat. Genet.* 49: 387-394.
- Bellott, D. W., H. Skaletsky, T. Pyntikova, E. R. Mardis, T. Graves, C. Kremitzki, L. G. Brown, S. Rozen, W. C. Warren, R. K. Wilson and D. C. Page. 2010. Convergent evolution of chicken Z and human X chromosomes by expansion and gene acquisition. *Nature* 466: 612-616.
- Bermejo-Alvarez, P., D. Rizos, D. Rath, P. Lonergan and A. Gutierrez-Adan. 2010. Sex determines the expression level of one third of the actively expressed genes in bovine blastocysts. *PNAS* 107: 3394-3399.
- Bisoni, L., L. Battle-Morera, A. P. Bird, M. Suzuki and H. A. McQueen. 2005. Female-specific hyperacetylation of histone H4 in the chicken Z chromosome. *Chromosome Res.* 13: 205-214.
- Brenner, C. 2002. Hint, Fhit and GalT: function, structure, evolution and mechanism of three branches of the histidine triad superfamily of nucleotide hydrolases and transferases. *Biochemistry* 41: 9003-9014.
- Briggs, S. F. and R. A. Reijo Pera. 2014. X chromosome inactivation: recent advances and a look forward. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 28: 78-82.
- Burt, D. W. 2007. Emergence of the chicken as a model organism: implications for agriculture and biology. *Poult. Sci.* 86: 1460-1471.
- Caetano, L. C., F. G. Gennaro, K. Coelho, F. M. Araujo, R. A. Vila, A. Araujo, A. de Melo Bernardo, C. R. Marcondes, S. M. Chuva de Sousa Lopes and E. S. Ramos. 2014. Differential expression of the MHM region and of sex-determining-related genes during gonadal development in chicken embryos. *Genet. Mol. Res.* 13: 838-849.
- Chojnacka-Puchta, L. and D. Sawicka. 2020. CRISPR/Cas9 gene editing in a chicken model: current approaches and applications. *J. Appl. Genet.* 61: 221-229.
- Crews, D., J. Bergeron, J. Bull, D. Flores, A. Tousignant, J. Skipper and T. Wibbels. 1994. Temperature-dependent sex determination in reptiles: Proximate mechanisms, ultimate outcomes and practical applications. *Dev. Genet.* 15: 297-312.
- Dewing, P., T. Shi, S. Horvath and E. Vilain. 2003. Sexually dimorphic gene expression in mouse brain precedes gonadal differentiation. *Mol. Brain Res.* 118: 82-90.



