

影响内蒙古典型草原3种牧草 饱和链烷回收率的因素研究

刘贵河^{1,2}, 张英俊¹, 汪诗平^{2*}, 韩建国^{1*}, 林立军¹, 马秀枝²

(1. 中国农业大学草地研究所, 北京 100094; 2. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810008)

摘要: 2004年秋季在中国科学院内蒙古草原生态系统定位站,用不同放牧演替阶段的优势植物羊草、糙隐子草和冷蒿分别按30%、20%和50%的比例混合组成日粮,饲喂12只(39±2.1 kg)2岁羯羊(内蒙古细毛羊×蒙古羊)。试验分2个组,投喂胶囊组9只羊,每只羊投喂1粒QSM胶囊,对照组3只羊不投喂;试验期14d内每天记录绵羊实际牧草采食量和排粪量,并收集牧草样品在45℃烘箱中烘干;粪便样品连续收集7d,分别在45℃烘干和冷冻;利用气相色谱分析牧草和粪便样品中链烷含量,计算粪便中链烷的回收率。试验结果表明,牧草链烷含量存在物种间差异,绵羊粪便中链烷的回收率与链烷长度存在线性增加关系,烘干处理粪样的链烷回收率高于冷冻干燥处理的回收率,两者存在显著的正相关,且投喂QSM胶囊不会影响其他链烷的回收率。

关键词: 饱和链烷;回收率;绵羊;内蒙古典型草原

中图分类号: S816.32;S812.3;S54 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-5759(2006)04-0109-06

放牧家畜食性和食量的测定方法很多,但这些方法不同程度存在局限性,或者是估测的精确度不高,或是试验繁琐^[1-3]。而饱和链烷技术是20世纪80年代发展起来的一门新技术,该技术是利用植物表皮蜡质层中普遍存在的饱和性碳氢化合物或称饱和链烷(*N*-alkanes)作为内源标记物来测定放牧家畜的食性和食量^[4,5]。在这些链烷中,偶数链烷含量低,奇数链烷含量高,家畜采食后不被吸收,在粪便中回收率高且相邻链烷回收率相近^[6,7]。通过投喂家畜人工合成的已知浓度的与奇数链烷相邻的偶数链烷胶囊,利用两者回收率相近的特点可以消除不完全回收的缺点,从而准确地测定家畜采食量^[8-14]。但是由于食草动物粪便中链烷的含量必须用链烷回收率校正后,与草地提供的植物种类或植物部位的链烷含量相比较,才能精确确定家畜采食牧草的种类组成和比例,进而计算采食量,故粪便中链烷回收率是运用链烷技术精确估测食草动物食性食量的关键。许多研究表明,植物链烷通过家畜消化道后在粪便中的回收率存在差异^[15,16],其受很多因素的影响,如家畜种类^[17]、牧草种类和部位^[18]、取样方法^[19]、取样时间^[20]、样品处理方法^[21]、内标物的使用及链烷的计算方法等^[22]。本试验主要探讨牧草中链烷经过家畜消化道后的变化及其影响因素,旨在为应用链烷技术测定放牧家畜食性食量提供理论和技术依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物和日粮

该研究于2004年8月5日-19日在中国科学院内蒙古草原生态系统定位站(北纬43°26'~44°08',东经116°04'~117°05')进行,选择内蒙古典型草原不同放牧演替阶段的优势植物羊草(*Leymus chinensis*)、糙隐子草(*Cleistogenes squarrosa*)和冷蒿(*Artemisia frigida*)按一定比例混合组成绵羊日粮。试验从20只2岁羯羊(内蒙古细毛羊×蒙古羊)中选择健康无病的12只,体重39±2.1 kg。

1.2 试验设计和饲养管理

12只试验羊随机分为2组,其中9只羊分别投喂1粒人工合成的QSM(Qualify Sheep Mature 限于成熟绵

收稿日期:2005-06-17

基金项目:国家自然科学基金重大研究计划重点基金项目(90211017);国家自然科学基金(30371019);中国科学院知识创新工程方向性项目(KSCX2-SW-107)。

