

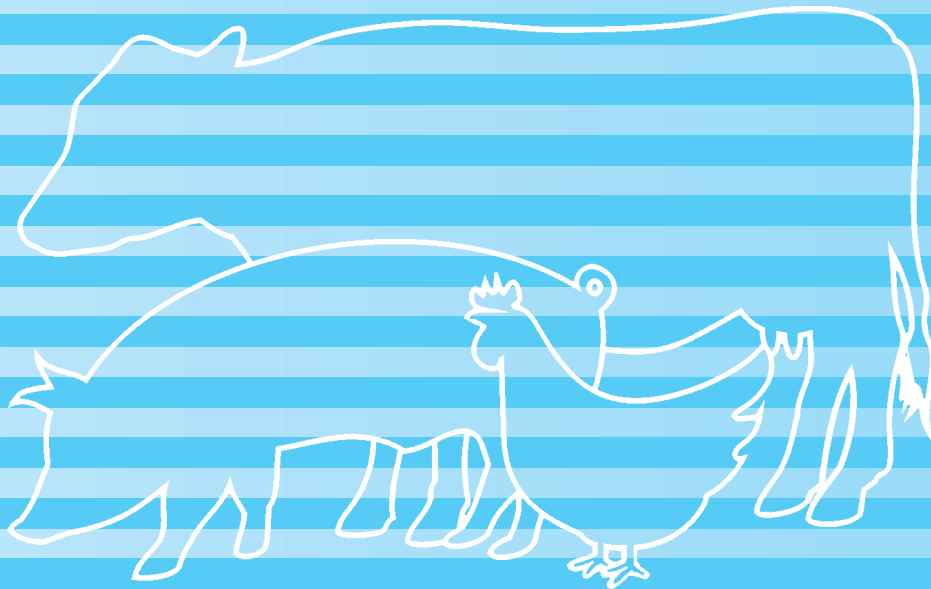
ISSN 0253-9209
DOI: 10.6991/JTLR

畜產研究

第五十六卷 第一期 中華民國一一二年 三月 季 刊

JOURNAL OF TAIWAN LIVESTOCK RESEARCH

Vol. 56 No. 1 March 2023



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：方珍玲 王佩華 王尚禮 王政騰 王珮華 王紓愍 王淑音 王勝德
王聖耀 王瀚聰 朱有田 朱志成 余 祺 余 碧 吳信志 吳勇初
吳建平 吳錫勳 李固遠 李欣蓉 李姿蓉 李恒夫 李國華 李淵百
李滋泰 沈朋志 周明顯 林幼君 林正斌 林正鏞 林怡君 林美峰
林義福 林德育 邱智賢 施意敏 洪靖崎 范耕榛 唐品琦 徐濟泰
張世融 張仲彰 張秀鑾 張怡穎 張啟聖 梁筱梅 章嘉潔 莊士德
許振忠 許晉賓 郭彥甫 郭卿雲 郭錡德 陳文賢 陳立人 陳志峰
陳志銘 陳怡兆 陳明汝 陳洵一 陳秋麟 陳嘉昇 陳億乘 黃大駿
黃永芬 黃英豪 楊國泰 楊深玄 楊鎮榮 萬一怒 萬添春 廖御靜
劉秀洲 劉振發 練慶儀 鄭永祥 鄭裕信 蕭振文 魏良原 譚發瑞
蘇天明 蘇忠楨
(以姓名筆劃為序)

編輯委員：李欣蓉 林幼君 林德育 洪哲明 張世融 郭卿雲 陳翠妙 廖御靜
(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:

C. L. FANG	P. H. WANG	S. L. WANG	C. T. WANG	P. H. WANG
S. M. WANG	S. Y. WANG	S. D. WANG	S. Y. WANG	H. C. WANG
Y. T. JU	C. C. CHU	C. YU	P. YU	H. C. WU
Y. C. WU	C. P. WU	H. H. WU	G. Y. LEE	S. S. LEE
T. R. LEE	H. F. LEE	K. H. LEE	Y. P. LEE	T. T. LEE
P. C. SHEN	M. H. CHOU	Y. C. LIN	J. B. LIN	C. Y. LIN
Y. C. LIN	M. F. LIN	Y. F. LIN	D. Y. LIN	C. H. CHIU
Y. M. SHY	C. C. HUNG	G. J. FAN	P. C. TANG	C. T. HSU
S. R. CHANG	S. C. CHANG	H. L. CHANG	Y. I. CHANG	C. S. CHANG
H. M. LIANG	C. C. CHANG	S. T. CHUANG	C. C. HSU	C. B. HSU
Y. F. KUO	C. Y. KUO	M. D. KUO	W. S. CHEN	L. R. CHEN
C. F. CHEN	C. M. CHEN	Y. C. CHEN	M. J. CHEN	H. I. CHEN
T. L. CHEN	C. S. CHEN	Y. C. CHEN	D. J. HUANG	Y. F. HUANG
I. H. HWANG	G. T. YANG	S. S. YANG	J. R. YANG	Y. N. WAN
T. C. WAN	Y. J. LIAO	H. C. LIU	J. F. LIU	C. Y. LIEN
Y. H. CHENG	Y. S. CHENG	J. W. SHIAU	L. Y. WEI	F. J. TANG
T. M. SU	J. J. SU			

EDITORS:

S. S. LEE	Y. C. LIN	D. Y. LIN	C. M. HUNG	S. R. CHANG
C. Y. KUO	T. M. CHEN	Y. J. LIAO		



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：www.tlri.gov.tw

編輯\印製者：沐福商行

電 話：0985-187287

出 版 日 期：中華民國 112 年 3 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：www.govbook.com.tw

GPN : 2005200015

ISSN : 0253-9209

DOI : 10.6991/JTLR

畜產研究

第 56 卷第 1 期

中華民國 112 年 3 月

目 錄

	頁
1. 黑絨烏骨雞之育成及推廣蔡銘洋、洪哲明、林正鏞、林義福、林德育、鄭裕信、洪國翔、劉曉龍	1
2. 微衛星標記應用於季新鴨之遺傳結構及其類緣關係之探討張怡穎、魏良原、陳志毅、劉秀洲	9
3. 不同割期及留樁高度對狼尾草台畜草三號青貯品質之影響林正斌、丁恩寧、顏才博、吳錫勳	23
4. 以次世代定序方式分析畜產廢水處理活性污泥之細菌多樣性廖仁寶、黃雅玲、黃子瑄、陳若菁、程梅萍	34
5. 性別對商用紅羽土雞生長性能、血液生化值、屠體性狀及生產效益之影響林正鏞、李秀蘭	46
6. 黃芩葛根對細胞抗發炎活性及荷蘭仔女牛下痢之影響李國華、林文宏、趙俊炫、林宗毅、陳志毅	55
7. 生長肥育豬飼養於水簾式豬舍對生長性能及廢水處理水質之影響蘇天明、翁義翔、鍾承訓、劉威志、蕭庭訓	66
8. 臺灣養豬畜牧業溫室氣體減量潛力評估與基線方法學排放係數之探討連興隆、林岱霖	76

黑絨烏骨雞之育成及推廣⁽¹⁾

蔡銘洋⁽²⁾⁽⁶⁾ 洪哲明⁽²⁾ 林正鏞⁽²⁾ 林義福⁽³⁾ 林德育⁽⁴⁾ 鄭裕信⁽⁵⁾ 洪國翔⁽⁶⁾ 劉曉龍⁽²⁾⁽⁷⁾

收件日期：111 年 6 月 23 日；接受日期：111 年 11 月 18 日

摘 要

本試驗挑選黑絨烏骨雞 (*Gallus gallus domesticus*)，進行外觀及產蛋性能選育，育成高產蛋率烏骨雞，提供產業特色化烏骨雞蛋生產。黑絨烏骨雞以小族群系譜選育的方式，選育高產蛋之黑絨烏骨雞，繁殖新世代。雞隻於 16 週齡進行雞隻外觀與體重檢定，母雞上籠收集初產蛋重、初產體重、達 40 週齡產蛋數、40 週齡平均蛋重及 40 週齡體重。另公雞 16 週齡體重需達族群公雞平均體重以上，列入候選之種公雞上雞籠飼養。試驗選育 11 個世代總計檢定公雞 1,528 隻與母雞 2,237 隻。第 11 世代 (G11) 檢定結果，公雞與母雞 16 週齡平均體重分別為 1,667 g 與 1,253 g。產蛋性能測定結果，母雞平均初產日齡、初產蛋重、初產體重、40 週齡體重、40 週齡平均蛋重及達 40 週齡產蛋數分別為 142 日、29.7 g、1,596 g、2,111 g、45.1 g 及 102 枚，至 G11 代達 40 週齡產蛋數表型值累計改進量達 32 個，育種價值由 G1 代 0.26 提升至 G11 代 24.2，其 G11 代之 40 週齡產蛋數遺傳值累計改進量估值達 23.9 枚，40 週齡蛋殼顏色的亮度 (以 L^* 值表示)、紅色度 (以 a^* 值表示) 及黃色度 (以 b^* 值表示) 平均分別為 76.9、7.0 及 19.6，蛋形係數為 75.1%、蛋殼強度 3.4 kg/cm² 及蛋殼厚度 0.33 mm，可提供產業種母雞產蛋性能改良之母系烏骨雞或蛋肉兼用種烏骨雞。

關鍵詞：產蛋性能、選育、烏骨雞。

緒 言

烏骨雞 (*Gallus gallus domesticus*) 為古老的優良中國地方雞種之一，在市場上頗受歡迎，在臺灣常被飼養作為藥膳用雞，價格高甚具經濟效益。1995 年 6 月 28 日中華民國養雞協會自中國大陸江蘇家禽科學研究所引進黑絨烏骨雞種蛋 60 枚，種蛋重為 52.4 g，贈與行政院農業委員會畜產試驗所 (以下簡稱畜試所) 進行孵化，於同年 7 月 20 日孵出雛雞 49 隻 (劉等，2011)，平均初生雛雞的體重為 40.5 g，其 16 週齡體重平均 1,485 ± 260 g，外貌特徵仍不一致 (戴等，1996)。

1997 年生長性能檢定顯示，雛公雞與雛母雞出生重分別為 30.8 與 30.9 g、12 週齡體重為 1,119 g 與 917 g、16 週齡體重為 1,666 g 與 1,274 g (黃等，1998)。繁殖性能檢定顯示，初產日齡為 161 日、初產體重為 1,597 g、初產蛋重為 33.4 g、40 週齡體重為 1,760 g、達 40 週齡蛋重為 41.5 g 及達 40 週齡產蛋數為 80 枚 (黃等，1999)，引進雞群飼養於畜試所舊有三股雞舍，其後保留該黑絨烏骨雞族群飼養於畜試所。

臺灣種雞業者為增加烏骨雞生長速率，常與大型肉雞雜交，導致烏骨雞體格變大、快速成長，於 8 週齡公雞體重約 1.4 公斤，母雞約 1.2 公斤，且外貌特徵逐漸失去烏骨雞原有地方品種特徵，如缺纓頭、部份烏骨雞腳趾為四趾或雞冠呈單冠等特徵。另一方面種母烏骨雞因體型變大，導致產蛋數減少明顯，母雞平均初產日齡為 191 天，達 40 週齡產蛋數平均只有 44 枚，已嚴重影響到烏骨雞之雛雞生產 (劉等，2018)。本試驗利用黑絨烏骨雞原有品種特徵，如體型小，產蛋數佳，肉質鮮美等特性，選育具高產蛋性能母系烏骨雞，以提供產業種母雞產蛋性能改良之母系烏骨雞或蛋肉兼用種烏骨雞。

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2727 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) 行政院農業委員會畜產試驗所遺傳育種組。

(5) 行政院農業委員會畜產試驗所所長退休。

(6) 國立屏東科技大學農學院生物資源博士班。

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

材料與方法

本試驗於畜試所產業組試驗雞舍進行，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照護及使用小組以畜試動字 104-20 號申請核准。

I. 選育流程

藉由遺傳育種理論與混合模式之應用 (Mrode, 2000; Cheng *et al.*, 2009)，設計以系譜選育方式進行選拔，依系譜收集親屬相關資料分析其遺傳變異，並使用動物模式分析選拔性狀之育種價估值，自 2005 年起黑絨烏骨雞以小族群系譜選育方式，候選種母雞於 18 週齡以後上個別母雞籠 (長 50 cm、寬 30 cm、高 39 cm)，進行產蛋性能檢定。候選種公雞於 18 週齡以後上個別公雞籠 (長 50 cm、寬 30 cm、高 49 cm)。於完成收集每代黑絨烏骨雞之產蛋性狀資料後，利用系譜之親屬關係資料，進行最佳線性無偏差預測值 (best linear unbiased prediction, BLUP) 之統計分析 (劉等, 2012)，選留達 40 週齡產蛋數育種價估值較高之個體公、母雞，並避開全同胞與半同胞配種，進行繁殖下一代。

II. 生長性能檢定與外貌特徵篩選

G7 至 G11 代之雛雞孵化後，於 16 週齡測量體重，並篩選烏骨雞之外貌特徵，其檢查項目有玫瑰冠、纓頭、鬚鬚、藍耳、絲羽、烏皮、多趾及毛腳等烏骨雞品種外貌特徵，若不符合品種特徵雞隻，予以淘汰。公雞 16 週齡體重需達該世代族群公雞平均體重以上 (各世代選留隻數如表 1)，列入候選留種公雞上雞籠飼養。

III. 產蛋性能測定

母雞經生長性能測定後，其 16 週齡體重需達 700 g 以上，選留雛白痢陰性之母雞群 (各世代選留數如表 1)，上個別產蛋籠進行初產蛋重、初產體重、初產日齡、達 40 週齡體重、40 週齡平均蛋重及達 40 週齡產蛋數等產蛋性能檢定。另於 G11 母雞延長檢定產蛋週齡至 52 週齡，進行 52 週齡平均蛋重及達 52 週齡產蛋數檢定。

IV. 蛋殼色差度測定

選用 G11 代個別母雞 40 週齡收集所產之雞蛋三顆，計 109 枚使用分光測色計 (Konica Minolta, CM-2300d, Japan)，測其蛋殼鈍端之外表蛋殼色差度，其所測得之 L^* 值、 a^* 值及 b^* 值， L^* 值代表亮度，數值 100 時為全白，0 時為全黑； a^* 值代表紅色度，正值時為紅，負值為綠； b^* 值代表黃色度，正值時為黃，負值時為藍。

V. 蛋形係數、蛋殼強度與蛋殼厚度測定

選用 G11 代個別母雞 40 週齡的 106 枚蛋，進行測定：

蛋形係數 (Egg shape index)：以游標卡尺量測雞蛋之長軸與短軸，以計算蛋形係數。蛋形係數 = [短軸 (mm) / 長軸 (mm)] \times 100 (Islam and Dutta, 2010)。

蛋殼強度 (Eggshell strength)：以日製之蛋殼強度測定器 (SV-200H, ALGOL, Japan)，測定蛋殼強度，單位為 kg/cm^2 。

蛋殼厚度 (Eggshell thickness)：將風乾後的蛋殼 (去殼膜部) 使用日製測微器 (Mitutoyo 547-361 Absolute) 測定之，在蛋的鈍端、尖端、赤道處各取一小片測其三點厚度取平均值，測至 0.01 mm (Nordskog and Farnsworth, 1953)。

VI. 統計分析

試驗資料使用 SAS 統計分析系統之一般線性模式程序 (general linear model procedure, GLM) 進行變方分析 (SAS, 2011)，並以 student-newman-keuls test (SNK) 比較不同世代之平均值間差異顯著性，本試驗顯著水準為 $P < 0.05$ 。另使用 SAS 統計分析系統之 PROC INBREED 程序估算每代公母雞之近親係數。

結果與討論

I. 選育試驗雞隻及選留百分率

本試驗設計以小族群系譜選育方式，按 40 週齡產蛋數的無偏差育種價估值選留個體於 2005 — 2016 年間共繁殖黑絨烏骨雞公 1,528 隻及母 2,237 隻，合計 3,765 隻供試驗使用。依估算達 40 週齡產蛋數之育種價由高到低排序，G2 與 G3 預期選留達 40 週齡產蛋數較優之個體公 12 隻、母 60 隻，並避開全同胞與半同胞配種，進行人工授精個別配種。另為擴大繁殖族群於 G4 — G8 擴大選留種雞，選取公 15 隻、母 75 隻。2014 年因應禽流感疫

情，而減少母雞數目，G9 選取公 23 隻、母 36 隻及 G10 選取公 11 隻、母 47 隻進行人工授精個別配種。於 G11 恢復選取公 15 隻、母 75 隻配種方式，進行繁殖下一代。淘汰產蛋少或蛋未受精或未有孵化小雞之母雞，實際有後代的公雞與母雞如表 1 選留種雞公及母隻數。公雞之選留百分率 5.5 – 22.7% 之間，平均為 14.1%，母雞之選留百分率 14.2 – 82.5% 之間，平均為 48.35%。

計算黑絨烏骨雞經 11 代選拔之後，每代公母雞之近親係數平均值與標準偏差結果，列於表 2。公雞之近親係數平均值與母雞近似，由於 1995 年至 2005 年間之雞群數量少，雞隻採用逢機配種繁殖，可能存在血緣關係，因此為避開近親配種，重新編號，並假設種原來源無親屬關係，並避開全同胞與半同胞配種，以減少近親配種的發生。結果顯示於第 G1 代之公母雞均無親屬關係存在，然而每代近親係數呈緩慢增加，至第 11 代時公雞為 0.154 ± 0.043 ，母雞為 0.156 ± 0.043 。

表 1. 黑絨烏骨雞之各世代選拔族群

Table 1. Selected populations of black velvet silky chicken by generation

Generation	Year of hatching	No. of chick		Selection parents		Selection percentage	
		M*	F	M	F	M	F
G0				12	45		
G1	2005	59	144	11	24	18.6	16.7
G2	2006	47	78	10	41	21.3	52.6
G3	2007	93	221	10	39	10.8	17.6
G4	2008	66	132	15	65	22.7	49.2
G5	2009	109	241	15	59	13.8	24.5
G6	2010	129	297	15	68	11.6	22.9
G7	2012	204	369	15	68	7.4	18.4
G8	2013	187	465	15	66	8.0	14.2
G9	2014	416	117	23	36	5.5	30.8
G10	2015	37	57	11	47	29.7	82.5
G11	2016	181	113	15	67	8.3	59.3
Total		1,528	2,237	167	625		

* M: Male, F: Female.

表 2. 黑絨烏骨雞各世代之近親係數

Table 2. Inbreeding coefficient of black velvet silky chicken by generation

Generation	Male	Female
G1	0	0
G2	0.027 ± 0.052	0.024 ± 0.050
G3	0.031 ± 0.030	0.029 ± 0.033
G4	0.056 ± 0.033	0.056 ± 0.034
G5	0.060 ± 0.024	0.064 ± 0.022
G6	0.092 ± 0.030	0.095 ± 0.030
G7	0.113 ± 0.032	0.110 ± 0.028
G8	0.140 ± 0.022	0.138 ± 0.024
G9	0.151 ± 0.017	0.151 ± 0.021
G10	0.149 ± 0.056	0.163 ± 0.036
G11	0.154 ± 0.043	0.156 ± 0.043

Mean \pm Standard Deviation.

II. 黑絨烏骨雞生長性能

從 G1 至 G11 累積資料，經統計分析體重之平均值結果，列於表 3。分析不同世代間黑絨烏骨雞 10 週齡體重，公雞以 G11 (961 ± 137 g) 最重，G1 (685 ± 129 g) 最輕；母雞則以 G9 (793 ± 110 g) 最重，G1 (547 ± 105 g) 最輕。G1 至 G6 於 20 週齡體重，公雞以 G6 ($1,824 \pm 214$ g) 最重，G1 ($1,480 \pm 204$ g) 最輕；母雞則以 G6 ($1,378 \pm 226$ g) 最重，G1 ($1,103 \pm 165$ g) 最輕。G7 後因配合母雞提早上籠，20 週齡體重提前於 16 週齡測定，G7 至 G11 16 週齡體重，公雞以 G9 ($1,686 \pm 217$ g) 最重，G7 ($1,481 \pm 202$ g) 最輕；母雞也是以 G9 ($1,299 \pm 132$ g) 最重，G7 ($1,102 \pm 153$ g) 最輕。選育 G11 第 16 週齡公雞與母雞體重分別為 $1,667 \pm 194$ g 與 $1,253 \pm 150$ g，相較與民間 (豐和火雞公司) 黑羽烏骨雞 16 週齡母雞平均體重 $1,032$ g 較重 (劉等, 2018)。

表 3. 黑絨烏骨雞選育族群第 1 代至第 11 代於 10、16 和 20 週齡體重

Table 3. Body weight at 10,16 and 20-wk-age of black velvet silky chicken in G1-G11 selection flock

Generation	Body weight of male (g)			Body weight of female (g)		
	10 wks	16 wks	20 wks	10 wks	16 wks	20 wks
G1	685 ± 129 (n = 59)	—	$1,480 \pm 204$ (n = 59)	547 ± 105 (n = 138)	—	$1,103 \pm 165$ (n = 144)
G2	—	—	$1,595 \pm 170$ (n = 44)	—	—	$1,191 \pm 147$ (n = 77)
G3	775 ± 116 (n = 57)	—	$1,740 \pm 205$ (n = 93)	659 ± 105 (n = 125)	—	$1,336 \pm 165$ (n = 221)
G4	728 ± 137 (n = 66)	—	$1,660 \pm 215$ (n = 63)	587 ± 109 (n = 130)	—	$1,250 \pm 198$ (n = 127)
G5	708 ± 140 (n = 106)	—	$1,780 \pm 234$ (n = 105)	591 ± 110 (n = 238)	—	$1,323 \pm 192$ (n = 237)
G6	882 ± 143 (n = 112)	—	$1,824 \pm 214$ (n = 86)	719 ± 119 (n = 266)	—	$1,378 \pm 226$ (n = 261)
G7	745 ± 149 (n = 178)	$1,481 \pm 202$ (n = 152)	—	598 ± 118 (n = 328)	$1,102 \pm 153$ (n = 323)	—
G8	861 ± 178 (n = 172)	$1,614 \pm 245$ (n = 164)	—	681 ± 139 (n = 436)	$1,173 \pm 156$ (n = 432)	—
G9	875 ± 151 (n = 409)	$1,686 \pm 217$ (n = 416)	—	793 ± 110 (n = 115)	$1,299 \pm 132$ (n = 117)	—
G10	—	$1,520 \pm 205$ (n = 37)	—	—	$1,204 \pm 170$ (n = 57)	—
G11	961 ± 137 (n = 180)	$1,667 \pm 194$ (n = 181)	—	778 ± 93 (n = 112)	$1,253 \pm 150$ (n = 112)	—

n: Sample size, mean \pm standard deviation.

III. 產蛋性能測定

於 2005 – 2016 年 (G1 至 G11 代) 共選留黑絨烏骨雞母雞 1,963 隻上籠，供測定產蛋性能。累積 11 代之產蛋性能資料，結果列於表 4。G11 母雞之平均初產日齡為 142 ± 10 日，初產體重為 $1,596 \pm 190$ g，初產蛋重為 29.7 ± 5.6 g，40 週齡體重為 $2,111 \pm 261$ g，40 週齡蛋重為 45.1 ± 3.6 g，達 40 週齡產蛋數為 102 ± 21 枚。比較世代間黑絨烏骨雞產蛋性能差異，初產日期以 G11 母雞最早開始初產，以 G2 母雞為最晚開始初產，G11 與 G2 相比較初產日期達顯著性差異 ($P < 0.05$)。初產體重以 G11 最重，G1 為最輕，世代間有顯著性差異 ($P < 0.05$)。初產蛋重以 G3 較重，G11 較輕，世代間有顯著性差異 ($P < 0.05$)。40 週齡平均蛋重以 G3 較重，G9 較輕，世代間有顯著性差異 ($P < 0.05$)。40 週齡體重以 G11 為最重，G1 為最輕，世代間有顯著性差異 ($P < 0.05$)。40 週齡產蛋數以 G1 為最少，G11 為最多，世代間有顯著性差異 ($P < 0.05$)。其結果 G11 較 G1 之 40 週齡產蛋數增加 45%，確實達到增加母雞產蛋數效果。

表 4. 黑絨烏骨雞選育族群第 1 代至第 11 代產蛋性能

Table 4. Laying performance of black velvet silky chicken in each generation of selection flock

Generation	AFE (day)	BWFE (g)	EWFE (g)	EW40 (g)	BW40 (g)	EN40 (egg)	Selection differential
G1	167 ± 8 ^b (n = 79)	1,327 ± 164 ^f (n = 79)	32.9 ± 3.7 ^{bed} (n = 79)	46.3 ± 4.1 ^{cde} (n = 72)	1,614 ± 222 ^e (n = 76)	70 ± 16 ^f (n = 78)	2 (72 ± 14) (n = 24)
G2	170 ± 16 ^a (n = 72)	1,458 ± 145 ^{de} (n = 73)	33.1 ± 4.3 ^{bed} (n = 73)	49.0 ± 3.5 ^a (n = 59)	1,652 ± 216 ^e (n = 63)	77 ± 17 ^e (n = 75)	1 (78 ± 13) (n = 41)
G3	159 ± 11 ^c (n = 192)	1,487 ± 185 ^{cd} (n = 192)	35.6 ± 7.1 ^a (n = 192)	49.7 ± 4.0 ^a (n = 180)	1,825 ± 221 ^e (n = 190)	85 ± 17 ^{cd} (n = 189)	8 (93 ± 9) (n = 39)
G4	166 ± 12 ^b (n = 130)	1,357 ± 176 ^f (n = 132)	34.7 ± 5.7 ^{ab} (n = 132)	48.0 ± 3.7 ^b (n = 123)	1,655 ± 251 ^e (n = 129)	83 ± 14 ^d (n = 128)	8 (91 ± 9) (n = 65)
G5	158 ± 13 ^{cd} (n = 241)	1,562 ± 195 ^{ab} (n = 241)	35.4 ± 7.6 ^a (n = 241)	46.9 ± 4.2 ^{bc} (n = 224)	1,840 ± 231 ^{cd} (n = 241)	85 ± 20 ^c (n = 241)	16 (101 ± 9) (n = 59)
G6	153 ± 11 ^e (n = 255)	1,558 ± 184 ^{ab} (n = 255)	34.0 ± 7.3 ^{abc} (n = 255)	47.1 ± 3.6 ^{bc} (n = 224)	1,875 ± 237 ^c (n = 244)	91 ± 18 ^b (n = 255)	14 (105 ± 8) (n = 68)
G7	155 ± 11 ^{de} (n = 312)	1,408 ± 175 ^e (n = 312)	32.0 ± 6.7 ^{cde} (n = 312)	45.5 ± 3.7 ^{de} (n = 296)	1,782 ± 250 ^d (n = 310)	96 ± 17 ^b (n = 312)	14 (110 ± 9) (n = 68)
G8	159 ± 14 ^e (n = 395)	1,418 ± 174 ^e (n = 395)	31.4 ± 5.9 ^{de} (n = 395)	43.8 ± 3.8 ^f (n = 346)	1,760 ± 242 ^d (n = 384)	86 ± 23 ^{cd} (n = 395)	25 (111 ± 10) (n = 66)
G9	149 ± 12 ^f (n = 117)	1,583 ± 206 ^a (n = 117)	31.7 ± 7.3 ^{de} (n = 117)	43.2 ± 4.6 ^f (n = 117)	1,821 ± 217 ^{cd} (n = 117)	94 ± 14 ^b (n = 117)	10 (104 ± 10) (n = 36)
G10	147 ± 5 ^f (n = 57)	1,517 ± 222 ^{bc} (n = 56)	31.6 ± 7.2 ^{de} (n = 56)	46.5 ± 4.4 ^{cd} (n = 48)	2,026 ± 347 ^b (n = 57)	94 ± 18 ^b (n = 57)	0 (94 ± 18) (n = 47)
G11	142 ± 10 ^g (n = 113)	1,596 ± 190 ^a (n = 113)	29.7 ± 5.6 ^e (n = 113)	45.1 ± 3.6 ^e (n = 94)	2,111 ± 261 ^a (n = 113)	102 ± 21 ^a (n = 113)	6 (108 ± 14) (n = 67)

AFE: age at the first egg.

BWFE: body weight at the first egg.

EWFE: egg weight at the first egg.

EW40: egg weight at 40 wks of age.

BW40: body weight at 40 wks of age.

EN40: egg number at 40 wks of age.

n: Sample size, mean ± standard deviation.

Selection differential: EN40 of the mean of the selected parents- EN40 of the base population mean.

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

分析 G1 代至 G11 代黑絨烏骨雞達 40 週齡產蛋數表型值，由 G1 代之 70 枚提升至 G11 代 102 枚，經計算各代之表型值選拔差則介於 0 – 25 枚之間，平均各代為 9.5 枚，實際試驗結果其 G11 代達 40 週齡產蛋數表型值累計改進量為 32 枚 (如表 4 與圖 1 所示)。至於達 40 週齡產蛋數育種價值則由 G1 代之 0.26 提升至 G11 代 24.2，其 G11 代達 40 週齡產蛋數遺傳值累計改進量估值達 23.9 枚 (如圖 1)。顯示經持續 11 代於達 40 週齡產蛋數之選拔，在遺傳估值的分析結果，有逐代改進現象。經 11 代的產蛋數選拔之後，黑絨烏骨雞之初產日齡提早 25 天，40 週齡產蛋數則增加 32 枚。

戴等 (1996) 報告顯示，黑絲羽烏骨雞之初產日齡為 153 日，初產體重為 1,711 g，達 40 週齡產蛋數 86 枚左右。黃等 (1999) 報告使用黑絲羽烏骨雞進行產蛋性能測定結果，初產日齡、初產體重及初產蛋重之平均分別為 161.4 ± 1.9 日、 $1,597 \pm 18.8$ g 及 33.4 ± 0.48 g，40 週齡體重、40 週齡蛋重及達 40 週齡產蛋數分別為 $1,760 \pm 26.5$ g、 41.5 ± 0.4 g 及 80.3 ± 2.3 枚。本試驗結果顯示與 1995 年自大陸引進畜試所之原黑色絲羽烏骨雞比較，經 11 代選育之後產蛋數已大幅提升。另臺灣豐和火雞有限公司生產的黑羽烏骨雞 (簡稱豐和黑羽烏骨雞) 母雞之平均初產日齡為 193 日，初產蛋重 30.8 g，初產體重 1,388 g，40 週齡體重 1,386 g，40 週齡平均蛋重 39.2 g，40 週齡產蛋數為 44 枚 (劉等，2018)。如以畜試所選育之黑絨烏骨雞達 40 週齡產蛋數 102 枚與豐和黑羽烏骨雞之 44 枚相比，則增加 58 枚蛋。

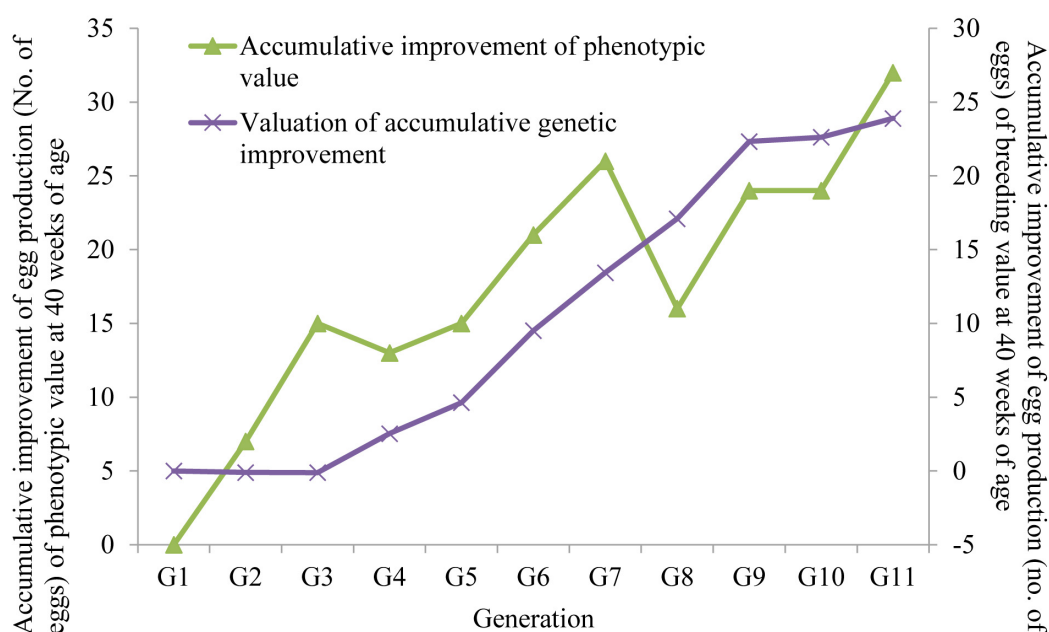


圖 1. 黑絨烏骨雞達 40 週齡產蛋數表型值與遺傳值之累計改進量。

Fig. 1. Cumulative improvement in phenotypic and genetic values of egg production in black velvet silky chicken to 40 weeks of age.

IV. 蛋殼色差度、蛋形係數、蛋殼強度與蛋殼厚度測定

G11 之黑絨烏骨雞，於 40 週齡收集個別母雞所產之雞蛋 3 顆，測其外表蛋殼色差度及蛋殼品質測定，其結果列於表 5。母雞 40 週齡平均蛋殼色差度 L 值為 76.9 ± 4.5 ，蛋殼色差度 a 值為 7.0 ± 2.4 ，殼色差度 b 值為 19.6 ± 3.9 ，其蛋殼外觀顏色為淺褐色。母雞 40 週齡平均蛋長為 49.7 ± 2.1 mm，蛋寬為 37.3 ± 1.5 mm，蛋形係數則為 75.1 ± 3.7 ，蛋殼強度為 3.4 ± 0.8 kg/cm²，蛋殼厚度為 0.33 ± 0.03 mm。

V. 產業利用性

蛋用：黑絨烏骨雞 G11 的 52 週齡蛋重為 48.4 ± 4.7 g，達 52 週齡產蛋數為 148 ± 20 枚。產蛋數較民間飼養之烏骨雞多出一倍產蛋量 (劉等，2018)，且黑絨烏骨雞蛋有別於一般市售雞蛋，較一般雞蛋小，外觀蛋殼顏色較白殼雞蛋色澤深，較褐殼雞蛋色澤淺，呈淺褐色。業者可以特色化烏骨雞蛋做較高售價方式銷售，增加產品價格與農民收益。

種用：黑絨烏骨雞第 G11 檢定結果，達 40 週齡產蛋數可高達 102 ± 21 枚。以畜試所選育之黑絨烏骨雞達 40 週齡產蛋數 102 枚與產業現況 44 枚 (劉等，2018) 增加 58 枚蛋。若以飼養 1 批次畜試所選育的黑絨烏骨雞種母雞 10 萬隻為例，與產業現況比較，產蛋數達 40 週齡即可相差 580 萬枚蛋，若以 80% 孵化率估算可增加 464

萬隻小雞，售價以每隻小雞 24 元估算，較民間飼養的種用烏骨雞產值多增加約新臺幣 11,136 萬元經濟效益產生。

表 5. 黑絨烏骨雞第 11 世代 40 週齡蛋殼色差度與蛋殼品質測定

Table 5. Eggshell color and eggshell quality of black velvet silky chicken in 40-wks of G11

Items	N	Mean \pm standard deviation	Range
Eggshell color			
L* value	109	76.9 \pm 4.5	58.3 – 86.4
a* value	109	7.0 \pm 2.4	1.4 – 13.1
b* value	109	19.6 \pm 3.9	7.41 – 27.8
Egg length, mm	106	49.7 \pm 2.1	43.9 – 56.1
Egg width, mm	106	37.3 \pm 1.5	32.7 – 41.2
Egg shape coefficient, %	106	75.1 \pm 3.7	62.4 – 87.2
Eggshell strength, kg/cm ²	106	3.40 \pm 0.80	1.0 – 6.1
Eggshell thickness, mm	106	0.33 \pm 0.03	0.20 – 0.40

截至 111 年 10 月為止，已有三家民間養雞業者向畜試所申請「蛋肉兼用型黑絨烏骨雞之飼養管理」技術轉移，主要以生產黑絨烏骨雞蛋，做為特色化蛋品銷售。

結 論

黑絨烏骨雞保留部分烏骨雞之玫瑰冠、纓頭、鬍鬚、藍耳、絲羽、烏皮、多趾及毛腳等品種特徵。經第 G11 代檢定結果，達 40 週齡產蛋數可高達 102 ± 21 枚。以此育成的黑絨烏骨雞提供做為民間配種用母系，有助於產業提升烏骨雞母雞繁殖效能，促進產值提升效益。

參考文獻

- 黃祥吉、劉曉龍、陳怡兆、王政騰、鄭裕信、張秀鑾、黃鈺嘉、鍾秀枝。1998。大陸雞與本省土雞之開發及利用。I. 大陸雞與本省土雞生長性能之比較。臺灣省畜產試驗所八十七年度試驗報告第 14-1 – 14-8 頁。臺灣省畜產試驗所，臺南縣。
- 黃祥吉、劉曉龍、鄭裕信、張秀鑾、廖宗文、鍾秀枝。1999。大陸雞與本省土雞之開發及利用。II. 大陸雞與本省土雞繁殖性能之比較。臺灣省畜產試驗所八十八年度試驗報告第 17-1 – 17-4 頁。臺灣省畜產試驗所，臺南縣。
- 劉曉龍、林義福、洪哲明、謝昭賢。2011。黑羽及白羽烏骨雞之引進及飼養。畜產專訊 77：1-3。
- 劉曉龍、林義福、洪哲明、陳添福、謝昭賢、鄭裕信。2012。絲羽烏骨雞與黑色絲羽烏骨雞生長與繁殖性能研究。畜產研究 45(2)：141-152。
- 劉曉龍、林德育、蔡銘洋、洪哲明、林義福、鄭裕信、王義松。2018。豐和烏骨雞選育 4 代之蛋殼顏色改良與近親係數。中畜會誌 47(增刊)：185。
- 戴謙、鍾秀枝、黃祥吉、張秀鑾。1996。大陸地方雞種在臺灣之適應性觀察。中畜會誌 25(增刊)：102。
- Cheng, Y. S., R. Rouvier, H. L. Liu, S. C. Huang, Y. C. Huang, C. W. Liao, J. J. L. Tai, C. Tai, and J. P. Poivey. 2009. Eleven generations of selection for the duration of fertility in the intergeneric crossbreeding of ducks. Genet. Sel. Evol. 41(1): 1-11.
- Islam, M. S. and R. K. Dutta. 2010. Egg quality traits of indigenous, exotic and crossbred chickens (*Gallus domesticus* L.) in Rajshahi, Bangladesh. J. Life Earth Sci. 5: 63-67.
- Mrode, R. A. 2000. Linear Models for the Prediction of Animal Breeding Values. CAB International, London, UK.
- Nordskog, A. W. and G. Fransworth, Jr. 1953. The problem of sampling for egg quality in breeding flock. Poult. Sci. 32: 918-921.
- SAS. 2011. SAS user guide: Statistics, SAS Inst., Cary, NC. USA.

Breeding and promotion of Black Velvet Silky chicken ⁽¹⁾

Ming-Yang Tsai ⁽²⁾⁽⁶⁾ Che-Ming Hung ⁽²⁾ Cheng-Yung Lin ⁽²⁾ Yih-Fwu Lin ⁽³⁾ Der-Yuh Lin ⁽⁴⁾
Yu-Shin Cheng ⁽⁵⁾ Kuo-Hsiang Hung ⁽⁶⁾ and Hsiao-Lung Liu ⁽²⁾⁽⁷⁾

Received: Jun. 23, 2022; Accepted: Nov. 18, 2022

Abstract

In this experiment, appearance and egg production performance of black velvet silky chickens (*Gallus gallus domesticus*) were selected to breed the high egg production silky chicken strain for industrial production of eggs of black silky chickens. Black silky chickens were pedigree selected and bred in a small population. The birds had individual wing tags and kept reproducing new generations of high egg production silky chickens. The egg weight and body weight at the first egg, and the number of eggs laid, the average egg weight and body weight at 40 weeks of age were collected. The body weight of males over the average weight of the population at 16 weeks of age was required. A total of 1,528 males and 2,237 females were tested for 11 generations. In generation 11 (G11), the results showed that the average body weight of males and females at 16 weeks of age was 1,667 and 1,253 g, respectively. The results of egg production performance showed that the age, egg weight and body weight at the first egg were 142 days, 29.7 g and 1,596 g, respectively. The body weight, average egg weight and egg number at 40 weeks of age were 2,111 g, 45.1 g and 102, respectively. In G11, at 40 weeks of age, the phenotypic cumulative value of egg production number was 32. Breeding value was increased from 0.26 of G1 to 24.2 of G11. The estimated improvement of cumulative genetic value of egg production number in G11 of 40 weeks of age was 23.9. The eggshell color L* value, a* value and b* average values were 76.9, 7.0 and 19.6, respectively. Egg shape index, eggshell strength and eggshell thickness were 75.1%, 3.4 kg/cm² and 0.33 mm, respectively. The black velvet silky chickens can provide for the improvement of laying performance of silky chickens in the industry.