- Doran, T. J., C. A. Cooper, K. A. Jenkins and M. L. Tizard. 2016. Advances in genetic engineering of the avian genome: "Realising the promise". *Transgenic Res.* 25: 307-319.
- Doran, T. J., K. R. Morris, T. G. Wise, T. E. O'Neil, C. A. Cooper, K. A. Jenkins and M. L. V. Tizard. 2018. Sex selection in layer chickens. *Anim. Prod. Sci.* 58: 476-480.
- Dorizzi, M., N. Richard-Mercier and C. Pieau. 1996. The ovary retains male potential after the thermosensitive period for sex determination in the turtle *Emys orbicularis*. *Differentiation* 60: 193-201.
- Elango, N. and S. V. Yi. 2008. DNA Methylation and Structural and Functional Bimodality of Vertebrate Promoters. *Mol. Biol. Evol.* 25: 1602-1608.
- Elbrecht, A. and R. G. Smith. 1992. Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens. *Science* 255: 467-470.
- Ellegren, H., L. Hultin-Rosenberg, B. Brunstrom, L. Dencker, K. Kultima and B. Scholz. 2007. Faced with inequality: chicken do not have a general dosage compensation of sex-linked genes. *BMC Biol.* 5: 40.
- Ellis, H. L., K. Shioda, N. F. Rosenthal, K. R. Coser and T. Shioda. 2012. Masculine epigenetic sex marks of the CYP19A1/aromatase promoter in genetically male chicken embryonic gonads are resistant to estrogen-induced phenotypic sex conversion. *Biol. Reprod.* 87: 23, 1-12.
- Fridolfsson, A. K., H. Cheng, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, H. C. Liu, T. Raudsepp, T. Woodage, B. Chowdhary, J. Halverson and H. Ellegren. 1998. Evolution of the avian sex chromosomes from an ancestral pair of autosomes. *PNAS* 95: 8147-8152.
- George, F. W., H. Matsumine, M. J. McPhaul, R. G. Somes, Jr. and J. D. Wilson. 1990. Inheritance of the henny feathering trait in the golden Campine chicken: evidence for allelism with the gene that causes henny feathering in the Sebright bantam. *J. Hered.* 81: 107-110.
- Graves, J. A. 2003. Sex and death in birds: a model of dosage compensation that predicts lethality of sex chromosome aneuploids. *Cytogenet. Genome Res.* 101: 278-282.
- Graves, J. A. 2014. Avian sex, sex chromosomes and dosage compensation in the age of genomics. *Chromosome Res.* 22: 45-57.
- Handley, L. J., H. Ceplitis and H. Ellegren. 2004. Evolutionary strata on the chicken Z chromosome: implications for sex chromosome evolution. *Genetics* 167: 367-376.
- Hirst, C. E., A. T. Major, K. L. Ayers, R. J. Brown, M. Mariette, T. B. Sackton and C. A. Smith. 2017. Sex reversal and comparative data undermine the W chromosome and support Z-linked DMRT1 as the regulator of gonadal sex differentiation in birds. *Endocrinology* 158: 2970-2987.
- Hirst, C. E., A. T. Major and C. A. Smith. 2018. Sex determination and gonadal sex differentiation in the chicken model. *Int. J. Plant Dev. Biol.* 62: 153-166.
- Itoh, Y., K. Kampf and A. P. Arnold. 2011. Possible differences in the two Z chromosomes in male chickens and evolution of MHM sequences in Galliformes. *Chromosoma* 120: 587-598.
- Jost, J. P., R. Keller and C. Dierks-Ventling. 1973. Deoxyribonucleic acid and ribonucleic acid synthesis during phosvitin induction by 17 $\beta$ -estradiol in immature chicks. *J. Biol. Chem.* 248: 5262-5266.
- Lambeth, L. S., D. M. Cummins, T. J. Doran, A. H. Sinclair and C. A. Smith. 2013. Overexpression of aromatase alone is sufficient for ovarian development in genetically male chicken embryos. *PLoSOne* 8: e68362.
- Lambeth, L. S., C. S. Raymond, K. N. Roeszler, A. Kuroiwa, T. Nakata, D. Zarkower and C. A. Smith. 2014. Over-expression of DMRT1 induces the male pathway in embryonic chicken gonads. *Dev. Biol.* 389: 160-172.
- Major, A. T. and C. A. Smith. 2016. Sex reversal in birds. *Sex. Dev.* 10: 288-300.
- Mank, J. E. and H. Ellegren. 2007. Parallel divergence and degradation of the avian W sex chromosome. *Trends Ecol. Evol.* 22: 389-391.
- Mank, J. E. and H. Ellegren. 2009. Sex-linkage of sexually antagonistic genes is predicted by female, but not male, effects in birds. *Evolution* 63: 1464-1472.
- McPhaul, M. J., H. Matsumine, M. A. Herbst and J. D. Wilson. 1991. Aromatase expression in extragonadal tissues of the Sebright chicken is controlled by a retroviral promoter. *Trans Assoc. Am. Phys.* 104: 141-149.
- Moghadam, H. K., M. A. Pointer, A. E. Wright, S. Berlin and J. E. Mank. 2012. W chromosome expression responds to female-specific selection. *PNAS* 109: 8207-8211.
- Morin, V., N. Veron and C. Marcelle. 2017. CRISPR/Cas9 in the chicken embryo. *Methods Mol. Biol.* 1650: 113-123.