作者简介:刘贵河(1968-),男,内蒙古太仆寺旗人,在读博士生。E-mail:guihelu@sohu.com

*通讯作者。E-mail:wangship@yahoo.com;grasslab@public3.bta.net.cn

羊)饱和链烷胶囊(购于新西兰 Captec™ 公司),对照组 3 只羊不投喂,QSM 胶囊中含 C₃₂和 C₃₆各 1.0 g,每天释放 50 mg,可持续释放 17~23 d。试验期每只羊带 1 个集粪袋收集全粪,且每天饲喂羊草(30%)、糙隐子草(20%)和冷蒿(50%)3 种鲜草混合的日粮 2.5 kg,分别在每日 8:00、12:00 和 15:00 时分 3 次饲喂,并于 11:30、14:30 和 18:00 时取绵羊食剩的牧草,并按种分开称重,傍晚给绵羊饮水、补盐。

1.3 样品采集和处理

饲喂绵羊前,每天准确称取 3 种鲜草各约 150 g,在 45℃ 烘干,测牧草干鲜比,饲喂后食剩的每种牧草取约 50 g,准确称量后在 45℃ 烘干,测干鲜比,以计算每种牧草每天实际采食的干物质量;同时把试验期所取每种牧草分别混合均匀,过 1 mm 筛粉碎,备测链烷含量。

试验期每天 7:00 时收集一次全粪,准确称量实际排粪量。然后用四分法取 10% 粪样在 45℃ 烘干,另取 5% 的粪样冷冻干燥。然后将每只羊 7 d 的粪样按每天实际排粪量的比例混合均匀,过 1 mm 筛粉碎,备测链烷含量。

1.4 链烷提取和化学分析

准确称取每种牧草样品 1.0 g 和粪样 0.8 /Lg(精确到 0.001 g),放入 Pyrex 玻璃瓶中,加入 0.2 mg C₂₂、0.2 mg C₃₄ 标准样和 10 mL 乙醇化 KOH(1.5 mol/L),封口置于 90℃ 烘箱中皂化 4.5 h,取出后加入 7 mL 庚烷和 5 mL 蒸馏水,在水浴锅中加热 5 min,摇匀后在 2 000 r/min 的离心机离心 5 min,上清液置于试管中,在 Pyrex 瓶中再加入 7 mL 庚烷,摇匀后在 2 000 r/min 的离心机再离心 5 min,上清液置于同一试管中,溶液用 2 g 硅胶过滤提纯,用庚烷反复清洗试管,将滤液中的庚烷用空气泵吹干得到链烷,然后溶解到 1 mL 庚烷中,注入 1 μL 于 GC-2010 气相色谱中(岛津公司生产),分析样品中链烷含量^[5,7]。

1.5 色谱条件

GC-2010 配置 FID(flame ionization detector) 检测器,色谱柱为 TC-1 型毛细柱(直径 0.25 mm,长 30 m,厚 0.25 μm)。分离法注入(Split ratio 55:1)。载气氦气速率 1.3 kg/cm²(1.0 mL/min 左右),氮气速率 40 mL/min,氢气为 0.5 kg/cm²(30 mL/min 左右)。柱箱温度设置为升温程序,起始温度 200℃,停留 0.5 min,然后以 20℃/min 升温 250℃,再以 10℃/min 从 250℃ 升温到 300℃,以 6℃/min 从 300℃ 升温到 324℃,以 3℃/min 从 324℃ 升温到 350℃,然后在 3 min 内从 350℃ 降温到 200℃。注射器和监测器的温度都保持在 350℃。色谱图中显示峰值的最小峰面积参数设为 300。

1.6 校准

含有 C₂₀到 C₃₆的标准溶液设置为 5 个浓度梯度,由浓度和峰面积的回归关系得出标准曲线,用以计算样品中链烷的浓度。采用标准添加法,即在每个样品测定时均加入 C₂₂和 C₃₄,根据两者加入前后浓度的比值建立回归方程,以校正样品中链烷的萃取损失^[22]。

1.7 回收率计算

粪样中各种链烷含量乘以 7 d 粪便干物质排出量即为粪中链烷总量,牧草中各种链烷含量乘以 7 d 相应牧草干物质采食量即为采食牧草链烷总量,两者比值即为相应链烷的回收率。

1.8 数据分析

碳链长度对回收率的影响以及干燥处理对链烷含量和回收率的影响,分别用全部试验羊及投喂组羊做重复,所得数据用 SAS V6.12 统计软件进行单因素方差分析($P=0.05$)和回归分析。