Key words: Egg production performance, Selection and breeding, Silky chicken.

(1) Contribution No. 2727 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) Breeding and Genetics Division, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(5) Retired from Director General Office, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(6) Graduate Institute of Bioresources, National Pingtung University of Science and Technology.

(7) Corresponding author, E-mail: slong@mail.tlri.gov.tw.

微衛星標記應用於季新鴨之遺傳結構 及其類緣關係之探討⁽¹⁾

張怡穎⁽²⁾⁽⁴⁾ 魏良原⁽²⁾ 陳志毅⁽³⁾ 劉秀洲⁽²⁾

收件日期：111 年 8 月 9 日；接受日期：111 年 12 月 29 日

摘 要

北京鴨 (Duck, *Anas platyrhynchos*) 最初於民國 40 至 50 年代引進現在的行政院農業委員會畜產試驗所，持續進行毛色、體重及受精持續性等選拔，此品系於民國 110 年命名為季新鴨。然因季新鴨為閉鎖族群，族群數量小，其基因頻率及遺傳歧異度易受選拔、配種策略影響，應定期進行遺傳監測，故本研究之目的即為分析季新鴨之遺傳變異資訊，並了解其與其他鴨種的類緣關係。本研究使用分布於 5 個染色體上共 11 組篩選自褐色菜鴨的微衛星標記進行分析，結果顯示，季新鴨整體遺傳變異略低於民間北京鴨品系，交替基因數略低於保種菜鴨及北京鴨與褐色菜鴨的合成品系等各家鴨品系，但高於選育白色菜鴨，有效交替基因數則與前述品系大致相當，此結果可能由季新鴨族群不大，加上長期選拔所造成，但不同標記間近交指數差異甚大，顯示此族群目前應尚無嚴重近親衰退之虞。類緣關係樹結果顯示，季新鴨與民間北京鴨遺傳距離最近，但與其他品種(系)，包括民間北京鴨，皆未形成明確分支。本研究中季新鴨跟兩民間北京鴨品系的 pairwise F_{ST} 分別為 0.1582 及 0.1873，雖接近品種層級最低之 pairwise F_{ST} ，但綜合類緣關係樹及 STRUCTURE 分析結果，季新鴨與兩民間北京鴨品系的遺傳分化程度應仍為品系層級。後續將以本研究建立遺傳變異結果作為基準，供定期進行季新鴨遺傳監測，另遺傳結構分析的結果亦可提供於此品系推廣至產業時配種、選育參考。

關鍵詞：遺傳多態性、遺傳結構、微衛星標記、北京鴨。

緒 言

我國肉鴨以土番鴨 (mule duck, *Anas platyrhynchos* × *Cairina moschata*) 占最大宗，約近肉鴨產量 8 成，每年約生產 2,450 萬隻，其係以公番鴨與母改鴨或母北京鴨進行屬間雜交生產 (Cheng *et al.*, 2009)。產業為確保生產時的受精率，每 3 天即需進行一次人工授精，不但人力成本耗資甚鉅，頻繁注精亦易造成鴨隻緊迫，影響生產效率。故畜產試驗所宜蘭分所(下稱宜蘭分所)於分所內的北京鴨 L201 品系進行受精持續性檢定，並持續監控後裔土番鴨羽色分數，歷經 13 個世代，育成北京鴨長受精持續性品系，達到 6 天授精一次的育種目標，命名為「季新鴨」(行政院農業委員會畜產試驗所，2021)。

北京鴨原產於中國華北，深具生長快、體型大等優勢，最初於民國 40 至 50 年代就引進畜產試驗所及宜蘭分所飼養，民國 67 年起依系譜繁殖第一代(行政院農業委員會畜產試驗所，2021)。歷年來，北京鴨在宜蘭分所歷經大型北京鴨選拔，分為逢機、高產蛋及大體型三品系，原備後續雜交使用(胡等，1991)。然試驗發現北京鴨作為三品種土番鴨生產中改鴨的父系，影響土番鴨羽毛顏色甚深，故將三品系合併為現在的 L201 品系，以毛色選拔為主、體重較輕汰除為輔，第 14 代時，後裔土番鴨毛色在 3 及 7 級以內者已改進至 80.1 及 99.5% (李等，1993；李及康，1997)，第 17 代開始受精持續性檢定及選拔，至今已選拔超過 16 個世代。因皆為閉鎖族群，加上族群數量小，大約在 200 至 450 隻之間，為避免嚴重近親衰退，繁殖時分為 20 個公鴨家族，避開全、半同胞進行配種，每個世代亦記錄 8、16 週齡體重與產蛋性能，作為監測之用(陳等，2019)。綜上所述，北京鴨自引進宜蘭分所已逾 50 年並已選拔超過 33 個世代。

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2728 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所宜蘭分所。

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所新竹分所。

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

根據聯合國糧食及農業組織 (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) 建議，畜禽管理除性能監測族群變化，為確認選拔策略對於族群遺傳歧異度之影響，應另以分子標記探討族群遺傳結構 (FAO, 2012)。各種分子標記中，微衛星標記因具有廣布於真核生物基因組、較不受選拔影響、交替基因數多、多態性訊息含量豐富及低成本等特性 (Liu and Cordes, 2004; Tamaki, 2007; Gemayel *et al.*, 2010)，至今仍廣泛應用於印度、菲律賓、越南、中國等各國鴨隻族群研究 (Magpantay *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019; Pham *et al.*, 2021; Veeramani *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2021)，Lai *et al.* (2020) 亦篩選新的褐色菜鴨微衛星標記，並針對我國鴨種進行分析。另已有雞隻研究提到，族群越小，其基因頻率越易隨著時間改變，顯示對於家禽種原保存及育種計畫，監測遺傳歧異度隨時間變化有其重要性 (Tu *et al.*, 2018; Palinkas-Bodzsar *et al.*, 2020)。

故本研究之目的為應用微衛星標記建立季新鴨之遺傳變異資訊，並了解其與民間大型北京鴨的類緣關係，供後續進行遺傳監測及育種策略制定，以利此新品系永續經營。

材料與方法

I. 試驗動物

本研究之供試動物取自飼養於宜蘭分所的季新鴨第 12 代 (即 L201 品系第 29 世代，品系簡稱 CH)，自第 11 代每隻留種母鴨挑選後代 1 公或 1 母，共 30 公及 30 母。另自 Lai *et al.* (2020) 所使用飼養於宜蘭分所的兩個民間大型北京鴨品系，分別隨機挑選 11 隻個體 (BPA 及 BPB) 進行基因型鑑別。為釐清季新鴨與其他鴨品種 (系) 間之類緣關係，本試驗加入本團隊先前進行基因型鑑別之種原白色菜鴨第 15 代 (GWT, N = 30)、宜蘭白鴨臺畜一號第 27 代 (L102, N = 40) (張等, 2016)、種原褐色菜鴨第 17 代 (GBT, N = 30) (張等, 2018)、季新鴨前身與褐色菜鴨正反交後固定的五結白鴨第 7 代 (L401, N = 118) (行政院農業委員會畜產試驗所, 2015)、五結黑色番鴨第 16 代 (BM, N = 30) 及白色番鴨畜試 1 號第 23 代 (WM, N = 50) (張等, 2021) 等鴨群的基因型資料，各族群數量及來源如表 1。

表 1. 本研究試驗鴨隻數量及基因型來源

Table 1. Number and source of experimental animals in this study

Population ¹	No. of drake	No. of duck	Genotype source
CH	30	30	This study
BPA	6	5	Sampled from Lai <i>et al.</i> (2020), genotyped in this study
BPB	7	4	Sampled from Lai <i>et al.</i> (2020), genotyped in this study
GWT	15	15	Chang <i>et al.</i> (2016)
L102	20	20	Chang <i>et al.</i> (2016)
GBT	15	15	Chang <i>et al.</i> (2018)
L401	59	59	TLRI (2015)
BM	15	15	Chang <i>et al.</i> (2021)
WM	25	25	Chang <i>et al.</i> (2021)

¹ CH: Chihsin duck; BPA and BPB: Pekin duck introduced from the industrial farms; GWT: germplasm-conserved white Tsaiya duck; L102: Ilan White Tsaiya TLRI NO.1; GBT: germplasm-conserved brown Tsaiya duck; L401: Wujie White Duck; BM: Wujie Black Muscovy; WM: White Muscovy LRI 1.

本研究涉及之動物試驗於宜蘭分所執行，動物之使用、飼養及實驗內容係依據宜蘭分所實驗動物管理委員會核准 (畜試宜動字第 106002 號) 之試驗準則進行。

II. 微衛星標記分析

本研究自前述季新鴨之翅靜脈採集新鮮血液，依 Gentra Puregene Blood Kit (QIAGEN, Netherlands) 說明書指示並參考 Bush *et al.* (2005) 調整用於萃取的血量以進行基因組 DNA 之萃取。所得基因組 DNA 置入 -20°C 保存備用。

本研究利用之微衛星標記係篩選自褐色菜鴨 (Hsiao *et al.*, 2008)，挑選於家鴨及番鴨各族群測試皆具較佳多態性者如表 2，包括 APT001、APT004、APT008、APT010、APT012、APT017、APT020、APT025、APT026、

APT032 及 APT033 等共 11 組 (位於 1、2、3、7 及 Z 染色體)。取試驗動物基因組 DNA 進行 PCR，其反應總體積為 10 μ L，其中包含 50 ng 模板基因組 DNA、正反引子各 0.2 μ M、1 X PCR buffer、1.5 mM $MgCl_2$ 、0.2 mM dNTP 及 0.375 U *Taq* DNA polymerase (TAKARA Co., Japan)。反應條件為 94°C 變性 10 分鐘，接著進行以下循環 30 次，包括 94°C 變性 20 秒、60°C 鍊合 30 秒及 72°C 延伸 30 秒，最後再以 72°C 延伸 10 分鐘。PCR 反應後，以 TBE 緩衝液製備 1% 瓊脂糖膠體進行電泳確認產物。PCR 產物經稀釋與基因標準品 (GeneScan 500 Liz size standard) 混合製備成樣品盤，送國家基因體醫學研究中心 (National Center for Genome Medicine) 經 ABI 3730 序列分析儀 (Applied Biosystems, USA) 分析辨別 PCR 產物片段大小，取得分析原始檔後，再以 Peak Scanner v1.0 software (Applied Biosystems, USA) 人工判讀各微衛星標記之基因型。

表 2. 11 組菜鴨微衛星標記引子序列、鍊合溫度及所在鴨染色體資訊

Table 2. Primer sequences, annealing temperature and orthologous microsatellites in the duck genome scaffold of the 11 Tsaiya duck-derived microsatellite markers

Locus ¹	Primer sequences (5'→3')	Ta (°C) ²	Chr. ³	Duck genome scaffold no. ⁴
APT001	F: GTCCCACTGGTTTGCTGTCC R: ACTACGCATGGCAGTGAGGTT	60	Z	1,509
APT004	F: GGGCAGGAAAATCTCCTGAAT R: TCTCAGTGGCTGAGCGGTC	60	3	192
APT008	F: CAAAGAAATCCTAGAACATCATTCAAAT R: TCTTCTGGCTTTTCACCTTAGTTTAGTA	60	1	358
APT010	F: CACTCAGGCTTTTAGGTCCATTAATA R: CATCTGAGAATGCACTTACTGTCAAA	60	2	1,199
APT012	F: TTGAGCCTCAGGTTCTAAACTCCTA R: TCATAACATTTTCAGACCAGTTTTTCAGA	60	2	5
APT017	F: TGGATGGACAGACGGGTGA R: TGGAAGTTTTGATTTCTAGTGCTTACA	60	1	481
APT020	F: TTCCAAGTTTGTTCATGCCAATAGA R: CTGACCATGTTAGGGCGTTTTAG	60	1	197
APT025	F: TCCTAAGAAACGTTGCTTCATAGACC R: GAGTTAAGCTTCATCACTCTGTGACTG	60	2	121
APT026	F: CCCTGAAAGGCTGTTTTATATATCCA R: ATGTAAATAAAGTAGCCTTGACCGGT	60	7	477
APT032	F: TCACTTTCTTGACTCTCCTTGTTTT R: TGAATTGAATTCTGTTTCAGGATAAATG	60	2	45
APT033	F: CTTACCCCTACCTCATAAGGAACCTG R: ATTCCAAATCTGCAAGGTGAGTATTA	60	Z	14

¹ Hsiao *et al.* (2008), developed from Tsaiya duck.

² Annealing temperature.

³ The location on the duck chromosome.

⁴ The orthologous microsatellites in the duck genome scaffold.

III. 季新鴨遺傳變異與其他鴨群遺傳結構之族群統計分析

為比較季新鴨、民間北京鴨及其他鴨群之遺傳變異，本研究利用 Cervus 3.0 軟體 (Kalinowski *et al.*, 2007) 針對前項所得基因型資料計算交替基因數目 (Number of alleles, N_a)、觀測 (Observed heterozygosity, H_o) 與期望異質度 (Expected heterozygosity, H_e) (Nei, 1978) 及多態性訊息含量 (Polymorphic information content, PIC) (Botstein *et al.*, 1980)，並以 POPGENE 1.32 軟體 (Yeh *et al.*, 1997) 計算有效交替基因數目 (Number of effective alleles, N_e)、進行哈溫平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium) 檢定 (Guo and Thompson, 1992) 及估算 Wright's F-statistics 之族群內近交係數 (Within-population inbreeding coefficient, F_{IS})。

族群分析部分以 STRUCTURE 2.3 軟體 (Pritchard *et al.*, 2000) 進行群數分布之模擬分析，其計算開始模擬 5,000 次後 500,000 次可能的分群數 K ($K = 2$ 至 10)，每個 K 值重複模擬 20 次，並利用 STRUCTURE HARVESTER v0.6.91 程式 (Earl and vonHoldt, 2012) 依 Evanno 法 (Evanno *et al.*, 2005) 估算最適 K 值 (分群數)，並以 CLUMPAK 1.1 (Kopelman *et al.*, 2015) 統整 STRUCTURE 的結果，產出視覺化的圖形，另使用 PHYLIP 套裝軟體 (Felsenstein, 2002) 計算族群間遺傳距離 (Nei, 1972)，以鄰近相接法 (Neighbor-joining, NJ) 繪製類緣關係樹 (Saitou and Nei, 1987)，並以靴拔重抽法 (bootstrap method) 進行 1,000 次重複取樣，以驗證季新鴨與其他鴨品種 (系) 間之類緣關係，並以 FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2001) 依 Weir and Cockerham (1984) 所述估算族群 pairwise F_{ST} ，以評估族群近親及族群間分化程度。

結果與討論

I. 季新鴨微衛星標記遺傳變異分析

利用 11 組微衛星標記分析季新鴨遺傳變異結果如表 3 所示。在季新鴨分別觀測到 34 個交替基因，除 Z 染色體上的 APT001 無多態性以外，4 組微衛星標記具中度 ($0.25 \leq PIC < 0.5$) 多態性，6 組標記具高度多態性 ($PIC \geq 0.5$)，顯示除了 APT001 以外之 10 組微衛星標記應可用於季新鴨遺傳變異分析。扣除 APT001 標記，此族群平均 N_a 為 3.3 個 (2 至 5 個) 交替基因，平均 N_e 為 2.5 個 (1.9 至 3.6 個)。 H_o 介於 0.350 至 0.661，平均為 0.509； H_e 介於 0.464 至 0.726，平均為 0.593。在 11 組標記中，僅有 APT033 偏離哈溫平衡，參考 Pham *et al.* (2013) 以 FreeNA 軟體 (Chapuis and Estoup, 2007) 檢測 11 組微衛星標記的無效交替基因 (null allele)，發現 APT033 雖共觀測 3 個交替基因 (片段大小 234、262 及 266)，其估測無效交替基因頻率接近 0.2，扣除 Z 染色體上 APT001 及 APT033 兩組標記後，平均 F_{IS} 下降至 0.108，且不同標記間 F_{IS} 差異甚大，未顯著異於 0 ($P > 0.05$)，至第 12 代之族群平均近親系數為 0.149，配合性狀表現 (行政院農業委員會畜產試驗所，2021)，此族群目前應尚無嚴重近親衰退之虞。

比較季新鴨及兩個民間品系大型北京鴨品系之各項遺傳變異結果 (表 4)，在交替基因數部分，季新鴨僅在 APT032 具 5 個交替基因，略高於民間品系的 2 及 3 個，其餘標記皆低於民間品系或與其相當。在有效交替基因數部分，季新鴨在 APT010 為 2.9 個，高於民間品系 2.2 及 2.4 個； APT017 則有 3.6 個，介於兩民間品系 3.1 及 3.8 個之間； APT032 為 2.4 個，略高於兩民間品系的 2.0 及 2.3 個。在觀測與期望異質度部分，季新鴨與兩民間品系互見高低，但大多以民間品系高於季新鴨。兩民間品系具高度多態性的標記 ($PIC \geq 0.5$) 數皆為 7 組，亦多於季新鴨之 6 組。而在 F_{IS} 部分，三品系則皆有標記間差異甚大的情形。與兩個民間品系大型北京鴨品系 (BPA 與 BPB) 比較交替基因分布情況 (表 5)，季新鴨在 APT012、APT017、APT026 及 APT032 等標記有品系特有交替基因，且相較於 BPA 與 BPB 兩族群間各標記片段大小與交替基因頻率類似，季新鴨與兩民間品系的交替基因分布情況則有明顯不同。整體來說，以兩民間品系的遺傳變異高於季新鴨，推測此由於季新鴨經長期選拔所致。

與其他北京鴨微衛星標記研究相較，Wu *et al.* (2009) 以橫跨 16 個連鎖群 (linkage group) 的 18 組微衛星標記分析 2 個中國北京鴨自然族群 (BJ) 及 2 個櫻桃谷北京鴨品系 (CV)，雖然其平均交替基因數達 8.33 及 7.72 個，平均 H_o 分別為 0.514 與 0.527，平均 H_e 分別為 0.604 及 0.627，平均 PIC 分別為 0.573 及 0.590。與季新鴨扣除 APT001 以外 10 組微衛星標記之遺傳變異相近。

再與其他於宜蘭分所飼養之鴨品種 (系) 相較 (表 6)，季新鴨交替基因種類與交替基因頻率分布與褐色菜鴨、白色菜鴨、五結白鴨及番鴨明顯不同。與五結黑色番鴨及白色番鴨畜試 1 號相較，季新鴨明顯具較高遺傳變異，推測因菜鴨微衛星標記應用至番鴨時為跨物種使用，可能使高多態性標記因標的序列旁引子黏合區域之突變累積而無法增幅，或標記之多態性及專一性因跨屬利用而有所折扣 (張等，2021)。而相較於種原白色、褐色菜鴨 (GWT 及 GBT) 及合成品系五結白鴨 (L401) 等家鴨品種 (系)，季新鴨的交替基因數略低於前述品種 (系)，稍高於宜蘭白鴨臺畜一號 (L102)，但在有效交替基因數部分，季新鴨則與大多家鴨品種 (系) 相當。與 Lai *et al.* (2020) 研究相較，其同樣使用篩選自褐色菜鴨基因體的微衛星標記，分析民間大體型品系北京鴨，其平均交替基因數為 6.5 個，有效交替基因數為 3.6 個，民間大體型品系北京鴨的遺傳變異與褐色菜鴨保種族群及大部分選育品系相當，但高於白色菜鴨保種及選育族群，類似於本研究結果。

由於 FAO 尚未建議鴨隻使用的微衛星標記，本研究使用之 11 組微衛星標記篩選自褐色菜鴨 (Hsiao *et al.*, 2008)，挑選於菜鴨各族群測試具較佳多態性者，綜觀此 11 組微衛星標記於北京鴨、改鴨、褐色菜鴨、白色菜

鴨等家鴨之遺傳變異， N_a 平均 7.3 個， N_e 為 3.6 個，平均 H_o 為 0.474，平均 H_e 為 0.690，平均 PIC 為 0.646，除 APT001 與 APT032 為中度多態性外，其餘標記皆為高度多態性。與 Lai *et al.* (2020) 篩選之新標記相較，其 N_a 平均為 11.3 個， N_e 為 5.4 個，平均 H_o 為 0.591，平均 H_e 為 0.747，平均 PIC 為 0.708。本團隊使用的 11 組微衛星標記在多態性上雖稍遜一籌，但其重複單位皆為四個核苷酸，可減小判讀錯誤可能性；又此 11 組微衛星標記分別位於鴨 1、2、3、7 號及 Z 染色體上，過去比對鴨染色體時，各標記皆位於不同染色體架構 (scaffold)，應有相當距離。另 Wu *et al.* (2009) 及 Lai *et al.* (2020) 分別認為 H_o 及 PIC 大於 0.5 或 H_o 需介於 0.3 至 0.8，標記始具充足多態性，適用於遺傳變異分析。本研究扣除無多態性之 APT001 後，其餘標記平均 H_o 為 0.509，平均 PIC 為 0.508，符合前述標準。綜上所述，本研究認為此 11 組微衛星標記從多態性及於染色體分布來看，確實可用於進行季新鴨的遺傳分析。

民國 70 年宜蘭分所以選育大型北京鴨為目標，原建立北京鴨雜交三品系：201 (逢機品系)、202 (高產蛋品系，選拔 40 週齡產蛋數) 及 203 (大型體品系，選拔 8 或 10 週齡體重) (胡等，1991)，然自民國 76 年起加強北京鴨毛色檢定，第 6 代後裔土番鴨毛色在 3 級以內 (僅頭頂有黑毛) 的比例為 10.9%，隔年合併三品系為一 L201 品系，自第 10 代起擴大北京鴨選拔族群數量，母鴨自先前 200 隻增加至約 400 隻，持續進行毛色選拔 (李等，1993)。第 14 代時，北京鴨 L201 後裔土番鴨毛色在 3 及 7 級以內者已分別達到 80.1 及 99.5% (李及康，1997)。後又經觀察發現土番鴨生產屬間雜交之淘汰蛋中 70 至 80% 為無精蛋，且 25.2% 為早期中止，由於鴨屬間雜交受精持續性已被證明為可選拔改善性狀 (胡等，1999)，故此族群自第 17 代在例行性毛色檢定工作外加入受精持續性檢定。自選拔長受精持續性以來，公鴨在 100 至 200 隻，母鴨大多在 200 至 300 隻，選拔百分率公鴨為 10.3 至 23.3，母鴨為 20.5 至 47.2 (行政院農業委員會畜產試驗所，2021)，由於族群不大，再加上長期選拔，可能因此使季新鴨的遺傳歧異度低於民間大型北京鴨品系及未選拔的種原白色、褐色菜鴨。

II. 遺傳結構分析

為探討季新鴨與其他鴨品種 (系) 間之類緣關係，本研究進行季新鴨與兩個民間大型北京鴨 (BPA 及 BPB) 基因型鑑別，並加入保種褐色菜鴨與白色菜鴨、選育白色菜鴨、五結白鴨、黑色番鴨及白色番鴨等鴨群的基因型資料共同進行遺傳結構分析。

表 3. 11 組菜鴨微衛星標記於季新鴨之遺傳變異

Table 3. Genetic variations of Chihsin duck with the 11 Tsaiya duck-derived microsatellite markers

Locus	Fragment (bp)	N_a^1	N_e^2	H_o^3	H_e^4	PIC ⁵	F_{IS}^6
APT001	178	1	1.0	0.000	0.000	0.000	NA
APT004	294 – 314	3	2.0	0.377	0.512	0.404	0.264
APT008	180 – 192	3	2.9	0.661	0.658	0.578	-0.005
APT010	204 – 220	3	2.9	0.610	0.661	0.581	0.077
APT012	193 – 209	5	2.9	0.526	0.660	0.594	0.203
APT017	173 – 193	4	3.6	0.633	0.726	0.669	0.128
APT020	169 – 197	3	2.1	0.533	0.528	0.424	-0.009
APT025	109 – 121	2	1.9	0.350	0.464	0.354	0.246
APT026	130 – 138	3	1.9	0.400	0.475	0.381	0.158
APT032	195 – 267	4	2.4	0.650	0.595	0.519	-0.092
APT033*	234 – 266	3	2.8	0.350	0.652	0.571	0.463
Average		3.1	2.4	0.463	0.539	0.461	0.143
SD		1.0	0.7	0.196	0.199	0.184	0.162

¹ Number of alleles.

² Number of effective alleles.

³ Observed heterozygosity.

⁴ Expected heterozygosity.

⁵ Polymorphic information content.

⁶ Wright's fixation index, within population inbreeding estimate.

* Represented significant ($P < 0.01$) departure from Hardy-Weinberg equilibrium.

NA: not available.

表 4. 應用 11 組菜鴨微衛星標記分析兩個民間大型北京鴨 (BPA 及 BPB) 之遺傳變異
Table 4. Genetic variations of Pekin duck introduced from the industrial farms (BPA and BPB) with the 11 Tsaiya duck-derived microsatellite markers

Locus	BPA							BPB							
	Fragment (bp)	N _a ¹	N _e ²	H _O ³	H _E ⁴	PIC ⁵	F _{IS} ⁶	Locus	Fragment (bp)	N _a ¹	N _e ²	H _O ³	H _E ⁴	PIC ⁵	F _{IS} ⁶
APT001	178 – 206	2	1.5	0.273	0.368	0.290	0.258	APT001	178 – 206	2	1.8	0.273	0.455	0.340	0.400
APT004	286 – 306	5	3.1	0.636	0.706	0.620	0.099	APT004	294 – 302	3	2.2	0.364	0.567	0.463	0.358
APT008	180 – 192	4	3.3	0.091	0.732	0.644	0.876	APT008	180 – 200	5	3.4	0.818	0.736	0.653	-0.111
APT010	204 – 212	3	2.2	0.455	0.567	0.463	0.198	APT010	204 – 224	4	2.4	0.636	0.619	0.522	-0.027
APT012	185 – 201	5	4.4	0.818	0.81	0.735	-0.010	APT012	185 – 201	5	3.8	0.818	0.771	0.697	-0.061
APT017	169 – 185	5	3.1	0.545	0.706	0.620	0.228	APT017	169 – 189	5	3.8	0.727	0.775	0.693	0.062
APT020	181 – 189	3	2.1	0.545	0.55	0.466	0.009	APT020	169 – 189	4	3.1	0.636	0.706	0.613	0.099
APT025	109 – 125	4	2.8	0.727	0.671	0.580	-0.083	APT025	109 – 125	4	2.8	0.818	0.68	0.594	-0.203
APT026	130 – 146	4	2.5	0.727	0.636	0.548	-0.143	APT026	130 – 142	3	2.1	0.545	0.541	0.422	-0.007
APT032	207 – 215	2	2.0	0.364	0.519	0.373	0.299	APT032	207 – 259	3	2.3	0.545	0.602	0.484	0.095
APT033	230 – 266	5	3.8	0.364	0.775	0.693	0.530	APT033	230 – 262	5	4.1	0.455	0.792	0.715	0.426
Average		3.8	2.8	0.504	0.640	0.548	0.205	Average		3.9	2.9	0.603	0.659	0.563	0.094
SD		1.2	0.9	0.220	0.129	0.137	0.295	SD		1.0	0.8	0.187	0.110	0.125	0.213

¹ Number of alleles.
² Number of effective alleles.
³ Observed heterozygosity.
⁴ Expected heterozygosity.
⁵ Polymorphic information content.
⁶ Wright's fixation index, within population inbreeding estimate.

表 5. 季新鴨與兩個民間大型北京鴨觀測之交替基因一覽表
Table 5. Observed alleles of Chihsin duck (CH) and Pekin duck introduced from the industrial farms (BPA and BPB)

	APT001	APT004	APT008	APT010	APT012	APT017	APT020	APT025	APT026	APT032	APT033														
CH	178 ¹	1.00 ²	294	0.58	180	0.24	204	0.25	193	0.02	173	0.29	169	0.04	109	0.36	130	0.33	195	0.32	234	0.35			
			298	0.39	188	0.39	208	0.41	197	0.18	181	0.23	189	0.57	121	0.64	134	0.03	207	0.54	262	0.43			
			314	0.03	192	0.37	220	0.34	201	0.30	189	0.36	197	0.39			138	0.65	215	0.13	266	0.23			
									205	0.47	193	0.13							267	0.02					
												209	0.04												
BPA	178	0.77	286	0.09	180	0.27	204	0.32	185	0.23	169	0.05	181	0.23	109	0.50	130	0.14	207	0.55	230	0.27			
	206	0.23	294	0.45	184	0.23	208	0.59	189	0.27	173	0.45	185	0.14	117	0.05	138	0.27	215	0.45	234	0.27			
			298	0.05	188	0.41	212	0.09	193	0.09	177	0.09	189	0.64	121	0.18	142	0.55			242	0.05			
			302	0.32	192	0.09			197	0.27	181	0.09			125	0.27	146	0.05			262	0.32			
												306	0.09	201	0.14	185	0.32							266	0.09
BPB	178	0.68	294	0.32	180	0.09	204	0.55	185	0.23	169	0.05	169	0.09	109	0.27	130	0.05	207	0.50	230	0.09			
	206	0.32	298	0.09	184	0.32	208	0.32	189	0.41	173	0.27	181	0.36	113	0.09	138	0.59	215	0.41	234	0.27			
			302	0.59	188	0.41	212	0.05	193	0.14	181	0.27	185	0.14	121	0.14	142	0.36	259	0.09	238	0.32			
					196	0.14	224	0.09	197	0.09	185	0.09	189	0.41	125	0.50					242	0.09			
												200	0.05	201	0.14	189	0.32							262	0.23

¹ Fragment size (bp) of PCR product.
² Allele frequencies.

表 6. 應用 11 組菜鴨微衛星標記分析季新鴨 (CH)、種原白色菜鴨第 15 代 (GWT)、宜蘭白鴨臺畜一號 (L102)、種原褐色菜鴨第 17 代 (GBT)、五結白鴨第 7 代 (L401)、五結黑色番鴨第 16 代 (BM)、白色番鴨畜試 1 號第 23 代 (WM) 及於兩個民間大型北京鴨 (BPA 及 BPB) 之平均遺傳變異

Table 6. The average of genetic variations of Chihsin duck (CH), germplasm-conserved white Tsaiya duck (GWT), Ilan White Tsaiya TLRI NO.1 (L102), germplasm-conserved brown Tsaiya duck (GBT), Wujie White Duck (L401), Wujie Black Muscovy (BM), White Muscovy LRI 1 (WM), Pekin duck introduced from the industrial farms (BPA and BPB) with the 11 Tsaiya duck-derived microsatellite markers

Population [*]	N _i	N _a ²	N _e ³	H _O ⁴	H _E ⁵	PIC ⁶	dHWE ⁷	F _{IS} ⁸
CH	60	3.1	2.4	0.463	0.539	0.461	1	0.143 ± 0.162
BPA	11	3.8	2.8	0.504	0.604	0.548	0	0.205 ± 0.295
BPB	11	3.9	2.9	0.603	0.659	0.563	0	0.094 ± 0.213
GWT	30	3.6	2.4	0.497	0.557	0.479	1	0.114 ± 0.215
L102	40	2.5	1.9	0.377	0.443	0.370	2	0.140 ± 0.268
GBT	30	4.5	2.7	0.500	0.588	0.531	0	0.165 ± 0.302
L401	118	4.1	2.4	0.492	0.503	0.450	6	0.090 ± 0.330
BM	30	3.0	2.1	0.340	0.420	0.370	1	0.214 ± 0.208
WM	50	2.4	1.6	0.294	0.315	0.263	0	0.062 ± 0.174

* CH, BPA, and BPB were genotyped in this study, while BPA and BPB were sampled in Lai *et al.* (2020); GWT and L102 were genotyped in Chang *et al.* (2016, in Chinese); GBT was genotyped in Chang *et al.* (2018, in Chinese); L401 was genotyped in TLRI (2015, in Chinese); BM and WM were genotyped in Chang *et al.* (2021, in Chinese).

¹ Sample size.

² Number of alleles.

³ Number of effective alleles.

⁴ Observed heterozygosity.

⁵ Expected heterozygosity.

⁶ Polymorphic information content.

⁷ Number of markers departed from Hardy-Weinberg equilibrium.

⁸ Wright's fixation indice, within population inbreeding estimate and standard deviations.

根據各族群基因頻率計算族群間之遺傳距離 (Nei's distance, Nei, 1972) 並繪製類緣關係樹 (圖 1)，將 BM 及 WM 番鴨設為外群 (outgroup)，結果顯示除兩種番鴨拔靴值 (bootstrap value) 為 99，白色菜鴨 (WT 及 L102) 拔靴值為 92，分別成為獨立分支外，其它分支之拔靴值皆未超過 70，表示未形成明確分支。但自圖上可看到季新鴨與民間大型北京鴨最為接近，再來是 L401，接著是兩個白色菜鴨品系，褐色菜鴨則與前述鴨族群有較遠之遺傳距離。查這些鴨品種 (系) 發展歷程，季新鴨最早源自北京鴨 (行政院農業委員會畜產試驗所，2021)，L401 則是應用季新鴨前身 L201 品系與褐色菜鴨畜試二號正反交，並選拔受精蛋數選育而成 (行政院農業委員會畜產試驗所，2015) 之品系；白色菜鴨則是民國 50 年代自全臺各地收集白色羽毛且具類似菜鴨體型的鴨隻閉鎖選育而成，亦有民國 42 年時由農復會引進北京鴨與菜鴨交配而得之說法，有可能具部分北京鴨血統 (張等，2016)。以上顯示本研究分析結果確實反應相關鴨品種 (系) 發展及類緣關係。

圖 2 顯示 STRUCTURE 軟體分析以 CLUMPAK 1.1 統整視覺化之結果，經 Evanno 法估算 (Evanno *et al.*, 2005) 最適 K 值為 2。K = 2 時，僅區分家鴨與兩種番鴨；K = 3 時，則分出菜鴨 (GBT、GWT 及 L102)，但有一半的模擬結果未相同；K = 4 時，分出北京鴨 (CH、BPA 及 BPB)，雖然 BPA 及 BPB 未成一獨立群集；K = 5 時，季新鴨與民間北京鴨分至不同群集，GBT 自菜鴨中分離出來，有趣的是，民間北京鴨與 GBT 分至同一群集，BPA 及 BPB 仍未成獨立群集；而 K = 6 時，民間北京鴨自成一群集，另 GWT 也有一部分分至同一群集，另自 K = 6 以降即無模擬 20 次皆有一致結果之 K 值，而兩種白色菜鴨與番鴨始終無法分至獨立群集，此類似 Lai *et al.* (2020) 的結果，應與分析族群同時包含番鴨、北京鴨與菜鴨，族群間差異過大有關，如單就番鴨 (張等，2021) 及白色菜鴨 (張等，2016) 進行分析時，各品系仍可分為不同群集。

而各族群之族群分化分析結果如表 7 所示，根據 Wright (1965) 所述，當族群分化指數小於 0.05 表幾乎無分化；介於 0.05 至 0.25 表低至中度分化；而大於 0.25 時表高度分化。本研究之各族群兩兩相較之下，所有組合間皆有顯著分化。不同品系間的 F_{ST} 最低為 0.0248 (兩民間北京鴨 BPA 與 BPB)，最高為 0.2314 (GWT 與 L102)；

而品種間的 F_{ST} 最低為 0.2026 至 0.2253 (L401 與兩民間北京鴨)，最高為 0.3794 (CH 與 L102)。Lai *et al.* (2020) 研究中，各鴨種兩兩組合亦皆為顯著分化，褐色菜鴨品系間 F_{ST} 分布為 0.092 至 0.167，白色菜鴨兩品系的 F_{ST} 為 0.240，與本研究 0.2314 相當接近；Lai *et al.* (2020) 於品種間分析部分，民間北京鴨與褐色菜鴨品系間的 F_{ST} 分布為 0.190 至 0.247，與白色菜鴨品系的 F_{ST} 分布為 0.257 至 0.286。而本研究民間北京鴨與 GBT 之 F_{ST} 為 0.2243 及 0.2455，與白色菜鴨則自 0.2391 至 0.3302，亦與 Lai *et al.* (2020) 的研究有相近趨勢。而本研究主要探討的季新鴨與保種褐色菜鴨的 F_{ST} 為 0.3187，與兩白色菜鴨品系間的 F_{ST} 則分別為 0.3146 及 0.3794，相對民間北京鴨與褐色菜鴨、白色菜鴨的 F_{ST} 高出一些，此或許與季新鴨長期以小族群進行選拔有關。另外保種褐色菜鴨、保種白色菜鴨與各鴨種的 F_{ST} 接近，或可部分說明類緣關係樹大多未形成明確分支，以及 STRUCTURE 結果發生褐色菜鴨與北京鴨分至同一群集的情況。綜整以上本研究及其他研究結果，鴨品系間的 F_{ST} 自 0.092 至 0.240，

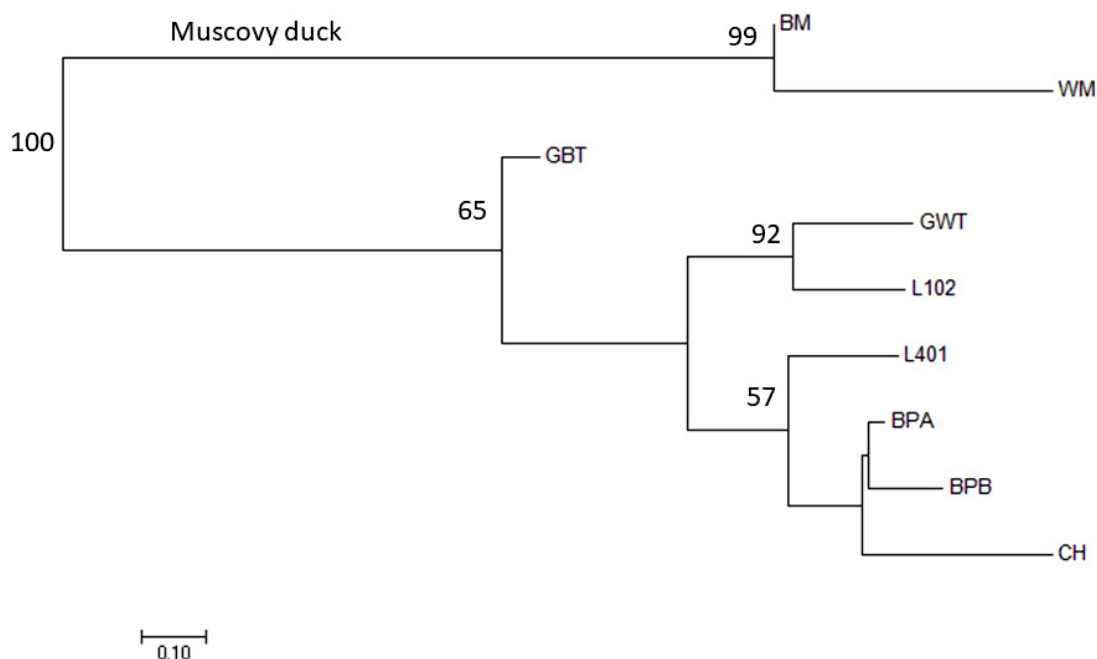


圖 1. 季新鴨 (CH)、種原白色菜鴨第 15 代 (GWT)、宜蘭白鴨臺畜一號 (L102)、種原褐色菜鴨第 17 代 (GBT)、五結白鴨第 7 代 (L401)、五結黑色番鴨第 16 代 (BM)、白色番鴨畜試 1 號第 23 代 (WM) 及於兩個民間大型北京鴨 (BPA 及 BPB) 之類緣關係樹圖。分支上數值為該分支上之拔靴值 (Bootstrap value)。

Fig. 1. The phylogenetic tree of Chihsin duck (CH), germplasm-conserved white Tsaiya duck (GWT), Ilan White Tsaiya TLRI NO.1 (L102), germplasm-conserved brown Tsaiya duck (GBT), Wujie White Duck (L401), Wujie Black Muscovy (BM), White Muscovy LRI 1 (WM), Pekin duck introduced from the industrial farms (BPA and BPB). The numbers on the branches are bootstrap values.