- Moriyama, S., J. Ogiwara, J. Kato, T. Hori and S. Mizuno. 2006. PKCI-W forms a heterodimer with PKCI-Z and inhibits the biological activities of PKCI-Z in vitro, supporting the predicted role of PKCI-W in sex determination in birds. *J. Biochem.* 139: 91-97.
- Omotehara, T., C. A. Smith, Y. Mantani, Y. Kobayashi, A. Tatsumi, D. Nagahara, R. Hashimoto, T. Hirano, Y. Umemura, T. Yokoyama, H. Kitagawa and N. Hoshi. 2014. Spatiotemporal expression patterns of doublesex and mab-3 related transcription factor 1 in the chicken developing gonads and Mullerian ducts. *Poult. Sci.* 93: 953-958.
- O'Neill, M., M. Binder, C. Smith, J. Andrews, K. Reed, M. Smith, C. Millar, D. Lambert and A. Sinclair. 2000. ASW: a gene with conserved avian W-linkage and female specific expression in chick embryonic gonad. *Dev. Genes. Evol.* 210: 243-249.
- Ozgural, O., B. Bahadir, I. Dogan, U. Eroglu, S. Aktan, I. Kar, G. Cakici, E. Al-Beyati, G. Kahilogullari and A. Unlu. 2019. The effect of phenylamidol on neural development in early chicken embryo model. *Turk. Neurosurg.* 29: 851-855.
- Pace, H. C. and C. Brenner. 2003. Feminizing chicks: a model for avian sex determination based on titration of Hint enzyme activity and the predicted structure of an Asw-Hint heterodimer. *Genome Biol.* 4: R18.
- Parks, K. P., H. Seidle, N. Wright, J. B. Sperry, P. Bieganski, K. Howitz, D. L. Wright and C. Brenner. 2004. Altered specificity of Hint-W123Q supports a role for Hint inhibition by ASW in avian sex determination. *Physiol. Genomics* 20: 12-14.
- Rastetter, R. H., C. A. Smith and D. Wilhelm. 2015. The role of non-coding RNAs in male sex determination and differentiation. *Reproduction* 150: R93-107.
- Renfree, M. B. and R. V. Short. 1988. Sex determination in marsupials: evidence for a marsupial-eutherian dichotomy. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* 322: 41-53.
- Roeszler, K. N., C. Itman, A. H. Sinclair and C. A. Smith. 2012. The long non-coding RNA, MHM, plays a role in chicken embryonic development, including gonadogenesis. *Dev. Biol.* 366: 317-326.
- Saitoh, Y. and S. Mizuno. 1992. Distribution of XhoI and EcoRI family repetitive DNA sequences into separate domains in the chicken W chromosome. *Chromosoma* 101: 474-477.
- Scholz, B., K. Kultima, A. Mattsson, J. Axelsson, B. Brunstrom, K. Halldin, M. Stigson and L. Dencker. 2006. Sex-dependent gene expression in early brain development of chicken embryos. *BMC Neurosci.* 7: 12.
- Smith, C. A., K. N. Roeszler, Q. J. Hudson and A. H. Sinclair. 2007. Avian sex determination: what, when and where? *Cytogenet. Genome Res.* 117: 165-173.
- Smith, C. A., K. N. Roeszler, T. Ohnesorg, D. M. Cummins, P. G. Farlie, T. J. Doran and A. H. Sinclair. 2009. The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. *Nature* 461: 267-271.
- Sun, D., D. L. Maney, T. S. Layman, P. Chatterjee and S. V. Yi. 2019. Regional epigenetic differentiation of the Z Chromosome between sexes in a female heterogametic system. *Genome Res.* 29: 1673-1684.
- Teranishi, M., Y. Shimada, T. Hori, O. Nakabayashi, T. Kikuchi, T. Macleod, R. Pym, B. Sheldon, I. Solovei, H. Macgregor and S. Mizuno. 2001. Transcripts of the MHM region on the chicken Z chromosome accumulate as non-coding RNA in the nucleus of female cells adjacent to the DMRT1 locus. *Chromosome Res.* 9: 147-165.
- Tolosa, A., X. Zhou, B. Spittau and K. Krieglstein. 2013. Establishment of a survival and toxic cellular model for Parkinson's disease from chicken mesencephalon. *Neurotox. Res.* 24: 119-129.
- Vaillant, S., S. Magre, M. Dorizzi, C. Pieau and N. Richard-Mercier. 2001. Expression of AMH, SF1 and SOX9 in gonads of genetic female chickens during sex reversal induced by an aromatase inhibitor. *Dev. Dynam.* 222: 228-237.
- Vilches-Moure, J. G. 2019. Embryonic chicken (*Gallus gallus domesticus*) as a model of cardiac biology and development. *Comp. Med.* 69: 184-203.
- Wilhelm, D., S. Palmer and P. Koopman. 2007. Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol. Rev.* 87: 1-28.
- Wright, A. E., H. K. Moghadam and J. E. Mank. 2012. Trade-off between selection for dosage compensation and masculinization on the avian Z chromosome. *Genetics* 192:1433-1445.
- Zhang, S. O., S. Mathur, G. Hattem, O. Tassy and O. Pourquie. 2010. Sex-dimorphic gene expression and ineffective dosage compensation of Z-linked genes in gastrulating chicken embryos. *BMC genomics* 11: R13.
- Zhao, D., D. McBride, S. Nandi, H. A. McQueen, M. J. McGrew, P. M. Hocking, P. D. Lewis, H. M. Sang and M. Clinton. 2010. Somatic sex identity is cell autonomous in the chicken. *Nature* 464: 237-242.