2 结果与分析

2.1 3 种牧草链烷含量的变化

3 种牧草中奇数链烷含量均高于相邻偶数链烷含量(表 1),其中,羊草和糙隐子草中偶数链烷含量较低,两者均以 C₂₇、C₂₉、C₃₁、C₃₃ 含量丰富,且以 C₃₁ 含量最高;而冷蒿相应链烷含量普遍高于 2 种禾草,但仍以长奇数链烷含量丰富,且以 C₂₉ 含量最高,说明双子叶牧草与单子叶禾草链烷含量存在明显的种间差异。

2.2 粪便不同干燥处理下链烷含量的变化

从表 2 可以看出,多数情况下烘干处理的粪样中链烷的含量显著高于冷冻干燥处理的粪样中链烷的含量(P

表 1 不同牧草链烷含量(DM)

Table 1 Concentrations of N-alkanes in forages(DM)

mg/ kg

牧草品种 Species	C ₂₁	C ₂₃	C ₂₄	C ₂₅	C ₂₆	C ₂₇	C ₂₈	C ₂₉	C ₃₀	C ₃₁	C ₃₂	C ₃₃	C ₃₅	C ₃₆
糙隐子草 <i>Cleistogenes squarrosa</i>	20	21	16	24	19	40	21	77	20	88	21	45	21	0
羊草 <i>Leymus chinensis</i>	19	19	17	23	19	32	19	42	19	80	19	34	0	0
冷蒿 <i>Artemisia frigida</i>	41	29	17	68	22	155	38	1 071	72	710	58	129	47	0

表 2 粪便样品不同干燥处理链烷含量变化(DM)

Table 2 Concentrations of N-alkanes in feces at different drying treatments(DM)

mg/ kg

干燥方法 Drying conditions	C ₂₁	C ₂₃	C ₂₄	C ₂₅	C ₂₆	C ₂₇	C ₂₈	C ₂₉	C ₃₀	C ₃₁	C ₃₂	C ₃₃	C ₃₅	C ₃₆
烘箱干燥 Oven dry	43a	39a	30a	70a	38a	162a	57a	976a	91a	747a	160a	184a	82a	138a
冷冻干燥 Freeze dry	36b	31b	21b	58b	27b	145b	42b	1004a	77b	797a	154a	165b	56b	137a

同列标有不同字母的数值间差异显著 ($P < 0.05$)。Figures attached with different alphabet in the same column are significantly different at 0.05 probability level.

<0.05),但天然优势链烷 C₂₉ 和 C₃₁ 与人工合成的 C₃₂ 和 C₃₆ 含量差异不显著,说明粪样干燥方式对绵羊采食牧草中的优势链烷和 QSM 胶囊中含有的链烷影响较小。

2.3 粪便不同干燥处理对链烷回收率的影响

从图 1 可以看出,不同长度的链烷回收率不同,从 C₂₁ 到 C₃₅ 其回收率呈线性增加,且粪便冷冻干燥处理相应链烷的回收率除 C₂₉ 和 C₃₁ 外,显著 ($P < 0.05$) 低于烘干处理,2 种处理链烷的回收率存在显著的正相关 ($r = 0.88$),且相邻奇数链烷的回收率差异显著 ($P < 0.05$)。

2.4 投喂 QSM 胶囊对链烷回收率的影响

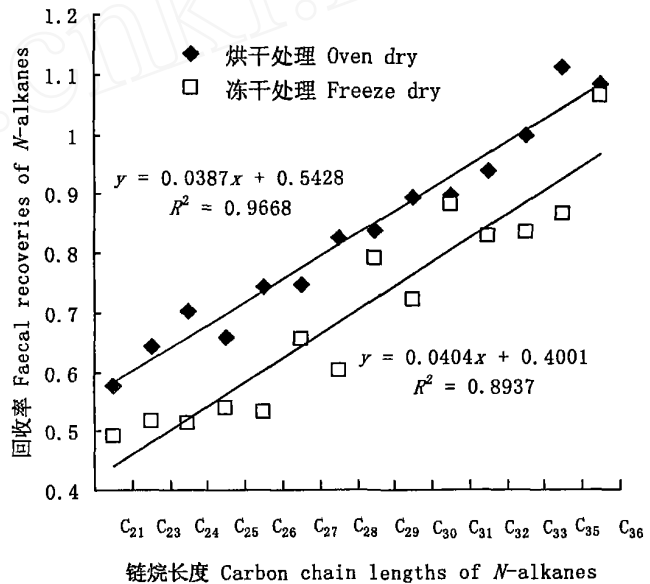


图 1 不同干燥处理链烷回收率与碳链长度的关系

Fig. 1 Relationships between the faecal recoveries of N-alkanes and their carbon chain lengths at different drying treatments