表 7. 利用 11 組微衛星標記分析季新鴨 (CH)、種原白色菜鴨第 15 代 (GWT)、宜蘭白鴨臺畜一號 (L102)、種原褐色菜鴨第 17 代 (GBT)、五結白鴨第 7 代 (L401) 及兩個民間大型北京鴨 (BPA 及 BPB) 之遺傳分化指數 (對角線右上)，各族群間皆為顯著分化 ($P < 0.05$)

Table 7. F_{ST} value based on 11 Brown Tsaiya microsatellite markers for Chihsin duck (CH), germplasm-conserved white Tsaiya duck (GWT), Ilan White Tsaiya TLRI NO.1 (L102), germplasm-conserved brown Tsaiya duck (GBT), Wujie White Duck (L401), Pekin duck introduced from the industrial farms (BPA and BPB), all the F_{ST} values are significant differentiation ($P < 0.05$)

Population	GWT	L102	GBT	L401	BPA	BPB
CH	0.3146	0.3794	0.3187	0.2484	0.1582	0.1873
GWT		0.2314	0.2596	0.3278	0.2500	0.2391
L102			0.3082	0.3067	0.3262	0.3302
GBT				0.2870	0.2243	0.2455
L401					0.2026	0.2253
BPA						0.0248

品種間則自 0.190 至 0.330，而本研究中季新鴨跟兩民間北京鴨品系的 F_{ST} 分別為 0.1582 及 0.1873，雖接近上述品種間最低之 F_{ST} ，但綜合類緣關係樹及 STRUCTURE 分析結果，季新鴨與兩民間北京鴨品系的遺傳分化程度應仍為品系層級。

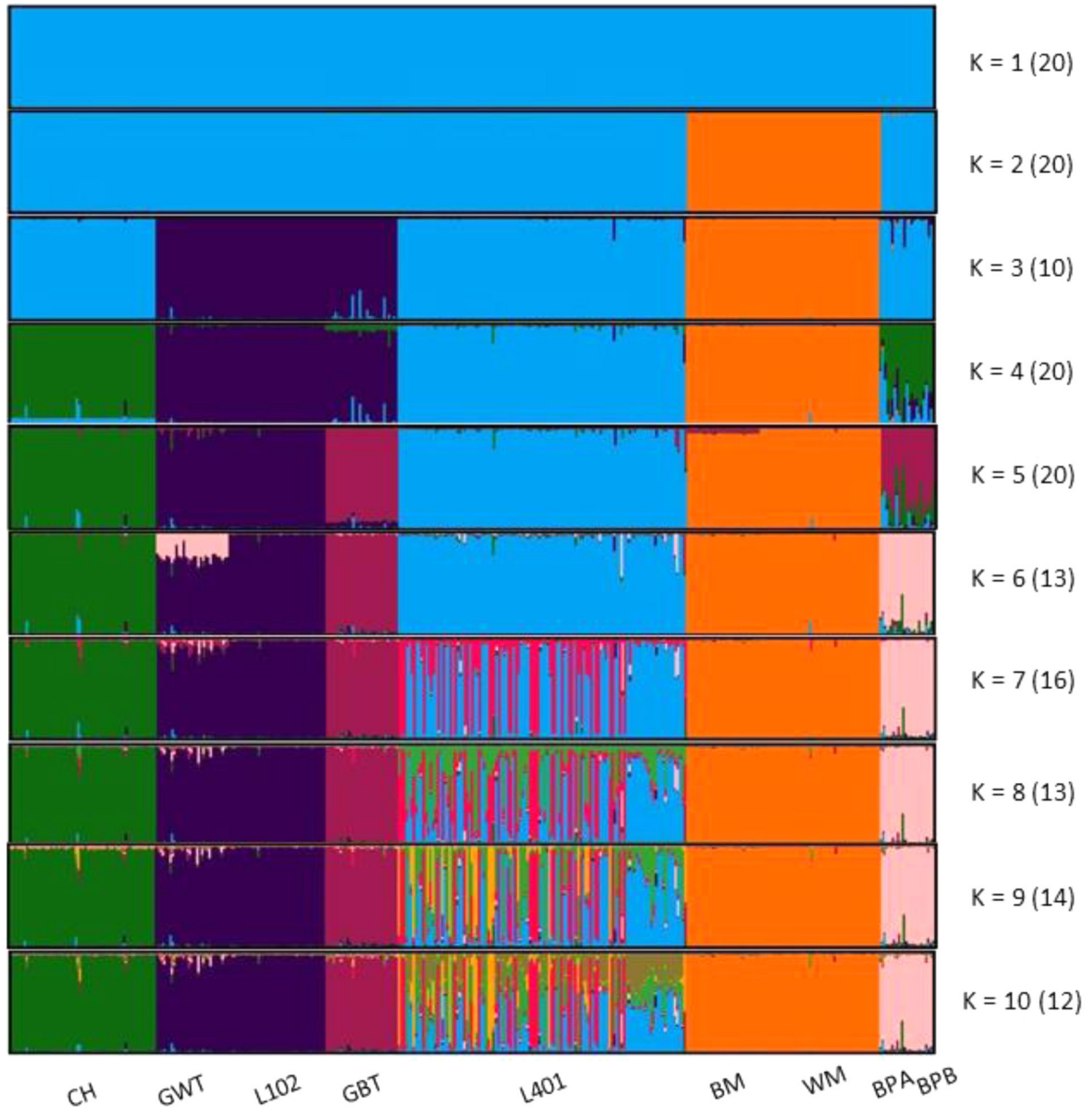


圖 2. 季新鴨 (CH)、種原白色菜鴨第 15 代 (GWT)、宜蘭白鴨臺畜一號 (L102)、種原褐色菜鴨第 17 代 (GBT)、五結白鴨第 7 代 (L401)、五結黑色番鴨第 16 代 (BM)、白色番鴨畜試 1 號第 23 代 (WM) 及兩個民間大型北京鴨 (BPA 及 BPB) 以 STRUCTURE 軟體進行分群分析之結果，品系後的數字為世代數此圖可能分群數 (K) 設為 2 至 10，後方括號內的數字表示在 95% 閾值下模擬 100 次中相同結果之次數；不同顏色代表該不同群集，縱軸每圖條代表一個體。

Fig. 2. STRUCTURE clustering of Chihsin duck (CH), germplasm-conserved white Tsaiya duck (GWT), Ilan White Tsaiya TLRI NO.1 (L102), germplasm-conserved brown Tsaiya duck (GBT), Wujie White Duck (L401), Wujie Black Muscovy (BM), White Muscovy LRI 1 (WM), Pekin duck introduced from the industrial farms (BPA and BPB). K: possible number of subpopulation; Q: proportional membership of ducks to genetic clusters. Colors correspond to different genetic clusters. Each vertical bar represents a single individual.

總結前述結果，本研究分析季新鴨之遺傳變異資訊，後續將以本研究結果作為遺傳變異基準，於此品系選育的同時，定期進行遺傳監測。而本研究另分析季新鴨遺傳結構與民間大型北京鴨及其他鴨種間的類緣關係，由於季新鴨目標作為土番鴨生產母禽（行政院農業委員會畜產試驗所，2021），除直接用於土番鴨生產，亦可與

種鴨業者自有種母鴨品系雜交，改進其受精持續性，或可協助業者針對自有品系進行遺傳分析，以供配種、選育參考。未來將透過上述兩方向促進季新鴨種原永續保存與增加應用。

結 論

季新鴨因長期選育，其整體遺傳變異略低於大多家鴨品系，但有效交替基因數仍與其他品系相當，加上不同微衛星標記間近交指數差異甚大，目前應尚無嚴重近親衰退之虞。而季新鴨跟兩民間北京鴨品系的遺傳分化程度應未達品種層級。後續將以本研究分析之遺傳變異結果作為基準，供季新鴨定期進行遺傳監測，另遺傳結構分析的結果亦可提供於此品系推廣至產業時配種、選育參考。

誌 謝

本研究承行政院農業委員會經費支持 (106 農科 -19.1.1- 畜 -L1)，並承科技部生技類核心設施平臺維運計畫下之國家基因體醫學研究中心協助微衛星標記基因型分析。試驗期間承蒙林秀齡、林美葉、柯惠君、張喬茵、陳淑惠、馮國銘及黃順和等宜蘭分所同仁協助試驗之進行，特此誌謝。

參考文獻

- 行政院農業委員會畜產試驗所。2015。「五結白鴨」品系登記審定書。
- 行政院農業委員會畜產試驗所。2021。「季新鴨」品系登記審定書。
- 李舜榮、胡怡浩、陳銘正。1993。優良白色土番鴨親代選育。畜產研究 26：121-129。
- 李舜榮、康清亮。1997。土番鴨白色羽毛出現率之改進。畜產研究 30：293-299。
- 胡怡浩、林淑蕙、陳得財。1999。優良白色土番鴨親代選育。畜產試驗所八十八年試驗報告。
- 胡怡浩、姜延年、陳銘正、潘金木。1991。北京鴨雜交品系與商業品系肉鴨生長及屠體性能之比較。畜產研究 24：141-148。
- 張怡穎、張惠斌、魏良原、陳怡蓁、丁詩同、王佩華、林恩仲、黃振芳、陳志峰、劉秀洲。2018。微衛星標記應用於不同褐色菜鴨品系族群遺傳結構之探討。中畜會誌 47：221-238。
- 張怡穎、劉秀洲、陳怡蓁、丁詩同、王佩華、林恩仲、蕭孟矜、黃振芳。2016。微衛星標記應用於白色菜鴨保種族群與宜蘭白鴨臺畜一號遺傳結構之探討。畜產研究 49：138-147。
- 張怡穎、魏良原、陳怡蓁、劉秀洲。2021。菜鴨微衛星標記應用於不同番鴨族群遺傳多態性之探討。畜產研究 54：126-139。
- 陳志毅、魏良原、張惠斌、張怡穎、劉秀洲。2019。經 11 代受精持續性選拔後之北京鴨受精蛋數遺傳表現探討。畜產研究 52：58-65。
- Botstein, D., R. L. White, M. Skolnick, and R. W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-331.
- Bush, K. L., M. D. Vinsky, C. L. Aldridge, and C. A. Paszkowski. 2005. A comparison of sample types varying in invasiveness for use in DNA sex determination in an endangered population of greater Sage-Grouse (*Centrocercus urophasianus*). *Conserv. Genet.* 6: 867-870.
- Chapuis, M. P. and A. Estoup. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Mol. Biol. Evol.* 24: 621-631.
- Cheng, Y. S., R. Rouvier, H. L. Liu, S. C. Huang, Y. C. Huang, C. W. Liao, J. J. Liu Tai, C. Tai, and J. P. Poivey. 2009. Eleven generations of selection for the duration of fertility in the intergeneric crossbreeding of ducks. *Genet. Sel. Evol.* 41: 32.
- Earl, D. A. and B. M. vonHoldt. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour.* 4: 359-361.
- Evanno, G., S. Regnaut, and J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14: 2611-2620.

- FAO. 2012. Phenotypic characterization of animal genetic resources. FAO Animal Production and Health Guidelines No. 11. Rome.
- Felsenstein, J. 2002. PHYLIP 3.6 (Phylogeny Inference Package). Department of Genetics, University of Washington, Seattle, WA. Software. Accessed Aug. 31, 2018. <http://evolution.gs.washington.edu/phylip.html>.
- Gemayel, R., M. D. Vincens, M. Legendre, and K. J. Verstrepen. 2010. Variable tandem repeats accelerate evolution of coding and regulatory sequences. *Annu. Rev. Genet.* 44: 445-477.
- Goudet, J. 2001. FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. Version 2.9.3. Available from: <https://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.
- Guo, S. W. and E. A. Thompson. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48: 361-372.
- Hsiao, M. C., H. C. Liu, Y. C. Hsu, Y. H. Hu, S. H. Li, and S. R. Lee. 2008. Isolation and characterization of microsatellite markers in Tsaiya duck. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 21: 624-627.
- Kalinowski, S. T., M. L. Taper, and T. C. Marshall. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol. Ecol.* 16: 1099-1106.
- Kopelman, N. M., J. Mayzel, M. Jakobsson, N. A. Rosenberg, and I. Mayrose. 2015. Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Mol. Ecol. Resour.* 15: 1179-1191.
- Lai, F. Y., Y. Y. Chang, Y. C. Chen, E. C. Lin, H. C. Liu, J. F. Huang, S. T. Ding, and P. H. Wang. 2020. Monitoring of genetically close Tsaiya duck populations using novel microsatellite markers with high polymorphism. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 33: 888-901.
- Liu, Z. J. and J. F. Cordes. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238: 1-37.
- Magpantay, V. A., A. L. Lambio, R. P. Laude, C. E. Reano, and M. G. Q. Diaz. 2019. Genetic diversity of Philippine mallard Duck (*Anas platyrhynchos domesticus* L.) based on SSR markers. *Philipp. J. Sci.* 148: 725-733.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *Amer. Nat.* 106: 283-292.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Palinkas-Bodzsar, N., N. Sztan, T. Molnar, and A. Hidas. 2020. Gene conservation of six Hungarian local chicken breeds maintained in small populations over time. *PLoS One* 15: e0238849.
- Pham, L. D., D. N. Do, L. Q. Nam, N. Van Ba, P. H. Ninh, D. P. Thuy, P. V. Son, and P. C. Thieu. 2021. Evaluation of genetic diversity and population structure in four indigenous duck breeds in Vietnam. *Anim. Biotechnol.* 15: 1-8.
- Pham, M. H., C. Berthouly-Salazar, X. H. Tran, W. H. Chang, R. P. M. A. Crooijmans, D. Y. Lin, V. T. Hoang, Y. P. Lee, M. Tixier-Boichard, and C. F. Chen. 2013. Genetic diversity of Vietnamese domestic chicken populations as decision-making support for conservation strategies. *Anim. Genet.* 44: 509-521.
- Pritchard, J. K., M. Stephens, and P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The Neighbor-joining method: a method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Tamaki, K. 2007. Molecular forensics. In: *Minisatellite and Microsatellite DNA Typing Analysis*. pp. 71-86. John Wiley & Sons, Ltd. England.
- Tu, Y., J. Shu, G. Ji, M. Zhang, and J. Zou. 2018. Monitoring conservation effects on a Chinese indigenous chicken breed using major histocompatibility complex B-G gene and DNA Barcodes. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 31: 1558-1564.
- Veeramani, P., R. Prabakaran, S. N. Sivaselvam, T. Sivakumar, S. T. Selvan, and S. M. K. Karthickeyan. 2021. Genetic Diversity of Six Duck Populations in India. *Indian J. Anim. Res.* B4379.
- Weir, B. S. and C. C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Wright, S. 1965. The interpretation of population structure by F-Statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19: 395-420.
- Wu, F., Y. Huang, Y. Ma, S. Hu, J. Hao, and N. Li. 2009. Evaluation of genetic diversity and relationships within and between two breeds of duck based on microsatellite markers. *Prog. Nat. Sci.* 19: 1581-1586.

- Yeh, F. C., R. C. Yang, T. B. J. Boyle, Z. H. Ye, and J. X. Mao. 1997. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.
- Zhang, X., Y. He, W. Zhang, Y. Wang, X. Liu, A. Cui, Y. Gong, J. Lu, X. Liu, X. Huo, J. Lv, M. Guo, X. Du, L. Han, H. Chen, J. Chen, C. Li, and Z. Chen. 2021. Development of microsatellite marker system to determine the genetic diversity of experimental chicken, duck, goose, and pigeon populations. *Biomed. Res. Int.* 2021: 8851888.
- Zhang, Y., L. Wang, Y. Bian, Z. Wang, Q. Xu, G. Chang, and G. Chen. 2019. Marginal diversity analysis of conservation of Chinese domestic duck breeds. *Sci. Rep.* 9: 13141.

Study on genetic structure and phylogeny in Chihsin duck using microsatellite markers ⁽¹⁾

Yi-Ying Chang ^{(2) (4)} Liang-Yuan Wei ⁽²⁾ Jih-Yi Chen ⁽³⁾ and Hsiu-Chou Liu ⁽²⁾

Received: Aug. 9, 2022; Accepted: Dec. 29, 2022

Abstract

Pekin duck was first introduced into the Livestock Research Institute in Taiwan in the 1950s and 1960s and continuously selected for feather color, weight, and duration of fertility. The novel line was named Chihsin Duck (CH) in 2021. However, because CH are a closed population with a small population size, their allele frequencies and genetic diversity were easily affected by selection and breeding strategies, and should be monitored regularly. Therefore, the purposes of this study were to establish the genetic variation information of CH and to investigate the phylogeny with other duck species. In this study, a total of 11 microsatellite markers selected from the brown Tsaiya duck were used for analysis. The results showed the genetic variations in CH were slightly lower than that of the industrial Pekin duck lines (BPs). The average number of alleles in CH was slightly lower than that of germplasm-persevered Tsaiya ducks and the synthetic line between Pekin duck and brown Tsaiya duck, but higher than the selected white Tsaiya duck. The number of effective alleles was roughly in the same level as that of the aforementioned lines. It may be due to the small population of CH and the long-term selection, resulting in the aforementioned results. However, the values of within-population inbreeding coefficient in different markers were very different, so there should be no serious inbreeding depression in CH at present. The results of the phylogenetic tree showed that CH had the shortest genetic distance with BPs, but it did not form any robust branch between CH with any other breeds (lines), including the BPs. In this study, the pairwise F_{ST} of CH and BPs were 0.1582 and 0.1873, respectively, which were close to the pairwise F_{ST} at the lowest breed level. However, the genetic differentiation relationship between CH and BPs should still be close to the line level based on the results of the phylogenetic tree and STRUCTURE. In the future, the genetic variation results analyzed in this study would be used as a reference to regular genetic monitoring. In addition, the results of genetic structure analysis could also be applied to mating and breeding programs when this line was promoted to industry.

Key words: Genetic polymorphism, Genetic structure, Microsatellite markers, Pekin duck.

(1) Contribution No. 2728 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Ilan Branch, COA-LRI, Ilan 26846, Taiwan, R. O. C.

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

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

Effects of cutting growth stages and stay heights on the silage quality of *Pennisetum purpureum* NP cv. TS3 ⁽¹⁾

Jeng-Bin Lin ⁽²⁾ Nicole Timm ⁽³⁾ Tsair-Bor Yen ⁽³⁾ and Hsi-Hsun Wu ⁽⁴⁾⁽⁵⁾

Received: May 23, 2022; Accepted: Jan. 05, 2023

Abstract

Napier grass (*Pennisetum purpureum*) cultivated in the tropical and subtropical regions are renowned for its vigorous growth, high nutritive contents and palatability. The aim of the study was to determine the effects of cutting growth stages and stay heights on silage quality of Napier grass cv. TS3 (NP cv.TS3), that was a dwarf plant type of Napier grass and named in 2009. The 3 × 2 factorial design by completely randomized design (CRD) with 3 replications of each treatment was conducted at the Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan, Taiwan, R.O.C. Treatments applied were cutting growth stages at the 30, 60 or 90 days and stay heights with 10 and 20 cm. The results showed that crude protein (CP) contents of silage decreased as the cutting growth stages were extended from 30 to 90 days. The contents of neutral detergent fiber (NDF), hemicellulose (HC) and water soluble carbohydrate (WSC) decreased, too. However, the contents of minerals and acid detergent fiber (ADF) increased during ensiling. No significant difference ($P > 0.05$) was found on the pH values of silages among cutting growth stages. The lactic acid content of silage cut at 60 days interval was higher than that of cut at 30 days ($P < 0.05$). There was no significant difference among cutting growth days on the Flieg's scores. The cutting at 60 days and the stay height with 10 cm might be the most optimum for producing high forage yield with high quality for NP cv. TS3.

Key words: Cutting stage, *Pennisetum purpureum*, Silage quality, Stay height.

Introduction

Elephant grass bears the name Napier grass (*Pennisetum purpureum*) to pay tribute to Colonel Napier of Rhodesia currently known in Zimbabwe who carried out remarkable work to notify the Rhodesian agricultural department on the nutritive value of the grass (Singh *et al.*, 2013).

Napier grass grows around the tropical and subtropical regions in the world. It is often used as forage by cut and carry system and grazing (Wijitphan *et al.*, 2009). The plant species and the harvested growth stage were two principal management factors that could have significant impact on the herbage chemical contents, which could affect the silage fermentation characteristics, dry matter recovery and aerobic stability (McEniry *et al.*, 2013). High quality silage was dependent on the quality of the source material used for ensiling which guarantee optimal nutrient concentration (Khalili *et al.*, 2005; Fan *et al.*, 2018; Fan *et al.*, 2019). Silage quality would be affected by harvest stage, while prolonging the primary growth harvest would cause negative consequences on dry matter intake (Kuoppala *et al.*, 2008). Herbage harvested at an early stage tended to be more difficult to ensile for the greater demand of lower pH values by fermentation acids. Extended harvest date inevitably causes a marked increase on dry matter content of the silage. However, it could cause a decrease in the crude protein and $\text{NH}_3\text{-N}$ contents (Woodard *et al.*, 1991; Perculija *et al.*, 2011; Bijeliæ *et al.*, 2015). Cheng and Chen (1997)

(1) Contribution No. 2729 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

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

(3) Department of Tropical Agriculture and International Cooperation, National Pingtung University of Science and Technology, Pingtung 912301, Taiwan, R. O. C.

(4) Department of Animal Science, National Pingtung University of Science and Technology, Pingtung 912301, Taiwan, R. O. C.

(5) Corresponding author, E-mail: hhwu@mail.npust.edu.tw.

stated that harvest dates of 60 to 70 days produced adequate dry matter to make better quality silage without any additives. Santos *et al.* (2013) also recommended harvesting the elephant grass at a cutting interval of 50 to 60 days to guarantee adequate moisture content.

Grass with inadequate content of water soluble carbohydrate (WSC) required for fermentation would affect the contents of acetate and butyrate production when on ensiling (Yokota *et al.*, 1992). It was required that WSC content of the source material before ensiling should be at least 30 to 50 g/kg DM for successful ensiling (Weinberg, 2008). High WSC content helped enhance ensiling characteristics (Amer *et al.*, 2012). The optimal harvest period for *Pennisetum* spp. as recommended by several authors might be 6 to 7 weeks for more higher DM and WSC contents (Manyawu *et al.*, 2003). WSC was noted to be higher when the grass was harvested at 6 weeks growth stage (Hoglund *et al.*, 2005). Another principal determinant factor for ensiling quality was low pH value in silage (Yang *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2012; Xie *et al.*, 2012). The level of pH value in silage below 4.2 was considered to be ideal for effective silage preservation (Sebolai *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2013).

The objective of the trial was to determine the effects of cutting growth stages and stay heights left after cutting on silage quality of new Napier grass cultivar cv. TS3, which was selected for high ratio of leaf and stem (Fig. 1). The pH value and Flieg's score (Sebolai *et al.*, 2012) were used to evaluate silage quality.



Fig. 1. The *Pennisetum purpureum* NP cv. TS3 grown at Livestock Research Institute in Tainan city, Taiwan.

Materials and Methods

Field experiment was carried out at the forage crop experimental farm of Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan, Tainan, Taiwan, R.O.C. from 2016 to 2018. The experimental field was carried out weed control at first, followed by adding a layer of fresh loamy soil along with organic fertilizer which was uniformly spread over the surface of the soil.

I. Experimental design

The experiment was a 3×2 factorial design arranged by complete randomized design (CRD) with 3 replications, given a total of 18 plots. Each plot was an area of $100 \times 120 \text{ cm}^2$. The NP cv. TS3, characterized for having prolific tillering capability and quick regrowth, with a potential height reaching to 100 cm, was used for the experiment. The treatments were cutting growth stages at 30, 60 and 90 days and staying at heights with 10 and 20 cm for four cuts in one year (Fig. 2).

II. Preparation of ensiling material

The grass harvested were chopped to a length of approximately 2 cm, 2 kg chopped materials were loaded into polyethylene bags for vacuum sealing, subsequently. The vacuum sealed bags were then laid upright at room temperature for fermentation for 60 days.

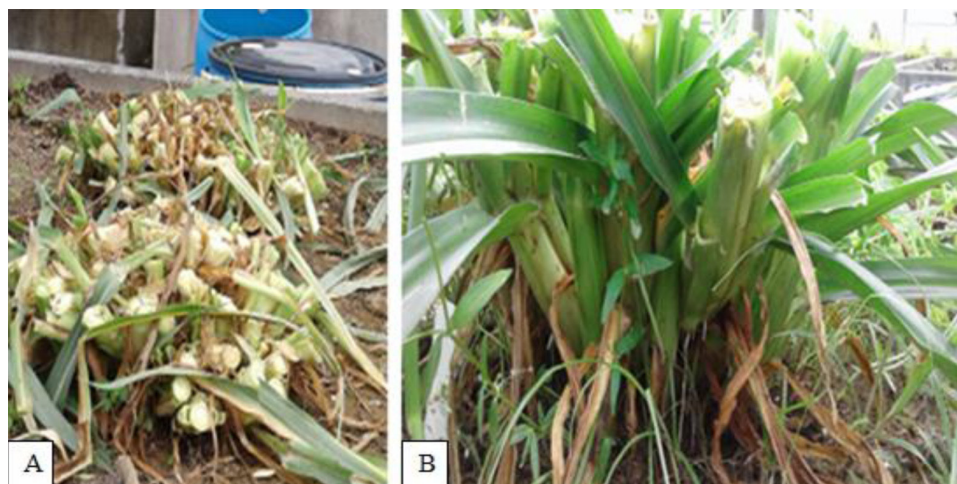


Fig. 2. The NP cv. TS3 harvested stay heights with (A) 10 cm and (B) 20 cm.

III. Silage chemical analysis

After ensiling for 60 days, the bags were opened and weighed. The nutritive compositions of the dry matter of the silage were analyzed, such as crude protein (CP) analytic method by AOAC (1984) and neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), WSC and ash contents by the analytic methods developed by Goering and Van Soest (1970).

IV. pH, lactic acid and Flieg's score

The pH of silage-water was measured by pH meter. The Flieg's scores were evaluated by the contents of volatile fatty acids, including lactic acid, acetic acid, propionic acid and butyric acids, and were determined by the high performance liquid chromatography (HPLC) method by Jones and Kay (1976). Flieg's scores were calculated according to the method designed by McCullough (1979).

V. Statistical analysis

Statistical analysis was conducted using the statistical product and service solution (SPSS 23). The results were expressed as mean \pm SE. The data were tested by t-test. The analysis of variance (ANOVA) was through the medium of the Duncan Multiple Comparison Test. Results with $P < 0.05$ were considered statistically significant. All tests were carried out for the most part at least in triplicate.

Results and Discussion

I. Evaluation of crude protein contents after ensiled 60 days

Borreani *et al.* (2008) indicated that the microbiological and nutritional quality in silage were due to factors relating to harvest stage, ensiling technology and the management practices. Results from a comprehensive evaluation of the effect of the cutting growth stages at 30, 60 and 90 days on the CP contents of the silage quality of the NP cv. TS3, it showed a decreasing trend as the harvest dates increased (Table 1). The change in the CP content during ensiling was more pronounced at the cutting interval of 90 days. The CP content of the after ensiling material at cutting intervals of 90 days was near the content stated by Maria *et al.* (2010) for the proper functioning of the rumen, where the minimal content of crude protein required for the good operation of the rumen was 7%. The negative effects of having less than the required amount could affect the ruminal fermentation and consequently the nutrient intake and digestibility. The contents of CP were less changed after ensiling when cut at the 60 days cutting interval growth stage in comparison to those of the 30 and 90 days. The loss was less when cut at stay height 20 cm for the 60 and 90 days cutting growth stages, while that for the 30 days was greater. Fijałkowska *et al.* (2015) explained that the content of crude protein was not so much affected during ensiling in contrast to carbohydrate; in which it was transformed into more highly degradable soluble non-protein compounds. Thus, it could result in lowering the efficiency of the microbial protein synthesis at the level of the rumen. The dry matter content and the pH value of the ensiled materials were noted to be the most important factors to affect proteolysis. Spitaleri *et al.* (1995) observed that the content of crude protein and neutral detergent fiber

Table 1. Chemical contents of grass and silage of NP cv. TS3 harvested at growth stages 30, 60 and 90 days and stay heights with 10 and 20 cm

Material	GS [#]	SH	CP	NDF	ADF	WSC	HC	P	K	Ca	Mg
		day	cm	----- % -----							
Grass	30	10	16.08 ^{a*} ± 0.94	51.11 ^f ± 0.74	28.76 ^c ± 0.51	2.40 ^c ± 0.46	22.35 ^{cd} ± 0.82	1.23 ^{cd} ± 0.05	5.80 ^{cd} ± 0.45	0.13 ^{ef} ± 0.00	0.28 ^{cd} ± 0.03
	20		14.09 ^b ± 0.87	50.86 ^f ± 0.58	28.68 ^c ± 0.37	4.14 ^b ± 0.56	22.18 ^{cd} ± 0.82	1.18 ^d ± 0.03	5.28 ^d ± 0.26	0.13 ^{ef} ± 0.01	0.28 ^{cde} ± 0.02
Silage	30	10	12.98 ^b ± 0.63	47.57 ^g ± 0.77	33.07 ^{bcd} ± 1.54	0.74 ^c ± 0.06	14.51 ^f ± 1.80	1.34 ^{abc} ± 0.04	10.88 ^a ± 0.09	0.26 ^a ± 0.01	0.35 ^{ab} ± 0.02
	20		12.91 ^b ± 0.43	48.01 ^g ± 0.16	33.40 ^{bcd} ± 0.32	0.71 ^c ± 0.07	14.61 ^f ± 0.31	1.31 ^{abc} ± 0.02	10.55 ^a ± 0.59	0.23 ^{ab} ± 0.02	0.37 ^a ± 0.00
Grass	60	10	10.35 ^{cd} ± 0.38	55.03 ^{de} ± 0.23	31.25 ^{de} ± 0.34	5.86 ^a ± 0.75	23.78 ^{bc} ± 0.19	1.19 ^d ± 0.02	4.13 ^{de} ± 0.29	0.11 ^{ef} ± 0.01	0.23 ^e ± 0.01
	20		10.10 ^{cd} ± 0.16	57.35 ^{cd} ± 0.38	31.07 ^{de} ± 0.91	5.26 ^{ab} ± 1.20	26.28 ^{ab} ± 0.62	1.28 ^{abcd} ± 0.01	3.95 ^{de} ± 0.45	0.15 ^{de} ± 0.03	0.28 ^{cde} ± 0.01
Silage	60	10	10.56 ^c ± 0.52	52.44 ^f ± 0.56	34.89 ^{bc} ± 0.88	0.78 ^c ± 0.08	17.56 ^c ± 0.82	1.35 ^{ab} ± 0.01	8.44 ^b ± 0.32	0.20 ^{bc} ± 0.02	0.33 ^{abcd} ± 0.02
	20		10.44 ^{cd} ± 0.60	53.20 ^{ef} ± 0.53	35.82 ^{ab} ± 0.22	0.72 ^c ± 0.06	17.39 ^c ± 0.67	1.37 ^a ± 0.04	7.48 ^{bc} ± 1.33	0.20 ^{bc} ± 0.02	0.34 ^{abc} ± 0.03
Grass	90	10	8.03 ^e ± 0.57	58.48 ^{bc} ± 0.71	31.60 ^d ± 1.24	5.58 ^{ab} ± 0.57	26.88 ^a ± 0.56	1.20 ^d ± 0.05	3.86 ^{de} ± 0.07	0.10 ^f ± 0.00	0.24 ^e ± 0.02
	20		8.61 ^{de} ± 0.43	60.59 ^{ab} ± 0.68	32.28 ^{cd} ± 0.62	4.46 ^{ab} ± 0.54	28.31 ^a ± 1.31	1.26 ^{bcd} ± 0.02	2.92 ^e ± 0.36	0.13 ^{ef} ± 0.01	0.30 ^{bode} ± 0.03
Silage	90	10	7.87 ^e ± 0.54	57.41 ^{cd} ± 1.05	37.84 ^a ± 0.87	0.72 ^c ± 0.02	19.57 ^{de} ± 1.20	1.29 ^{abcd} ± 0.03	7.80 ^b ± 0.39	0.19 ^{cd} ± 0.01	0.31 ^{abcd} ± 0.02
	20		7.91 ^e ± 0.51	61.10 ^a ± 0.86	38.27 ^a ± 1.52	0.78 ^c ± 0.03	22.83 ^c ± 0.44	1.25 ^{bcd} ± 0.03	5.82 ^{cd} ± 1.33	0.18 ^{cd} ± 0.01	0.37 ^a ± 0.01

[#] GS: Growth Stage; SH: Stay Height; CP: Crude Protein; NDF: Neutral Detergent Fiber; ADF: Acid Detergent Fiber; WSC: Water Soluble Carbohydrates; HC: Hemicellulose; CF: Crude Fiber; P: Phosphorus; K: Potassium; Ca: Calcium; Mg: Magnesium.

* Mean ± standard error.

^{a, b, c, d, e, f} Means in the same column with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

were affected to a greater degree by plant maturity than by moisture content on ensiling. This coincided partially with the results from the NP cv. TS3 in the sense that, the more immature grass with higher moisture level had a higher percentage of CP loss compared to the more prolonged growth stages at 60 and 90 days cutting intervals.

II. Evaluation of the contents of fiber and WSC after ensiled 60 days

In relation to the fiber contents were a decreasing trend in both NDF and HC contents while for those of ADF were an increasing trend. As mentioned before, it was noted that both NDF and HC had losses during the ensiling process, however, ADF content increased. Previous research found that the ash content often increased after the ensiling process. Rime *et al.* (1997) attributed this as a result of proportionally larger losses of the other chemical components than that of the ADF. The Table 1 showed that the HC content from 30 to 90 days cutting intervals with stay high of 10 and 20 cm after ensiling loss. However, that of silage NDF content at 90 days with stem height 20 cm increased and both 10 and 20 cm had greater loss on 30 and 60 days silages. For the ADF content, there were significant differences between 10 and 20 cm for the 30 to 90 days cutting interval of silage. Also, Khalili *et al.* (2005) observed that there was lower NDF content in first-cut growth silage in comparison to the regrowth silage. In support, Perculija *et al.* (2011) stated that early harvest gives rise to higher DM and NDF digestibility of the silage. When the forage grew older, their silage had an increase in cell wall carbohydrate, higher ADF content and lower CP content. Alstrup *et al.* (2016) stated that the more lignified stem is associated with greater level of NDF concentration in the silage. These mentioned all coincided with the results obtained during the ensilage process of the NP cv. TS3.

The WSC content of NP cv. TS3 at cutting growth stages 30, 60 and 90 days and the stay heights are 10 and 20 cm. Table 1 showed that except for the treatment of 30 days cutting interval with 10 cm stay height, the WSC contents of silage were lower than those of forage, which meant WSC was consumed at the ensiling process. Interestingly, the 60 days cutting interval with both 10 and 20 cm stay height had the greatest amount of loss in WSC contents, followed by the treatments of 90 days cutting interval. The least WSC content loss was experienced by the cutting interval of 30 days during the ensilage process. It was assumed that due to higher moisture content at the cutting interval of 30 days, the silage material would have acidified at a much shorter duration than the forage of lower moisture content. Forage suitable for ensiling might carry an adequate amount of fermentable substrates in the form of water soluble carbohydrate (Yokota *et al.*, 1992; Kung, 2010; Shen *et al.*, 2012). In support of the mentioned that Yitbarek and Tamir (2014) stated, ensiling was considered a very complex process which was based on many factors including natural microbial phase, harvesting conditions and the sugar content of the forage.

III. Evaluation of the content of mineral after ensiled 60 days

In relation to the alteration of the ash content during the ensilage process, it was noted that there was gain for all of the variables with the exception of phosphorus at the cutting interval of 90 days cut at 20 cm (Table 1). The gain for the ash variables were seen more so on the 10 cm cutting height for the 60 and 90 days cutting interval, whereas for the cutting interval at 30 days it was not as defined. The general trend observed for the cutting interval, was higher gain in potassium during the ensilage process, while calcium was the least that gained. Kuoppala *et al.* (2008) noted that the increase in the ash content is due to an increase in the DM during the ensiling process. According to Weinberg (2008) two of the main components of forage that have effect on the buffering capacity of the forage material were the ash and protein contents, which when high, can result in high buffering capacity.

IV. Evaluation of the pH value after ensiled 60 days

The pH value plays a very pivotal role during the ensilage process, a rapid descent not only helps to inactivate the undesirable microorganism but also facilitates in the protection from degradation of valuable nutrients. The average pH value can fluctuate between 3.8 and 4; this depends on the cutting interval of the forage and the content of water soluble carbohydrates that affect the buffering capacity (Woodard *et al.*, 1991; Santos *et al.*, 2013). A fluctuation trend was observed in the pH values of the NP cv. TS3 at the various cutting growth stages, which did not reach to be significantly different. Close assessment of the pH values revealed that the lowest value was at a cutting interval of 60 days followed by the 90 days (Fig. 3). The result showed in having the one with the highest pH value (Table 2). There was no significant difference between the cutting growth stages and heights in spite of the aforementioned. Woodard and Prine (1991) obtained pH values that fell between the range of 3.8 and 4.4 from the Napier grass silage. It was found

that the correlation was connected to the harvest time and the genotype of the forage. The mentioned was consistent with the pH results of the NP cv. TS3, with the exception of the cutting interval at the 30 days cut with 10 cm. Bijelić *et al.* (2015) found that low dry matter content accompanied by high pH value and high butyric acid, in addition to low lactic and acetic acid contents resulted in poor fermentation silage. In addition, Yitbarek and Tamir (2014) stated that clostridia was very sensitive to water availability, therefore, in order to develop and proliferate it requires wet conditions. The mentioned proven contrast to the results obtained at the 30 days cutting interval of the NP cv. TS3 which although had the lower dry matter content among the cutting growth stages tested negative for the presence of butyric acid. One of the problems that high DM can pose according to the above mentioned authors at the hour of ensiling is inadequate compaction of the forage material which can lead to an extended aerobic period, also, oxidative losses and the formation of mold. Also, Liu *et al.* (2016) mentioned that forage of moderate moisture content has better fermentation quality than that of high and low moisture content.

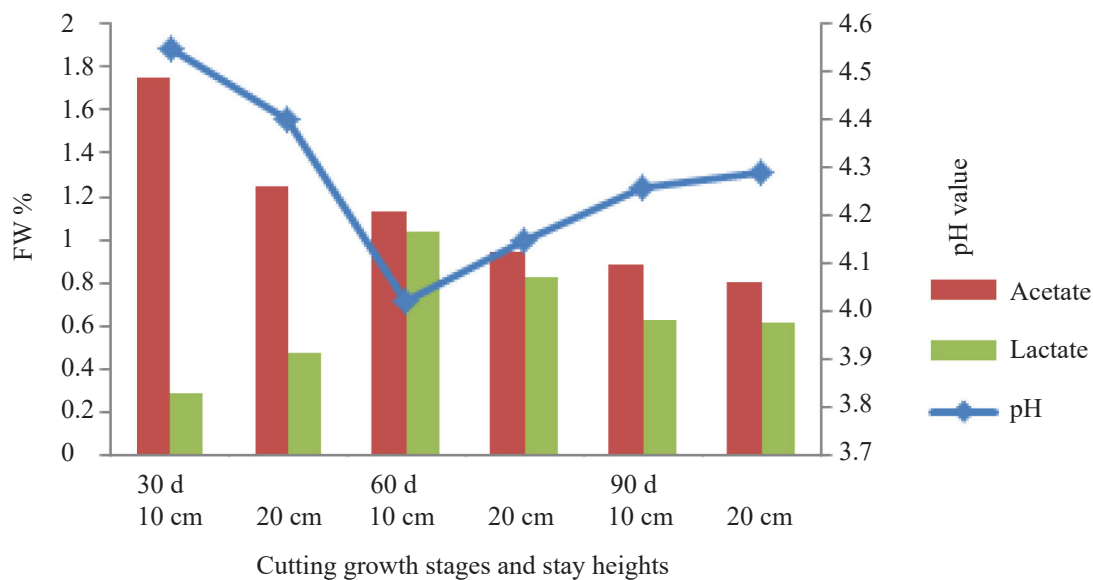


Fig. 3. Evaluation of the contents of volatile fatty acids and pH values of the NP cv. TS3 harvested growth stages 30, 60 and 90 days and stay heights with 10 and 20 cm.

Table 2. The silage quality of NP cv. TS3 harvested at different growth stages and stay heights

GS [#]	SH	pH	Acetate	Butyrate	Lactate	Flieg's score
day	cm				%	
30	10	4.50 ± 0.28	1.75a* ± 0.17	0.00 ± 0.00	0.28 b ± 0.15	51.50 c ± 0.50
	20	4.40 ± 0.27	1.25ab ± 0.36	0.00 ± 0.00	0.47ab ± 0.13	53.92 c ± 1.99
60	10	4.02 ± 0.14	1.13ab ± 0.47	0.00 ± 0.00	1.04 a ± 0.20	67.00 a ± 3.02
	20	4.15 ± 0.13	0.94ab ± 0.10	0.00 ± 0.00	0.82ab ± 0.13	61.25ab ± 2.74
90	10	4.26 ± 0.09	0.88 b ± 0.03	0.00 ± 0.00	0.63ab ± 0.12	58.83 b ± 1.30
	20	4.29 ± 0.28	0.80 b ± 0.05	0.31 ± 0.31	0.61ab ± 0.30	57.25 b ± 1.55

[#] As shown in Table 1.

* Mean ± standard error.

^{a, b, c} Means in the same column with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

V. Evaluation of the contents of volatile fatty acids and Flieg's score after ensiled 60 days

In relation to the VFA (volatile fatty acids) of the NP cv. TS3, with respect to acetic acid, there was no significant difference between the cutting growth stages with the exception of the cutting interval at 30 days cut with 10 cm and that of the 90 days harvest cut with 10 and 20 cm (Fig. 3). The trend observed was one that decreased as the cutting interval of the NP cv. TS3 was delayed. The cutting interval that had the higher acetic acid value was at 30 days followed by the

60 days. The cutting height that had the lower acetic acid value fell 10 cm with the exception of the cutting interval at 30 days.

