

牛至油对猪粪尿混合物中挥发性脂肪酸和厌氧菌的影响

黄 灿¹, 唐新燕², 李 季³, 彭绪亚¹

(1. 重庆大学三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 400045; 2. 重庆大学生物工程学院, 重庆 400044; 3. 中国农业大学资源与环境学院, 北京 100094)

摘 要:牛至油是一种植物挥发性油, 由于其来源的天然性和广谱的抗菌作用, 已被广泛地用于畜禽生产中。然而牛至油的这种广谱抑菌作用是否会在畜禽废弃物处理中起到一定的作用, 有关这方面的研究国内外均未见相关报道。本研究采用室内培养方法, 将收集的新鲜猪粪、尿和去离子水按 10:7:3 的比例(质量比)进行混合摇匀配成猪排泄物样本, 评估牛至油这种绿色添加剂对猪粪尿中主要恶臭物(挥发性脂肪酸)和厌氧菌的影响。结果表明, 牛至油能降低猪粪尿混合物的 pH 值, 28 d 后, 没有添加牛至油的对照组的 pH 值为 6.50 而 0.06%(V/V)和 0.12%(V/V)牛至油组的 pH 值则分别为 5.81 和 5.60。此外, 牛至油的添加减少了猪粪尿中粪大肠杆菌和总厌氧菌的数量, 并对挥发性脂肪酸的产生具有抑制作用, 且表现出剂量依赖性。0.12%的牛至油 28 d 内能完全抑制新的短链挥发性脂肪酸的产生, 在此剂量下, 1 d 内粪大肠杆菌从 6.7×10^5 CFU·mL⁻¹ 降低至不可检测; 2 d 后总厌氧菌数量从 4.32×10^{10} CFU·mL⁻¹ 减至 1.3×10^7 CFU·mL⁻¹, 21 d 后仍然保持该抑制水平。

关键词:牛至油; 猪粪尿混合物; 挥发性脂肪酸; 厌氧菌

中图分类号:X713 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2008)05-2101-04

Effect of Oregano Essential Oil on Volatile Fatty Acids and Anaerobic Bacteria in Swine Waste Slurries

HUANG Can¹, TANG Xin-yan², LI Ji³, PENG Xu-ya¹

(1. Key Laboratory of the Three Gorges Reservoir Region's Eco-Environment, Ministry of Education, Chongqing University, Chongqing 400045, China; 2. College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China; 3. College of Resource and Environment Science, China Agriculture University, Beijing 100094, China)

Abstract: Odors from swine waste slurry are a complex mixture of volatile compounds arising from microbial anaerobic degradation of proteins, carbohydrates, and fats. It is assumed that inhibiting microbial activities in swine waste slurry is likely conducive to controlling odor and reducing the potential for transmission of pathogens. Oregano essential oil (OEO) as naturally occurring metabolites of plants are bactericidal to many pathogenic microorganisms in pure culture system. However, no information is available on the effect of the oil on natural highly diverse microbial ecosystems such as waste management systems. The objective of this study was to assess the effect of OEO on volatile fatty acids (VFA) and anaerobic bacteria in swine waste slurries. After collection, swine waste slurry (faeces:urine:deionized water, 10:7:3, weight basis) were blended and the slurry were amended with 0%(V/V) OEO, 0.12%(V/V) α -pinene, 0.06%(V/V) OEO, 0.12%(V/V) OEO respectively. The results of this study indicated OEO reduced slurry pH. The pH of the control was 6.20. The low rates of OEO dropped the pH to 5.81, whereas the high rates dropped it to 5.60. In addition, OEO effectively inhibited the production of VFA, and reduced the number of fecal coliforms and total anaerobic bacteria. OEO at 0.12% completely inhibited the production of VFA in flasks over 28 days; fecal coliforms were reduced from 6.7×10^5 cells per mL to nondetectable within 1 day; total anaerobic bacteria were reduced from 4.32×10^{10} to 1.3×10^7 cells per mL after 2 days and continued to be suppressed to that level after 21 days. It is concluded that the plant-derived OEO could be used as alternative methods to solve some of the environmental problems associated with consolidated hog feeding operations.