表 3 不同投喂处理链烷回收率及其标准差

Table 3 Faecal recoveries of N-alkanes and standard errors in different treatments

处理 Treatments	C ₂₁	C ₂₃	C ₂₄	C ₂₅	C ₂₆	C ₂₇	C ₂₈	C ₂₉	C ₃₀	C ₃₁	C ₃₂	C ₃₃	C ₃₅	C ₃₆
投喂胶囊组 Dosed groups	0.57a	0.64a	0.69a	0.65a	0.73a	0.74a	0.81a	0.84a	0.89a	0.90a	0.91a	0.99a	1.08a	1.08
对照组 Controlled groups	0.59a	0.66a	0.73a	0.67a	0.78a	0.76a	0.86a	0.84a	0.92a	0.90a	1.01a	1.03a	1.20a	-
回收率平均值 Average	0.58	0.64	0.70	0.66	0.74	0.75	0.83	0.84	0.89	0.90	0.94	1.00	1.11	1.08
标准差 SE	0.03	0.04	0.05	0.04	0.05	0.03	0.05	0.04	0.04	0.05	0.07	0.05	0.10	0.07

同列标有不同字母的数值间差异显著 ($P < 0.05$)。Figures attached with different alphabet in the same column are significantly different at 0.05 probability level.

以烘干羊粪为例(表3),投喂 QSM 胶囊组与对照组绵羊粪便中链烷回收率差异均不显著($P > 0.05$),说明投喂 QSM 胶囊不影响牧草中其他链烷的回收,同时也说明绵羊个体对链烷的回收率比较一致。

3 讨论

3.1 粪便中链烷的回收率是运用链烷技术精确估测放牧家畜食性食量的关键^[23],研究发现,绵羊粪便中链烷的回收率随碳链长度的增加呈线性增加趋势,链烷从 C_{21} 到 C_{35} ,回收率由 59% 线性增加到 111%,这与 Mayes 等^[5]测定的链烷从 C_{27} 到 C_{35} ,粪便中链烷回收率由 71.3% 线性增加为 93.1% 的结果类似,回收率的这种线性增加趋势与其他研究人员的结果也类似^[15,16]。但与 Vulich 等^[8]测定的链烷从 C_{28} 到 C_{35} ,回收率由 93.3% 减少为 91.1% 相反。此外,Uehara 等^[18]指出链烷回收率与链烷长度没有相关关系。出现以上结果的原因,一方面是因为家畜瘤胃内微生物可以分解碳氢化合物,尤其是碳原子数少的碳氢化合物^[24],另一方面是因为家畜在十二指肠和回肠对链烷存在不同程度的吸收造成的,因为从十二指肠和回肠提取的样品,其链烷的回收率高于粪便中的回收率^[15]。而且,长链不饱和碳氢化合物在粪便中也有少量存在^[24],这可能也是造成长链烷回收率偏高的原因之一。

3.2 牧草和粪便样品的处理方法以及链烷的分析和计算方法都会影响链烷的测定结果,直接影响回收率,如乙醇化 KOH 的浓度、皂化时间、提取链烷有机溶剂的选择、内标物的使用和计算、链烷提取时的温度、样品的干燥方式等^[19-22]。本研究中烘干羊粪样品的链烷含量普遍高于冷冻干燥羊粪样品的链烷含量,因而烘干处理回收率也高于冷冻干燥处理的回收率。这一结果与 Dove 等^[16]测定的回收率相反,可能是本试验样品取样后冷冻时间较长(90 d),或者在冷冻干燥过程中经过变温程序处理,粪便样品中链烷有所损失的缘故,其原因有待于进一步研究。此外,粪便中链烷的回收率受牧草种类、其采食比例和采食量的影响^[25],但也有研究表明,回收率不受采食量和家畜种类的影响^[23,26]。研究发现,绵羊个体对粪便中链烷的回收率没有显著的差异,一方面可能是饲喂的牧草种类组成单一,另一方面绵羊个体差异较小,食性较为一致,对牧草中链烷分解和吸收相似所致。