Results obtained on the NP cv. TS3 coincided with the findings of Woodard *et al.* (1991) who stated that immature grass has the tendency to carry a negative correlation with silage quality; this was as a result of high buffering capacity, low conservation and increase in the concentrations of acetate. The immature *Pennisetum* species had higher pH value than that of the mature during ensilaging; in addition, lactic acid and acetic acid were both the principal fermentation components. Also, Yokota *et al.* (1992) mentioned that lactic acid was the principal preservative acid in the silage, which was followed by acetic acid. Muck (1988) mentioned that having a concentration of < 1% butyric acid was deemed favorable. However, it was elucidated that high moisture content of > 79% and pH of > 4.5 created ideal conditions for fermentation. According to the results obtained on the NP cv. TS3, in spite that the silage material from the cutting interval of 30 days had pH value that well exceeded the 4.5 benchmark for clostridium growth and proliferation, the results showed that the 0% butyric acid was an indication of the non-presence of clostridium. The fact that the fermentation of the silage material of the NP cv. TS3 was carried out in polyethylene vacuum sealed mini bags, this could have facilitated a more extensive fermentation. Cherney *et al.* (2004) mentioned that when the effluent cannot escape from the vacuum-packed mini-silos, it can account for higher acids; the effluent production could then lead to a more extensive fermentation. Dry matter recovery was a measure of the effectiveness of the ensiling process (Spitaleri *et al.*, 1995). Bolsen *et al.* (1996) justified the absence of clostridium in forage that carries less than 65% moisture; due to having adequate amount of sugars that helped in reducing the pH to a level that was below 4.6 - 4.8, at which point clostridia growth was inhibited. The cutting interval at 30 days of the NP cv. TS3 having higher moisture content in comparison to the older cutting growth stages at 60 and 90 days, at the cutting interval with 20 cm, recorded relatively high WSC of 4.14%, which contributed to the lower pH value of 4.40 in comparison to the much higher pH value of 4.55 at the cutting interval with 10 cm (Tables 1 and 2).

Lactic acid, the most beneficial in the ensilage process similar to the acetic acid, did not show a well-defined trend throughout the ensilage process, at the different cutting growth stages of the NP cv. TS3. It followed more of a fluctuation path, where the lower value was seen at the cutting interval of 30 days and that of the higher value with the cutting interval of 60 days (Fig. 3). There was no significant difference between cutting growth stages, with the exception between the 30 days interval with the cutting height of 10 cm and that of the 60 days with the cutting height of 10 cm. Good quality silage is achieved when lactic acid is the predominant acid produced, as it is deemed the most efficient fermentation acid and will lower the pH value of the silage the fastest. The more rapid the fermentation process can complete, more nutrients will be retained in the silage (Schroeder, 2004). Also, Oladosu *et al.* (2016) mentioned that rapid descent of the pH value impedes the growth of Clostridia and enterobacteria. The cutting height that carried a slightly higher lactic acid value was that of 10 cm with the exception of the cutting interval of 30 days. Lactic acid is the primary acid produced as a result of lactic acid bacteria degrading water soluble carbohydrate in an anaerobic condition. Continued production of lactic acid which lowers the pH value will eventually stop the growth of all bacteria (Kung, 2010; Muck, 2010; Bijelić *et al.*, 2015). In addition, Ferriera *et al.* (2013) stated that this will result in minimal losses in dry matter and protein and give rise to higher nutritive digestibility values. According to Amer *et al.* (2012) lactic acid concentration was higher in forage of high WSC. This is consistent with results obtained on the NP cv. TS3, except that it was at the cutting interval of 60 days that the lactic content was much higher than that at 90 days. Muck (2010) elucidated that the two key processes required to preserve the forage in the silo was the creation of an anaerobic environment and the fermentation of sugars by lactic acid bacteria to lactic acid and other products. On the contrary, grass with inadequate amount of WSC required for fermentation leads to the production of acetate and butyrate (Yokota and Ohshima, 1991; Yokota *et al.*, 1992).

Flieg's score pivotal in the ensilage process of forage through the rating of its value it can then give an indication on the quality of the forage. The analysis on the Flieg's score of the silage material of NP cv. TS3 showed a similar trend to acetic and lactic acids, it followed more of a fluctuation path with the highest recorded value falling at the cutting interval of 60 days and the lowest at the 90 days interval cut with 20 cm (Fig. 4). That being said, its values between the stay heights with 10 and 20 cm did not show any significant difference.

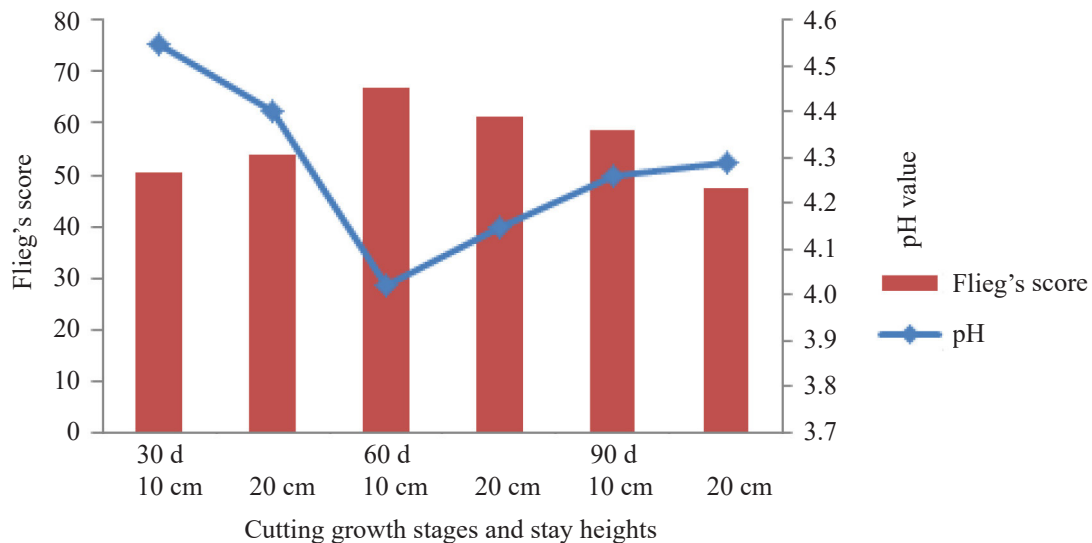


Fig. 4. Evaluation of the pH values and Flieg's scores of the NP cv.TS3 harvested growth stages 30, 60 and 90 days and stay heights with 10 and 20 cm.

Conclusion

There was significant difference on the Flieg's scores among different cutting growth stages and stay heights. The grass cut at 60 days with stay height 10 cm had the highest Flieg's score 67.00 ± 3.02 , followed by 90 days with stay heights 10 or 20 cm, then that cut at 30 days with 10 cm stay heights was the lowest Flieg's score 51.50 ± 0.50 (Table 2). The results above might suggest that the cutting growth stages at 60 days with stay height 10 cm was considered the most optimum for producing high forage yield and high silage quality of the NP cv. TS3.

References

- Alstrup, L., K. Søegaar, and M. R. Weisbjerg. 2016. Effects of maturity and harvest season of grass-clover silage of forage-to-concentrate ratio on milk production of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 99: 328-334.
- Amer, S., F. Hassanat, R. Berthiaume, P. Seguin, and A. F. Mustafa. 2012. Effects of water soluble carbohydrate content on ensiling characteristics, chemical composition and in vitro gas production of forage millet and forage sorghum silages. *Anim. Feed Sci. Technol.* 177: 23-29.
- A. O. A. C. 1984. Official Methods of analysis of the association of official analytical chemist. 14 ed. Washington DC. pp. 125-142.
- Bijelić, Z., Z. Tomić, D. Ružić-Muslić, V. Krnjaja, V. Mandić, M. Petričević, and V. Caro-Petrović. 2015. Silage fermentation characteristics of grass legume mixtures harvested at two different maturity stages. *Biotechnol. Anim. Husbandry* 31: 303-311.
- Bolsen, K. K., G. Ashbell, and Z. G. Weinberg. 1996. Silage fermentation and silage additives review. *Asian J. Appl. Sci.* 9: 483-493.
- Borreani, G., T. F. Bernardes, and E. Tabacco. 2008. Aerobic deterioration influences the fermentative, microbiological and nutritional quality of maize and sorghum silages on farm in high quality milk and cheese production chains. *R. Bras. Zootec.* 37: 68-77.
- Cherney, D. J. R., J. H. Cherney, and W. J. Cox. 2004. Fermentation characteristics of corn forage ensiled in mini silos. *J. Dairy Sci.* 87: 4238-4246.
- Cheng, Y. K. and C. S. Chen. 1997. Breeding to improve yield and quality in Napier grass. Taiwan Livestock Research Institute, Heng-Chun Branch, Kenting, Pintung, Taiwan, ROC, 1: 11-12.
- Fan, G. J., T. R. Li, T. F. Shiao, and C. F. Lee. 2018. The feeding value of NP cv.TS3 and NP cv.TS7 for lactating goats. *J. Taiwan Livestock Res.* 51: 8-15.

- Fan, G. J., B. L. Shin, T. R. Li, T. F. Shiao, T. T. Lee, and C. F. Lee. 2019. Evaluation of the feeding values of Napier grass cv. TS8 for lactating dairy goats. *J. Taiwan Livestock Res.* 52: 256-263.
- Ferreira, D. J., A. M. Zanine, E. M. Santos, R. P. Lana, W. L. Silva, A. L. Souza, and O. G. Pereira. 2013. Fermentation and nutritive value of elephantgrass silage inoculated with *Streptococcus bovis*. *Arch. Anim. Sci.* 60:110-124.
- Fijałkowska, M., B. Pysera, K. Lipiński, and D. Strusińska. 2015. Changes of nitrogen compounds during ensiling of high protein herbages: A Review. *Ann. Anim. Sci.* 15: 89-305.
- Goering, H. K. and P. J. Van Soest. 1970. Forage fiber analyses. (apparatus, reagents, procedures, and some applications). Agriculture Handbook No: 379. United States Department of Agriculture, pp. 1-20.
- Hoglund, M., H. M. Hanslin, and M. V. Oijen. 2005. Timothy regrowth, tillering and leaf area dynamics following spring harvest at two growth stages. *Field Crops Res.* 93: 51-63.
- 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
- Khalili, H., J. Sairanen, J. Nousiainen, and P. Huhtanen. 2005. Effects of silage made from primary or regrowth grass and protein supplementation on dairy cow performance. *Livest. Prod. Sci.* 96: 269-278.
- Kung, L. Jr. 2010. Understanding the biology of silage preservation to maximize quality and protect the environment. *Proc. California Alfalfa and Forage Symposium, Visalia, California*, pp. 41-54.
- Kuoppala, K., M. Rinne, J. Nousiainen, and P. Huhtanen. 2008. The Effect of cutting time of grass silage in primary growth and regrowth and the interactions between silage quality and concentrate level on milk production of dairy cows. *Livest. Sci.* 116: 171-182.
- Liu, S., X. Ge, Z. Liu, and Y. Li. 2016. Effect of harvest date on *Arundo donax* L. (giant reed) composition, ensilage performance and enzymatic digestibility. *Bioresource Technol.* 205: 97-103.
- Manyawu, G. J., C. Chakoma, S. Sibanda, C. Mutisi, and I. C. Chakoma. 2003. The effect of harvesting interval on herbage yield and nutritive value of Napier grass and hybrid *Pennisetums*. *Asian-Austral. J. Anim. Sci.* 16: 996-1002.
- Maria, M., T. Rêgo, J. Neuman, M. Neiva, A. C. do Rêgo, M. J. D. Cândido, M. S. de Sousa-Carneiro, and R. N. B. Lôbo. 2010. Chemical and bromatological characteristics of elephant grass silages containing a mango by-product. *R. Bras. Zootec.* 39: 81-87.
- McCullough, M. E. 1979. Silage: some general consideration. In: Mc Cullough, M. E. *Fermentation of silage*. National Feed Ingredient Association, Iowa, USA.
- McEniry, J., C. King, and P. O' Kiely. 2013. Silage fermentation characteristics of three common grassland species in response to advancing stage of maturity and additive application. *Grass and Forage Sci.* 69: 393-404.
- Muck, R. E. 1988. Factors influencing silage quality and their implications for management. *J. Dairy Sci.* 71: 2992-3002.
- Muck, R. E. 2010. Silage microbiology and its control through additives. *R. Bras. Zootec.* 39: 183-191.
- Oladosu, Y., M. Y. Rafii, N. Abdullah, U. Magaji, G. Hussin, A. Ramli, and G. Miah. 2016. Fermentation quality and additives: a case of rice straw silage. *BioMed. Res. International* pp. 1-14.
- Perculija, G., M. Vranic, H. Kutnjak, and J. Leto. 2011. In sacco dry matter and NDF degradability of grass silage harvested at three stages of Maturity. *Anim. Sci. Biotechnol.* 68: 58-62.
- Rime, M., S. Jaakkola, and P. Huhtanen. 1997. Grass maturity effects on cattle fed silage based diets. 1. organic matter digestion, rumen fermentation and nitrogen utilization. *Anim. Feed Sci. Technol.* 67: 1-17.
- Santos, R. J. C., M. A. Lira, A. Guim, M. V. F. Santos, J. Carlos, B. D. Junior, and A. C. L. Mello. 2013. Elephant grass clones for silage production. *Sci. Agric.* 70: 6-11.
- Schroeder, J. W. 2004. Silage fermentation and preservation. *Angus J.* 56: 1-9.
- Sebolai, T. M., A. A. Aganga, M. Nsinamwa, and J. C. Moreki. 2012. Effects of different silage preservatives on silage quality of *Pennisetum purpureum* harvested at different harvesting periods. *Online J. Anim. Feed Res.* 2: 139-144.
- Shen, C., X. Shang, X. Chen, Z. Dong, and J. Zhang. 2012. Growth, chemical components and ensiling characteristics of kinggrass at different cuttings. *African J. Biotechnol.* 11: 12749-12755.
- Singh, B. P., H. P. Singh, and E. Obeng. 2013. Elephant grass. 2013. In *Biofuel Crops: Production, Physiology and Genetics* (ed. B. P. Singh), Centre for Agriculture and Bioscience International, pp. 271-291.
- Spitaleri, R. E., L. E. Sollenberger, C. R. Staples, and S. C. Schank. 1995. Harvest management effects on ensiling characteristics and silage nutritive value of seeded *Pennisetum* hexaploid hybrids. *Post-harvest Biol. Technol.* 5: 353-

362.

- Weinberg, Z. G. 2008. Preservation of forage crops by solid state lactic acid fermentation ensiling. Springer; New York. pp. 443-467.
- Wijitphan, S., P. Lorwilai, and C. Arkaseang. 2009. Effects of stay heights on productivity and quality of king Napier grass (*Pennisetum purpureum* cv. King Grass) under irrigation. Pakistan J. Nutri. 8: 1244-1250.
- Woodard, K. R. and G. M. Prine. 1991. Forage yield and nutritive value of elephant grass as affected by harvest frequency and genotype. Agron. J. 83: 541-546.
- Woodard, K. R., G. M. Prine, and D. B. Bates. 1991. Silage characteristics of elephantgrass as affected by harvest frequency and genotype, Agron. J. 83: 547-551.
- Xie, Z. L., T. F. Zhang, X. Z. Chen, G. D. Li, and J. G. Zhang. 2012. Effects of maturity stages on the nutritive composition and silage quality of whole crop wheat. Asian-Austral. J. Anim. Sci. 25: 1374-1380.
- Yang, C. M. J., S. C. Huang, T. Chang, Y. H. Cheng, and C. T. Chang. 2004. Fermentation acids, aerobic fungal growth, and intake of Napier grass ensiled with nonfiber carbohydrates. J. Dairy Sci. 87: 630-636.
- Yitbarek, M. B. and B. Tamir. 2014. Silage additives: review. Open J. Appl. Sci. 4: 258-274.
- Yokota, H. T. and M. Ohshima. 1991. Effect of environmental temperature and addition of molasses on the quality of Napier grass (*Pennisetum purpureum* schum.) silage. Asian-Austral. J. Anim. Sci. 4: 377-382.
- Yokota, H., T. Okajima, and M. Ohshima. 1992. Nutritive value of Napier grass (*Pennisetum purpureum* Schum.) silage ensiled with molasses by goats. Asian-Austral. J. Anim. Sci. 5: 33-37.

不同割期及留樁高度對狼尾草台畜草三號 青貯品質之影響⁽¹⁾

林正斌⁽²⁾ 丁恩寧⁽³⁾ 顏才博⁽³⁾ 吳錫勳⁽⁴⁾⁽⁵⁾

收件日期：111 年 5 月 23 日；接受日期：112 年 1 月 5 日

摘 要

狼尾草 (*Pennisetum purpureum*) 在熱帶與亞熱帶地區是生長快速、高營養分與適口性佳的重要牧草草種。本試驗目的旨在探究狼尾草台畜草三號植株在不同割期及留樁高度對青貯品質之影響。本試驗於行政院農業委員會畜產試驗所進行，採 3×2 複因子完全隨機設計 (completely randomized design, CRD)。處理因子包括割期 30、60、90 天及留樁高度為 10 及 20 公分。試驗結果顯示，當割期由 30 天、60 天延長至 90 天，青貯後之粗蛋白質 (crude protein, CP) 含量隨之降低，中洗纖維 (neutral detergent fiber, NDF)、半纖維素 (hemicellulose, HC) 與水溶性碳水化合物 (water soluble carbohydrate, WSC) 含量亦隨之降低，礦物質和酸洗纖維 (acid detergent fiber, ADF) 則在青貯後含量提高。結果顯示 30、60、90 天割期並不影響青貯後 pH 值 ($P > 0.05$)，青貯後乳酸含量則以 60 天割期最高，而 30 天為最低且達顯著差異 ($P < 0.05$)，青貯品質評分 (Flieg's score) 以割期 60 天留樁高度 10 公分為最高，割期 30 天留樁高度 10 公分為最低。因此，狼尾草台畜草三號建議以生長 60 天的割期及留樁高度 10 公分之新鮮材料做成之青貯料品質最佳。

關鍵詞：割期、狼尾草、青貯品質、留樁高度。

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2729 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所飼料作物組。

(3) 國立屏東科技大學熱帶農業暨國際合作系。

(4) 國立屏東科技大學動物科學與畜產系。

(5) 通訊作者，E-mail: hhwu@mail.npust.edu.tw。

以次世代定序方式分析畜產廢水處理活性污泥之 細菌多樣性⁽¹⁾

廖仁寶⁽²⁾ 黃雅玲⁽³⁾ 黃子瑄⁽³⁾ 陳若菁⁽⁴⁾ 程梅萍⁽⁵⁾⁽⁶⁾

收件日期：111 年 8 月 8 日；接受日期：112 年 1 月 13 日

摘 要

本研究之目的在於利用次世代定序方式探討畜產廢水處理設施中活性與厭氧污泥中細菌多樣性，藉以瞭解不同活性污泥中細菌群落組成之差異，並期以延伸利用。試驗樣品含 4 種，包括在熱季採集 2 個活性污泥與 1 個厭氧污泥樣品，以及在涼季採集 1 個活性污泥樣品。使用瓷珠震盪方式直接萃取 4 種污泥樣品中之微生物 DNA，其後利用次世代定序方式進行 16S rRNA 基因變異區 V3 – V4 序列解序，並以生物資訊學工具分析樣品中之細菌多樣性。分析結果顯示，樣品物種豐度以厭氧污泥樣品含量最高，平均可達 2,205 種，活性污泥樣品則介於 1,682 – 1,854 種。活性污泥樣品含有占比較高之菌門為 *Bacteroidetes* 與 *Proteobacteria*；厭氧污泥樣品則為 *Bacteroidetes* 與 *Patescibacteria*。依操作分類單位 (operational taxonomic unit, OTU) 分析結果，占比前 10 名的菌屬有 *Denitratisoma*、*Ferruginibacter*、DMER64、*Bacterium enrichment culture clone R4-41B*、*Smithella*、*Limnobacter*、*Ignavibacterium*、*Nitrosomonas*、*Christensenellaceae R7 group* 及 *Arcobacter*，其中源自活性污泥之菌屬，多與氮循環相關。此外，PCoA (principal coordinates analysis)、NMDS (non-metric multidimensional scaling)、PLS-DA (partial least squares discriminant analysis) 及 t-SNE (t-distributed stochastic neighbor embedding) 分析結果顯示，4 種樣品可區分為 3 大群，即熱季所採集之好氧樣品 2 個為 1 群、厭氧樣品 1 群，而涼季所採集之好氧樣品則為另 1 群。綜而言之，以次世代定序方式解析涼、熱季污泥之細菌組成，可獲得重要的優勢細菌種類資訊，提供未來之研究或應用參考。

關鍵詞：活性污泥、細菌多樣性、廢水處理。

緒 言

國內畜牧廢水大多採用三段式處理，即固液分離、厭氧處理及好氧處理，期使放流水能夠達到環保法規規定的標準，如非草食動物與草食動物在化學需氧量 (chemical oxygen demand, COD)、生化需氧量 (biochemical oxygen demand, BOD) 及懸浮固體 (suspended solid, SS) 的規定量值須分別不大於 600 vs. 450、80 vs. 80 及 150 vs. 150 mg/L，若畜牧業者違反規定將被處以罰鍰 (行政院環境保護署，2014)。依據調查顯示，養豬場廢水若採用三段式處理且正常操作，絕大多數場放流水品質都可符合排放標準 (郭等，2008)。實務上，應用微生物可分解大量廢水中的營養鹽與降解有毒物質，減少放流水對環境的衝擊 (Amanatidou *et al.*, 2015)，且為一種經濟可行的操作方式 (Wagner and Loy, 2002; Rajasulochana and Preethy, 2016)。

廢水處理場中之活性污泥含有多種微生物，但僅約 1 – 15% 微生物屬可分離培養者 (Amann *et al.*, 1995)。許多的研究探討不同廢水種類如都市污水與工業廢水之處理廠中的活性污泥細菌組成，期以瞭解有機物代謝途徑與潛力 (Qin *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2021)。可作為探討活性污泥中微生物多樣性的方式，包括分離培養鑑定 (van Veen, 1973)、16S rRNA 基因庫 Sanger 定序 (廖等，2015; Liaw *et al.*, 2010)、16S rRNA 基因限制酶圖譜 (程等，2009)、16S rRNA 聚合酶連鎖反應 – 變性梯度膠體電泳 (polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE) (Zhou *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2013)、16S rRNA 基因高度變異區域

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2730 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經營組。

(4) 行政院農業委員會畜產試驗所遺傳育種組。

(5) 行政院農業委員會畜產試驗所副所長室。

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

V3 — V4 (the V3–V4 hypervariable regions of the 16S rRNA gene) (Isazadeh *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2020) 或全長次世代基因定序及多源基因體定序、分子探針 (Xu *et al.*, 2020)。其中 16S rRNA 基因 V3 — V4 次世代定序方式為一種可較完整性探討活性污泥中的細菌群落組成，廣為應用的評估方法。

本研究藉由次世代定序技術解析 16S rRNA 基因 V3 — V4 區序列，分析廢水處理設施中活性與厭氧污泥中細菌之組成，並藉以探討不同樣品的細菌群落分布及其差異，同時期能從中找出優勢細菌，以供後續活性污泥的跨域應用、廢水處理品質監測之參考或菌體及功能性基因之利用。

材料與方法

I. 活性污泥樣品採集

分別於 2005 年 5 月 26 日、6 月 8 日及 2006 年 1 月 6 日在行政院農業委員會畜產試驗所總廢水處理場各採取活性污泥 1 L；2005 年 8 月 22 日採取厭氧污泥 1 L，測定其 pH 與溫度後，再個別自採樣瓶吸取 3 — 4 重複適量約 1 mL 污泥樣品至微量離心管，離心後去除上層液，冷凍保存於 -70°C 冷凍櫃。所採樣品之編號 2006 年 1 月 6 日採樣者命名為 AS1，2005 年 5 月 26 日、6 月 8 日及 8 月 22 日者分別命名為 AS2、AS3 及 AS4。畜產試驗所總廢水處理場採用三段式處理方式處理養豬廢水，因預期 5、6 月活性污泥微生物活性與組成較為穩定，篩選新穎脂解酵素基因機率較大，故密集採樣，1 月屬於涼季，採集樣品以當作對照。一般而言，厭氧污泥微生物組成較為穩定，所採集樣品亦當作對照。

II. 活性污泥微生物 DNA 之萃取

利用 DNA 萃取試劑組 (PowerSoil DNA Isolation Kit, MOBIO, USA) 分別進行活性與厭氧污泥中微生物 DNA 之萃取。將凍存之污泥樣品置入含陶瓷珠緩衝液之微量管，加入 60 μ L C1 緩衝液 (含 SDS 之試劑，用以溶解細胞)，震盪混勻 5 s。以組織均質機 (MagNA Lyser, Roche, Germany) 在 5,500 rpm 條件下，作用 25 s。在 10,000 \times g 下離心 30 s，吸取上清液至新的微量離心管。依序以不同的緩衝液 (C2 — C6：C2 含特定試劑以沉澱非 DNA 之有機與無機物質，C3 含特定試劑以沉澱額外的非 DNA 之有機與無機物質，C4 為高濃度鹽溶液，C5 為含乙醇之溶液，C6 為洗提溶液) 與旋轉過濾管進行 DNA 純化步驟，最後可得 100 μ L DNA。

III. 細菌多樣性分析

污泥細菌多樣性分析委託圖爾生物科技股份有限公司，採用微生物體 16S 擴增子定序方式進行。利用 16S rRNA 基因引子對 341F 與 805R，增幅放大 V3 — V4 區域，並進行序列解序。根據 barcode 序列和 PCR 擴增引物序列從分出各樣品數據，去除 barcode 和引物序列後，使用 FLASH (v. 1.2.11) 進行樣品的序列拼接 (最小重疊長度 10 bp；重疊區域最大錯配率為 0.1)，拼接後的序列稱為 raw tags。以 Qiime (v. 1.9.1) 進行序列品質過濾處理而獲得 clean tags，再以 UCHIME 演算法與資料庫 (Gold Database (16S) / Unite Database (ITS)) 篩除嵌合體序列後得到最終用於後續分析的 effective tags。利用 USEARCH (v.7.0.1090) 中的 UPARSE 演算法進行操作分類單位 (operational taxonomic unit, OTU) 分析，以 97% 的序列相同性 (identity) 當作 OTU 分類閾值。以 RDP Classifier (v. 2.2) 對 OTUs 代表序列進行物種注釋分析。使用 Qiime (v. 1.9.1) 分析 alpha 多樣性，含計算 Observed-species、Shannon、Simpson、ACE、Chao1、PD_whole_tree 及 Good's coverage 指數，以 Tukey 和 Kruskal (Post-hoc test) 分析 alpha 多樣性指數組間差異。使用 Qiime (v. 1.9.1) 分析 beta 多樣性，含計算 UniFrac (unique fraction distance) 距離與建構非加權配對群團分析法 (unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA) 樣品聚類樹。以 R (v. 3.3.1) 繪製主成分分析 (principal component analysis, PCA)、主座標分析 (principal co-ordinates analysis, PCoA)、非度量多維度分析 (non-metric multidimensional scaling, NMDS) 及偏最小平方判別分析 (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA) 分析圖。進一步以 t-分佈隨機鄰域嵌入 (t-distributed stochastic neighbor embedding, t-SNE) 或利用線性判別分析 (linear discriminant analysis (LDA) effect size, LEfSe) 進行組別間主要微生物分析，LDA Score 的篩選值設定為 4。使用 R vegan 套件分別進行 Anosim、MRPP 及 Adonis 分析。T-test 檢驗組間物種差異顯著性分析。使用 R 的 Corplot 套件分析優勢物種 Spearman 相關係數。相關基因功能預測則採 PICRUSt (phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states, v. 1.1.1)，使用 Greengenes 資料庫與 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 資料庫，進行多源基因體功能預測。另外亦利用 BugBase 進行微生物表型預測，所使用的表型資料庫來源有 IMG (Integrated Microbial Genomes)、KEGG 及 PATRIC (Pathosystems Resource Integration Center)，包括好氧性 (aerobic)、兼性厭氧性 (facultative anaerobic)、革蘭氏陰性 (Gram negative)、革蘭氏陽性 (Gram positive)、生物膜形成 (biofilm forming)、

移動元件 (mobile elements containing)、致病性 (pathogenic potential) 及氧化壓力耐受性 (oxidative stress tolerance)。

結果與討論

I. 活性污泥樣品 pH 與溫度

自畜產試驗所總廢水處理場採集污泥樣品後，隨即攜回實驗室進行 pH 與溫度測定。活性污泥樣品 AS1、AS2 及 AS3 之 pH 與溫度，分別為 7.94、20℃；7.59、30℃；7.70、30℃，厭氧污泥樣品 AS4 之 pH 與溫度則為 7.07、29℃。活性污泥的 pH 會影響所含微生物的組成與其活性，在 pH 6.5–8.5 的環境下，微生物有較佳分解污染物的活性 (Painter and Loveless, 1983)，另有研究指出，在 pH 7.5 狀態下，微生物有最佳的生長率與受質移除率 (Yavuz and Celebi, 2000)。由此推論，本研究所採集的活性污泥之有機物降解活性處於良好的狀態。

II. 活性污泥微生物 Alpha 多樣性分析

在活性污泥樣品的 alpha 多樣性指數分析中 (表 1)，同為好氧性質的活性污泥樣品裡，AS3 之 4 重複分析平均值 $1,812.0 \pm 29.1$ ，具最高的物種豐富度，其次為 AS2 之 3 重複分析平均值 $1,770.7 \pm 46.8$ ，最低者為 AS1 之 4 重複分析平均值 $1,700.5 \pm 19.1$ ；另厭氧污泥樣品 AS4 之 4 重複分析物種豐富度平均值達 $2,204.5 \pm 17.8$ ，較活性污泥高。在 Shannon 與 Simpson 指數的比較，其重複樣品分析之平均數值高低，分別依序為 AS4 (8.70 ± 0.02 vs. 0.9906 ± 0.0004)、AS2 (8.00 ± 0.04 vs. 0.9897 ± 0.0003)、AS3 (7.86 ± 0.02 vs. 0.9887 ± 0.0003)、AS1 (7.66 ± 0.11 vs. 0.9834 ± 0.0021)，然而其他的相關指數如 Chao1 與 ACE 之比較，其重複樣品分析之平均數值高低，則分別依序為 AS4 ($2,435.1 \pm 26.8$ vs. $2,411.8 \pm 29.8$)、AS3 ($2,265.2 \pm 32.4$ vs. $2,271.8 \pm 22.8$)、AS2 ($2,202.3 \pm 105.5$ vs. $2,182.3 \pm 83.2$)、AS1 ($2,094.9 \pm 41.8$ vs. $2,082.7 \pm 31.1$)。此外，各樣品分析之 Good's Coverage 平均值介於 99.22 – 99.45%，由此顯示定序分析的覆蓋率足夠說明樣品中之族群分析可靠性 (Good, 1953; Singleton *et al.*, 2001)。Shi *et al.* (2021) 調查分析豬場廢水處理系統活性污泥的物種豐富度為 $1,777.0 \pm 34.8$ ，與本研究相近，而在厭氧污泥樣品的物種豐富度為 $1,887.6 \pm 35.66$ ，則低於本研究分析所得之數值；另其厭氧與活性污泥樣品之 Shannon 指數分析數值分別為 5.37 與 5.24，亦低於本研究所得之分析數值 7.53 – 8.73。Yan *et al.* (2021) 分析養牛場廢水處理系統的 11 個污泥樣品，發現 Chao、Ace、Shannon 及 Simpson 指數的數值範圍分別為 786.90 – 1,394.97、702.67 – 1,427.56、4.063 – 5.024 及 0.0147 – 0.0947，皆低於本研究分析所得者。

表 1. 不同污泥樣品操作分類單元 alpha 多樣性分析

Table 1. Estimates of alpha diversity for operational taxonomic units (OTUs) for different sludge samples

Group	Sample	Species richness	Shannon	Simpson	Chao1	ACE	Good's coverage
AS1	AS1.1	1,703	7.5276	0.9804	2,128.5939	2,095.3928	0.9929
	AS1.2	1,726	7.7563	0.9846	2,133.2468	2,113.6133	0.9929
	AS1.3	1,682	7.6229	0.9833	2,064.3790	2,081.3319	0.9930
	AS1.4	1,691	7.7376	0.9852	2,053.5677	2,040.4517	0.9934
AS2	AS2.1	1,756	8.0157	0.9896	2,193.0270	2,161.0179	0.9929
	AS2.2	1,733	7.9882	0.9894	2,101.8140	2,111.7683	0.9932
	AS2.3	1,823	8.0657	0.9900	2,312.1181	2,274.1229	0.9922
AS3	AS3.1	1,809	7.8862	0.9890	2,229.6753	2,253.7284	0.9923
	AS3.2	1,793	7.8488	0.9887	2,292.0615	2,267.3517	0.9920
	AS3.3	1,854	7.8469	0.9882	2,245.8576	2,304.9256	0.9922
	AS3.4	1,792	7.8745	0.9888	2,293.3840	2,261.1941	0.9921
AS4	AS4.1	2,199	8.6933	0.9905	2,416.2333	2,409.0380	0.9945
	AS4.2	2,225	8.6907	0.9904	2,463.9200	2,449.0421	0.9942
	AS4.3	2,183	8.7037	0.9904	2,408.6818	2,376.0762	0.9947
	AS4.4	2,211	8.7292	0.9912	2,451.6653	2,413.0165	0.9944

在本研究 4 個活性污泥樣品中所含 OTUs 相似性的分析方面，由 Venn diagram 顯示 4 個樣品總共含 3,767 個 OTUs，其中 1,077 個相同 (相似性 $\geq 97\%$)，各樣品特有的 OTU 數目依序為 200、34、41 及 647 個，特有 OTUs 占 24.5% (圖 1)。3 個同為活性污泥樣品 AS1、AS2 及 AS3 有 1,647 個相同 OTUs，其中 AS2 與 AS3 有 2,021 個相同 OTUs，高於 AS1 與 AS2 之 1,783 個相同 OTUs，以及 AS1 與 AS3 之 1,876 個 OTUs。依樣品的採集日期，AS2 與 AS3 在同一年度的 5、6 月採樣，而 AS1 則在次年的 1 月採集，故而顯示活性污泥的微生物多樣性隨著季節與月份變化，兩個樣品的採集月份相近則有較高相似性的微生物組成。微生物多樣性之變化，常隨著季節、溫度、pH 及營養等因素而進行動態改變 (Ijoma *et al.*, 2021)。

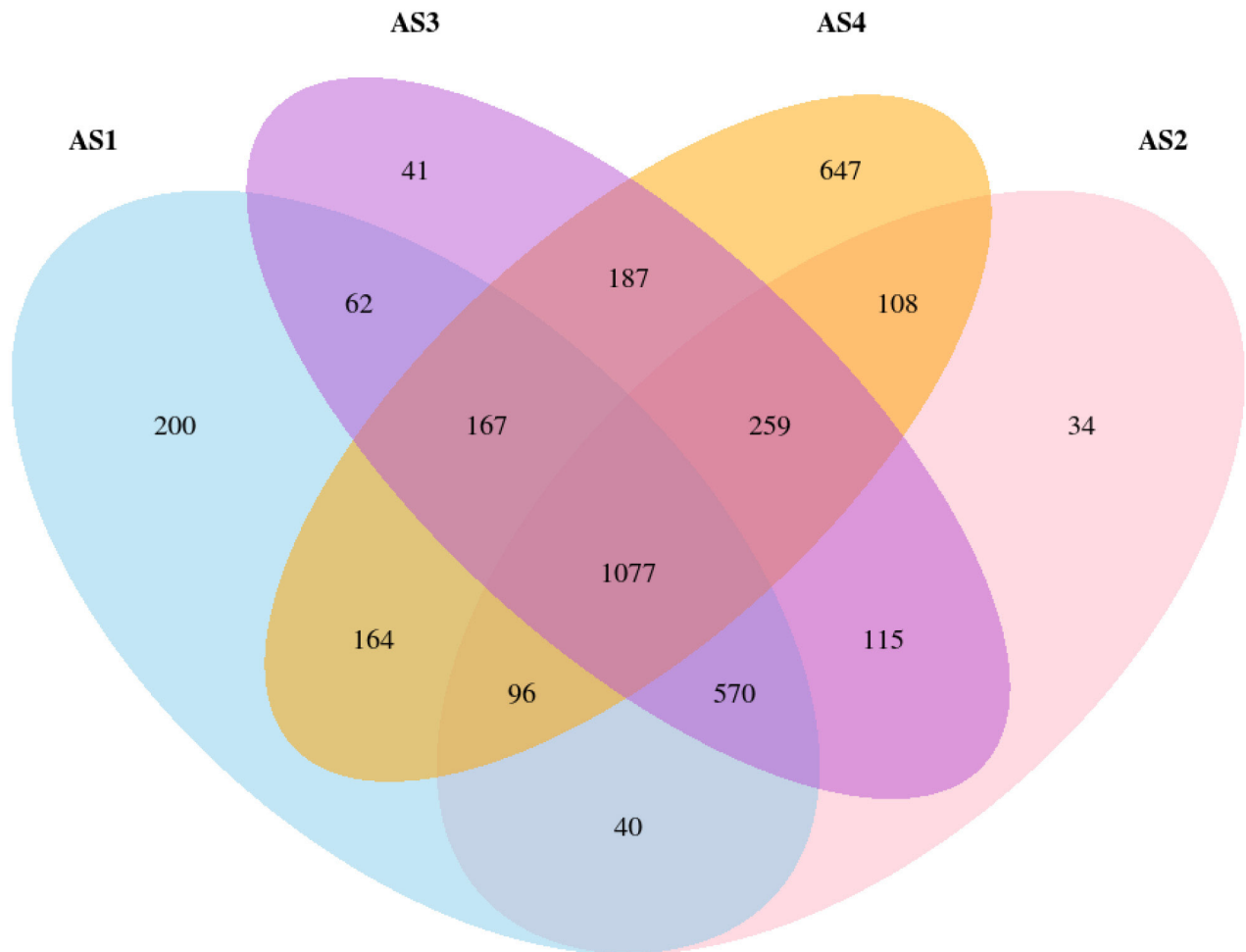


圖 1. 4 種污泥 OTUs 之分布。

Fig. 1. OTUs distribution among 4 sludge samples.

III. 活性污泥微生物 Beta 多樣性分析

當以 unweighted UniFrac KW.post-hoc.LSD 法對 4 種活性污泥樣品進行分析，結果顯示每種樣品間皆有顯著性的差異 (圖 2a)；然若以 weighted UniFrac KW.post-hoc.LSD 方式分析，結果顯示 AS1 與 AS2 和 AS1 與 AS3 之間有顯著的差異 (圖 2b)。當以 weighted UniFrac 距離進行 PCoA 分析作圖時，發現 4 個樣品之個別重複分析樣品均緊密在一起，此顯示重複樣品的一致性甚佳 (圖 3a)。而 AS2 與 AS3 則分布在同一象限接近處，顯示此兩者樣品性質相近。進一步以 NMDS (圖 3b)、t-SNE (圖 3c)、PLS-DA (圖 3d) 方式統計分析，皆有類似的分析結果。上述分析結果顯示，AS2 與 AS3 在取樣的日期較接近且無環境過大變化的狀況下，兩者有較接近的微生物組成。同時，各組組內樣品相異性低，一致性佳，且組間的差異性，無論使用本段上述何種分析方法均可適當呈現。

IV. 活性污泥微生物功能預測

利用 PICRUSt 結合 16S rRNA 定序資料、GreenGenes 資料庫及 KEGG 資料庫，進行多源體基因體功能預測。在第二層代謝 (metabolism) 的分析中，基因占比較高的代謝種類依序為胺基酸、醣類及能量，最低者為

其他次級代謝物生合成 (圖 4)。其中在醣類代謝部分，厭氧樣品 AS4 的基因占比高於好氧樣品 AS1、AS2 及 AS3，顯示三段式廢水處理過程，在厭氧處理階段可分解碳水化合物以生成沼氣。另於 BugBase 的分析，針對好氧的表型做出與實際採樣樣品性質一致的結果，即 AS1–AS3 為好氧樣品，AS4 為厭氧樣品。其他分析結果顯示，兼性厭氧菌較多存在於 AS2 與 AS3，同時顯示較容易生成生物膜、含較多革蘭氏陰性菌、可動遺傳因子、較高致病性及較耐環境壓力者均為好氧樣品。另外，分析推估厭氧樣品含較高之革蘭氏陽性菌比率 (圖 5)。

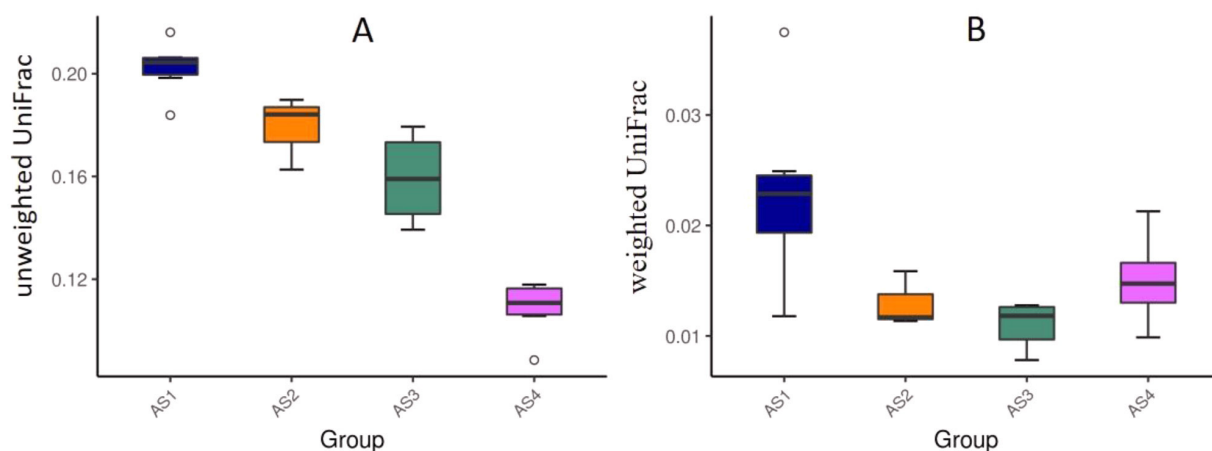


圖 2. 以 unweighted 與 weighted UniFrac 比較各組樣品 beta 多樣性分析箱型圖。

Fig. 2. Comparison of beta diversity of 4 sludge samples by unweighted and weighted UniFrac methods. A: unweighted UniFrac; B: weighted UniFrac. The circles mean outliers.