Keywords: oregano essential oil; swine waste slurries; volatile fatty acids; anaerobic bacteria

收稿日期: 2007-11-02

基金项目: 北京市生态学重点学科项目(XK10019440); 北京市都市农业学科群建设项目(XK1001190553)

作者简介: 黄 灿(1977—), 男, 博士, 主要从事固体废物处理与资源化方面的教学与研究工作。E-mail: huangcancau@163.com

通讯作者: 李 季 E-mail: lijij@cau.edu.cn

集约化畜禽养殖业在提高生产效率、降低生产成本和提供优质畜禽产品的同时,也由于生产过分集中没有过多的土地消纳畜禽粪便资源导致氮素损失、恶臭化合物的排放、地下水和地表水污染、病原菌的传播而引起人们的关注。微生物在厌氧或兼性厌氧条件下发酵畜禽粪尿中的碳水化合物、蛋白质和脂肪是恶臭气体产生的主要原因。主要恶臭物有短链挥发性脂肪酸、含氮化合物和含硫化合物。由于畜禽粪尿恶臭的产生与微生物的活动有关,如果能抑制微生物的发酵必将减少畜禽粪尿恶臭的产生和对环境的危害。

牛至(*Origanum vulgare linn*)又名止痢草,小叶薄荷,为唇形科牛至属多年生草本植物。牛至茎叶含挥发性油——牛至油。牛至油由于其天然性、抗菌的广谱性和高效性已在畜禽生产中得到了广泛的应用,如牛至油可减少畜禽发病率,提高饲料利用率以促进畜禽生长^[1]。然而牛至油的这种广谱抑菌作用是否会在畜禽废弃物处理中起到一定的作用,有关这方面的研究国内外均未见相关报道。目前,许多研究显示牛至油具有抗菌活性,然而大多数的研究仅仅是在人工培养基上评估牛至油对一种或几种微生物的抗菌能力^[2,3],很少有涉及在自然生态系统中如动物肠道、废弃物处理中牛至油应用效果的研究报道。正是基于这点,本研究将牛至油应用于猪粪尿混合物的处理中,探讨牛至油对猪粪尿混合物中微生物代谢及挥发性脂肪酸等恶臭化合物产生量的影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料

新鲜猪粪尿取自中国农科院畜牧所养猪场(肥育猪,日粮主要成分是 85%的玉米和 11%豆粕)。实验所用的液体牛至油购自加拿大(National Nutrition, Barrie, ON),含有 45%的香荆芹酚;掩蔽剂 α -蒎烯购自上海友思生物有限公司,其纯度大于 98%;其他化学试剂均购至北京化学试剂公司。

1.2 试验设计

试验开始前将收集的新鲜猪粪、尿和去离子水按 10:7:3 的比例进行混合摇匀配成猪排泄物样本。将猪排泄物样本 500 mL 装入 1 L 三角瓶中,每组 3 瓶,共 4 组,分别为空白对照组,添加 0.12%(V/V,下同)的 α -蒎烯,0.06%(V/V,下同)的牛至油,0.12%(V/V,下同)的牛至油,用橡皮塞密封瓶口,置于室温 25 ℃的环境下静止培养。各组接入以上添加剂充分摇匀 1 min 后取样,该时间点定为 0。试验共进行 28 d,分别

在 0、1、2、4、7、10、14、21、28 d 取样(取样前充分摇匀)测定猪粪尿混合物中的 pH 值、总挥发性脂肪酸、总厌氧菌和粪大肠杆菌的数量。

pH 值的测定:取样 15 mL 置于振摇器上振摇 10 min 后采用玻璃复合电极直接测定。

总厌氧菌的测定:按活菌稀释平板计数法,采用的是厌氧手套箱,在严格厌氧的条件下培养 3~5 d,其培养基的配制如下^[4]:牛脑浸液 200 mL·L⁻¹;牛心浸液 250 mL·L⁻¹;蛋白胨 10 g·L⁻¹;酵母浸粉 5 g·L⁻¹;葡萄糖 2 g·L⁻¹;氯化钠 5 g·L⁻¹;磷酸二氢钠 2.5 g·L⁻¹;半胱氨酸 0.5 g·L⁻¹;1%氯化血红素溶液 0.5 mL·L⁻¹;1%维生素 K₁ 溶液 0.1 mL·L⁻¹;水 550 mL,调节 pH 值至 7.2~7.6^[4]。