# An overview on chicken sex determination mechanism <sup>(1)</sup>

Hsiao-Yun Kuo <sup>(2)(4)</sup> and I-Heng Chang <sup>(3)</sup>

Received: May 4, 2020; Accepted: Aug. 3, 2020

## Abstract

The challenge of poultry industry is the requirement of single sex preference which is not possible to adopt sperm selection technique due to the heterozygous system in females. Chicken belongs to avian birds and its evolutionary status of avian species is between reptiles and mammals; however, evidences showed that birds do not possess the temperature-dependent control for sex determination as that observed in reptiles or dominant SRY gene for sex determination in most mammals. An increasing number of studies suggest that the unique sex determination or differentiation system exists in bird's genetic mechanism, and the integrated sex determination mechanism still remains elusive inconclusive. 雞 The current sex determination mechanism hypotheses of birds are the Z chromosome dosage compensation, W chromosome or female related dominant gene and cell autonomous. There are still no definite mechanisms that can completely explain the sex determination and differentiation pathways of birds but it is generally assumed that these three mechanisms are interrelated. In addition to the transcriptome level, the influence of epigenetic regulation on sex determination and differentiation is also involved in sex determination in birds. The current precise gene editing techniques can provide a useful tool to better understand the sex related mechanisms of chickens in the future

Key words: Chicken, Female heterogametic system, Sex determination mechanism.

---

(1) Contribution No. 2646 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Physiology Division, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(3) Technical Service Division, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(4) Corresponding author, E-mail: hykuo@tlri.gov.tw.

# 行政院農業委員會畜產試驗所「畜產研究」稿約

(民國 94 年 3 月修訂)

(民國 108 年 12 月修訂)

- I. 本刊為學術性刊物，刊載有關畜產科學原創性研究報告、調查報告及學術性專題論著。
- II. 本刊為季刊，每年 3 月、6 月、9 月及 12 月底出版。
- III. 文稿之排列順序為標題、摘要、緒言、材料與方法 (學術性專題論著可略)、結果、討論 (結果與討論可合為一節)、結論 (可略)、誌謝 (可略) 及參考文獻。以中文撰寫者，須附英文摘要 (Abstract)，以英文撰寫者，則附中文摘要。中英文摘要以不超過五百字為原則，須列中英文相對應之 3 至 6 個關鍵詞。
- IV. 文稿書寫格式，主要參考 Journal of Animal Science：
  - (i) 文稿請用 Word 檔 A4 紙張格式，內文以 12 號字型繕打，中文採新細明體，英文採 Times New Roman，圖表置於內文之後。行距採用單行間距，版面設定中等邊界 (上下 2.54 cm，左右 1.91 cm)，並編碼連續行號。
  - (ii) 文字敘述之編號依序為 I、(i)、1、(1)、A、(a)。圖表以圖 1、表 1 等順序表示。中文稿件之圖表標題及圖說請中英並列，圖表內文字請以英文呈現。文字敘述用英文者，圖表中之文字僅用英文。
  - (iii) 本刊以黑白印刷為原則，圖表務求印刷後可清楚分辨標示，並請以電腦繪製，以利排版。
  - (iv) 單位及縮寫：
    1. 單位使用公制，習見之符號及縮寫不必另附中文。專門名詞無適當譯名者可從原文。
    2. 以下常用之縮寫可直接撰寫於本刊稿件不須另作定義：
      - (1) 長度：km、m、cm、mm、 $\mu\text{m}$ 。
      - (2) 重量：kg、g、mg、 $\mu\text{g}$ 。
      - (3) 體積：L、mL、 $\mu\text{L}$ 。
      - (4) 時間：wk、d、h、min、s。
      - (5) 其他： $^{\circ}\text{C}$ 、pH、cal、rpm。
  - (v) 統計分析達顯著差異性請以 \*、<sup>a</sup>、<sup>b</sup>、<sup>c</sup> 等上標標示，並於表下方說明。
  - (vi) 參考文獻：
    1. 正文中須書出參考文獻之作者姓氏與年份：
      - (1) 西文文獻之作者僅一人者，書一人之姓如 (Johnson, 1991)；作者為二人者，書二人之姓如 (Johnson and Hobbs, 1991)；作者為三人或以上者，用第一人之姓後再書 *et al.* 如 (Johnson *et al.*, 1991)。
      - (2) 中文文獻之作者僅一人者，書一人之姓氏如 (趙, 1990)；作者為二人者，書二人之姓氏如 (趙及錢, 1990)；作者為三人或以上時，則於第一人姓氏後再加一等字如 (趙等, 1990)。
    2. 參考文獻列示以確經引用者為限，排列次序為作者、年份、題目、發表刊物名稱、卷數、頁數等依次書寫，例如：
      - (1) 期刊類  
王政騰、朱慶誠。1991。土番鴨繫留、電昏、放血、燙毛等屠宰條件之探討。畜產研究 24：133-140。  
胡怡浩、姜延年、陳銘正、潘金水。1991。北京鴨雜交品系與商業品系肉鴨之生長及屠體性能之比較。畜產研究 24：141-148。  
Ayub, M. and M. Shoaib. 2009. Studies on fodder yield and quality of sorghum alone and in mixture with guar under different planting techniques. Pak. J. Agri. Sci. 46: 25-29.  
Hsu, F. H., C. J. Nelson, and A. G. Matches. 1985. Temperature effects on germination of perennial warm-season forage grasses. Crop Sci. 25: 215-220.