V. 優勢物種分析

在各種污泥樣品所含 OTUs 類別的比較，本研究的活性污泥的優勢菌門包括 *Bacteroidetes*、*Proteobacteria*、*Patescibacteria* 及 *Chloroflexi*，厭氧污泥的優勢菌門則為 *Bacteroidetes*、*Patescibacteria*、*Firmicutes* 及 *Proteobacteria* (圖 6)。在牛場廢水處理系統中發現，整體處理過程的優勢菌門為 *Proteobacteria*、*Bacteroidetes* 及 *Firmicutes* (Yan *et al.*, 2021)。而在豬場廢水處理系統中，活性污泥含有的優勢菌門則為 *Proteobacteria*、*Chlorolipid*、*Bacteroidetes*、*Spirochetes* 及 *Firmicutes* (Shi *et al.*, 2021)，另有研究養豬廢水處理過程中的優勢菌門為 *Firmicutes*、*Bacteroidetes*、*Proteobacteria* 及 *Actinobacteria* (Da Silva *et al.*, 2015)。Kumar *et al.* (2020) 分析豬糞中微生物組成，發現豬糞經過連續 14 週的儲存，每週取樣分析，菌門分布之平均數值顯示，以 *Firmicutes* 占 76.2% 為優勢菌門，次為 *Bacteroidetes* (14.4%) 及 *Proteobacteria* (4.9%)，但經過 14 週儲存後，*Firmicutes* 占比漸減，而 *Bacteroidetes* 占比則漸增。

本研究經過分析所有污泥樣品 OTUs，占比前 10 名的菌屬有 *Denitratisoma*、*Ferruginibacter*、DMER64、*Bacterium enrichment culture clone R4-41B*、*Smithella*、*Limnobacter*、*Ignavibacterium*、*Nitrosomonas*、*Christensenellaceae R7 group* 及 *Arcobacter* (圖 7)，涼季活性污泥 AS1 的優勢菌屬有 *Denitratisoma*、*Arcobacter*、*Ignavibacterium*、*Limnobacter* 及 *Ferruginibacter*，熱季活性污泥 AS2 與 AS3 優勢菌屬為 *Ferruginibacter*、*Limnobacter*、*Denitratisoma*、*Nitrosomonas* 及 *Bacterium enrichment culture clone R4-41B*，熱季之厭氧污泥優勢菌屬則為 DMER64、*Smithella*、*Bacterium enrichment culture clone R4-41B* 及 *Christensenellaceae R7 group*。活性污泥樣品中之優勢菌屬大部分與氮代謝相關，如硝化菌或脫硝菌，其中 *Denitratisoma*、*Ferruginibacter*、*Limnobacter*、*Arcobacter* 及 *Ignavibacterium* 為好氧脫硝菌，*Nitrosomonas* 為硝化菌。另在厭氧污泥中之 *Smithella* 則為硫化物氧化菌，DMER64 推估為優越之木質素分解者，在甲烷化過程中扮演重要的角色 (Arthur *et al.*, 2022)。當以屬階層所注釋到的物種資訊進行線性組合降維分析時，可觀察貢獻度較大的關鍵物種，如 AS1 之關鍵菌屬為 *Arcobacter* 與 *Denitratisoma*；AS2 與 AS3 關鍵菌屬為 *Ferruginibacter*；AS4 關鍵菌屬則為 *Smithella* 與 DMER64 (圖 8)。另外，尚有其他為數眾多特性不明的菌株。因此，畜牧場三段式廢水處理設施利用多種微生物降解有機污染物，並可減少廢水中的氮素。另藉由高通量 DNA 定序技術與生物資訊分析，可發現廢水處理中重要之微生物種類。此外，養豬廢水處理之活性污泥經過相關的研究指出，可跨域應用於不同產業廢水的處理，如石化業廢水經過畜牧污泥的植種應用，可降低廢水中之 COD，並俾益於減少工業廢水處理時間與維持處理系統微生物穩定性 (鄭等, 2020)。另有研究指出，活性污泥亦為探勘新穎酵素的重要生物資源之一 (Liaw *et al.*, 2010; Kimura and Kamagata, 2016)。

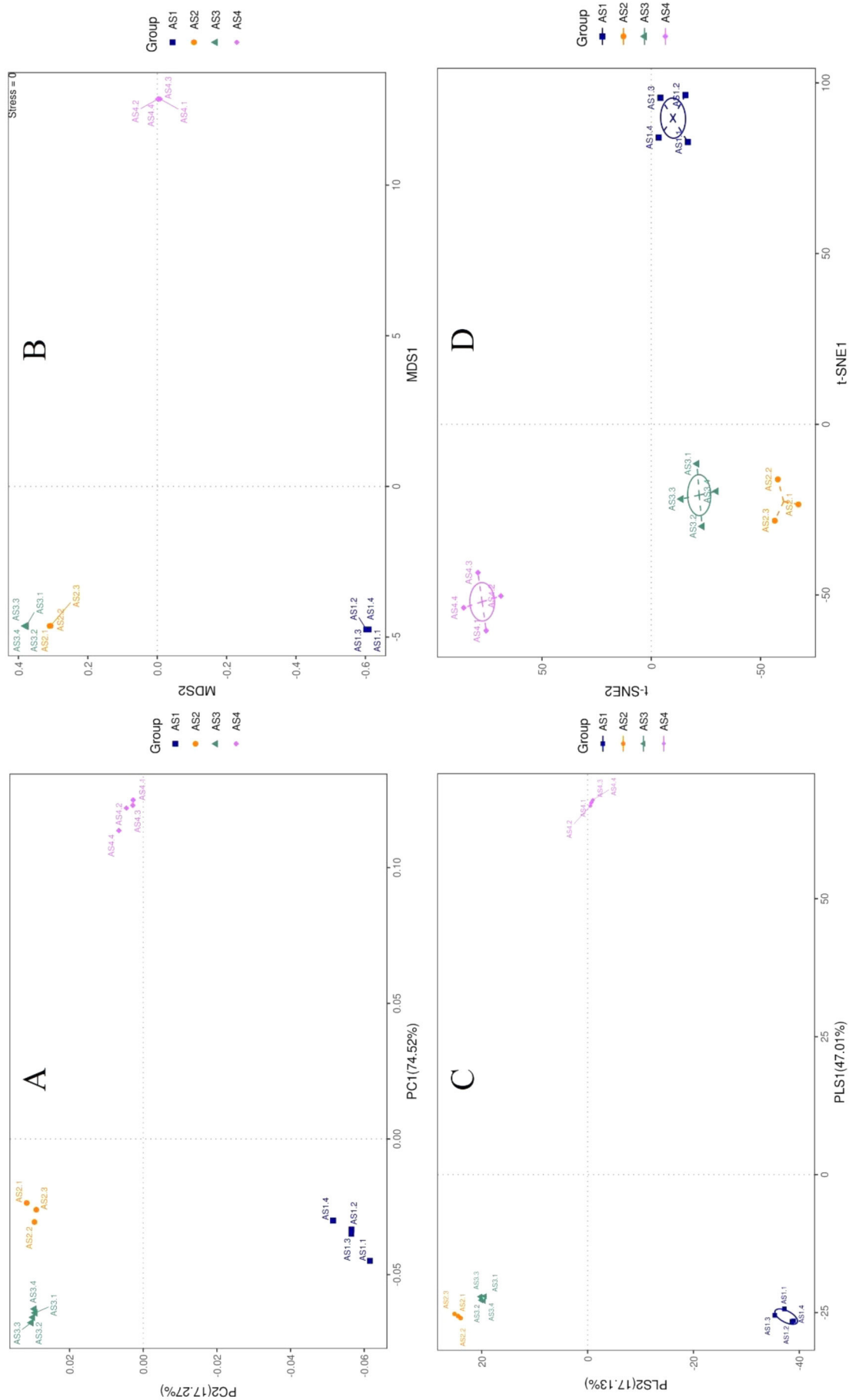


圖 3. 以 PCoA、NMDS、PLD-SA 及 t-SNE 分析樣品組間與組內之差異性。
Fig. 3. Difference between and within groups by PCoA, NMDS, PLD-SA, and t-SNE analyses.
a: PCoA; b: NMDS; c: PLD-SA; d: t-SNE.

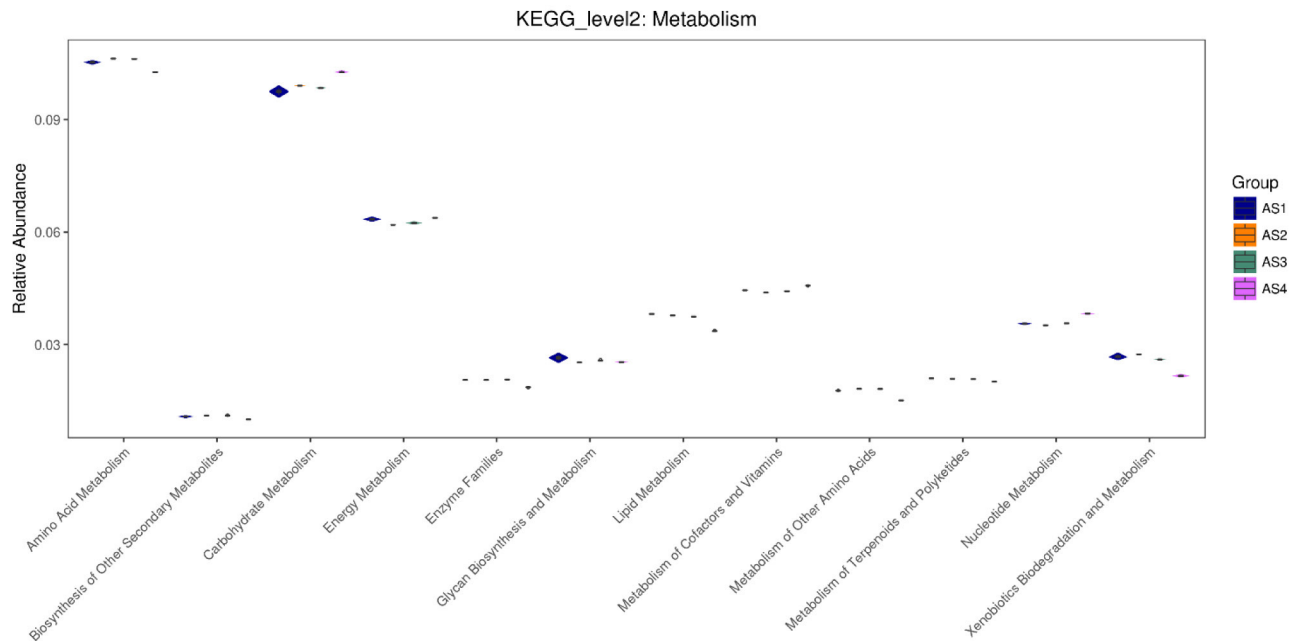


圖 4. 以 KEGG 資料庫預測污泥中微生物之功能。

Fig. 4. Function prediction of microorganisms in the sludge samples by PICRUSt based on KEGG database.

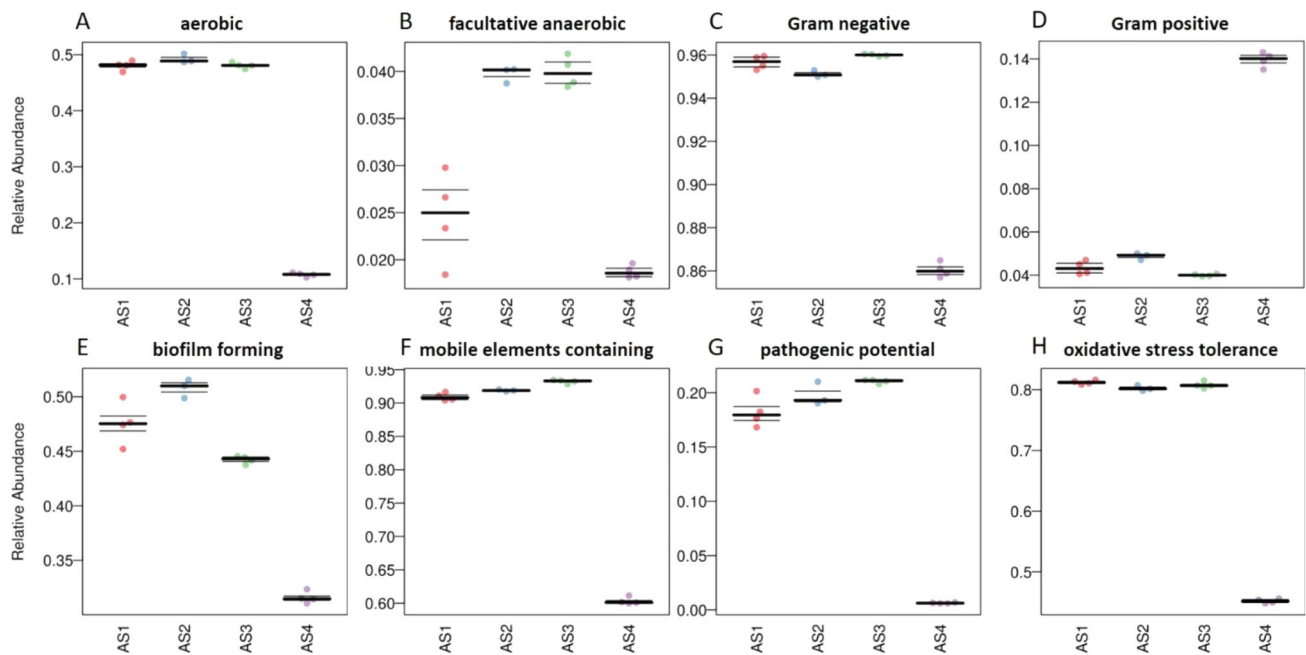


圖 5. 污泥微生物表型預測。

Fig. 5. Phenotype prediction of microorganisms in the sludge samples.

A: aerobic; B: facultative anaerobic; C: Gram negative; D: Gram positive; E: biofilm forming; F: mobile elements containing; G: pathogenic potential; H: oxidative stress tolerance.

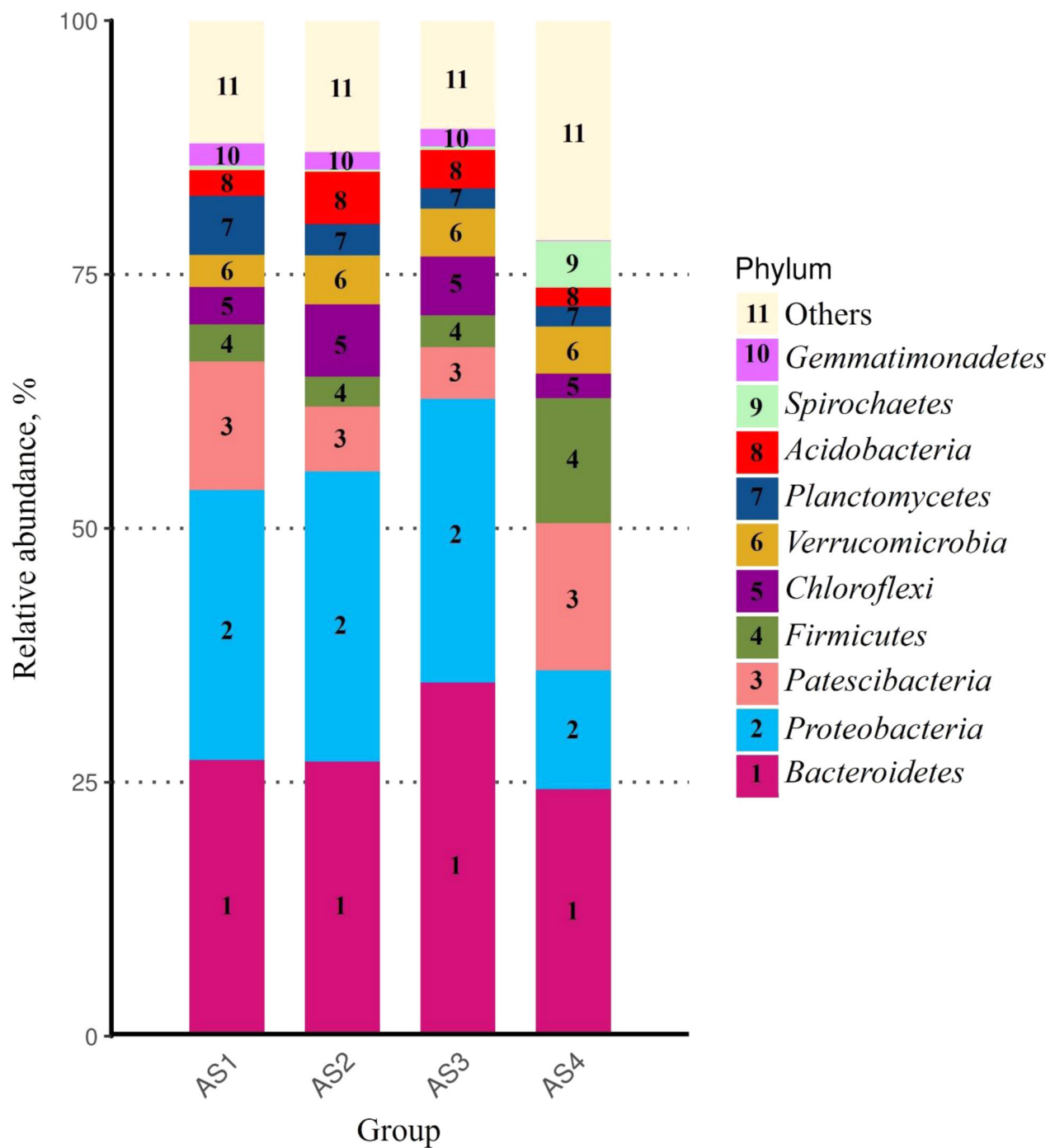


圖 6. 污泥樣品菌門之分布。

Fig. 6. Distribution of taxonomic affiliation at phylum level of sludge samples.

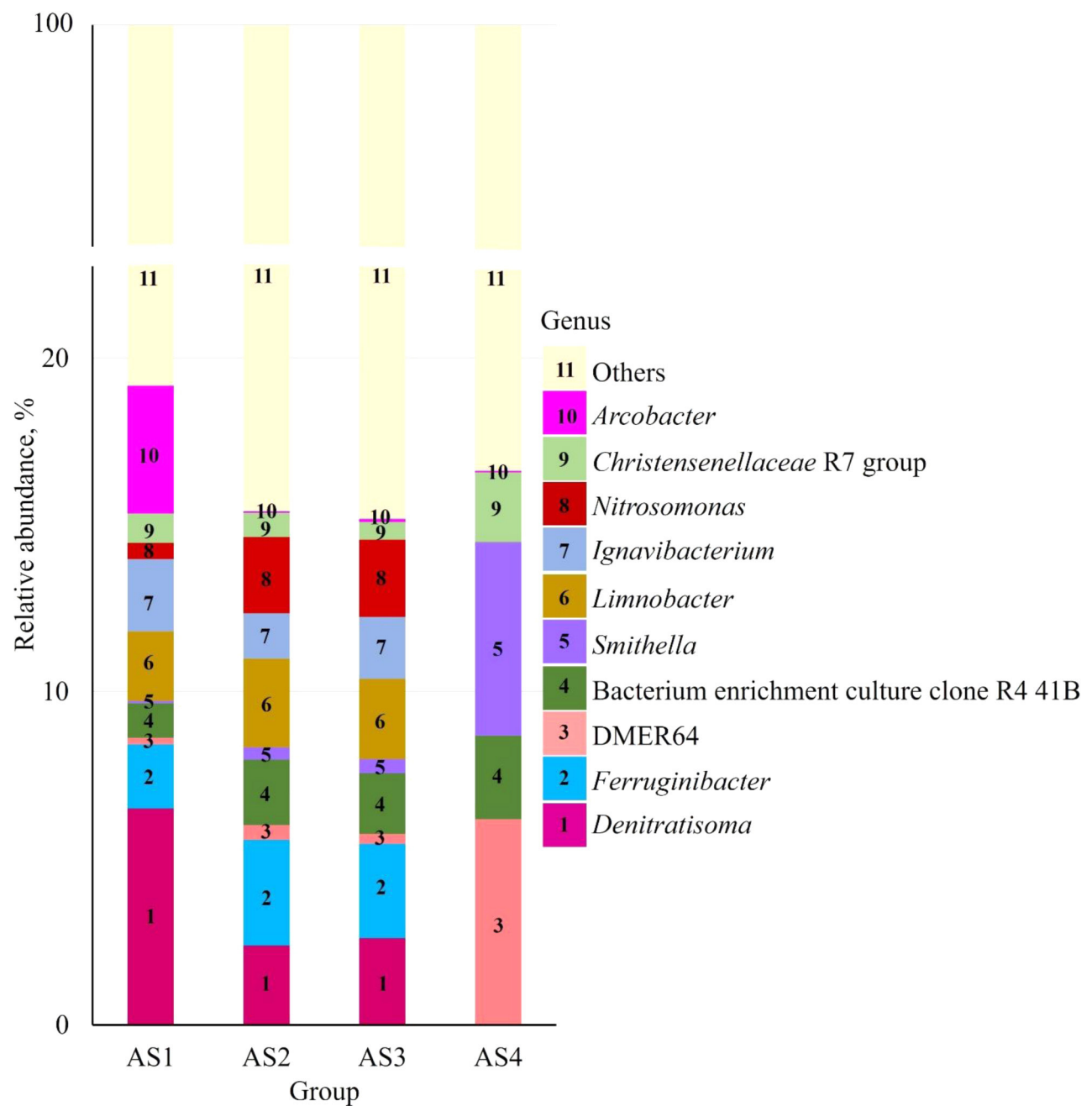


圖 7. 污泥樣品優勢菌屬之分布。

Fig. 7. Distribution of dominant genus in the sludge samples.

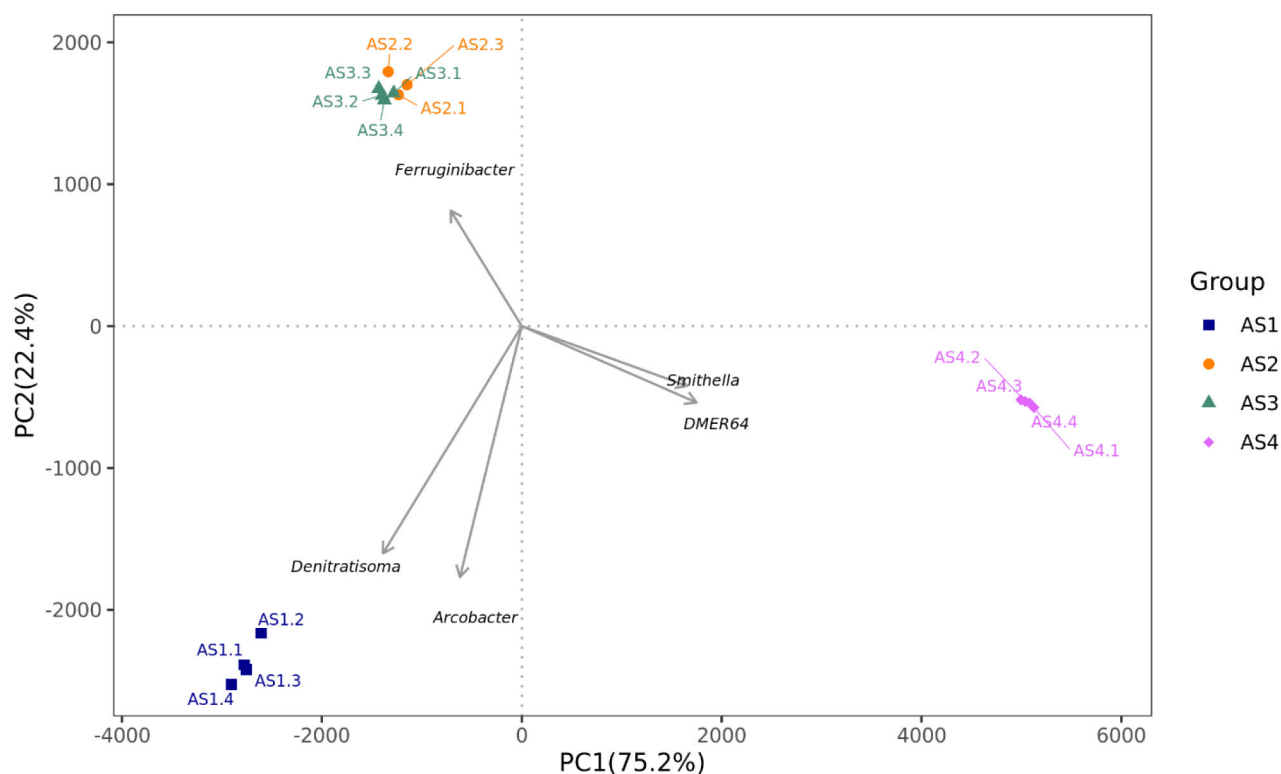


圖 8. 污泥樣品之屬階層 PCA 分析圖。

Fig. 8. Principal component analysis based on the operational taxonomic unit abundance at genus level in different sludge samples.

結 論

維持活性污泥微生物的穩定性，常為廢水處理成功的關鍵。本研究藉先進的 DNA 解析技術與資料分析功能，探討活性污泥的細菌多樣性，瞭解其中關鍵的優勢菌種，期可提供畜牧廢水處理設施之廢水處理狀態的診斷參考之一，進而改進廢水處理之效能，俾利生態環境與畜牧產業之永續發展。

參考文獻

- 行政院環境保護署。2014。放流水標準。中華民國 103 年 1 月 22 日。行政院環境保護署環署水字第 1030005842 號令修正發布第二條條文。
- 郭猛德、蕭庭訓、王政騰。2008。養豬三段式廢水與污泥處理技術。畜牧半月刊 81(5)：29-38。
- 程梅萍、蕭庭訓、廖仁寶。2009。豬糞尿厭氣處理污泥中之甲烷菌分布探討。畜產研究 42(3)：255-264。
- 廖仁寶、陳若菁、吳明哲、陳水財、程梅萍、蕭庭訓。2015。家禽屠宰場廢水處理活性污泥之細菌多樣性分析。畜產研究 48(4)：265-271。
- 鄭羽展、李志杰、林依杏、林振益。2020。植種養豬場厭氧污泥對一石化廢水厭氧單元化學需氧量降解之初探。中畜會誌 49(3)：253-266。
- Amanatidou, E., G. Samiotis, and D. Bellos. 2015. Net biomass production under complete solids retention in high organic load activated sludge process. *Bioresour. Technol.* 182: 193-199.
- Amann, R. I., W. Ludwig, and K. H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143-169.
- Arthur, R., S. Antonczyk, S. Off, and P. A. Scherer. 2022. Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of wheat straw in a CSTR system with 'Synthetic Manure': Impact of nickel and tungsten on methane yields, cell count, and microbiome. *Bioengineering (Basel)*. 9: 13.
- Chen, H. J. Y. Z. Lin, J. M. Fanjiang, and C. Fan. 2013. Microbial community and treatment ability investigation in AOA

- process for the optoelectronic wastewater treatment using PCR-DGGE biotechnology. *Biodegradation* 24: 227-243.
- Da Silva, M. L., M. E. Cantão, M. P. Mezzari, J. Ma, and C. W. Nossa. 2015. Assessment of bacterial and archaeal community structure in swine wastewater treatment processes. *Microb. Ecol.* 70: 77-87
- Good, I. J. 1953. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* 40: 237-264.
- Ijoma, G. N., R. Nkuna, A. Mutungwazi, C. Rashama, and T. S. Matambo. 2021. Applying PICRUSt and 16S rRNA functional characterisation to predicting co-digestion strategies of various animal manures for biogas production. *Sci Rep.* 11: 19913.
- Isazadeh, S., S. Jauffur, and D. Frigon. 2016. Bacterial community assembly in activated sludge: mapping beta diversity across environmental variables. *Microbiologyopen* 5: 1050-1060.
- Liaw, R. B., M. P. Cheng, M. C. Wu, and C. Y. Lee. 2010. Use of metagenomic approaches to isolate lipolytic genes from activated sludge. *Bioresour. Technol.* 101: 8323-8329.
- Kimura, N. and Y. Kamagata. 2016. A thermostable bilirubin-oxidizing enzyme from activated sludge isolated by a metagenomic approach. *Microbes Environ.* 31: 435-441.
- Kumar, H., Y. N. Jang, K. Kim, J. Park, M. W. Jung, and J. E. Park. 2020. Compositional and functional characteristics of swine slurry microbes through 16S rRNA metagenomic sequencing approach. *Animals (Basel)*. 10: 1372.
- Painter, H. A. and J. E. Loveless. 1983. Effect of temperature and pH value on the growth-rate constants of nitrifying bacteria in the activated-sludge process. *Water Res.* 17: 237-248.
- Qin, H., B. Ji, S. Zhang, and Z. Kong. 2018. Study on the bacterial and archaeal community structure and diversity of activated sludge from three wastewater treatment plants. *Mar. Pollut. Bull.* 135: 801-807.
- Rajasulochana, P. and V. Preethy. 2016. Comparison on efficiency of various techniques in treatment of waste and sewage water-A comprehensive review. *Resource-Efficient Technologies* 2: 175-184
- Shi, L., N. Liu, G. Liu G, and J. Fang. 2021. Bacterial community structure and dynamic changes in different functional areas of a piggery wastewater treatment system. *Microorganisms* 9: 2134.
- Singleton, D. R., M. A. Furlong, S. L. Rathbun, and W. B. Whitman. 2001. Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4374-4376.
- van Veen, W. L. 1973. Bacteriology of activated sludge, in particular the filamentous bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 39: 189-205.
- Wagner, M. and A. Loy. 2002. Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 218-227.
- Xu, W., V. R. Brand, S. Suresh, M. A. Jensen, R. W. Davis, C. S. Criddle, R. P. St Onge, and R. W. Hyman. 2020. Community members in activated sludge as determined by molecular probe technology. *Water Res.* 168: 115104.
- Yan, W., N. Wang, D. Wei, C. Liang, X. Chen, L. Liu, and J. Shi. 2021. Bacterial community compositions and nitrogen metabolism function in a cattle farm wastewater treatment plant revealed by Illumina high-throughput sequencing. *Environ. Sci. Pollut. Res Int.* 28: 40895-40907.
- Yang, Y., L. Wang, F. Xiang, L. Zhao, and Z. Qiao. 2020. Activated sludge microbial community and treatment performance of wastewater treatment plants in industrial and municipal zones. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 17: 436.
- Yavuz, H. and S. S. Çelebi. 2000. Effects of magnetic field on activity of activated sludge in wastewater treatment. *Enzyme Microb. Technol.* 26: 22-27.
- Zhang, B., X. Xu, and L. Zhu. 2018. Activated sludge bacterial communities of typical wastewater treatment plants: distinct genera identification and metabolic potential differential analysis. *AMB Express* 8: 184.
- Zhang, L., Z. Shen, W. Fang, and G. Gao. 2019. Composition of bacterial communities in municipal wastewater treatment plant. *Sci. Total Environ.* 689:1181-1191.
- Zhang, X., Z. Song, Q. Tang, M. Wu, H. Zhou, L. Liu, and Y. Qu. 2021. Performance and microbial community analysis of bioaugmented activated sludge for nitrogen-containing organic pollutants removal. *J. Environ. Sci. (China)* 101: 373-381.
- Zhou, S., C. Wei, L. Ke, and H. Wu. 2010. PCR-DGGE as a supplemental method verifying dominance of culturable microorganisms from activated sludge. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20: 1592-1596.

Analysis of bacterial diversity in activated sludge from livestock wastewater treatment by next-generation sequencing technology ⁽¹⁾

Ren-Bao Liaw ⁽²⁾ Ya-Ling Huang ⁽³⁾ Tzu-Hsuan Huang ⁽³⁾
Jo-Ching Chen ⁽⁴⁾ and Mei-Ping Cheng ⁽⁵⁾⁽⁶⁾

Received: Aug. 8, 2022; Accepted: Jan. 13, 2023

Abstract

The purpose of this study was to explore the bacterial diversity in activated and anaerobic sludge in livestock wastewater treatment facilities by next-generation sequencing, so as to understand the differences in bacterial community composition in different activated sludges, and to extend the utilization. Four sludge samples were collected, including 2 aerobic and 1 anaerobic samples collected in the hot season and 1 aerobic sample collected in the cool season. The microbial DNA in the four sludge samples was directly extracted by the method of ceramic bead shaking, and then the V3-V4 hypervariable regions of the 16S rRNA gene sequence was revealed by the next-generation sequencing method, and the bacterial diversity in the samples was analyzed by bioinformatics tools. The analysis results showed that the anaerobic sludge samples had the highest species abundance, with an average of 2,205 species, and the activated sludge samples ranged from 1,682 to 1,854 species. The bacteria in the activated sludge samples were *Bacteroidetes* and *Proteobacteria* with a higher proportion; the anaerobic sludge samples were *Bacteroidetes* and *Patiscibacteria*. Based on the OTU analysis of 4 sludge samples, top 10 genera with higher frequency included *Denitratisoma*, *Ferruginibacter*, DMER64, *Bacterium* enrichment culture clone R4-41B, *Smithella*, *Limnobacter*, *Ignavibacterium*, *Nitrosomonas*, *Christensenellaceae* R7 group, and *Arcobacter*. Besides, the results of PCoA (principal component analysis), NMDS (non-metric multidimensional scaling), PLS-DA (partial least squares discriminant analysis), and t-SNE (t-distributed stochastic neighbor embedding) analyses showed that the 4 samples could be divided into 3 groups, namely 2 aerobic samples collected in the hot season as the same group, the other one group of anaerobic sample, and another group of an aerobic sample collected in the cool season. In summary, revealing the microbial composition of sludge samples collected from the hot and cool seasons by next-generation sequencing analysis is an important approach, and the important information of dominant bacteria obtained in this study can be a reference for further research or applications.

Key words: Activated sludge, Bacterial diversity, Wastewater treatment.

(1) Contribution No. 2730 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

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

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

(4) Breeding and Genetics Division, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

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

(6) Corresponding author, E-mail: mpcheng@mail.tlri.gov.tw.