粪大肠杆菌的测定:按活菌稀释平板计数法,用 EMB 培养基在 37 ℃的条件下培养 24 h 后计算其菌落数^[5]。

总挥发性脂肪酸的测定:取猪粪尿与无离子水按 1:1 的比例混合均匀,1 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,取其上清液用 20%的盐酸将 pH 值调至 2.6~3.2 之间,用 Shimadzu14A 气相色谱仪按内标法测定挥发性脂肪酸含量。色谱法测定挥发性脂肪酸的条件为:规格为 Φ 3 mm×2 m 的玻璃柱,填充物为 10%SP-1200 和 1% H₃PO₄ 涂于 Chromosorb WHP(80-100 目),检测器为氢火焰离子化检测器,测试条件柱温 160 ℃,气化室温度 190 ℃,检测室温度 190 ℃,载气(H₂)50 mL·min⁻¹,燃气(N₂)50 mL·min⁻¹。总挥发性脂肪酸中包括:乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸、异戊酸、己酸^[6]。

2 结果与分析

2.1 牛至油处理后对猪粪混合物 pH 值的影响

从表 1 可以看出,在猪粪尿中添加 0.12%的 α -蒎烯对猪粪尿 pH 值影响较小,和对照组相比,添加牛至油能降低猪粪尿的 pH 值。28 d 后,没有添加牛至油的对照组的 pH 值为 6.50 而添加 0.06%和 0.12%牛至油组的 pH 值则分别为 5.81 和 5.60。Smith 等^[7]报道:牛至油中含有香荆芹酚和百里香酚,单独或联合添加到畜禽粪尿时能促进乳酸积累,降低粪尿的 pH 值,减少氨的挥发,保存更多的氮素养料。乳酸不是挥发性有机酸,乳酸的累积并不会增加粪尿的恶臭强度^[8]。

2.2 牛至油处理后对猪粪尿中总挥发性脂肪酸产生量的影响

畜禽粪便含有未消化的有机物质,如碳水化合

表 1 牛至油处理后猪粪尿中 pH 值的变化

Table 1 Changes of pH values in swine waste slurries after adding oregano essential oil

时间/d	pH值			
	对照	0.12%α-蒎烯	0.06%牛至油	0.12%牛至油
0	7.35	7.35	7.35	7.35
1	7.10	7.18	6.83	6.77
2	7.24	7.22	6.79	6.68
4	6.93	7.00	6.05	5.98
7	6.94	6.96	5.83	5.76
10	6.84	6.79	5.74	5.64
14	6.62	6.63	5.70	5.65
21	6.57	6.54	5.75	5.63
28	6.50	6.47	5.81	5.60

物、蛋白质和脂肪。在需氧的情况下,碳、氮和含硫的化合物可降解为二氧化碳、硝酸盐、硫酸盐和水。然而在厌氧条件下,这些有机化合物的降解则产生甲烷、二氧化碳、硫化氢、水等终产物。在多数情况下,畜禽废弃物处于兼性厌氧条件,这导致了氨、其他含氮化合物、挥发性脂肪酸、含硫化合物、醇类,胺类等(如吡啶,粪臭素,甲酚)恶臭化合物的产生^[9]。

要对恶臭定义是件困难的事,因为组成恶臭的化合物很多,收集恶臭也是件困难的事,再者用仪器分析恶臭物质的浓度与用感官法分析的恶臭强度之间通常缺乏相关性^[10,11]。许多研究表明,氨、硫化氢和恶臭强度之间的相关性很差。然而 Zahn^[11]在对 34 个养猪场的研究中发现,空气中的挥发性有机酸的含量(主要是碳数小于 10 或具有支链的挥发性脂肪酸,如异丁酸、戊酸、异戊酸、己酸、异己酸)与猪粪中恶臭强度之间存在着最好的相关性。因而控制挥发性有机酸的形成和排放将对猪粪恶臭强度的减少有着直接的影响。本研究显示(表 2),牛至油的添加对猪粪尿挥发性脂肪酸的产生具有抑制作用,并表现出剂量依赖性。0.12%牛至油添加到猪粪尿中 28 d 内能阻止任何新的挥发性脂肪酸的产生,0.06%牛至油则在 10 d 内能阻止任何新的挥发性脂肪酸的产生。α-蒎烯仅是一种的掩蔽剂,以 0.12%的剂量添加到猪粪尿时,没有发现对猪粪尿微生物发酵过程产生抑制作用。