## (2) 書本類

- 朱純燕。2001。水禽類小病毒蛋白基因之分子選殖及抗原性分析。國立中山大學生物科學系，博士論文，高雄市。
- 李登元。1979。乳牛學。臺灣商務印書館，臺北市，第 300 - 322 頁。
- American Oil Chemists Society (AOCS). 1980. Official and Tentative Methods of the American Oil chemists Society. 3rd ed. Am. Oil Chem. Soc., Champaign, IL, USA.
- Association of Official Agricultural Chemists (AOAC). 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, VA, USA.
- Tai C. 1985. Duck breeding and artificial insemination in Taiwan. Duck Production Science and World Practice, pp. 193-203. University of New England, Armidale, Australia.
- Wang, Y. C. 1985. Regrowth ability of Napier grass (*Pennisetum purpureum* Schamach) in the dry, cold season in Taiwan. Proceedings of the XV International Grassland Congress, pp. 1239-1241. Kyoto, Japan.

## (3) 其他類

- 行政院農業委員會。2018。農業統計年報。<https://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/book/Book.aspx>。
- 行政院農業委員會。2017。農委會農業資料統計查詢。<http://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/maintenance/Announce.aspx>。
- SAS. 2015. SAS/STAT® 14.1. SAS Institute Inc., Cary, NC. USA.
- SPSS. 2008. SPSS Statistics for Windows, Version 17.0. SPSS Inc., Chicago, IL. USA.
3. 中日文獻以第一作者姓氏筆劃多少為序，西文以第一作者姓氏之拼音先後排列，並按中文、日文、西文之次序排列。
4. 西文期刊名稱請用縮寫，縮寫請參照美國國家醫學圖書館線上資料庫 (NLM Catalog) 之 IOS (Information and documentation) 縮寫。
5. 參考文獻皆不編號。
- V. 本刊編輯委員會保有修改與退稿之權利。稿件經本刊接受後，作者進行出刊校稿時，不得擅自更改內容及數據。
- VI. 本刊亦接受短報 (short communication) 與速報 (rapid report)。其寫法亦遵照本稿約之規定，稿長包括圖、表、相片等不得超過 4 個印刷面。
- VII. 稿件經本刊委員會轉請專家審查，編輯委員會根據專家審查意見通知投稿人，是否接受刊載，或須修改後始可刊載。本刊無提供稿費。
- VIII. 稿件經本刊接受後，該稿件之全部或部份，不得投稿其他刊物，以不同語文投稿其他刊物亦所不許。本刊具專屬版權，刊登權屬發行單位畜產試驗所所有，非經本所書面同意，不得轉載或轉移他處發表。如有上述情事，相關法律責任由作者自負，本刊有拒絕接受其投稿之權利。
- IX. 來稿請寄 71246 臺南市新化區牧場 112 號，「行政院農業委員會畜產試驗所技術服務組畜產研究編輯委員會」收，聯絡電話：06-5911211。投稿請以 A4 紙列印，確認收件後，另通知繳交電子檔。
- X. 自民國 93 年開始實施之計畫，其論文如涉及使用脊椎動物進行科學應用計畫者，請撰稿者檢附該計畫經所屬機構動物實驗管理小組審議認可之文件。