性別對商用紅羽土雞生長性能、血液生化值、屠體性狀及生產效益之影響⁽¹⁾

林正鏞⁽²⁾ 李秀蘭⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾

收件日期：111 年 6 月 15 日；接受日期：112 年 1 月 13 日

摘 要

本研究旨在比較商用紅羽土雞，不同性別之生長性能、血液性狀、屠體性狀及生產效益之差異，以推薦適合之上市週齡。選用 288 隻健康且體重相近之出生雛雞，經性別鑑定後依公、母進行分組，每處理 8 重複，每重複 18 隻，試驗為期 13 週。試驗期間提供相同之育雛期 (0 – 4 週齡)、生長期 (5 – 8 週齡) 及肥育期 (9 – 13 週齡) 飼糧與水，供雞隻自由攝取。結果顯示，商用紅羽土雞公雞於 8 及 13 週齡之體重與平均日增重及隻日飼料採食量顯著較母土雞為高 ($P < 0.05$)，且肥育期之飼料轉換率亦顯著較母土雞為佳 ($P < 0.05$)，而全期死亡率則顯著較母土雞為高 ($P < 0.05$)。商用紅羽土雞公雞於 4 週齡之血漿總膽固醇及肌酸酐濃度顯著較母土雞為高 ($P < 0.05$)，而 13 週齡之血漿三酸甘油酯濃度則顯著較母土雞為低 ($P < 0.05$)。商用紅羽土雞公雞於 5 – 8、9 – 13 及 0 – 13 週齡之飼料採食成本顯著較母土雞為多 ($P < 0.05$)，9 – 13 及 0 – 13 週齡之增重成本顯著較母土雞為少 ($P < 0.05$)，且 0 – 13 週齡之粗收益則均顯著較母土雞為多 ($P < 0.05$)。另商用紅羽土雞公雞之活體重、屠體重及屠宰率顯著較母土雞為高 ($P < 0.05$)，商用紅羽土雞母雞之腹脂比例則顯著較公土雞者為高 ($P < 0.05$)。綜上結果顯示，建議商用紅羽土雞公雞飼養到 12 – 13 週齡；母土雞則飼養到 8 – 9 週齡上市，可達到較佳之生產效益。

關鍵詞：屠體性狀、土雞、性別、生長效益。

緒 言

養雞產業是臺灣重要的畜牧產業之一，肉雞產業又可分為白肉雞 (broiler) 與有色肉雞 (country chicken)。2022 年養雞產業年產值約 761 億元，占畜產產值近 40.91%。臺灣土雞具有肉質優良且具有較好凝集性與高截切值之特性，深受國內消費者喜愛及青睞，尤其是烹調後之肉質甜美及具特殊風味，非常符合國人對美食之要求。依據行政院農業委員會 2022 年農業統計年報資料顯示臺灣有色肉雞供應屠宰數量約為 110,030 公噸，產值約 249 億元。紅羽土雞 (red-feathered Taiwan Country chicken) 飼養期約 12 週每隻體重約 2.94 kg，每隻粗收益 (雞肉及內臟) 為 210.10 元，高於白肉雞的 100.08 元 (飼養期約 5 週，體重 2.14 kg) 和黑羽土雞 (black-feathered Taiwan Country chicken) 的 176.06 元 (飼養期約 15 週，體重 2.25 kg) (行政院農業委員會，2021)，因此紅羽土雞為養雞產業中重要收益來源之一。

雞肉品質受營養、特性、飼養密度、基因型、年齡、性別和生產系統類型等之影響 (Mikulski *et al.*, 2011; Połtowicz and Doktor, 2012; Cömert *et al.*, 2016; Cygan-Szczegielniak *et al.*, 2019; Gálvez *et al.*, 2020)。性別是決定雞肉的物理性狀及雞隻生長和屠體性狀的重要因素 (Cygan-Szczegielniak *et al.*, 2019)。此外，雞隻性別會直接影響雞屠體性狀和肉質參數 (Cömert *et al.*, 2016; Cygan-Szczegielniak *et al.*, 2019; Goo *et al.*, 2019; Tumová *et al.*, 2021)，通常公肉雞具有較重的活體重及日增重，而這會影響屠體性狀及肌肉品質之相關性狀 (Maiorano *et al.*, 2012; Cygan-Szczegielniak *et al.*, 2019)。

為了迎合國人喜好及生產者為了降低飼養成本，育種者不斷的進行選育改良，促使商用紅羽土雞選拔早熟性與生長速度的情況下，是否會造成雞隻生理性狀之改變，過去白肉雞為了追求高飼效及生長速度不斷推動基因選拔改

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2731 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所產業組。

(3) 國立屏東科技大學生物資源研究所。

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

良，隨之而來的影響到白肉雞生理不平衡所衍生出許多問題，如骨骼缺陷增加 (Lilburn, 1994)、代謝失衡 (Olkowski, 2007)、繁殖性能低落 (Sarabia Fragoso *et al.*, 2013) 及免疫功能改變 (Cheema *et al.*, 2003) 等問題。本研究旨在探討及比較商用紅羽土雞不同性別之生長性能、血液與屠體性狀及生產效益，提供數據評估供未來研究及實際應用之參考。

材料與方法

本試驗於行政院農業委員會畜產試驗所高雄種畜繁殖場雞舍進行，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 101007 號申請核准在案。

I. 試驗動物與試驗設計

本試驗採用商用紅羽土雞 (臺禽生物科技股份有限公司，臺禽紅色 (E))，雛雞於孵化後經公、母鑑別選取健康且活力良好及體重相近之雛雞 288 隻，依性別分為公土雞及母土雞組，每組 8 欄，每欄 18 隻 ($409 \times 192 \text{ cm}$, 2.3 隻/m^2)。試驗期間採自然光照及平飼養，並提供相同之育雛期 (0 – 4 週齡，粗蛋白 22.12%，代謝能 3,136 kcal/kg)、生長期 (5 – 8 週齡，粗蛋白 19.7%，代謝能 3,133 kcal/kg) 及肥育期 (9 – 13 週齡，粗蛋白 17.61%，代謝能 3,133 kcal/kg) 飼糧與水，供雞隻自由攝取，飼糧組成及營養分析值如表 1。

II. 生長性能

- (i) 體重與採食量測量：試驗期間於第 4 週齡、8 週齡及 13 週齡秤重一次，並記錄雞隻採食量及計算飼料轉換率，【飼料攝取量 (g) ÷ 體增重 (g)】。
- (ii) 雞隻死亡率：於試驗期間每隔 4 週記錄雞隻死亡隻數，並計算雞隻死亡率。
- (iii) 每隻雞之粗收益計算

雞隻活體售價依中央畜產會 111 年 11 月 11 日提供之臺灣地區家禽產地每日交易行情計算，紅羽土雞北及中區平均價為 80.83 元/kg，紅羽土雞雛雞售價為 22 元/隻。現今紅羽土雞各階段飼料成本分別為育雛期 22.59 元/kg、生長期 20.57 元/kg 及肥育期 19.57 元/kg。

每隻雞之粗收益 = 【雞隻活體重 (g) × 每公克售價】－飼料成本－雛雞價格。

III. 血液生化值

試驗期間分別於 4、8 及 13 週齡進行採血，採血器每 mL 加入 50 μL 內含 heparin-Li 1,000 IU/mL 之 0.15 M NaCl 溶液，從翼靜脈採血，採血完成後離心 30 分鐘 ($1,500 \times g$, 5°C)，將血漿分裝後貯存於 -20°C 供血液性狀測定。測定血漿尿酸 (uric acid)、肌酸酐 (creatinine)、三酸甘油酯 (triglyceride) 及總膽固醇 (total cholesterol) 濃度，使用試劑套組 (Wako, Japan)，以血液自動分析儀 (Hitachi 7050, Japan) 測定之。

IV. 屠體性狀

試驗結束後，屠宰前經禁食 12 小時後，進行個別雞隻秤重。於合格電宰廠 (結風食品有限公司) 進行雞隻屠宰及振聲農業科技股份有限公司進行屠體性狀調查，屠宰雞隻經電昏、放血、脫毛、取下腹脂及取出內臟後，進行屠體重及腹脂重測定。

- (i) 屠體重測定：雞隻經電昏、放血、脫毛及取出內臟後之屠體加以稱重。
- (ii) 屠宰率測定：屠宰率 % = 屠體重 / 活體重 $\times 100$ 。
- (iii) 腹脂比例測定：腹脂重 / 活體重 $\times 100$ (腹脂指蓄積在坐骨、華氏囊及砂囊周圍之脂肪)。

V. 飼料營養組成分析

水分、粗蛋白質、粗脂肪及粗纖維之分析依中華民國國家標準－飼料檢驗法進行分析 (行政院經濟部標準檢驗局, 1986)。鈣、磷、胺基酸之分析依 AOAC (2000) 進行分析。

VI. 統計分析

試驗所得資料以統計分析系統 (Statistical Analysis System) 套裝軟體 (SAS, 2013) 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，以最小平方均值 (Least Squares Mean, LSM) 測定法比較各處理組間差異的顯著性。

表 1. 試驗飼糧組成

Table 1. The composition of the experimental diets

Items	Starter 0 — 4 weeks old	Grower 5 — 8 weeks old	Finisher 9 — 13 weeks old
Ingredients, %			
Yellow corn	55.75	59.72	64.26
Soybean meal (43.5%)	2.00	14.50	14.00
Soybean meal without hull	22.20	—	—
Full soybean meal	—	—	15.70
Full soybean meal without hull	12.50	22.50	—
Fish meal (65%)	2.50	—	—
Wheat meal	—	—	2.80
L-Lysine.HCl	0.03	—	0.01
DL-Methionine	0.13	0.08	0.04
Salt	0.40	0.40	0.40
Soybean oil	1.68	—	—
Limestone pulverized	1.33	1.45	1.37
Dicalcium phosphate	1.23	1.10	1.22
Choline-50%	0.05	0.05	—
Premix*	0.20	0.20	0.20
Calculate value, %			
Crude protein	22.12	19.70	17.61
ME, kcal/kg	3,136	3,133	3,133
Crude fat	6.25	6.24	5.57
Crude fiber	2.69	3.27	3.23
Calcium	0.99	0.93	0.86
Total phosphorus	0.68	0.61	0.58
Available phosphorus	0.46	0.37	0.35
Lysine	1.28	1.05	0.92
Methionine	0.48	0.38	0.32
Analyzed value, %			
Crude protein	22.05	18.80	18.10
Crude fat	6.99	6.67	5.78
Crude fiber	2.44	2.39	2.88
Calcium	1.09	1.01	0.95
Total phosphorus	0.64	0.56	0.57
Lysine	1.14	1.06	0.92
Methionine	0.40	0.34	0.28
Feed cost, NT\$/kg	22.59	20.57	19.57

* Supplied per kilogram of diet: Vitamin A, 10,000 IU; Vitamin D₃, 1,000 IU; Vitamin E, 25 IU; Vitamin K₃, 3 mg; Vitamin B₁, 3 mg; Riboflavin B₂, 5 mg; Vitamin B₆, 3 mg; Vitamin B₁₂, 0.03 mg; Folic acid, 3 mg; Calcium pantothenate, 10 mg; Niacin, 50 mg; Biotin, 0.1 mg; Iron, 70 mg; Copper, 5 mg; Manganese, 60 mg; Zinc, 60 mg; Selenium, 0.1 mg.

結果與討論

本研究在探討及比較商用紅羽土雞不同性別之生長性能、血漿生化值與屠體性狀及生產效益之差異，並推薦土雞適合之上市週齡。

I. 生長性能

商用紅羽土雞不同性別對生長性能之影響，列示於表 2。結果顯示，商用紅羽土雞公雞於 8 及 13 週齡之體重顯著較母土雞為重 ($P < 0.05$)，且各階段 (0 — 4 週齡除外) 及全期 (0 — 13 週齡) 之平均日增重及隻日飼料採

食量亦顯著較母土雞為高 ($P < 0.05$)。另商用紅羽土雞公雞肥育期之飼料轉換率亦顯著較母土雞為佳 ($P < 0.05$)，全期死亡率則顯著較母土雞為高 ($P < 0.05$)。報告指出，性別效應會影響雞隻體重 (Maiorano *et al.*, 2017; Cygan-Szczegielniak *et al.*, 2019)。Brewer *et al.* (2012) 和 Zuidhof *et al.* (2014) 報告指出，公肉雞之隻日增重較母肉雞佳，本試驗結果與其相符。趙等 (2005) 研究指出，紅羽土雞飼養至 13 – 14 週齡上市時，公與母雞體重分別可達 3.0 與 2.6 kg 以上，其飼料轉換率則分別為 2.42 – 2.56 與 2.63 – 2.85 之間。本試驗結果顯示，公母飼養至 13 週齡上市體重分別為 3.4 與 2.8 kg，其飼料轉換率則分別為 2.78 與 3.09，因本試驗之趙等 (2005) 研究之結果差。目前臺灣商用土雞生長效率較以往研究報告者 (李及陳, 1998; 李及黃, 1985) 改進很多。另李 (1992) 及李等 (1997) 報告指出，紅羽土雞於 12 週齡過後繼續生長，則可能受到接近性成熟的影響而開始堆積脂肪，堆積脂肪將會使飼料轉換率變差，這可能是造成紅羽土雞後期飼料轉換率表現不如前期的原因。本試驗結果亦顯示，商用紅羽土雞母雞於 13 週齡時血漿三酸甘油酯 (表 3) 及腹脂率 (表 4) 顯著較公雞為高 ($P < 0.05$)。Burke and Henry (1997) 指出，雛雞的孵出體重受蛋大小影響，臺灣紅羽土雞的選拔著重在雞隻的早熟性及快速生長，可能因此造成紅羽土雞在 12 週齡前的飼料轉換率表現較佳。而公土雞死亡率顯著較母土雞高之原因，可能與其體重較重及接近性成熟後打鬥增加有關 (李, 1992)。另 Leitner *et al.* (1989) 報告指出，兩性之間體液和細胞介導的免疫反應活性的差異，母肉雞 T 和 B 淋巴細胞的活性及免疫反應皆比公肉雞佳，故肉雞死亡率與性別相關的差異可能是由於雄性免疫反應效率較低所致，此結果與本試驗相符，而李等 (2001) 指出，2001 年檢定商用土雞的結果顯示，商用紅羽土雞公雞的育成率在 85.1 – 95.9% 之間，母雞則在 86.8 – 99.1%，與本試驗有相似的結果。

表 2. 商用紅羽土雞公、母生長性能之比較 (0 – 13 週齡)

Table 2. Comparison of male and female birds on the growth performances in red feather native chickens during 0 to 13 weeks of age

Items	Male	Female	SE
Live body weight, g			
Chick weight	39.5	39.8	0.06
4 week old	551.5	527.1	8.30
8 week old	1,844.0 ^a	1,612.7 ^b	40.24
13 week old	3,454.4 ^a	2,798.4 ^b	59.37
Gain weight, g/day/bird			
0 – 4 week old	19.0	18.0	0.54
5 – 8 week old	46.2 ^a	38.8 ^b	1.04
0 – 8 week old	32.8 ^a	28.6 ^b	0.73
9 – 13 week old	46.0 ^a	33.9 ^b	1.11
0 – 13 week old	37.9 ^a	30.7 ^b	0.66
Feed intake, g/day/bird			
0 – 4 week old	46.8	45.0	0.75
5 – 8 week old	99.4 ^a	83.9 ^b	1.49
0 – 8 week old	73.6 ^a	64.8 ^b	1.01
9 – 13 week old	153.2 ^a	139.6 ^b	1.42
0 – 13 week old	104.5 ^a	93.9 ^b	1.56
Feed conversion ratio, feed/gain			
0 – 4 week old	2.49	2.52	0.07
5 – 8 week old	2.18	2.17	0.05
0 – 8 week old	2.26	2.28	0.05
9 – 13 week old	3.39 ^b	4.17 ^a	0.19
0 – 13 week old	2.78	3.09	0.09
Mortality, %			
0 – 4 week old	0.7	0.7	0.49
5 – 8 week old	0.7	0.0	0.39
0 – 8 week old	1.4	0.7	0.64
9 – 13 week old	3.5	0.0	0.82
0 – 13 week old	4.9 ^a	0.7 ^b	0.92

^{a, b} Means within the same row without the same superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

表 3. 商用紅羽土雞不同性別之血液生化值之比較 (0 – 13 週齡)

Table 3. Comparison of male and female birds on the blood characteristics in red feather native chickens during 0 to 13 weeks of age

Items	Male	Female	SE
Uric acid, mg/dL			
4 week old	7.04	6.07	0.28
8 week old	4.13	3.83	0.18
13 week old	4.33	4.78	0.17
Total cholesterol, mg/dL			
4 week old	216.35 ^a	191.00 ^b	3.07
8 week old	190.46	182.49	3.56
13 week old	160.87	168.10	2.98
Triglyceride, mg/dL			
4 week old	58.62	51.34	2.57
8 week old	26.05	27.25	1.48
13 week old	22.84 ^b	30.54 ^a	1.25
Creatinine, mg/dL			
4 week old	0.38 ^a	0.35 ^b	0.01
8 week old	0.35	0.32	0.01
13 week old	0.36	0.34	0.01

^{a, b} Means within the same row without the same superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

表 4. 商用紅羽土雞不同性別屠體性狀及生產效益之比較

Table 4. Comparison of male and female birds on the carcass traits and yield earnings in red feather native chickens at 13 weeks of age

Items	Male	Female	SE
Carcass traits			
Live weight, g	3,396 ^a	2,735 ^b	45.08
Carcass weight, g	2,899 ^a	2,254 ^b	36.84
Dressing, % B.W.	85.47 ^a	82.44 ^b	0.44
Abdominal fat weight, % B.W.	0.77 ^b	1.80 ^a	0.18
Feed cost, NT\$ / birds			
0 – 4 week old	29.60	28.46	0.84
5 – 8 week old	57.25 ^a	48.32 ^b	1.56
9 – 13 week old	104.93 ^a	95.62 ^b	1.10
0 – 13 week old	191.79 ^a	172.41 ^b	1.95
Gain weight cost, NT\$ / birds			
0 – 4 week old	56.25	56.93	0.76
5 – 8 week old	44.84	44.64	0.83
9 – 13 week old	66.34 ^b	81.61 ^a	1.69
0 – 13 week old	58.13 ^b	64.61 ^a	0.82
Earnings, NT\$ / birds			
at 8 week olds	38.67 ^a	30.17 ^b	2.95
at 13 week olds	62.56 ^a	29.46 ^b	3.28

^{a, b} Means within the same row without the same superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

由本試驗結果顯示，商用紅羽土雞母雞 9 – 13 週齡之飼料轉換率會顯著變差，商用紅羽土雞公雞 9 – 13 週齡之死亡率則顯著增加，應納入出售週齡考量。

II. 血液生化值

表 3 列示商用紅羽土雞不同性別之血液生化值之比較。在不同階段商用紅羽土雞不同性別血漿尿酸濃度皆無顯著差異。商用紅羽土雞公雞在 4 週齡之總膽固醇及肌酸酐濃度含量較母土雞為高 ($P < 0.05$)，商用紅羽土雞公雞於 13 週齡時血漿三酸甘油酯濃度顯著較母土雞為低 ($P < 0.05$)。家禽由於缺乏尿素循環中所必須的胺基甲醯磷酸合成酶 (carbamoyl phosphate synthetase)，故無法如哺乳動物般合成尿素，而以尿酸型態為體內氮化合物的主要終產物 (Karasawa, 1984)，因此血漿尿酸濃度可做為家禽對蛋白質利用情形之指標。Bogin (1992) 指出，食物中含較高量脂肪及蛋白質，血液中尿酸及膽固醇濃度會升高。本試驗使用之商用紅羽土雞公、母雞於 13 週齡時，其血漿尿酸、總膽固醇及肌酸酐濃度並無顯著影響。Kececi and Col (2011) 研究指出，土耳其的雉雞 (*Phasianus colchicus*) 其成雞之血漿總膽固醇和甘油三酯以及血漿尿酸水平均低於雛雞，本試驗之商用紅羽土雞公、母雞 4 週齡的血漿總膽固醇及三酸甘油酯濃度高於 8 週齡 (生長期) 及 13 週齡 (肥育期)，這種差異可能與生長和成熟所需的能量儲備有關。而商用紅羽土雞母雞於 13 週齡時其三酸甘油酯較公土雞高 ($P < 0.05$)，推估可能與母土雞較肥蓄積較多的腹脂及已接近性成熟，卵黃形成和卵形成過程中三酸甘油酯會增加有關。

III. 屠體性狀

商用紅羽土雞之公、母土雞屠宰率及腹脂率之比較，列示於表 4。結果顯示，商用紅羽土雞公雞在 13 週齡時活體重、屠體重及屠宰率顯著較母土雞為高 ($P < 0.05$)，而腹脂率則顯著較母土雞為低 ($P < 0.05$)。本研究結果與李等 (2001) 及 Lopez *et al.* (2011) 研究指出，公雞活體重及屠體重較母雞重之結果相符。在腹脂率方面，腹部脂肪與肌肉內脂肪有密切相關性，Tumová and Chodová (2018) 指出，腹部脂肪為最晚發育的組織，母肉雞腹部脂肪會隨著年齡增長而增加，Van der Klein *et al.* (2017) 指出，母肉雞腹脂率顯著的較公肉雞者高，這可能是受性腺激素影響導致母雞堆積較多的腹脂有關。

IV. 生產效益

表 4 列示商用紅羽土雞不同性別生產效益之比較。商用紅羽土雞公雞於 5 – 8、9 – 13 及 0 – 13 週齡之飼料成本顯著較母雞為高 ($P < 0.05$)，而 9 – 13 及 0 – 13 週齡之每公斤增重成本亦顯著較母雞為低 ($P < 0.05$)。因此，飼養商用紅羽土雞公雞每隻之粗收益顯著較商用紅羽土雞母雞為高 ($P < 0.05$)，每隻商用紅羽土雞公雞可多賺 33.10 元。臺灣土雞上市需具備性成熟的外觀，雞隻在接近性成熟時，體內會堆積脂肪使飼料轉換率變差 (李, 1992)。肉雞之飼料轉換率整體而言，受飼養期長短之影響，飼養日齡增加會因維持的能量損失增加而使飼料轉換率變差。另母雞接近性成熟時，母雞體內堆積脂肪，增重所需能量較高。而公雞在後期較好動，且有打鬥及架乘等行為，這些行為會增加能量的消耗致飼料轉換率變差 (李等, 1997；李與陳, 1998)。雖然有這些不利的因素存在，但與早期的土雞比較起來，商用紅羽土雞的飼料效率仍有明顯的改進。

由本研究結果顯示，商用紅羽土雞公雞比母雞有較高的活體重、平均日增重與隻日飼料採食量及屠宰率，且飼料轉換率亦較佳，致有較低的增重成本及較高的粗收益，但在 9 – 13 週齡有較高的死亡率。商用紅羽母土雞於 8 週齡及 13 週齡時，其粗收益分別為 30.17 元及 29.46 元，雖然商用紅羽母土雞之粗收益於 8 週及 13 週無顯著性差異，但考量商用紅羽土雞母雞於 9 – 13 週齡的飼料轉換率明顯變差及飼養管理的費用。就經濟層面而言，建議商用紅羽土雞公雞飼養到 12 – 13 週；商用紅羽土雞母雞飼養到 8 – 9 週即可上市，可降低生產成本，提高生產效益。

誌 謝

本試驗期間承行政院農業委員會畜產試驗所高雄種畜繁殖場梁桂容及陳接昌先生協助現場飼養管理、振聲農業科技股份有限公司及結風食品有限公司協助雞隻屠宰及分切工作與畜產經營系同仁協助，謹此誌謝。

參考文獻

中華民國國家標準－飼料檢驗法。1986。行政院經濟部標準檢驗局，臺北市。
行政院農業委員會。2022。農業統計年報。

- 李淵百。1992。臺灣的土雞。國立中興大學畜牧學系，臺中市。
- 李淵百、江碧玲、黃暉煌。1997。臺灣土雞最適上市週齡之研究。中畜會誌 26：285-296。
- 李淵百、吳憲郎、林旻蓉、涂海南、張秀鑾、項延埏、趙清賢、賴元亮、蘇夢蘭。2001。臺灣商用土雞性能介紹：生長與屠體性能。行政院農業委員會畜產試驗所，臺南市。
- 李淵百、陳志峰。1998。中興大學土雞品系推廣手冊。國立中興大學畜產學系，臺中市。
- 李淵百、黃暉煌。1985。物理環境、飼糧營養濃度與限食對臺灣三種主要肉用雞生產成績的影響。中畜會誌 14：1-15。
- 趙清賢、林旻蓉、賴元亮、蘇夢蘭、何玉珍、陳志峰、李淵百。2005。臺灣商用紅羽土雞與黑羽土雞的生長性能。中畜會誌 34：65-78。
- AOAC. 2000. Official methods of analysis (17th Ed.), Association of official analytical chemists, Washington, D. C.
- Bogin, E. 1992. Handbook for veterinary clinical chemistry. New York, Kodak Publ. USA.
- Brewer, V. B., V. A. Kuttappan, J. L. Emmert, J. F. C. Meullenet, and C. M. Owens. 2012. Big-bird programs: effect of strain, sex, and debone time on meat quality of broilers. Poult. Sci. 91: 248-254.
- Burke, W. H. and M. H. Henry. 1997. Characteristics of the pectoralis superficialis and semimembranosus of broiler strain chickens, Bantam chickens, and the reciprocal crosses. Poult. Sci. 76: 767-773.
- Cheema, M., M. A. Qureshi, and G. B. Havenstein. 2003. A comparison of the immune response of a 2001 commercial broiler with a 1957 random bred broiler strain when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. Poult. Sci. 82: 1519-1529.
- Cömert, M., Y. Sayan, F. Kırkpınar, Ö. H. Bayraktar, and S. Mert. 2016. Comparison of carcass characteristics, meat quality, and blood parameters of slow and fast grown female broiler chickens raised in organic or conventional production system. Anim Biosci. 29: 987-997.
- Cygan-Szczegielniak D., G. Maiorano, B. Janicki, M. Buzala, K. Stasiak, M. Stanek, A. Roślewska, G. Elminowska-Wenda, J. Bogucka, and S. Tavaniello. 2019. Influence of rearing system and sex on carcass traits and meat quality of broiler chickens. J. Appl. Anim. Res. 47: 333-338.
- Gálvez, F., R. Domínguez, A. Maggolino, M. Pateiro, J. Carballo, P. De Palo, F. Barba, and J. Lorenzo. 2020. Meat quality of commercial chickens reared in different production systems: Industrial, Range and Organic. Ann. Anim. Sci. 20: 263-285.
- Goo, D., J. H. Kim, H. S. Choi, G. H. Park, G. P. Han, and D. Y. Kil. 2019. Effect of stocking density and sex on growth performance, meat quality, and intestinal barrier function in broiler chickens. Poult. Sci. 98: 1153-1160.
- Karasawa, Y. 1984. Appearance of infused ¹⁵N-ammonia in urinary nitrogenous compounds in chickens fed low and high protein diets. Jap. J. Zootech. Sci. 55: 699-701.
- Keçeci, T. and R. Çöl. 2011. Haematological and biochemical values of the blood of pheasants (*Phasianuscolchicus*) of different ages. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 35: 149-156.
- Leitner, G., E. D. Heller, and A. Friedman. 1989. Sex-related differences in immune response and survival rate of broiler chickens. Vet. Immunol. Immunopathol. 21: 249-260.
- Lilburn, M. S. 1994. Skeletal growth of commercial poultry species. Poult. Sci. 73: 897-903.
- Lopez, K. P., M. W. Schilling, and A. Corzo. 2011. Broiler genetic strain and sex effects on meat characteristics. Poult. Sci. 90: 1105-1111.
- Maiorano, G., K. Stadnicka, S. Tavaniello, C. Abiuso, J. Bogucka, and M. Bednarczyk. 2017. In ovo validation model to assess the efficacy of commercial prebiotics on broiler performance and oxidative stability of meat. Poult. Sci. 96: 511-518.
- Maiorano, G., A. Sobolewska, D. Cianciullo, K. Walasik, G. Elminowska-Wenda, A. Slawinska, S. Tavaniello, J. Zylinska, J. Bardowski, and M. Bednarczyk. 2012. Influence of in ovo prebiotic and symbiotic administration on meat quality of broiler chickens. Poult. Sci. 91: 2963-2969.
- Mikulski, D., J. Celej, J. Jankowski, T. Majewska, and M. Mikulska. 2011. Growth performance, carcass traits and meat quality of slower-growing and fast-growing chickens raised with and without outdoor access. Asian Australas. J. Anim. Sci. 24: 1407-1416.
- Olkowski, A. A. 2007. Pathophysiology of heart failure in broiler chickens: Structural, biochemical, and molecular characteristics. Poult. Sci. 86: 999-1005.

- Połtowicz, K. and J. Doktor. 2012. Effect of slaughter age on performance and meat quality of slow-growing broiler chickens. *Ann. Anim. Sci.* 12: 621-631.
- SAS. 2013. SAS user guide: Statistics. SAS Inst., Cary, NC.
- Sarabia Fragoso, J., M. Pizarro Díaz, J. Abad Moreno, P. Casanovas Infesta, A. Rodriguez-Bertos, and K. Barger. 2013. Relationships between fertility and some parameters in male broiler breeders (body and testicular weight, histology and immunohistochemistry of testes, spermatogenesis and hormonal levels). *Reprod. Domest. Anim.* 48: 345-352.
- Tumová, E. and D. Chodová. 2018. Performance and changes in body composition of broiler chickens depending on feeding regime and sex. *Czech J. Anim. Sci.* 63: 518-525.
- Tumová, E., D. Chodová, E. Skrivanová, K. Laloucková, H. Šubrtová-Salmonová, M. Ketta, V. Machander, and E. Cotozzolo. 2021. The effects of genotype, sex, and feeding regime on performance, carcasses characteristic, and microbiota in chickens. *Poult. Sci.* 100: 760-764.
- Van der Klein, S. A. S., F. A. Silva, R. P. Kwakkel, and M. J. Zuidhof. 2017. The effect of quantitative feed restriction on allometric growth in broilers. *Poult. Sci.* 96: 118-126.
- Zuidhof, M. J., B. L. Schneider, V. L. Carney, D. R. Korver, and F. E. Robinson. 2014. Growth, efficiency, and yield of commercial broilers from 1957, 1978, and 2005. *Poult. Sci.* 93: 2970-2982.

Effects of male and female chickens on the growth performances, blood characteristics, carcass traits and compare yield earnings for commercial red feather native chicken ⁽¹⁾

Cheng-Yung Lin ⁽²⁾ and Hsiu-Lan Lee ^{(2) (3) (4)}

Received: Jun. 15, 2022; Accepted: Jan. 13, 2023

Abstract

An experiment was carried out to compare growth performances, blood characteristics, carcass traits and compare yield earnings of male and female chickens for commercial red feather native chicken. To recommend the suitable market age for chickens. Two hundred and eighty-eight healthy commercial red feather native chickens at 0-day were used as experimental animals, with similar body weight, were selected and randomly assigned to either male or female groups, which were allocated into 8 repeats with 18 chickens in each pen (409 × 192 cm). All chickens were provided with the same starter (0-4 weeks of age), grower (5-8 weeks of age) and finisher (9-13 weeks of age) diets. Feed and water were provided and feeding was *ad libitum* for 13 weeks experimental period. The results showed that average gain weight and feed intake in male chickens was significantly greater than those female chickens in the finisher period ($P < 0.05$). Compared with female chickens, male chickens had a significantly lower feed conversion ratio in finishers ($P < 0.05$). In addition, the mortality was significantly higher ($P < 0.05$) in male chickens in all during all periods whereas the female chickens had significantly lower concentration of plasma total cholesterol and creatinine in the starter period ($P < 0.05$). Also, the plasma triglyceride concentration in finishers was significantly higher ($P < 0.05$) in female chickens than those male chickens in finisher period. The feed cost in the grower, finisher and full period in male chickens were significantly greater ($P < 0.05$). Whereas the female chickens had significantly higher per kilogram gain weight cost in the finisher and full period ($P < 0.05$). In addition, the earnings were significantly ($P < 0.05$) greater in male chickens in 13 weeks. In addition, the percentages of live weight, carcass weight and dressing were significantly higher ($P < 0.05$) in male chickens than those female chickens, but the percentages of abdominal fat weight was significantly higher in female chickens than those male chickens ($P < 0.05$). In conclusion, commercial red-feather male native chickens are raised for 12-13 weeks; female native chickens can be raised to the market for 8 weeks, which can achieve the best production benefits.

Key words: Carcass traits, Native chicken, Sexes, Yield earnings.

(1) Contribution No. 2731 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

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

(3) Graduate Institute of Bioresources, National Pingtung University of Science and Technology.

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

黃芩葛根對細胞抗發炎活性及荷蘭仔牛下痢之影響⁽¹⁾

李國華⁽²⁾ 林文宏⁽³⁾ 趙俊炫⁽²⁾ 林宗毅⁽²⁾ 陳志毅⁽²⁾⁽⁴⁾

收件日期：111 年 5 月 6 日；接受日期：112 年 2 月 1 日

摘 要

為探討具保健效果的植生素 (phytogenics)，本試驗旨在探討黃芩 (*Scutellaria baicalensis* Georgi) 與葛根 (*Pueraria lobate* (Willd.) Ohwi) 對細胞抗發炎活性及添加於仔牛飼糧對其下痢改善之效果。體外細胞試驗，將黃芩與葛根水萃液依不同濃度分別作用於巨噬細胞株 (mouse BALB/c macrophage RAW 264.7) 進行抗發炎活性之檢測。動物體內試驗則將 20 頭約 8 週齡之荷蘭種雌性仔牛隨機均分成兩組，分別為對照組：未添加黃芩葛根，平均體重 74.6 kg；試驗組：每日每頭添加 5 g 黃芩葛根 (1:1)，平均體重 74.1 kg，試驗為期 30 天，進行仔牛體重、精料採食量、乾草採食量、糞便分數及血清生化值之量測。細胞試驗結果顯示，添加 10% 黃芩水萃液組可抑制一氧化氮 (nitric oxide, NO) 與間白素 -6 (interleukin-6, IL-6) 的產生，相較於 LPS 正對照組分別可減少 47.8 及 81.6% 之生成量；在腫瘤壞死因子 - α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 方面則無抑制之效果。添加 10% 葛根水萃液組可抑制 IL-6 的產生，相較於 LPS 正對照組可減少 24.1% 之生成量；對 NO 與 TNF- α 之生成則無抑制效果。另添加 10% 之黃芩及葛根水萃液組對細胞存活率均無顯著影響。動物試驗結果顯示，飼糧中添加黃芩葛根 30 天之試驗組，相較於對照組有顯著提升仔牛之糞便分數 (3.2 ± 0.4 vs. 2.1 ± 0.6 , $P < 0.05$)，顯示對仔牛下痢有改善；但是在日增重、精料採食量、乾草採食量及血清生化檢測均未受到試驗處理影響。綜上，黃芩及葛根水萃液對細胞發炎激素的生成有抑制作用，具抗發炎活性。飼糧添加黃芩與葛根雖然對仔牛之生長性能與血清生化檢測無顯著影響，但對仔牛下痢情形有顯著改善之效果。

關鍵詞：細胞發炎激素、下痢、荷蘭仔牛、葛根、黃芩。

緒 言

仔牛育成率的高低攸關乳牛場經營規模的命脈，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 8 週左右之哺乳期後進行斷乳，再進入仔牛生長期迄至 6 月齡左右止，此飼養過程之轉換，仔牛因會受到環境的適應性、斷乳、飼糧轉換及社會位序的改變等因子的影響而造成極大的緊迫，在此緊迫壓力下就容易發生仔牛消化系統之不適及出現下痢 (diarrhea) 現象，如病情嚴重者甚至會引發死亡，造成酪農嚴重的經濟損失 (吳，2002)。根據美國 2007 年國家動物健康監測系統的報告 (USDA, 2008) 指出，在美國有 57% 離乳仔牛的死因是與下痢有關，在韓國也有相近的仔牛死亡率 (53.4%) 是與下痢有關 (Hur *et al.*, 2013)。在挪威每年仔牛產量為 280,000 頭，但在 2006 年仔牛死亡相關的經濟損失估算約為 1,000 萬美元 (Østerås *et al.*, 2007)。因此，仔牛下痢是一種普遍且常見的疾病，亦是造成全球酪農經濟損失的主因之一，另當仔牛斷乳後進入生長期的前 30 天，則是仔牛下痢好發之關鍵期 (沈，1987)。

當細菌或內毒素入侵動物體內後會引發一連串的免疫反應，促使巨噬細胞活化以對抗外來病原 (細菌或內毒素)，降低其對體內之傷害。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，被激活的巨噬細胞會參與炎症反應、增強吞噬作用與釋放 TNF- α 等細胞激素 (Hirayama *et al.*, 2017)。以內毒素 (endotoxin) 刺激巨噬細胞時，所生成的物質可分為三類：(1) 高反應性含氧分子 (reactive oxygen species, ROS)：如一氧化氮 (nitric oxide, NO)，(2) 脂質衍生物：包括血小板活化因子及發炎分子如白三烯素 (leukotrienes)、前列腺素 (prostaglandins) 及血栓凝集素 (thromboxan) 及 (3) 蛋白質：通常是間白素 (interleukin, IL，如 IL-1、IL-6、IL-8)、腫瘤壞死因子 - α (tumor necrosis

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2732 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所新竹分所。

(3) 仁德醫護管理專科學校口腔衛生科兼任助理教授。

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

factor- α , TNF- α) 及干擾素- γ (interferon- γ , IFN- γ)，其中 IL-1、IL-6 及 TNF- α 為促發炎細胞激素 (pro-inflammatory cytokines)，在急性發炎反應中扮演重要角色，這三種細胞激素會增加血管通透性，因而導致紅、腫、熱、痛等發炎反應 (inflammatory response)，為發炎反應之主要調節者，可持續刺激活化巨噬細胞以分泌更多的促發炎的細胞激素。文獻指出脂多醣 (lipopolysaccharide, LPS) 是革蘭氏陰性菌 (如大腸桿菌) 外膜的主要成分，也是一種內毒素，可間接經由免疫調節分子 (如 TNF- α 、IL-1 及 IL-6 等) 誘導動物產生強烈的免疫反應，所以常利用 LPS 進行體外巨噬細胞抗發炎物質之功效評估。

由於抗生素在動物保健及醫療上的過度使用，導致抗藥性病原菌的產生，造成全球性公衛問題，所以如何減少抗生素的使用為當前最重的研究課題。植生素 (phytochemicals) 具保健的功效，其中傳統的中藥草應用於人類及動物的疾病醫療保健，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，如山藥、白朮、甘草、大棗及桔梗等之粉末組合作為離乳仔豬飼料添加物，可提升多形性嗜中性球之免疫活性，改善仔豬下痢情形與提高生長性能 (黃, 2009)。Abdallah *et al.* (2019) 研究指出，傳統中草藥 (traditional Chinese herbal medicine, TCHM) 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。當動物受到病原體感染入侵時，最先引起的就是發炎反應，造成組織之病理性傷害如腸道發炎、腸黏膜及絨毛受損，引發疾病出現臨床症狀。文獻指出具有抗發炎活性的中藥草，如黃芩及葛根 (徐等, 2013)，可能是減緩腸道發炎的潛在候選者。黃芩具清濕熱、瀉肺火，傳統文獻《傷寒論》指出黃芩具解表清裡之效，可用於動物下痢的解緩 (賈及黃, 2004)。Li *et al.* (2004) 亦指出黃芩是最廣泛被用於胃腸道的抗發炎中藥草之一。葛根具解肌退熱、生津止渴，經常被用於潰瘍性結腸炎 (ulcerative colitis, UC) 的解緩，UC 是一種炎症性腸病，伴有腹痛、腹瀉及直腸出血 (Guo *et al.*, 2017)。Jeon *et al.* (2020) 在人為誘發結腸炎之小鼠模型下給予葛根素進行處理，結果發現可減少小鼠結腸的病理解傷程度，以及抑制促炎細胞激素的分泌，證明葛根素應用在結腸炎小鼠模型中具有抗發炎之功效。由於黃芩及葛根對腸道之功效性廣，值得進一步應用於畜禽產業。因此本試驗進行黃芩及葛根對細胞抗發炎活性之探討，以及應用黃芩葛根添加於飼糧中評估其對荷蘭仔女牛下痢改善之功效。

材料與方法

I. 細胞抗發炎活性之體外試驗測定項目

- (i) 樣品萃取方法：試驗組之黃芩葛根粉購自科達製藥股份有限公司 (桃園市)，中文品名：黃芩、英文品名：Hwang Chyn (Huang Qin)、組成 / 成分：黃芩。中文品名：葛根、英文品名：Ger Gen (Ge Gen)、組成 / 成分：葛根。將黃芩及葛根樣品各在 60°C，經 8 – 10 h 烘乾，再以研磨機研磨過篩，粒徑大小為 160 目 (96 μ m)，並使其水分含量為 5% 以下。秤取乾燥研磨完成之黃芩粉或葛根粉 100 mg 添加純水 10 mL，於 25°C，150 rpm 震盪 2h 後，經 5,000 rpm 離心 5 min，收取上層水溶液即為黃芩或葛根水萃液原液 (將此原液濃度在本試驗定義為 100%)，提供進行後續之細胞測試，但未進行功能性成分分析。
- (ii) 細胞存活率測試 (viability of cells)：試驗所用之巨噬細胞 (mouse BALB/c macrophage RAW 264.7, BCRC 60001) 購於食品工業發展研究所，巨噬細胞於 37°C、5% 二氧化碳之 96 孔培養盤內培養 24 h，每孔置入 100 μ L 培養液，成分為 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco/BRL) 內含有 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco/BRL) 及 50 μ g/mL gentamicin (Gibco/BRL)，每孔內含 50,000 cells 與各種不同濃度的黃芩或葛根水萃液 (各 2.5、5 及 10%，此三濃度是從本試驗定義之 100% 水萃液原液稀釋而得)，利用 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenylthiazolium bromide (MTT assay) 來檢測細胞存活率 (Kao *et al.*, 2001)，並以未添加黃芩或葛根水萃液之細胞當作對照組。吸取 10 μ L MTT (5 mg/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 加入到培養液內，經過 4h、37°C 的培養，再加入等量的 0.04 N HCl 去溶解 MTT formazan (1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenyl formazan, Thiazolyl blue formazan)，接著設定在波長 570 nm 的條件下測試吸光值，以未被黃芩或葛根作用的細胞之 formazan 吸光值定義為 100%。
- (iii) 一氧化氮 (NO) 分析：巨噬細胞在 10.0 μ g/mL 細菌脂多醣 (Escherichia coli serotype O111:B4; Sigma-Aldrich, Cat. No. L4391) 作用 24 h 後，利用 Griess reaction 方法 (Yeh *et al.*, 2007)，檢測在細胞培養液中 NO 的濃度。取培養液 100 μ L/well，加入等量新鮮配置的 Griess 試劑 [由 Griess A 試劑 (0.1% N-(1-Naphthyl) ethylenediamine) 與 Griess B 試劑 (1% Sulfanilamide/5% H₃PO₄) 等比例混合, Sigma-Aldrich]，避光反應 10 分鐘後，用酵素免疫分析儀 (SpectraMax M2 Microplate Reader, Molecular Devices) 測量波長 550 nm 的吸光值。以新鮮之 100 μ L 細胞培養液當作空白對照組，未添加黃芩或葛根之細胞當作對照組。
- (iv) IL-6 及 TNF- α 分析：發炎相關細胞因子調節功效測試，分析黃芩與葛根水萃液 (2.5、5 及 10%) 在受到 10.0

$\mu\text{g/mL}$ LPS 活化的巨噬細胞株培養液中，以 ELISA 的方法檢測 IL-6 及 TNF- α 發炎細胞因子之生成量變化 (Yoon *et al.*, 2009)。本試驗採用之 Mouse IL-6 ELISA Max Deluxe Set 與 Mouse TNF- α ELISA Max Deluxe Set 分析試劑套組購買自 BioLegend 公司 (San Diego, California)，使用雙抗體三明治結合的方式，進行酵素連結免疫吸附分析法分析，第二級抗體連結有 Horseradish Peroxidase 酵素，透過 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine 呈色後，以盤式酵素免疫分析儀進行波長 450 nm 吸收光測定，以新鮮之 100 μL 細胞培養液當作空白對照組，未添加黃芩或葛根之細胞當作對照組，濃度參考標準品的呈色比較後，換算樣品中所含 IL-6 與 TNF- α 之濃度。

II. 動物體內試驗及飼養管理

使用荷蘭種仔女牛，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 74 kg) 已斷乳之荷蘭種仔女牛 20 頭，逢機均分為兩組，每頭每天添加 0 g (對照組， $n = 10$) 或 5 g 黃芩葛根粉 (黃芩：葛根 = 1:1) (試驗組， $n = 10$)。於每天早上提供少量精料時混合其中後餵飼。試驗設計採完全逢機試驗為期 30 天。試驗牛均分別群飼於同一棟牛舍之兩處牛欄 (分別為長 7 m、寬 5 m 及高 1.5 m)，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 (主含磨碎玉米、次為大豆粕、糖蜜、磷酸二鈣、碳酸氫鈉、維生素預混料及礦物預混料) (2 – 4 kg/day/head)，以及百慕達乾草及乾淨飲水則任食。試驗期間記錄每頭仔牛每天排便之糞便分數 (fecal consistency score)，範圍是 1 – 5 分，判定標準為水樣便 1 分、中等水便 2 分及正常糞便 3 分、糞便稍乾硬 4 分、糞便乾硬結塊 5 分 (Cockcroft, 2015)。仔牛生長性能分析為試驗前一天與試驗結束後一天，於上午 10 時於餵飼後測量所有牛隻之體重。紀錄每組牛隻每天之精料與乾草採食量。於試驗前一天與試驗結束後一天下午 3 時進行牛隻採血及血清生化值分析，從牛隻頸靜脈處經 75% 酒精棉擦拭消毒後，以 18 號針頭及無菌真空採血管 (不含任何抗凝血劑)，採集約 9 mL 血液於採血管內，靜置 10 分鐘後，離心 2,000 $\times g$ 、15 分鐘，分離血清於血清瓶中，並保存於 -20°C 的冰箱，直到要進行血清生化值分析時才解凍使用，以血清生化儀 (VITROS Chemistry System DT60 and DTSC, Johnson & Johnson Inc., USA) 根據使用說明方法操作，分析天門冬胺酸轉胺酶 (aspartate aminotransferase, AST)、丙胺酸轉胺酶 (alanine aminotransferase, ALT)、肌酸酐 (creatinine)、尿酸 (uric acid) 與血中尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 濃度，以評估飼糧添加黃芩葛根粉對仔牛之肝與腎功能指數的影響。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 (同意書編號：畜試竹動字 107-3)。