2.3 牛至油处理后对猪粪尿中大肠杆菌数量的影响

大肠杆菌通常作为水体被粪便污染的指示菌,该菌的许多菌株含有致病因子。从表 3 可以看出,0.12% α-蒎烯接入猪粪尿中对大肠杆菌的数量变化没有显著影响,低剂量的牛至油处理组 2 d 内其粪尿样品上没有检测到大肠杆菌,而高剂量的牛至油达到

表 2 牛至油处理后猪粪尿中总挥发性脂肪酸浓度的变化

Table 2 Changes of total volatile fatty acid production in swine waste slurries after adding oregano essential oil

时间/d	总挥发性脂肪酸/mmol·L ⁻¹			
	对照	0.12%α-蒎烯	0.06%牛至油	0.12%牛至油
0	51	51	51	51
1	86	89	53	50
2	111	120	50	52
4	146	152	51	53
7	182	177	55	51
10	224	230	52	50
14	268	273	60	51
21	314	310	73	51
28	350	347	81	54

表 3 牛至油处理后猪粪尿中大肠杆菌数量的变化

Table 3 Changes of total fecal coliforms in swine waste slurries after adding oregano essential oil

时间/d	大肠杆菌/10 ⁵ CFU·mL ⁻¹			
	对照	0.12%α-蒎烯	0.06%牛至油	0.12%牛至油
0	6.7	6.7	6.7	6.7
1	7.3	6.2	0.09	ND
2	8.0	7.0	ND	
4	7.5	7.1		
7	8.2	7.8		
10	6.2	6.6		
14	2.3	2.7		
21	1.4	1.0		
28	0.1	ND		

注:ND,no detected,未检测到菌落。

同样的效果只需要 1 d,表现出牛至油对大肠杆菌抑制的剂量依赖性。

2.4 牛至油处理后对猪粪尿中总厌氧菌数量的影响

畜禽养殖场恶臭的产生大多与畜禽废弃物中微生物的代谢活动有关,如果能抑制微生物的活动必将大大减轻畜禽废弃物的恶臭强度。前已述及挥发性脂肪酸的产生与猪粪尿恶臭强度之间有着较高的相关性,如果能减慢或阻止微生物发酵有机物的过程,将能更好地控制挥发性有机酸产生,这种假设被 Zahn^[8]的研究所证实。Zahn^[8]的研究发现:来自猪粪 C2-C9 有机酸在减少空气质量时候有着最大的贡献率。在大多数养殖场,完全控制畜禽废弃物形成甲烷和二氧化碳是件不可能的事情。传统的厌氧消化产甲烷在 20 世纪 70 至 80 年代很受欢迎,然而由于操作的复杂性和运行的成本很高,这种方法逐渐受到人们的冷落^[12]。同样地,畜禽粪便的好氧处理在经济上是不可行的,

因为它很少能有效地保存废弃物中的养分。目前,添加剂由于经济和应用的简便性在畜禽废弃物中正得到越来越广泛的使用。从原理上来说,使用抗菌剂抑制猪粪中微生物的发酵将导致恶臭物质挥发和病原菌的数量减少,温室气体的产生受到抑制,畜禽粪便中的养分得以保留。

本研究中,牛至油加入后的第 1 d 就表现出对总厌氧菌的抑制效应,0.12%的牛至油的这种抑制效应可以延续到 21 d 以后,0.06%牛至油的抑制效应也可延续 10 d 左右(表 4)。牛至油的这种抑菌效应必将对猪粪尿的发酵特征产生重要影响。