3.3 绵羊粪便中人工合成的链烷(偶数碳原子)与天然链烷(奇数碳原子)的回收率相似是运用双链烷技术评价绵羊食性食量的关键^[22],研究发现, C_{32} 与 C_{31} 、 C_{33} 回收率相近, C_{36} 与 C_{35} 回收率类似。因此,投喂 QSM 胶囊结合牧草中链烷可以用来评价绵羊的食物组成、采食量及排粪量。

4 结论

牧草链烷含量存在物种间差异,绵羊粪便中链烷的回收率与链烷长度存在线性增加关系,烘干处理粪样的链烷回收率高于冷冻干燥处理的回收率,两者存在显著的正相关,且投喂 QSM 胶囊不影响其他链烷的回收率。因此,在利用该技术估测放牧家畜的食性食量时可以应用烘干的粪样进行分析,而不必进行冷冻干燥,这样可以节省时间和方便操作。

参考文献:

- [1] 汪诗平. 几种草食动物日粮植物组成研究技术和方法的比较[J]. 草业学报, 1995, 4(3): 8-16.
- [2] 龙瑞军,董世魁,王元素,等. 反刍动物采食量的概念与研究方法[J]. 草业学报, 2003, 12(5): 8-17.
- [3] John W W, Scott M, Karen L L, *et al.* Calibrating fecal NIRS equations for predicting botanical composition of diets [J]. *Journal of Range Management*, 2002, 55: 374-382.
- [4] 肖金玉,侯扶江,于应文,等. 链烷技术估测放牧动物牧草采食量与消化率[J]. 草业学报, 2005, 14(4): 125-130.
- [5] Mayes R W, Lamb C S, Colgrove P M. The use of dosed and herbage *N*-alkanes as markers for the determination of herbage intake [J]. *Journal of Agricultural Science Cambridge*, 1986, 107: 161-170.
- [6] Malossini F, Piasentier E, Bovolenta S. *N*-Alkane content of some forages[J]. *Journal Science Food Agricultural*, 1990, 53: 405-409.
- [7] Dove H. Using the *N*-alkanes of plant cuticular wax to estimate the species composition of herbage mixtures [J]. *Journal Agricultural Research Australian*, 1992, 43: 1711-1724.
- [8] Vulich S A, O'riordan E G, Hanrahan J P. Use of *N*-alkanes for the estimation of herbage intake in sheep: accuracy and precision of the estimates [J]. *Journal of Agricultural Science*, 1991, 116: 319-323.