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，再以鄧肯式新多變測定法 (Duncan's new multiple rang test) 比較各組平均值間之差異顯著性 (SAS, 2003)。

結果與討論

I. 體外細胞試驗

利用體外細胞誘發發炎細胞激素之抗發炎活性測試，黃芩粉水萃液及葛根粉水萃液分別以 2.5、5 及 10% 三種不同濃度，進行發炎反應相關之細胞激素生成調節活性測試。分析受發炎刺激的巨噬細胞株培養液中，三種發炎細胞因子之生成量變化，包括 NO、IL-6 及 TNF- α ，結果顯示：

- (i) 黃芩粉水萃液對於受到細菌 LPS 活化的巨噬細胞株，其細胞存活率分析結果顯示，黃芩粉水萃液在本測試之添加濃度 (2.5、5 及 10%) 對巨噬細胞之存活率無顯著影響 (圖 1)。測其抗發炎活性方面，添加 2.5、5 及 10% 之黃芩水萃液皆顯著抑制 NO 及 IL-6 之生成量 (圖 2 及 3)，其中添加 10% 黃芩水萃液組對 NO 與 IL-6 的生成量分別為 52.2 (圖 2) 及 18.4 (圖 3)，相較於 LPS 正對照組極顯著減少 47.8 及 81.6% 的生成量 ($P < 0.001$)。然對 TNF- α 之生成則無下降之效果 (圖 4)。此結果與謝及周 (2012) 報告相似。Gong *et al.* (2018) 研究報告指出，黃芩萃取物中的黃酮類化合物，具抑制誘導 RAW264.7 巨噬細胞中之炎症生成反應。另黃芩在大鼠肺泡巨噬細胞株 (NR8383) 也得到相似之抗發炎作用，黃芩萃取物能抑制 NO、誘導型一氧化氮合成酶 (iNOS) 及核因子活化 B 細胞 κ 輕鏈增強子 (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- κ B) 等的釋放及表現緩解肺炎之功效 (Chen *et al.*, 2017)。
- (ii) 葛根粉水萃液對於受到細菌 LPS 活化的巨噬細胞株，其細胞存活率分析結果顯示，葛根粉水萃液在本測試之添加濃度 (2.5、5 及 10%) 對巨噬細胞之存活率無顯著影響 (圖 5)。其在抗發炎活性方面，僅可顯著降低

LPS 誘發細胞之 IL-6 之生成量。添加 10% 葛根水萃液對細胞之 IL-6 生成量為 75.9% (圖 7)，相較於 LPS 正對照組明顯減少 24.1% 的生成量 ($P < 0.05$)。對 NO (圖 6) 及 TNF- α (圖 8) 之生成則無抑制效果。

II. 黃芩葛根之動物試驗

飼糧添加黃芩葛根對荷蘭種仔牛乾草採食量、精料採食量及體重之影響如表 1。試驗結果顯示，每日每頭飼糧中添加 5g 黃芩葛根粉 30 天，試驗組之隻日精料採食量及乾草採食量分別為 3.70 ± 0.52 及 0.77 ± 0.18 kg；對照組則為 3.58 ± 0.48 及 0.70 ± 0.19 kg，兩組無顯著差異存在。在隻日增重方面，試驗組為 0.82 ± 0.10 kg；對照組則為 0.73 ± 0.19 kg，兩組無組間差異存在。在仔牛糞便檢測之糞便分數平均，試驗組糞便分數平均 3.2 ± 0.4 ，顯著高於對照組 2.1 ± 0.6 ($P < 0.05$)，顯示試驗組牛隻之下痢比率較少。本試驗在飼糧添加黃芩葛根的用量設計為每日每頭 5 g，從試驗結果顯示未有顯著提升牛隻增重的表現，但能降低仔牛下痢的發生率。Heller and Chigerwe (2017) 的報告指出仔牛下痢的機制有：1. 輪狀病毒 (rotavirus) 及冠狀病毒 (coronavirus) 感染造成消化道吸收下降；2. 滲透壓、分泌及蠕動異常；3. 消化道發炎：腸道通透性增加，提高體液從腸道流失。下痢的結果往往導致仔牛體液和離子不平衡，一旦超過患畜所能代償，會出現臨床症狀如虛弱、無力、躺臥、脫水、低血壓、代謝性酸血症及甚至循環衰竭 (休克) 而死亡。黃芩含小檗鹼、黃連素、甲基黃連鹼等多種生物鹼，具有很廣的抗菌範圍，尤其對痢疾桿菌、傷寒桿菌、綠膿桿菌、大腸桿菌、葡萄球菌及溶血性鏈球菌等均有較顯著的抑制作用，能增強白細胞的吞噬能力 (賈及黃，2004)。黃芩的藥理作用包括抗腫瘤，保肝和抗菌作用 (Saralamma *et al.*, 2017)，其所含之黃酮類化合物如黃芩苷、糖苷配基黃芩素及漢黃芩素是主要的生物活性物質。黃芩另具有抑制腸管蠕動等功能 (賈及黃，2004)。在葛根方面，主要含黃酮類物質：大豆素、大豆甙、葛根素、葛根素-7-木糖甙、葛根醇、葛根藤素及異黃酮甙 (賈及黃，2004)。《神農本草經》指出：葛根味甘，性平。主消渴、身大熱、嘔吐及諸痺。有助於治療感冒及腸胃疾病。徐等 (2013) 應用葛根於小鼠腹瀉之止瀉試驗，結果指出葛根可顯著改善小鼠腹瀉之作用。綜上，本試驗組仔牛有較低之下痢分數，推測可能與黃芩葛根內含之抗發炎等活性成分相關。

表 1. 飼糧添加黃芩葛根對荷蘭仔牛增重、精料、乾草採食量及糞便分數之影響

Table 1. Effects of adding *Scutellaria baicalensis* Georgi and *Pueraria lobate* (Willd.) Ohwi in diet on body weight, intake of concentrate and hay, and fecal consistency score of Holstein female 8-wk-old calves

Items	Control	Treatment ¹
No.	10	10
Initial weight, kg/head	$74.6 \pm 8.1^*$	74.1 ± 8.5
Final weight, kg/head	96.5 ± 14.9	98.7 ± 10.5
Body weight gain, kg/head	21.9 ± 11.1	24.3 ± 5.1
Daily gain, kg/head	0.7 ± 0.2	0.8 ± 0.1
Daily concentrate intake, kg/head	3.6 ± 0.5	3.7 ± 0.5
Daily hay intake, kg/head	0.7 ± 0.2	0.8 ± 0.2
Average fecal consistency score	2.1 ± 0.6^a	3.2 ± 0.4^b

*Mean \pm SD.

¹ Calves received diets with 5 g *Scutellaria baicalensis* Georgi and *Pueraria lobate* (Willd.) Ohwi powder administration (the ratio = 1:1) for 30 days.

^{a, b} Means with the different superscript differ ($P < 0.05$).

飼糧添加黃芩葛根對荷蘭種仔牛血清生化檢測值之影響如表 2。結果顯示，在血清生化指數之肝與腎 (AST、ALT、creatinine、uric acid 及 BUN) 功能方面，對照組 AST、ALT、creatinine、uric acid 及 BUN 試驗前 vs. 試驗後之平均值依序為 42.8 ± 11.5 vs. 43.1 ± 10.1 U/L、 37.3 ± 10.3 vs. 37.0 ± 9.2 U/L、 0.9 ± 0.1 vs. 0.8 ± 0.1 mg/dL、 1.0 ± 0.3 vs. 1.1 ± 0.3 mg/dL 及 6.2 ± 1.4 vs. 5.8 ± 1.2 mg/dL；試驗組 AST、ALT、creatinine、uric acid 及 BUN 試驗前 vs. 試驗後之平均值依序為 42.9 ± 10.8 vs. 40.2 ± 9.5 U/L、 44.3 ± 12.2 vs. 40.1 ± 8.6 U/L、 0.8 ± 0.1 vs. 0.7 ± 0.1 mg/dL、 1.2 ± 0.4 vs. 1.2 ± 0.3 mg/dL 及 5.9 ± 1.6 vs. 5.2 ± 1.2 mg/dL。兩組間無統計上之差異 ($P > 0.05$)，在試驗前與後兩組平均 AST、ALT、creatinine、uric acid 及 BUN 值皆在正常值範圍內 (沈，1987)，顯示餵食黃芩葛根粉牛隻在肝腎功能參考指數上沒有立即的影響。

表 2. 飼糧添加黃芩葛根對荷蘭種仔女牛之血清生化檢測值之影響

Table 2. The effects of addition of *Scutellaria baicalensis* Georgi and *Pueraria lobate* (Willd.) Ohwi on the clinical blood biochemical values of dairy calves

Item	Control (n = 10)		Treatment (n = 10)		Normal range ¹
	Before	After	Before	After	
AST (U/L)*	42.8 ± 11.5**	43.1 ± 10.1	42.9 ± 10.8	40.2 ± 9.5	21 – 100
ALT (U/L)	37.3 ± 10.3	37.0 ± 9.2	44.3 ± 12.2	40.1 ± 8.6	—
Creatinine (mg/dL)	0.9 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.1	< 1.5
Uric acid (mg/dL)	1.0 ± 0.3	1.1 ± 0.3	1.2 ± 0.4	1.2 ± 0.3	< 35
BUN (mg/dL)	6.2 ± 1.4	5.8 ± 1.2	5.9 ± 1.6	5.2 ± 1.2	2.9 – 8.9

* AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase; BUN: blood urea nitrogen.

** The data are given as mean ± SD.

¹ 沈永紹。1987。獸醫實驗診斷學提要。

結 論

在 LPS 誘導下的 RAW 264.7 巨噬細胞，添加 2.5、5 或 10% 之黃芩水萃液皆顯著抑制 NO 及 IL-6 的產生，而葛根水萃液在 5 及 10% 的濃度下能抑制 IL-6 的產生。飼糧添加黃芩葛根對荷蘭種仔女牛增重及血清生化肝腎功能指數無顯著影響，但使用的黃芩葛根的仔女牛具較低的糞便分數，對下痢有改善緩解之效，而其作用機制仍須再進行更深入之探討與研究，以臻更完善。

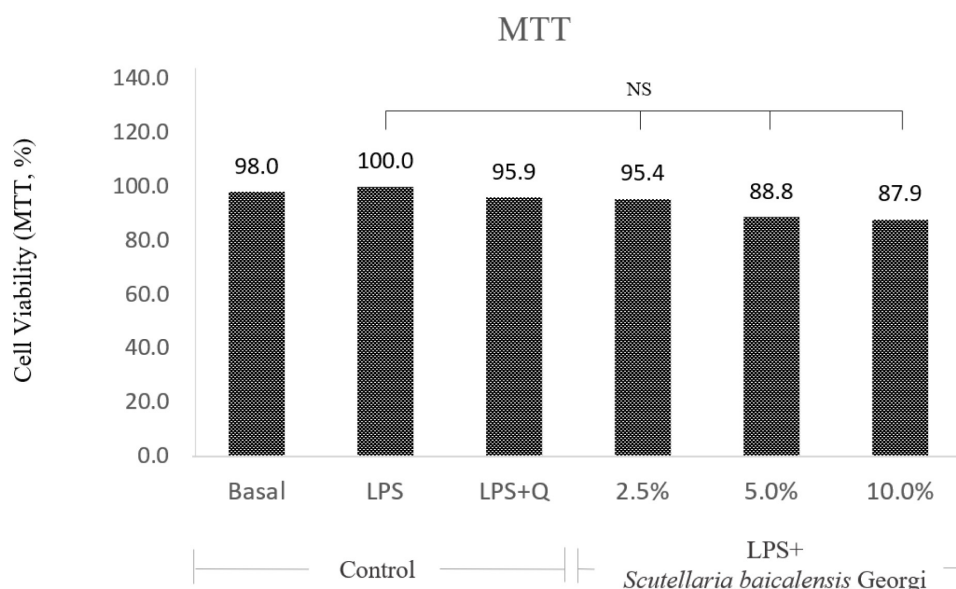


圖 1. 經 LPS (10.0 µg/mL) 處理的巨噬細胞株與黃芩粉水萃液 (2.5、5 或 10%) 共同培養 24 小時後對細胞存活率的影響。

Basal：空白對照組。

LPS：添加 LPS 但未添加黃芩粉水萃液之細胞當作對照組。

LPS + Q：LPS 與 Quercetin (槲皮素) 共同作用，為抗發炎陽性對照組。

LPS + *Scutellariae baicalensis* Georgi：LPS 與黃芩粉水萃液 (2.5、5 或 10%) 作用之試驗組。Fig. 1. The macrophage cells were treated by LPS (10.0 µg/mL) and *Scutellaria baicalensis* Georgi (SB) extract with various concentrations 2.5%, 5% and 10% for 24 hours to measure the effect on the cell viability.

Basal was the blank control group.

LPS was the cells with LPS but no SB extract added as the control group.

LPS + Q (Quercetin): an anti-inflammatory positive control group.

LPS + *Scutellaria baicalensis* Georgi: the treatment group of LPS and SB extract (2.5, 5 or 10%).

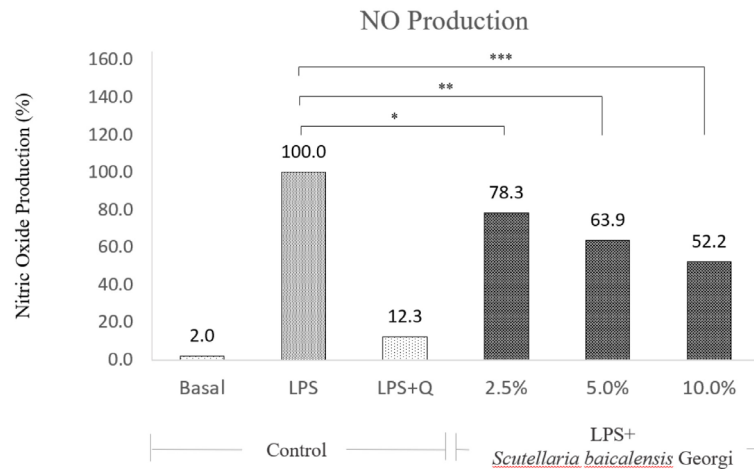


圖 2. 經 LPS (10.0 $\mu\text{g/mL}$) 處理的巨噬細胞株與黃芩粉水萃液 (2.5、5 或 10%) 共同培養 24 小時後對 NO 生成的影響。

Basal：空白對照組。

LPS：添加 LPS 但未添加黃芩粉水萃液之細胞當作對照組。

LPS + Q：LPS 與 Quercetin (槲皮素) 共同作用，為抗發炎陽性對照組。

LPS + *Scutellariae baicalensis* Georgi：LPS 與黃芩粉水萃液 (2.5、5 或 10%) 作用之試驗組。

Fig. 2. The macrophage cells were treated by LPS (10.0 $\mu\text{g/mL}$) and *Scutellaria baicalensis* Georgi (SB) extract with various concentrations 2.5%, 5% and 10% for 24 hours to measure the effect on the amounts of NO.

Basal was the blank control group.

LPS was the cells with LPS but no SB extract added as the control group.

LPS + Q (Quercetin): an anti-inflammatory positive control group.

LPS + *Scutellaria baicalensis* Georgi: the treatment group of LPS and SB extract (2.5, 5 or 10%).

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

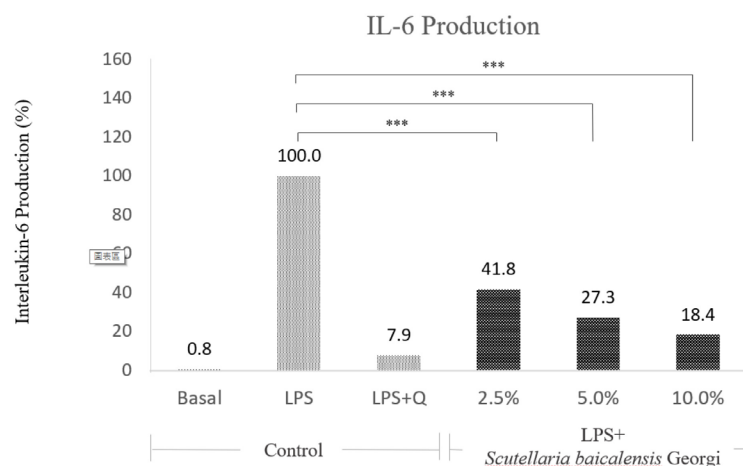


圖 3. 經 LPS (10.0 $\mu\text{g/mL}$) 處理的巨噬細胞株與黃芩粉水萃液 (2.5、5 或 10%) 共同培養 24 小時後對 IL - 6 生成的影響。

Basal：空白對照組。

LPS：添加 LPS 但未添加黃芩粉水萃液之細胞當作對照組。

LPS + Q：LPS 與 Quercetin (槲皮素) 共同作用，為抗發炎陽性對照組。

LPS + *Scutellariae baicalensis* Georgi：LPS 與黃芩粉水萃液 (2.5、5 或 10%) 作用之試驗組。

Fig. 3. The macrophage cells were treated by LPS (10.0 $\mu\text{g/mL}$) and *Scutellaria baicalensis* Georgi (SB) extract with various concentrations 2.5%, 5% and 10% for 24 hours to measure the effect on the amounts of IL-6.

Basal was the blank control group.

LPS was the cells with LPS but no SB extract added as the control group.

LPS + Q (Quercetin): an anti-inflammatory positive control group.

LPS + *Scutellaria baicalensis* Georgi: the treatment group of LPS and SB extract (2.5, 5 or 10%).

*** $P < 0.001$.

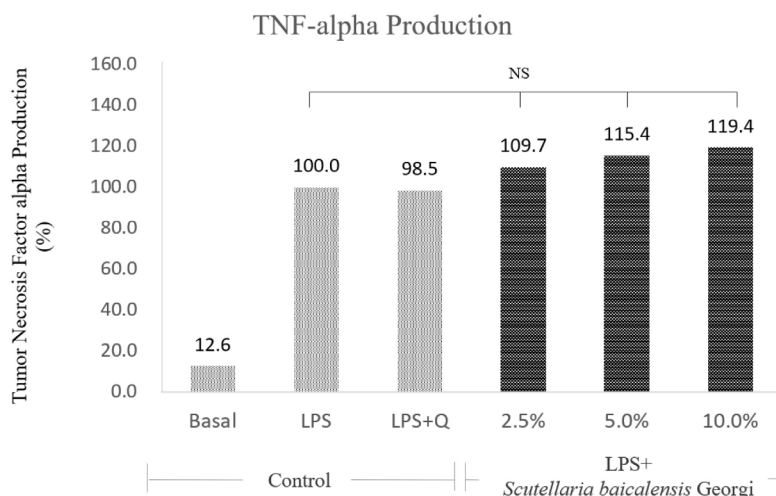


圖 4. 經 LPS (10.0 $\mu\text{g/mL}$) 處理的巨噬細胞株與黃芩粉水萃液 (2.5、5 或 10%) 共同培養 24 小時後對 TNF- α 生成的影響。

Basal：空白對照組。

LPS：添加 LPS 但未添加黃芩粉水萃液之細胞當作對照組。

LPS + Q：LPS 與 Quercetin (槲皮素) 共同作用，為抗發炎陽性對照組。

LPS + *Scutellariae baicalensis* Georgi：LPS 與黃芩粉水萃液 (2.5、5 及 10%) 作用之試驗組。

Fig. 4. The macrophage cells were treated by LPS (10.0 $\mu\text{g/mL}$) and *Scutellaria baicalensis* Georgi (SB) extract with various concentrations 2.5%, 5% and 10% for 24 hours to measure the effect on the amounts of TNF- α .

Basal was the blank control group.

LPS was the cells with LPS but no SB extract added as the control group.

LPS + Q (Quercetin): an anti-inflammatory positive control group.

LPS + *Scutellaria baicalensis* Georgi: the treatment group of LPS and SB extract (2.5, 5 or 10%).

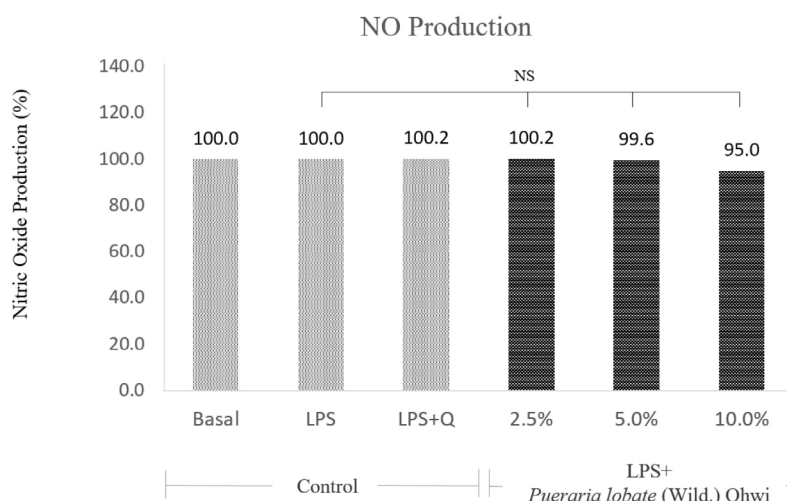


圖 5. 經 LPS (10.0 $\mu\text{g/mL}$) 處理的巨噬細胞株與葛根粉水萃液 (2.5、5 或 10%) 共同培養 24 小時後對細胞存活率的影響。

Basal：空白對照組。

LPS：添加 LPS 但未添加葛根粉水萃液之細胞當作對照組。

LPS + Q：LPS 與 Quercetin (槲皮素) 共同作用，為抗發炎陽性對照組。

LPS + *Pueraria lobate* (Willd.) Ohwi：LPS 與葛根粉水萃液 (2.5、5 或 10%) 作用之試驗組。

Fig. 5. The macrophage cells were treated by LPS (10.0 $\mu\text{g/mL}$) and *Pueraria lobate* (Willd.) Ohwi (PL) extract with various concentrations 2.5%, 5% and 10% for 24 hours to measure the effect on the amounts of cell viability.

Basal was the blank control group.

LPS was the cells with LPS but no PL extract added as the control group.

LPS + Q (Quercetin): an anti-inflammatory positive control group.

LPS + *Pueraria lobate* (Willd.) Ohwi: the treatment group of LPS and PL extract (2.5, 5 or 10%).

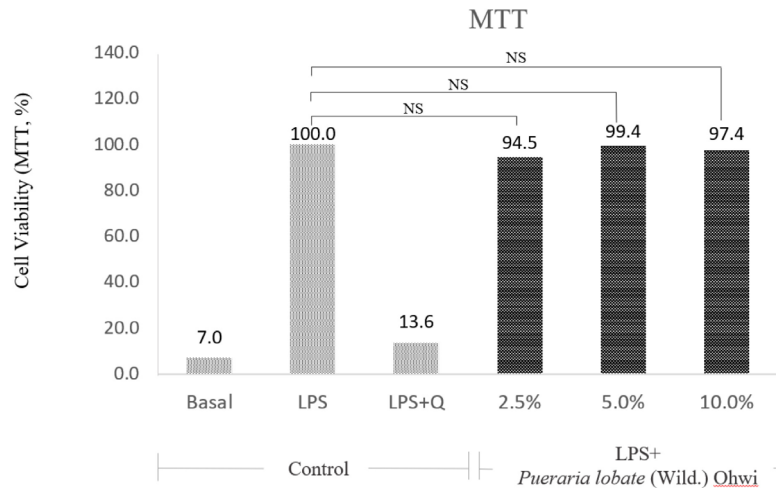


圖 6. 經 LPS (10.0 $\mu\text{g/mL}$) 處理的巨噬細胞株與葛根粉水萃液 (2.5、5 或 10%) 共同培養 24 小時後對 NO 生成的影響。

Basal：空白對照組。

LPS：添加 LPS 但未添加葛根粉水萃液之細胞當作對照組。

LPS + Q：LPS 與 Quercetin (槲皮素) 共同作用，為抗發炎陽性對照組。

LPS + *Pueraria lobate* (Willd.) Ohwi：LPS 與葛根粉水萃液 (2.5%、5% 或 10%) 作用之試驗組。

Fig. 6. The macrophage cells were treated by LPS (10.0 $\mu\text{g/mL}$) and *Pueraria lobate* (Willd.) Ohwi (PL) extract with various concentrations 2.5%, 5% and 10% for 24 hours to measure the effect on the amounts of NO.

Basal was the blank control group.

LPS was the cells with LPS but no PL extract added as the control group.

LPS + Q (Quercetin): an anti-inflammatory positive control group.

LPS + *Pueraria lobate* (Willd.) Ohwi: the treatment group of LPS and PL extract (2.5, 5 or 10%).

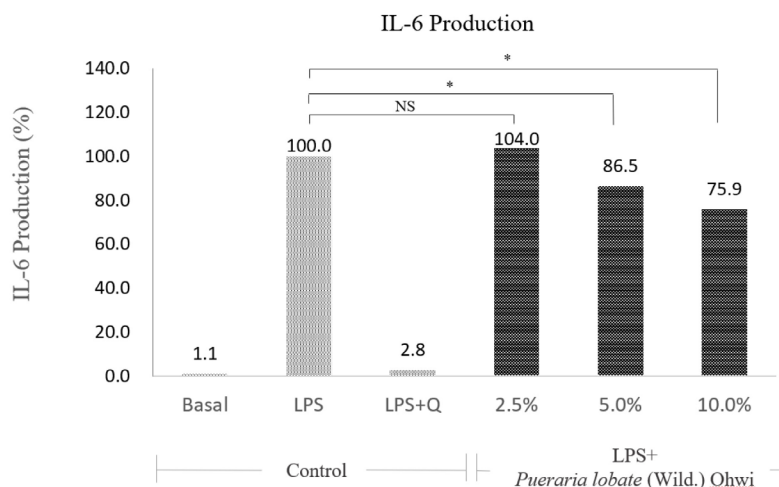


圖 7. 經 LPS (10.0 $\mu\text{g/mL}$) 處理的巨噬細胞株與葛根粉水萃液 (2.5、5 或 10%) 共同培養 24 小時後對 IL - 6 生成與細胞存活率的影響。

Basal：空白對照組。

LPS：添加 LPS 但未添加葛根粉水萃液之細胞當作對照組。

LPS + Q：LPS 與 Quercetin (槲皮素) 共同作用，為抗發炎陽性對照組。

LPS + *Pueraria lobate* (Willd.) Ohwi：為 LPS 與葛根粉水萃液 (2.5、5 或 10%) 作用之試驗組。

Fig. 7. The macrophage cells were treated by LPS (10.0 $\mu\text{g/mL}$) and *Pueraria lobate* (Willd.) Ohwi (PL) extract with various concentrations 2.5%, 5% and 10% for 24 hours to measure the effect on the amounts of IL-6.

Basal was the blank control group.

LPS was the cells with LPS but no PL extract added as the control group.

LPS + Q (Quercetin): an anti-inflammatory positive control group.

LPS + *Pueraria lobate* (Willd.) Ohwi: the treatment group of LPS and PL extract (2.5, 5 or 10%).

* $P < 0.05$.

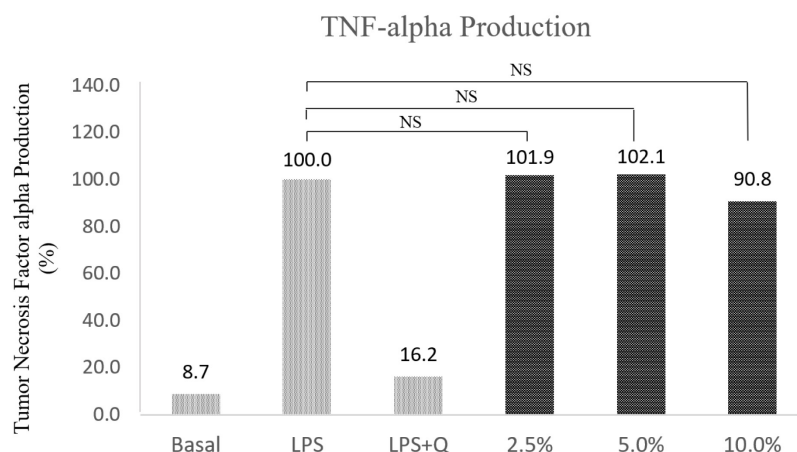


圖 8. 經 LPS (10.0 $\mu\text{g/mL}$) 處理的巨噬細胞株與葛根粉水萃液 (2.5、5 或 10%) 共同培養 24 小時後對 TNF- α 生成的影響。

Basal：空白對照組。

LPS：添加 LPS 但未添加葛根粉水萃液之細胞當作對照組。

LPS + Q：LPS 與 Quercetin (槲皮素) 共同作用，為抗發炎陽性對照組。

LPS + *Pueraria lobate* (Willd.) Ohwi：LPS 與葛根粉水萃液 (2.5%、5% 或 10%) 作用之試驗組。

Fig. 8. The macrophage cells were treated by LPS (10.0 $\mu\text{g/mL}$) and *Pueraria lobate* (Willd.) Ohwi (PL) extract with various concentrations 2.5%, 5% and 10% for 24 hours to measure the effect on the amounts of TNF- α .

Basal was the blank control group.

LPS was the cells with LPS but no PL extract added as the control group.

LPS + Q (Quercetin): an anti-inflammatory positive control group.

LPS + *Pueraria lobate* (Willd.) Ohwi: the treatment group of LPS and PL extract (2.5, 5 or 10%).

* $P < 0.05$.

誌 謝

本試驗承蒙行政院農業委員會之動物保健計畫 (108 農科 -21.1.2- 畜 -L1(1)) 經費之支持、本分所獸醫團隊及潘有恩同仁之現場牛隻採樣及試驗飼養管理，協助試驗如期完成，特此誌謝。

參考文獻

- 沈永紹。1987。獸醫實驗診斷學提要。華香園出版社，臺北市，pp. 310-311。
- 吳永惠。2002。牛病學。藝軒圖書出版社，臺北，pp. 154-159。
- 黃建璋。2009。評估中藥草作為早期離乳仔豬飼料添加物之效果。臺中，國立中興大學碩士論文。
- 謝明學、周瑞玲。2012。黃芩及其活性成分之抗發炎作用研究。元培學報 19：23-32。
- 徐郁雯、蕭淳方、許靜宜、黃耿侯、邵立珠。2013。葛根功效探討。藥學雜誌 29(3)：16-20。
- 賈敬敦、黃璐琦。2004。獸醫本草。中國醫藥科技出版社，北京，pp. 39-41。
- 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(1): 54-64.
- Chen, Q. Y., C. Q. Wang, Z. W. Yang, Q. Tang, H. R. Tan, X. Wang, and S. Q. Cai. 2017. Differences in anti-inflammatory effects between two specifications of *Scutellariae radix* in LPS-induced macrophages in vitro. *Chin. J. Nat. Med.* 15(7): 515-524.
- Cockcroft, P. D. 2015. *Bovine medicine*. Wiley Blackwell, Singapore, pp. 355-356.
- Gong, G., H. Wang, X. Kong, R. Duan, T. T. X. Dong, and K. W. K. Tsim. 2018. Flavonoids are identified from the extract of *Scutellariae radix* to suppress inflammatory-induced angiogenic responses in cultured RAW264.7 macrophages. *Sci. Rep.* 8(1): 17412-17420.
- Guo, B. J., Z. X. Bian, H. C. Qiu, Y. T. Wang, and Y. Wang Y. 2017. Biological and clinical implications of herbal medicine

- and natural products for the treatment of inflammatory bowel disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1401(1): 37-48.
- Heller, M. C. and M. Chigerwe. 2017. Diagnosis and treatment of infectious enteritis in neonatal and juvenile ruminants. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 34(1): 101-117.
- 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.
- Hur, T. Y., Y. H. Jung, C. Y. Choe, Y. I. Cho, S. J. Kang, H. J. Lee, K. S. Ki, K. S. Baek, and G. H. Suh. 2013. The dairy calf mortality: the causes of calf death during ten years at a large dairy farm in Korea. *Korean J. Vet. Res.* 53: 103-108.
- Jeon, Y. D., J. H. Lee, Y. M. Lee, and D. K. Kim. 2020. *Puerarin* inhibits inflammation and oxidative stress in dextran sulfate sodium-induced colitis mice model. *J. Biopha.* 124: 109847-109858.
- Kao, S. T., C. C. Yeh, C. C. Hsieh, M. D. Yang, M. R. Lee, H. S. Liu, and J. G. Lin. 2001. The Chinese medicine Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang inhibited proliferation of hepatoma cell lines by inducing apoptosis via G0/G1 arrest. *Life Sci.* 69: 1485-1496.
- Li, H. B., Y. Jiang, and F. Chen. 2004. Separation methods used for *Scutellaria baicalensis* active components. *J. Chr. B. Ana. Technol. Biomed. Life Sci.* 812(1): 277-290.
- Østerås, O., M. S. Gjestvang, S. Vatn, and L. Sølverød. 2007. Perinatal death in production animals in the Nordic countries -incidence and costs. *Acta. Vet. Scand.* 49(1): 14-22.
- Saralamma, V. V. G., H. J. Lee, G. E. Hong, H. S. Park, S. Yumnam, S. Raha, W. S. Lee, E. H. Kim, N. J. Sung, and S. J. Lee. 2017. Korean *Scutellaria baicalensis* Georgi flavonoid extract induces mitochondrially mediated apoptosis in human gastric cancer AGS cells. *Oncol. Lett.* 14: 607-614.
- SAS Institute. 2003. Statistics User Guide. Version 9.1. SAS Inst., Inc., Cary, NC.
- 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.
- USDA. 2008. Dairy 2007 Part II: Changes in the U.S. Dairy Cattle industry, 1991-2007. USDA-APHIS-VS, CEAH, Fort Collins, pp. 57-61.
- Yeh, C. C., S. J. Kao, C. C. Lin, S. D. Wang, C. J. Liu, and S. T. Kao. 2007. The immunomodulation of endotoxin-induced acute lung injury by hesperidin in vivo and in vitro. *Life Sci.* 80: 1821-1831.
- Yoon, S. B., Y. J. Lee, S. K. Park, H. C. Kim, H. Bae, H. M. Kim, S. G. Ko, H. Y. Choi, M. S. Oh, and W. Park. 2009. Anti-inflammatory effects of *Scutellaria baicalensis* water extract on LPS-activated RAW 264.7 macrophages. *J. Ethnopharmacol.* 125(2): 286-290.

The effects of *Scutellaria baicalensis* Georgi and *Pueraria lobate* (Willd.) Ohwi on the anti-inflammatory activity in cultured macrophage cells and on the incidence of diarrhea for Holstein heifer calf⁽¹⁾

Kuo-Hua Lee⁽²⁾ Wen-Hung Lin⁽³⁾ Chun-hsuan Chao⁽²⁾ Tsung-Yi Lin⁽²⁾ and Jih-Yi Chen⁽²⁾⁽⁴⁾

Received: May. 6, 2022; Accepted: Feb. 1, 2023

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the effects of *Scutellaria baicalensis* Georgi (SB) and *Pueraria lobate* (Willd.) Ohwi (PL) on anti-inflammatory activity of cells and on the incidence of calf diarrhea. The in vitro test of cell anti-inflammatory activity was to detect on macrophage cell line (mouse BALB/c macrophage RAW 264.7) treated by the water extracts of SB and PL. The results showed that the 10% SB water extract administration on cells could inhibit the production of nitric oxide (NO) and interleukin-6 (IL-6) by 47.8% and 81.6%, respectively. The tumor necrosis factor- α (TNF- α) was not affected. The 10% PL water extract administration inhibited the production of IL-6 by 24.1% and had no inhibitory effect on NO and TNF- α production. MTT assay showed that 10% concentration of SB and PL water extract administration had no significant effect on the survival rate of macrophages. A total of 20 calves (Holstein heifer) were randomly divided into two groups. Calves received diets with 0 (control group) or 5 g SB and PL powder administration (the ratio = 1:1) (treatment group) for 30 days. At start and end of the experiment, the hay intake, concentrate intake, body weight, fecal consistency score and the blood biochemical parameters were analyzed. The results showed that calves fed with SB and PL powder had a significantly ($P < 0.05$) increased fecal consistency score (3.2 ± 0.4 vs. 2.1 ± 0.6) compared to the control group. However, the hay intake, concentrate intake, body weight, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, creatinine, uric acid and blood urea nitrogen showed no significant difference between control group and treatment group. In conclusion, the 10% concentration of SB and PL water extract administration can inhibit the production of cell inflammatory cytokines. The results suggested the SB and PL could be good dietary supplements to lower the incidence of diarrhea for dairy calves.

Key words: Cytokines, Diarrhea, Holstein heifer calf, *Pueraria lobate* (Willd.) Ohwi, *Scutellaria baicalensis* Georgi.

(1) Contribution No. 2732 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 Oral Hygiene, Jen-Teh Junior College of Medicine, Nursing and Management, Miaoli 35664, Taiwan, R. O. C.