表 4 牛至油处理后猪粪尿中总厌氧菌数量的变化
Table 4 Changes of total anaerobic bacteria in swine waste slurries after adding oregano essential oil

时间/d	总厌氧菌的数量/10 ⁸ CFU·mL ⁻¹			
	对照	0.12%α-蒎烯	0.06%牛至油	0.12%牛至油
0	432	432	432	432
1	160.4	158.8	3.5	0.30
2	139.5	142.3	3.0	0.13
4	112.9	108.3	3.1	0.10
7	82.7	84.1	2.8	0.07
10	66.5	68.5	3.2	0.08
14	44.5	43.2	4.3	0.10
21	29.1	30.4	5.6	0.09
28	9.7	10.2	4.5	0.31

3 结语

牛至油能降低猪粪尿混合物的 pH 值,这将有利于减少猪粪尿中氨的挥发,保存更多的氮素养料。除了降低 pH 值,牛至油还能减少猪粪尿混合物中粪大肠杆菌和总厌氧菌的数量,有效抑制短链挥发性脂肪酸的产生,降低猪粪尿混合物的恶臭强度。

牛至油通过抑制猪粪尿中微生物的厌氧发酵减少挥发性脂肪酸的产生,不仅能有效地降低猪粪尿混合物的恶臭强度,而且有利于减少猪粪尿排放到环境后病原菌的传播,很可能在畜禽养殖业的可持续性发展中起着重要作用。今后应扩大牛至油的使用范围,

探讨其经济有效的使用剂量,关注牛至油处理的粪肥还田后的去向等问题。

参考文献:

[1] 陈立华,袁 纓,冷义福,等.牛至油对肉仔鸡生长性能和胴体品质的影响[J].中国家禽,2007,29(5):9-11.
CHEN Li-hua, YUAN Yin, LENG Yi-fu, et al. Effect of oregano oil on growth performance and carcass quality of broilers[J]. *China Poultry*, 2007, 29(5):9-11.

[2] Hammer K A, Carson C F, Riley T V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts[J]. *J Appl Microbio*, 1999, 86:985-990.

[3] Dorman H J D, Deans S G. Antimicrobial agents from plants;an -tibacterial activity of plant volatile oils[J]. *J Appl Bacteriol*, 2000, 88: 308-316.

[4] Butine T J, Leedle J A. Enumeration of selected anaerobic bacterial groups in cecal and colonic contents of growing-finishing pigs[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1989, 55:1112-1116.

[5] 陈天寿.微生物培养基的制造与运用 [M].北京:中国农业出版社,1999.
CHEN Tian-shou. Manufacture and application of microorganism cul- ture medium[M]. Beijing:China Agriculture Press, 1999.

[6] Rotto E R, Yokoyama M, Hengemuehle S, et al. Ammonia, volatile fatty acids, phenolics, and odor offensiveness in manure from growing pigs fed diets reduced in protein concentration[J]. *J Anim Sci*, 2003, 81:1754-1763.

[7] Smith D R, Moore P A, Haggard B E, et al. Effect of aluminum chloride and dietary phytase on relative ammonia losses from swine manure[J]. *J Anim Sci*, 2004, 82:605-611.

[8] Zahn J A, Hatfield J L, Do Y S, et al. Characterization of volatile emis- sions and wastes from a swine production facility[J]. *J Environ Qual*, 1997, 26:1687-1696.

[9] Mackie R I, Stroot P G, Varel V H. Biochemical identification and bio- logical origin of key odor components in livestock waste[J]. *J Anim Sci*, 1998, 76:1331-1342.

[10] Zhu J, Jacobson L D. Correlating microbes to major odorous compounds in swine manure[J]. *J Environ Qual*, 1999, 28:737-744.

[11] Zahn J A, DiSpirito A A, Do Y S, et al. Correlation of human olfactory responses to airborne concentrations of malodorous volatile organic compounds emitted from swine effluent[J]. *J Environ Qual*, 2001, 30: 624-634.

[12] Morse D J C, Mutter R. Anaerobic digester survey of California dairy producers[J]. *J Dairy Sci*, 1996, 79:149-153.