- [9] Mayes R W, Duncan A, Sibbald A M, *et al.* The use of plant *N*-alkanes for determining the composition of the diet of grazing herbivores [J]. *Journal Agricultural Science*, 1995, 121: 381-406.
- [10] Dove H, Moore A D. Using a least-squares optimization procedure to estimate botanical composition based on the alkanes of plant cuticular wax [J]. *Australian Journal of Agricultural Research*, 1995, 46: 1535-1544.
- [11] Reeves M, Fulkerson W J, Kellaway R C, *et al.* A comparison of three techniques to determine the herbage intake of dairy cows grazing kikuyu (*Pennisetum clandestinum*) pasture [J]. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 1996, 36: 23-30.
- [12] Hameleers A, Mayes R W. The use of *N*-alkanes to estimate supplementary grass silage intake in grazing dairy cows [J]. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*, 1998, 131: 205-209.
- [13] Duncan A J, Mayes R W, Lamb C S, *et al.* The use of naturally occurring and artificially applied *N*-alkanes as markers for estimation of short-term diet composition and intake in sheep [J]. *Journal of Agricultural Science Cambridge*, 1999, 32: 233-246.
- [14] Mayes R W, Dove H. Measurement of dietary nutrient intake in free-ranging mammalian herbivores [J]. *Nutrition Research Reviews*, 2000, 13: 107-138.
- [15] Mayes R W, Lamb C S, Colgrove P M. Digestion and metabolism of dosed even-chain and herbage odd-chain *N*-alkanes in sheep [J]. *Proceedings Cen. Meeting Europe Grasslands*, 1988, 159-163.
- [16] Dove H, Mayes R W, Freer M, *et al.* Faecal recoveries of the alkanes of plant cuticular waxes in penned and in grazing sheep [J]. *Proceedings XVI International Grassland Congress*, 1989, (2): 1093-1094.
- [17] Ordakowski A L, Kronfeld D S, Holland J L, *et al.* Alkanes as internal markers to estimate digestibility of hay or hay plus concentrate diets in horses [J]. *Journal of Animal Science*, 2001, 79: 1516-1522.
- [18] Uehara A, Hanada M, Okamoto M. The influence of different species on fecal recoveries and accuracy of forage intake estimation using alkane method [J]. *Grassland Science*, 2001, 47: 378-385.
- [19] Dove H, Mayes R W, Freer M. Effects of species, plant part, and plant age on the concentrations in the cuticular wax of pasture plants [J]. *Journal Agricultural Research Australian*, 1996, 47: 1333-1347.
- [20] Zhang Y, Togamura Y, Otsuki K. Study on the *N*-alkane patterns in some grasses and factors affecting the *N*-alkane patterns [J]. *Journal of Agricultural Science*, 2004, 142: 469-475.
- [21] Laredo M A, Simpson G D, Minson D J, *et al.* The potential for using *N*-alkanes in tropical forages as a marker for the determination of dry matter intake by grazing ruminants [J]. *Journal Agricultural Science Cambridge*, 1991, 117: 355-361.
- [22] Olivan M, Osoro K. Effect of temperature on alkane extraction from faeces and herbage [J]. *Journal Agricultural Science Cambridge*, 1999, 132: 305-312.
- [23] Brosh A, Henkin Z, Rothman S J, *et al.* Effects of fecal *N*-alkane recovery in estimates of diet composition [J]. *Journal of Agricultural Science*, 2003, 140: 3-100.
- [24] Dove H, Mayes R W. The use of plant wax alkanes as marker substances in studies of the nutrition herbivores: a review [J]. *Journal Agricultural Research Australian*, 1991, 42: 913-952.
- [25] Dove H, Mayes R W, Lamb C S, *et al.* Factors influencing the release rate of alkanes from an intra-ruminal, controlled-release device, and the resultant accuracy of intake estimation in sheep [J]. *Australian Journal of Agricultural Research*, 2002, 53: 681-696.
- [26] Elwert C, Kluth H, Rodehutschord M. Effect of variable intake of alfalfa and wheat on fecal alkane recoveries and estimates of roughage intake in sheep [J]. *Journal of Agricultural Science*, 2004, 142: 213-223.

**A study of fecal recovery of alkanes from sheep fed on three plant
species in the Inner Mongolia steppe**

LIU Gui-he^{1,2}, ZHANG Ying-jun¹, WANG Shi-ping², HAN Jian-guo¹, LIN Li-jun¹, MA Xiu-zhi²

(1. Institute of Grassland Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 2. Northwest
Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China)

Abstract : An experiment to calculate the fecal recoveries of alkanes was carried out at the Inner Mongolia Grassland Ecosystem Research Station of the Chinese Academy of Sciences in autumn 2004. Twelve wethers (Inner Mongolia fine wool sheep × Inner Mongolia sheep) selected from a group of two year olds were fed fresh mixtures of *Leymus chinensis* (30%), *Cleistogenes squarrosa* (20%) and *Artemisia frigida* (50%) in known proportions and amounts for 14 days. They were assigned to two groups in a randomized experimental design. Nine sheep were dosed with artificial QSM capsules (New Zealand Captec Company) and three sheep were not dosed. Samples of herbage and feces were collected daily for seven days and dried in oven at 45 °C before freeze drying for analysis of the alkane concentration by gas chromatography. The results showed that there was a different concentration of *N*-alkanes in the three forage species. Fecal recoveries of *N*-alkanes increased linearly with increasing carbon chain lengths, and were greater using oven drying than freeze drying. There was no significant effects of artificial QSM capsules on recoveries of alkanes from plant cuticular wax in sheep faeces.

Key words : *N*-alkane; fecal recoveries; sheep; Inner Mongolia steppe