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

生長肥育豬飼養於水簾式豬舍對生長性能及 廢水處理水質之影響⁽¹⁾

蘇天明⁽²⁾⁽³⁾ 翁義翔⁽²⁾ 鍾承訓⁽²⁾ 劉威志⁽²⁾ 蕭庭訓⁽²⁾

收件日期：111 年 8 月 18 日；接受日期：112 年 2 月 4 日

摘 要

本研究旨在探討將生長肥育豬飼養於糞尿溝式水簾豬舍，對豬隻生長性能及對廢水經厭氧處理後水質和沼氣產量的影響。試驗期間使用平均體重 23 – 120 kg 的 LD (Landrace ♀ × Duroc ♂) 肉豬 64 頭，飼糧及飲用水皆採任食。每週以經過厭氧發酵的處理水沖洗糞尿溝 2 次，將原廢水儲存於儲水槽中，每日自動控制進水 500 L 於容積 10 m³ 之直立式厭氧槽。厭氧處理系統穩定後，每 2 週採集糞尿溝沖洗水、原廢水、厭氧後上澄液及厭氧槽混合液分析水質，測定沼氣產量與成分。豬隻肥育期在糞尿溝沖洗前及沖洗後，採集豬舍內水簾端 (P1)、豬舍第 2 – 3 欄間 (P2)、豬舍內風扇端 (P3) 及豬舍外風扇端 (P4) 空氣樣品測定氨氣濃度。結果顯示，試驗期間豬隻增重、採食量及飼料效率 (gain/intake) 分別為 0.90 kg/day/head、2.24 kg/day/head 及 0.40。糞尿溝沖洗後 P2 和 P3 的氨濃度較沖洗前為低 ($P < 0.05$)。試驗期間平均沼氣產量為 3,380 L/day，沼氣中甲烷及二氧化碳濃度分別為 62.0% 及 25.6%，分析厭氧槽混合液發現，其銅和鋅濃度皆顯著地較原廢水為高。綜上，建議定期清理糞尿溝及排除厭氧槽污泥，以維持豬舍內空氣品質，降低銅和鋅蓄積。

關鍵詞：糞尿溝、養豬場、水簾式豬舍。

緒 言

農政單位鑒於畜牧廢棄物的污染問題日益受到重視，從民國 79 年開始建立以現今行政院農業委員會畜產試驗所 (以下簡稱畜試所) 及其附屬單位為主之輔導體系，輔導養豬場設置三段式廢水處理設施，而當時豬舍型式以實地面為主。在當前水資源欠缺及水污染防治費徵收等因素驅使下，節水飼養是養豬產業永續經營的趨勢。蘇等 (2016, 2018a) 進行實地面、部分條狀地面及全條狀地面等 3 種不同地面結構豬舍用水量與廢水量進行比較，結果豬隻飼養於部分條狀及全條狀地面豬舍，皆較飼養於實地面豬舍具較佳的節水減廢效果。

三段式處理在厭氧階段會有沼氣產生，沼氣含甲烷、二氧化碳及微量的硫化氫及水氣，政府間氣候變遷專門委員會 (Intergovernmental Panel on Climate Change, IPCC) 報告指出，甲烷造成溫室效應的程度為二氧化碳之 25 倍，顯見其對氣候變遷的影響，而甲烷亦為生質能之一，若妥善規劃加以利用，可降低溫室氣體排放量又可作為替代能源之效益。Harasimowicz *et al.* (2007) 指出，沼氣為有機物質經由厭氧發酵過程被微生物分解所產生的氣體，尤其是畜牧廢水、農業殘餘物、家庭污水及垃圾掩埋場等。Lusk (1998) 指出，沼氣生成速率受發酵溫度、滯留時間及微生物族群等影響，每磅的化學需氧量 (chemical oxygen demand, COD) 可產生 5.6 立方呎的甲烷，而沼氣中甲烷含量在 55 – 80%。Rasi *et al.* (2007) 及 Harasimowicz *et al.* (2007) 指出，沼氣含有 55 – 65% CH₄、30 – 45% CO₂ 和微量的硫化氫 (H₂S) 及水氣，熱值 (calorific value) 在 4,800 – 6,900 kcal/m³。行政院環境保護署 (2019) 公告養豬廢水放流水標準，其 COD、生化需氧量 (biochemical oxygen demand, BOD) 及懸浮固體 (suspended solid, SS) 分別不得大於 600、80 及 150 mg/L，pH 值須在 6 – 9 範圍內。行政院環境保護署 (2018) 從民國 106 年開始徵收畜牧業水污染防治費，以放流水的 COD 及 SS 濃度訂定費率，因此降低畜牧業排放水的 COD 及 SS 濃度可減少水污費支出。蘇等 (2018b) 將平均體重 52.9 ± 1.8 kg 的 LD 肉豬飼養於代謝架上，每日收集糞便及尿液後混合，模擬全條狀地面依重量比加入 1 : 1 的沖洗水後，注入有效容積 90 L 的直立式厭氧槽，水力停留時間 (hydraulic retention time, HRT) 分別為

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2733 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所經營組。

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

20 日及 30 日。結果 HRT 20 日組的上澄液 COD、總氮 (total nitrogen, TN)、銨態氮 (ammonium nitrogen, $\text{NH}_4^+\text{-N}$) 和總磷 (total phosphorus, TP) 濃度皆顯著地較 HRT 30 日組為高, HRT 30 日組的沼氣、甲烷和二氧化碳產量, 以及電導度與鉍和鉀濃度皆較 HRT 20 日組為高 ($P < 0.05$)。蘇等 (2018b) 指出, 厭氧處理 HRT 越長 (HRT 20 日 vs. HRT 30 日), 上澄液的 COD 濃度越低, 且每日沼氣產量較少 (HRT 20 日 vs. HRT 30 日 = 5.78 vs. 4.84 L/d; $P < 0.05$), 此與每日廢水注入量較少有關係, 而在厭氧槽污泥量保持固定的模式下, HRT 越長廢棄污泥的鉍和鉀濃度及電導度越高。

本試驗為因應夏季氣溫升高可能影響豬隻採食與增重, 以及廢水與氨氣排放衍生之鄰避效應等因素, 將生長肥育豬飼養於高床水簾糞尿溝式肉豬舍, 探討對豬隻生長性能、處理水再利用、沼氣產量及氨氣排放等之影響。

材料與方法

I. 試驗動物及處理

- (i) 試驗在 2019 年 2 月 15 日至 6 月 6 日間進行, 將平均體重 22.6 ± 5.1 kg 的 LD (Landrace ♀ × Duroc ♂) 肉豬 64 頭飼養於高床水簾密閉糞尿溝式肉豬舍, 平均分飼於 8 欄 (長 × 寬 = 4 m × 2.3 m = 9.2 m²/欄)、每欄飼養 8 頭, 豬舍床面鋪設預鑄鋼筋混凝土板, 每頭豬擁有 1.15 m² 飼養面積。飼糧及飲用水皆採任食, 飼糧參照 NRC (1998) 推薦的生長期與肥育期豬隻營養需要量調製 (表 1), 在豬隻平均體重約 120 kg 時結束生長試驗。

表 1. 實驗飼糧組成

Table 1. The compositions of experimental diet (as fed basis)

Item	Growing period	Finishing period
Ingredients	----- % -----	
Corn meal, CP 7.8%	64.25	73.32
Soybean meal, CP 43.8%	26.30	19.00
Wheat bran	3.00	3.00
Limestone, pulverized	1.20	1.00
Dicalcium phosphate	1.30	1.00
Choline chloride, 50%	0.10	0.08
Molasses	2.00	2.00
Salt	0.40	0.40
Soybean oil	1.20	—
Vitamin premix ¹	0.10	0.10
Mineral premix ²	0.15	0.10
Total	100.00	100.00
Calculated value		
Digestible energy, kcal/kg	3,410	3,369.00
Crude protein, %	17.09	15.16
Cu, mg/kg	15.8	11.5
Zn, mg/kg	98.0	85.9

¹ Vitamin premix provided per kilogram of diet as following: Vitamin A, 6000 IU; Vitamin D₃, 800 IU; Vitamin B₁₂, 0.02 mg; Vitamin E, 20 IU; Vitamin K₃, 4 mg; Vitamin B₁, 4 mg; Pantothenic acid, 16 mg; Niacin, 30 mg; Pyridoxine, 1 mg; Folic acid, 0.5 mg; Biotin, 0.1 mg.

² Mineral premix provided per kilogram of diet as follows: Fe (FeSO₄ · 7H₂O), 140 mg; Cu (CuSO₄ · 5H₂O), 7 mg; Mn (MnSO₄), 20 mg; Zn (ZnO), 70 mg; I (KI), 0.45 mg.

- (ii) 豬隻於試驗開始時磅重, 而後每 2 週磅重 1 次; 以欄為單位在豬隻平均體重達 100 kg 後, 每週磅重 1 次, 記錄飼糧採食量, 計算生長性能, 並調查試驗期間豬隻腳蹄損傷情形。
- (iii) 試驗豬隻飼養於畜試所經營組豬場內, 豬隻之使用、飼養及實驗內容, 經「畜試所實驗動物照護及使用小組」審查同意 (畜試動字第 108 — 24 號)。

- II. 每週 2 次 (週一及週四) 以經過厭氧的處理水沖洗糞尿溝, 沖洗後將未經固液分離之原廢水儲存於儲水槽中。應用可編程邏輯控制系統 (programmable logic controller, PLC) 自動控制進出水於容量 10 噸之直立式厭氧槽, 每日進出水量各 500 L, 即厭氧處理 HRT 為 20 日, 操作流程如下:
- (i) 進水前 30 分鐘: 停止直立式厭氧槽內 2 HP 攪拌器運作。
 - (ii) 進水前 2 分鐘: 以電動球閥輔以液面控制器自動排出直立式厭氧槽內上澄液, 抽入既有的臥置式處理系統, 再經厭氧處理後供為循環沖洗糞尿溝用。
 - (iii) 進水前 30 秒至進水後 30 秒: 啟動直立式厭氧槽內 2 HP 及儲水槽內 0.5 HP 附設之攪拌器。
 - (iv) 進水: 以 0.5 HP 污泥馬達輔以液面自動控制器, 將儲水槽中之原廢水抽入直立式厭氧槽。
 - (v) 進水後: 每 2 小時自動啟動直立式厭氧槽內附設之 2 HP 攪拌器 2 分鐘, 並於翌日進水前 30 分鐘停止攪拌器運作。
- III. 系統穩定後, 每 2 週採集沖洗糞尿溝之沖洗水、原廢水、厭氧後上澄液及進水後厭氧槽混合液, 進行氫離子濃度指數 (pH value)、電導度 (electrical conductivity, EC) 及 COD、總固形物 (total solids, TS)、揮發性固形物 (volatile solids, VS)、TN、TP、鉀 (potassium, K)、銅 (copper, Cu) 及鋅 (zinc, Zn) 濃度分析。
- IV. 空氣樣品採集: 豬隻肥育期每次糞尿溝沖洗前及沖洗後, 分別採集豬舍中間走道、距離床面 100 cm 處之水簾端 (P1)、豬舍中間 (P2; 豬舍第 2 欄與第 3 欄之隔間欄杆處)、豬舍內風扇端 (P3) 及豬舍外風扇端 (P4) 空氣樣品測定氨氣濃度。
- V. 沼氣產量及成分分析: 系統穩定後每週測定沼氣產量 3 次, 並採集沼氣分析其成分 1 次。
- VI. 分析方法
- (i) pH 值、EC 及 COD 濃度: 分別依照行政院環境保護署公告之 NIEA W424.53A (行政院環境保護署環境檢驗所, 2019a)、NIEA W203.51B (行政院環境保護署環境檢驗所, 2000) 及 NIEA W515.55A (行政院環境保護署環境檢驗所, 2018) 方法分析之。
 - (ii) TS 及 VS 濃度: 依照行政院環境保護署公告之 NIEA W210.58A (行政院環境保護署環境檢驗所, 2013) 方法分析之。
 - (iii) 總氮: 參照行政院環境保護署公告之 NIEA W423.52C (行政院環境保護署環境檢驗所, 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。水中硝酸鹽氮、亞硝酸鹽氮及凱氏氮之測定, 分別參照行政院環境保護署環境檢驗所 NIEA W419.51A (2006a)、NIEA W418.53C (2019b) 及 NIEA W451.51A (2006b) 方法分析之。
 - (iv) 總磷: 參照行政院環境保護署公告之 NIEA W423.52C27.53B (行政院環境保護署環境檢驗所, 2010) 方法分析之。
 - (v) 鉀、銅及鋅: 參考蘇等 (2020) 方法, 將水樣定量 50 mL 後加入 3 N 的鹽酸 10 mL, 以鍍玻璃覆蓋置 350℃ 電熱板進行酸解後, 以原子吸收光譜儀 (Spectrophotometer Z8100, Hitachi, Japan) 分析之。
 - (vi) 空氣樣品: 利用北川式ガス檢知管 (檢測範圍 0.2 – 20 ppm; 光明理化學工業株式會社, 神奈川縣, 日本) 測定氨氣濃度。
 - (vii) 沼氣產量: 每週一 09:00 安裝氣體流量計 (Shinagawa Corporation, Japan) 並記錄讀數後, 每週二、三、四同時間測定沼氣產量各 1 次。
 - (viii) 沼氣成分: 沼氣樣品以氣相層析儀—熱導偵測器 (Thermo Fisher Scientific, Inc, USA) 分析沼氣中甲烷及二氧化碳百分比含量。

VII. 統計分析

試驗豬隻生長性能、沼氣產量、比沼氣產量及沼氣成分以 Excel 2019 計算平均值。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), 以 LSMEANS 統計模式估計各處理組的最小平方平均值及標準機差, 再以鄧肯氏新多變域測定法 (Duncan's New Multiple Range Test), 檢定各處理組間的差異顯著性 ($P < 0.05$)。

結果與討論

I. 豬隻生長性能

本試驗豬隻生長期 (平均體重 23 kg 至 65.5 kg) 與肥育期 (平均體重 65.5 kg 至 119 kg) 分別餵飼消化能、

粗蛋白質、銅及鋅含量為 3,410 與 3,369 kcal/kg、17.09 與 15.16%、15.8 與 11.5 mg/kg 及 98.0 與 85.9 mg/kg 飼糧 (表 1)，消化能與粗蛋白質含量符合 NRC (1998) 推薦體重 20 – 100 kg 豬隻的營養需要量，銅和鋅含量也低於國家標準家畜禽配合飼料 (2010) 規定，生長期與肥育期分別為 25 和 110 ppm 與 25 和 100 ppm 的最高限量。試驗期間的增重、採食量及飼料效率分別為 0.90 kg/head/day、2.24 kg/head/day 及 0.40 (表 2)。過去文獻分別在熱季及涼季使用平均體重約 48 kg 與 39 kg 的 LD 肉豬，群飼在開放式豬舍至平均體重約 115 kg，結果熱季的增重、採食量及飼料效率分別為 0.70 kg/head/day、2.28 kg/head/day 及 0.31 (蘇等, 2016)，涼季則為 0.72 kg/head/day、2.20 kg/head/day 及 0.33 (蘇等, 2018a)，本試驗豬隻增重及飼料效率較蘇等 (2016) 與蘇等 (2018a) 皆佳。蘇等 (2016)、蘇等 (2018a) 與本試驗皆於同棟豬舍進行，蘇等 (2016) 與蘇等 (2018a) 係採取開放式、每欄飼養 6 頭生長肥育豬、每頭豬擁有 1.5 m² 飼養空間，而本試驗係採取密閉水簾進行，每欄飼養 8 頭生長肥育豬、每頭豬擁有 1.15 m² 飼養空間，皆符合行政院農業委員會 (2021) 畜牧場主要設施設置標準規定，肉豬飼養空間必須在 1 – 3 m²/pig。研究指出豬隻的增重和採食量會隨著飼養空間減少而降低 (Flohr *et al.*, 2016; Thomas *et al.*, 2017)。本試驗豬隻試驗開始時體重及飼養空間，明顯較蘇等 (2016) 與蘇等 (2018a) 為小，而飼料效率較佳，推測與豬隻飼養在密閉水簾豬舍內環境溫度較恆定有關。此外，試驗期間未發現豬隻有腳蹄損傷情形。

表 2. 試驗豬隻生長性能

Table 2. The growth performance of experimental pigs

Items	Mean	SD
Age, day		
Initial	87.7	5.6
End of growing period	141.7	5.6
End of finishing period	195.1	7.8
Body weight, kg		
Initial	22.6	5.1
End of growing period	65.5	9.8
End of finishing period	119.1	7.0
Gain, kg/day		
Growing period	0.78	0.12
Finishing period	1.01	0.13
Overall	0.90	0.08
Intake, kg/d		
Growing period	1.72	0.15
Finishing period	2.80	0.40
Overall	2.24	0.19
Feed efficiency, gain/intake		
Growing period	0.46	0.08
Finishing period	0.36	0.06
Overall	0.40	0.04

II. 各處理階段水質成分

試驗糞尿溝沖洗係使用經過直立式發酵槽處理後的上澄液、再經過臥置式處理設施厭氧處理後的處理水，直立式發酵槽系統穩定後，採集沖洗水、原廢水、厭氧後上澄液及進水後厭氧槽攪拌液樣品進行水質分析，共 8 次。沖洗水分析結果，其平均值分別為 pH 值 7.69、EC 6.57 mS/cm、COD 838 mg/L、TS 2,410 mg/L、VS 840 mg/L、TN 224 mg/L、TP 186 mg/L、K 360 mg/L、Cu 0.16 mg/L 和 Zn 0.27 mg/L (表 3)。原廢水各項水質濃度皆顯著地較厭氧後上澄液為高 ($P < 0.05$)，而厭氧處理對 COD、TS、VS、TN 及 TP 的去除率，則分別為 86.84、77.27、85.34、81.80 及 85.04% (表中未顯示)。本試驗為了解厭氧處理期間銅和鋅的蓄積情形，在試驗期間未排泥。採集直立式厭氧槽加入原廢水並經攪拌 2 分鐘後的樣品進行水質分析，發現其 Cu 和 Zn 濃度 (16.55 和 26.07 mg/L) 皆顯著地較原廢水 (2.03 和 17.81 mg/L) 為高 ($P < 0.05$)，顯示在直立式厭氧槽系統中 Cu 和 Zn 有累

積情形。

表 3. 各處理階段廢水水質成分

Table 3. Water qualities of pig wastewater at different treatment stage

Items	Water A ¹	Water B	Water C	Water D	SE
pH value	7.69 ^a	7.25 ^c	7.61 ^{ab}	7.47 ^b	0.05
EC, mS/cm	6.57 ^b	9.57 ^a	10.4 ^a	10.1 ^a	0.41
----- mg/L -----					
COD	838 ^c	21,000 ^a	2,790 ^c	12,900 ^b	704
TS	2,410 ^d	20,100 ^a	4,570 ^c	12,100 ^b	609
VS	840 ^c	13,500 ^a	1,980 ^c	7,620 ^b	436
TN	224 ^d	3,600 ^a	662 ^c	1,530 ^b	78
TP	186 ^c	2,000 ^a	303 ^c	1,420 ^b	70
K	360 ^c	1,100 ^a	785 ^b	1,090 ^a	20
Cu	0.16 ^c	2.03 ^b	0.28 ^c	16.6 ^a	0.45
Zn	0.27 ^c	17.8 ^b	1.03 ^c	26.1 ^a	0.81

¹ The Water A, Water B, Water C, and Water D were the manure ditch flushing water, raw wastewater, anaerobic supernatant and anaerobic tank mixture, respectively.

^{a, b, c, d} Means with in same row without the same superscripts differ ($P < 0.05$).

III. 豬舍糞尿溝沖洗前、後氨氣濃度之比較

豬隻肥育期在豬舍沖洗糞尿溝前及沖洗後各 15 分鐘，分別以氨檢知管 (檢測範圍 0.2 — 20 ppm)，測定豬舍走道中間距離地面 1 公尺高的水簾端 (P1)、豬舍第 2 欄與第 3 欄之隔間欄杆處 (P2)、豬舍內風扇端 (P3) 及豬舍外風扇端 (P4) 等 4 個點的氨氣濃度 (表 4)，結果沖洗前 P3 的氨濃度顯著地較 P1、P2 及 P4 皆高 ($P < 0.05$)，而沖洗後 P3 和 P4 的氨濃度則較 P1 及 P2 為高 ($P < 0.05$)。在沖洗前、後的比較方面，糞尿溝沖洗前 P2 (0.53 vs. 0.25 ppm) 和 P3 (2.36 vs. 0.77 ppm) 的氨濃度顯著地較豬舍沖洗後為高 ($P < 0.05$)，而 P1 和 P4 的氨濃度數值也較豬舍沖洗後為高，惟差異未達顯著。荷蘭社會和經濟委員會 (Sociaal Economische Raad, SER) 規定，員工在氨濃度 20 ppm 環境下的暴露時間不得超過 8 小時，在 50 ppm 或更高的情況下暴露時間不得超過 15 分鐘。Donham *et al.* (1989) 建議，工作人員不要暴露在超過 7 ppm 之氨濃度環境下；Reynolds *et al.* (1996) 也指出，牧場工作人員暴露之氨氣濃度限值為 7.5 ppm；Wathes (1998) 建議動物飼養環境氨濃度不超過 20 ppm。張等 (1997) 調查國內豬場環境中氨氣濃度低於 5 ppm，而行政院環境保護署 (2007) 公告畜牧場周界氨氣濃度限值必須低於 1 ppm。本試驗在水簾式密閉豬舍進行採固定式風扇排氣，以糞尿溝沖洗前豬舍內風扇端 (P3) 的氨濃度 2.36 ppm 最高，且較前述研究 (Donham *et al.*, 1989; Reynolds *et al.*, 1996; Wathes, 1998) 皆低，而 P4 點不論豬舍沖洗前、後 (0.66 vs. 0.62 ppm)，皆較行政院環境保護署 (2007) 公告的 1 ppm 氨濃度限值為低。

表 4. 豬舍沖洗前後氨氣濃度之比較

Table 4. Comparison of ammonia concentration (ppm) before and after flushing in pig house

Items	Before flushing	After flushing	SE
P1	0.18 ^b	0.10 ^b	0.05
P2	0.53 ^{bx}	0.25 ^{by}	0.06
P3	2.36 ^{ax}	0.77 ^{ay}	0.33
P4	0.66 ^b	0.62 ^a	0.08
SE	0.24	0.08	

¹ P1, P2, P3 and P4 were the wet-pad side, the 2nd to 3rd pen, fan side in the house and fan side outside the house, respectively.

^{a, b} Means with in same column without the same superscripts differ ($P < 0.05$).

^{x, y} Means with in same row without the same superscripts differ ($P < 0.05$).

IV. 沼氣產量及其成分分析

直立式厭氧槽的沼氣產量、沼氣甲烷濃度及二氧化碳濃度，分別為 $3,380 \pm 189$ L/d、 $62.0 \pm 2.18\%$ 及 $25.6 \pm 1.51\%$ (表 5)，估算每立方公尺槽體的沼氣、甲烷與二氧化碳產量分別約為 338 ± 19 、 209 及 86 L/day，參試豬隻 64 頭，估算每頭豬的沼氣、甲烷與二氧化碳產量則為 52.8 、 32.7 及 13.5 L/day。蘇等 (2018b) 將豬隻飼養於代謝架收集每日的豬隻糞便及尿液後混合，依 1:1 (w/w) 比例加入沖洗水調製原廢水。原廢水調製完成後注入直立式厭氧發酵模槽，水力停留時間分別為 20 天及 30 天，結果甲烷濃度介於 $60.5 - 62.7\%$ 間，與本試驗所得結果 ($62.0 \pm 2.18\%$) 相近。

表 5. 直立式發酵槽沼氣產量及其成分

Table 5. The production and composition for the biogas from of the experimental vertical anaerobic tank

Items	Mean	SD
Growing- finishing pig, head	64	
Vertical anaerobic tank volume, m ³	10	
Biogas production, L/d	3,380	189
Biogas compositions, %		
Methane	62.0	2.18
Carbon dioxide	25.6	1.51
Production ¹ , L/m ³ /d		
Biogas	338	19
Methane	209	—
Carbon dioxide	86	—
Production ² , L/pig/d		
Biogas	52.8	2.95
Methane	32.7	—
Carbon dioxide	13.5	—

¹ Estimated value, Production = biogas production \div 10; Methane production = methane concentration in biogas \div 10; Carbon dioxide production = carbon dioxide concentration in biogas \div 10.

² Estimated value, Production = biogas production \div 64; Methane production = methane concentration in biogas \div 64; Carbon dioxide production = carbon dioxide concentration in biogas \div 64.

在比沼氣產量 (specific biogas yield) 及比甲烷產量 (specific methane yield) 方面，COD、TS 和 VS 的比沼氣產量分別為 319 ± 50 mL/g COD/day、 333 ± 51 mL/g TS/day 及 498 ± 85 mL/g VS/day，比甲烷產量則為 198 ± 33 mL/g COD/day、 206 ± 32 mL/g TS/day 及 309 ± 54 mL/g VS/day (表 6)。本試驗使用的原廢水 TS 含量約 20,000 mg/L (表 3)，比沼氣產量及比甲烷產量 333 及 206 mL/g TS/day，與蕭等 (2016) 使用 TS 含量 2.0% 的雞糞混合液進行厭氧消化，獲得的比沼氣產量 (335 mL/g TS/day) 及比甲烷產量 (226 mL/g TS/day) 結果相近，而 VS 的比沼氣產量及比甲烷產量為 498 及 309 mL/g VS/day，也和蕭等 (2016) 試驗所得的比沼氣產量 (471 mL/g VS/day) 及比甲烷產量 (317 mL/g VS/day) 相近，但較 Bonmati *et al.* (2001) 在實驗室以養豬廢水控制厭氧槽溫度在 35°C 下操作所得結果比甲烷產量 403 mL/g VS/day，以及 Chae *et al.* (2008) 的研究 437 mL/g VS/day 皆低。

本試驗 COD 的比甲烷產量為 198 mL/g COD/day，與郭等 (1995) 每公克 COD 約可產生 0.21 L 甲烷之結果相近，惟較 McCarty *et al.* (1969) 提出的每公克 COD 約可產生 0.35 L 甲烷之理論值為少。諸多因素皆可能影響甲烷產量，IPCC 為了估算甲烷產量，提出了 Van't Hoff - Arrhenius 方法並以年平均溫度估算甲烷產量 (Dong *et al.*, 2006)，然 Habtewold *et al.* (2018) 指出，廢水中產甲烷群落的生長和活動可能是影響甲烷產量的關鍵因素，而這些微生物動態又會受到槽體內溫度的影響，且槽體內溫度也會隨著儲存時間而變化 (Rennie *et al.*, 2018)。因此 IPCC (Gavrilova *et al.*, 2019) 建議甲烷產量除了依國家別按月估算外，也必須將處理槽內溫度和儲存排空頻率 (storage emptying frequency) 納入考量，此外廢水成分中對產甲烷菌和抑制產甲烷的化合物 (Batstone *et al.*, 2002) 含量，也是影響甲烷產量的重要因素。上述因素皆可能為本試驗甲烷產量與 McCarty *et al.* (1969) 提出的理論值差異的原因。

表 6. 直立式發酵槽比沼氣產量及比甲烷產量

Table 6. Specific biogas yield and specific methane yield of the experimental vertical anaerobic tank

Items	Mean	SD
Biogas production, L/d	3,380	189
Methane concentration, %	62.0	2.2
Influent, L/d	515	10
Specific biogas yield ¹ , mL/g/d		
COD	319	50
TS	333	51
VS	498	85
Specific methane yield ² , mL/g/d		
COD	198	33
TS	206	32
VS	309	54

¹ Specific biogas yield = biogas production (mL/day) ÷ inflow wastewater (L/day) ÷ COD, TS, VS concentrations of inflow wastewater (mg/L) × 0.001 (unit conversion).

² Specific methane yield = biogas production (mL/day) × methane concentration (%) ÷ influent (L/day) ÷ COD, TS, VS concentrations of inflow wastewater (mg/L) × 0.001 (unit conversion).

結 論

- I. 從厭氧槽攪拌液樣品分析結果發現，其銅和鋅濃度皆顯著地較原廢水為高，顯示銅和鋅在直立式發酵槽系統中有累積情形。
- II. 比較糞尿溝沖洗前與沖洗後，豬舍內與豬舍外的氨氣濃度發現，豬舍沖洗前豬舍中間（豬舍第 2 欄與第 3 欄之隔間欄杆處）和風扇端的氨濃度較豬舍沖洗後顯著為高。
- III. 建議適時排出污泥予以曬乾後資源化利用，避免因污泥蓄積導致銅、鋅含量過高，而高床密閉豬舍仍應定期清理糞尿，以維持工作人員健康與豬舍內空氣品質。

參考文獻

- 行政院農業委員會。2021。畜牧場主要設施設置標準。中華民國 110 年 12 月 30 日修正公告。
- 行政院環境保護署。2007。空氣污染防治法規—固定污染源空氣污染物排放標準。中華民國 96 年 9 月 11 日行政院環境保護署環署空字第 0960068131 號令修正。
- 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。中華民國 107 年 12 月 26 日修正。
- 行政院環境保護署。2019。放流水標準。中華民國 108 年 4 月 29 日修正。
- 行政院環境保護署環境檢驗所。2000。水中導電度測定方法—導電度計法 (NIEA W203.51B)。中華民國 89 年 11 月 23 日環署檢字第 70017 號公告。
- 行政院環境保護署環境檢驗所。2004。水中總氮檢測方法 (NIEA W423.52C)。中華民國 93 年 8 月 9 日環署檢字第 0930057400 號公告。
- 行政院環境保護署環境檢驗所。2006a。水中硝酸鹽氮檢測方法—分光光度計法 (NIEA W419.51A)。中華民國 95 年 8 月 8 日環署檢字第 0950062980 號公告。
- 行政院環境保護署環境檢驗所。2006b。水中凱氏氮檢測方法 (NIEA W451.51A)。中華民國 95 年 3 月 31 日環署檢字第 0950025578 號公告。
- 行政院環境保護署環境檢驗所。2010。水中磷檢測方法—分光光度計／維生素丙法 (NIEA W427.53B)。中華民國 99 年 9 月 15 日環署檢字第 0990084224 號公告。
- 行政院環境保護署環境檢驗所。2013。水中總溶解固體及懸浮固體檢測方法—103 ~ 105 °C 乾燥 (NIEA

- W210.58A)。中華民國 102 年 1 月 15 日環署檢字第 1020004998 號公告。
- 行政院環境保護署環境檢驗所。2018。水中化學需氧量檢測方法－重鉻酸鉀 (NIEA W515.55A)。中華民國 107 年 11 月 22 日環署授檢字第 1070007386 號。
- 行政院環境保護署環境檢驗所。2019a。水之氫離子濃度指數 (pH 值) 測定方法－電極法 (NIEA W424.53A)。中華民國 108 年 1 月 22 日環署授檢字第 1080000393 號公告。
- 行政院環境保護署環境檢驗所。2019b。水中亞硝酸鹽氮檢測方法－比色法 (NIEA W418.54C)。中華民國 108 年 7 月 30 日環署授檢字第 1080004541 號公告。
- 張靜文、鍾弘、黃金鳳、蘇慧貞。1997。養豬場作業環境暴露危害研究。勞工安全衛生研究季刊 5(3)：1-22。
- 國家標準配合飼料 (家畜、家禽用)。2010。經濟部 99 年 5 月 18 日經授標字第 09920050420 號公告。
- 郭猛德、沈添富、曾四恭。1995。固液分離與攪拌對厭棄處理豬糞廢水之污泥產量與性質的影響。中畜會誌 24(2)：191-204。
- 蕭庭訓、蘇天明、陳水財、黃裕益、程梅萍、沈韶儀。2016。雞糞厭氧消化之沼氣產量評估。農業機械學刊 25(1)：1-11。
- 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(1)：26-34。
- 蘇天明、翁義翔、鍾承訓、蕭庭訓、程梅萍。2018a。地面結構對涼季豬隻生長性能與豬舍廢水量及水質之影響。畜產研究 51(1)：75-83。
- 蘇天明、翁義翔、鍾承訓、蕭庭訓、劉威志、廖仁寶。2018b。高床水簾豬舍之廢水及臭味處理模式評估。行政院農業委員會畜產試驗所 107 年度研究報告。
- 蘇天明、鍾承訓、蕭庭訓、程梅萍。2020。三段式處理對不同濃度養豬廢水之處理效果。畜產研究 53(2)：82-90。
- Batstone, D. J., J. Keller, I. Angelidaki, S. V. Kalyuzhnyi, S. G. Pavlostathis, A. Rozzi, W. T. M. Sanders, H. Siegrist, and V. A. Vavilin. 2002. The IWA Anaerobic Digestion Model No 1 (ADM1). *Water Sci. Technol.* 45(10): 65-73.
- Bonmatí, A., X. Flotats, L. Mateu, and E. Campos. 2001. Study of thermal hydrolysis as a pretreatment to mesophilic anaerobic digestion of pig slurry. *Water Sci. Technol.* 44 (4): 109-116.
- Chae, K. J., A. Jang, S. K. Yim, and I. S. Kim. 2008. The effects of digestion temperature and temperature shock on the biogas yields from the mesophilic anaerobic digestion of swine manure. *Bioresour. Technol.* 99: 1-6.
- Dong, H., J. Mangino, T. A. McAllister, J. L. Hatfield, D. E. Johnson, M. Aparecida de Lima, and A. Romanovskaya. 2006. Emissions from livestock and manure management. In S. Eggleton *et al.* (Eds.), 2006 IPCC guidelines for national greenhouse gas inventories pp. 10.7-10.82.
- Donham, K. J., P. Haglund, Y. Peterson, R. Rylander, and L. Belin. 1989. Environmental and health studies of farm workers in Swedish swine confinement buildings. *Brit. Ind. Med.* 46(1): 31-37.
- Flohr, J. R., M. D. Tokach, J. M. DeRouchey, J. C. Woodworth, R. D. Goodband, and S. S. Dritz. 2016. Evaluating the removal of pigs from a group and subsequent floor space allowance on the growth performance of heavy-weight finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 94: 4388-4400.
- Gavrilova, O., A. Leip, H. Dong, J. D. MacDonald, C. A. G. Bravo, B. Amon, R. B. Rosales, A. D. Prado, M. A. de Lima, W. Oyhantçabal, T. J. Weerden, Y. Widiawati, A. Bannink, K. Beauchemin, H. Clark, A. Leytem, E. Kebreab, N. M. Ngwabie, C. I. Opio, A. VanderZaag, and T. V. Vellinga. 2019. Emissions from livestock and manure management. 2019 Refinement to the 2006 IPCC guidelines for national greenhouse gas inventories: Agriculture, forestry and other land use, Vol. 4, pp. 10.49-10.73.
- Habtewold, J., R. Gordon, V. Sokolov, A. VanderZaag, C. Wagner-Riddle, and K. Dunfield. 2018. Targeting bacteria and methanogens to understand the role of residual slurry as an inoculant in stored liquid dairy manure. *Appl. Environ. Microbiol.* 84(7): 1-15.
- Harasimowicz, M., P. Orluk, G. Zakrzewska-Trznadel, and A. G. Chmielewski. 2007. Application of polyimide membranes for biogas purification and enrichment. *J. Hazard. Mater.* 144: 698-702.
- Lusk, P. 1998. Methane Recovery from Animal Manures: The Current Opportunities Casebook.
- McCarty, P., L. Beck, and P. S. Amant. 1969. Biological denitrification of wastewaters by organic materials. 24th Ind. Paper presented at the Waste Conf.
- National Research Council. 1998. Nutrient Requirements of Swine. 10th Revised. ed. Washington, D. C.
- Rasi, S., A. Veijanen, and J. Rintala. 2007. Trace compounds of biogas from different biogas production plants. *Energy.* 32:

1375-1380.

- Rennie, T. J., R. J. Gordon, W. N. Smith, and A. C. VanderZaag. 2018. Liquid manure storage temperature is affected by storage design and management practices: A modelling assessment. *Agric. Ecosyst. Environ.* 260: 47-57.
- Reynolds, S. J., K. J. Donham, P. Whitten, J. A. Merchant, L. F. Burneister, and W. J. Popenorf. 1996. Longitudinal evaluation of dose-response relationships for environmental exposures and pulmonary function in swine production workers. *Am. J. Ind. Med.* 29: 33-40.
- SAS. 2002. SAS procedure guide for personal computers. Version 6th ed. SAS Institute Inc. Cary, NC. U.S.A.
- SER, Wettelijke Grenswaarden Ammoniak. Available online: <http://www.ser.nl/nl/grenswaarden/ammoniak.aspx> (accessed on 20 July 2022).
- Thomas, L. L., R. D. Goodband, J. C. Woodworth, M. D. Tokach, J. M. DeRouchey, and S. S. Dritz. 2017. Effects of space allocation on finishing pig growth performance and carcass characteristics. *Transl. Anim. Sci.* 1: 351-357.
- Wathes, C. M. 1998. Aerial emissions from poultry production¹. *World's Poult. Sci.* 54(3): 241-251.

Effects of growing-finishing pigs in water-pad cooling pig house on growth performance and water quality of wastewater treatment ⁽¹⁾

Tein-Ming Su ⁽²⁾⁽³⁾ Yi-Hsiang Weng ⁽²⁾ Cheng-Hsun Chung ⁽²⁾ Wei-Zhi Liu ⁽²⁾ and Ting-Hsun Hsiao ⁽²⁾

Received: Aug. 18, 2022; Accepted: Feb. 4, 2023

Abstract

The purpose of this study was to investigate the effects of raising growing-finishing pigs in a water-pad cooling pig house with manure ditch on the growth performance of pigs, biogas production and effluent quality after anaerobic treatment of wastewater. During the experiment, 64 LD pigs with an average body weight of 23 kg grew to 120 kg, and both diet and drinking water were given *ad libitum*. The manure ditch was washed twice a week with the anaerobic treated wastewater and the raw wastewater produced was stored in a water storage tank. The raw wastewater was automatically controlled into a 10 m³ vertical anaerobic reactor at a rate of 500 L/day. While the anaerobic treatment system was stabilized, the flushing water for manure ditch, raw wastewater, anaerobic treated wastewater and the mixture in the anaerobic reactor were collected every 2 weeks to analyze the water quality. The biogas production and compositions were also determined. During the finishing stage of pigs, the gas samples of manure ditch before and after flushing were collected to detect the ammonia concentration, and the sampling sites included wet-pad side (P1), the 2nd to 3rd pen (P2), fan side in the house (P3), and fan side outside the house (P4). The results showed that the weight gain, feed intake and feed efficiency of pigs were 0.90 kg/day/head, 2.24 kg/day/head and 0.40, respectively, during the experiment period. The ammonia concentrations of P2 before and after flushing were 0.53 and 0.25 ppm, and those of P3 were 2.36 and 0.77 ppm. The ammonia concentrations of gas samples after flushing were lower than those before flushing ($P < 0.05$). The average biogas production rate during the experimental period was 3,380 L/day. The concentrations of methane and carbon dioxide in the biogas were 62.0% and 25.6%, respectively. The results of analysis of the mixture of anaerobic reactor showed the copper and zinc concentrations were significantly higher than those of the raw wastewater. In conclusion, it is recommended to flush the manure ditch regularly and remove the sludge in the anaerobic reactor for the maintenance of the air quality in the pig house and reduction of copper and zinc accumulation.

Key words: Manure ditch type, Pig farm, Water-pad cooling pig house.

(1) Contribution No. 2733 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

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

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

臺灣養豬畜牧業溫室氣體減量潛力評估與 基線方法學排放係數之探討⁽¹⁾

連興隆⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾ 林岱霖⁽²⁾⁽³⁾

收件日期：111 年 9 月 16 日；接受日期：112 年 2 月 4 日

摘 要

以環保署溫室氣體抵換專案有關廢水處理回收甲烷之方法學，利用廢水經厭氧消化處理產生之甲烷排放的計算評估，開發養豬畜牧業沼氣回收再利用的溫室氣體減量額度，在臺灣不易推動，其原因之一是專案的開發耗時且多量的監測參數墊高開發成本。因此，本研究針對本土養豬畜牧業之減碳潛力進行評估，同時根據標準基線方法學之原則，設計可供本土養豬畜牧業者評估其減量額度開發潛力所需的簡易評估工具，並分析本土化養豬畜牧業之豬隻甲烷排放係數（以二氧化碳當量，CO₂e 表示）。本研究與三家養豬畜牧場合作，執行採樣分析並採用聯合國小規模 clean development mechanism (CDM) 方法學 AMS.III.H. 及理想氣體方程式等二種方法推估排放係數。彰化牧場的廢水是最具有二氧化碳減量潛勢，減量額度為 14,000 ± 4,280 t CO₂e/year。評估各牧場豬隻甲烷排放係數（以二氧化碳當量，CO₂e 表示），彰化、雲林、屏東分別為 305 ± 93.1、352 ± 169、122 ± 34.5 kg CO₂e/head/year。本研究提出以厭氧池出流水化學需氧量（Chemical oxygen demand, COD）移除率 ≥ 80% 和 LV 值（COD 值與處理廢水量的乘積再除上豬隻頭數）介於 100 – 300 g/day/head 二項條件，作為判斷養豬場的廢水相關數據是否具備可用性之原則。本研究結果對臺灣豬隻甲烷排放係數的本土值建議為 346 ± 32.2 kg CO₂e/head/year。

關鍵詞：養豬畜牧廢水、溫室氣體抵換專案、甲烷排放係數、沼氣、標準基線。

緒 言

畜牧產業為我國農業中重要的一環，生產總值每年均超過 1 千億元新臺幣，占臺灣農產品生產總值 33% 以上（行政院環境保護署水質保護網 a）。雖然產值高，然而，養豬畜牧業產生的廢水與糞尿問題卻對環境造成衝擊，為了將廢棄物轉成資源，達到循環經濟之目的，政府刻正推動「畜牧糞尿資源化利用」，包括：厭氧發酵沼氣發電，沼液沼渣作為農地肥分使用，依農業事業廢棄物再利用管理辦法進行再利用；以及經處理至符合放流水標準，放流水作為澆灌之水資源利用等三種途徑（行政院環境保護署水質保護網 b）。養豬畜牧業廢水透過厭氧發酵用於沼氣發電或再利用，不論是對再生能源電力的開發或減碳的措施都是極佳的實務應用。以環保署水質保護網中引用蘇忠禎的研究（蘇，2014）顯示，就飼養規模 9,000 頭之養豬場使用 90 kW 的發電機為例，並根據其沼氣發電量進行計算，每頭豬每年平均可減少 1 噸二氧化碳當量（t CO₂e）。計算臺灣全國 550 萬頭養豬沼氣發電可產生之減碳效益，評估每年可減少 5,500,000 t CO₂e 的碳排量，占全國 CO₂ 排放量的 2%（行政院環境保護署水質保護網 b）。換言之，如果全臺養豬畜牧業都能進行沼氣回收，對我國永續發展目標「指標 12.8.2：畜牧廢棄物循環再利用」的 2030 年目標便可達成。

雖然臺灣大力推動沼氣發電，但全國設置沼氣發電之養豬場僅 53 場（行政院農業委員會，2019），全國養豬場共 6,609 場（行政院農業委員會，2020），設置沼氣發電的比例不到 0.8%。這當中除了大型養豬場之外，更多中小型養豬場對使用沼氣再利用缺乏動機。對中小型養豬業而言，設置沼氣回收再利用的投入成本與技術障礙，則令業主裹足不前。過去經驗顯示，由於（1）普遍機具設備設計不良，未將沼氣內所產生的硫化氫氣體去除，而造成處理設備及發電設施的腐蝕，或因（2）豬農專業能力欠缺，未落實應有操作及維護程序，或因（3）產生的電力超過自己所

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2734 號。

(2) 國立高雄大學土木與環境工程學系。

(3) 國立高雄大學新能源及電力發展研究中心。

(4) 通訊作者，E-mail: lien.sam@nuk.edu.tw。

需等因素，使得沼氣發電未能達到預期的效益 (蘇，2008；郭及蕭，2009)；另一可能原因為無法購得 10 – 20 kW 之小型沼氣發電機。

行政院環境保護署為了鼓勵國內各項產業投入溫室氣體減量活動於 104 年 12 月公告「溫室氣體抵換專案管理辦法」(簡稱抵換專案)，作為臺灣溫室氣體減量額度核發認證之窗口(行政院環境保護署，2022a)。根據事業溫室氣體排放量資訊平臺之公開資訊，目前臺灣的抵換專案方法學共計有 38 個。養豬畜牧業沼氣再利用導入溫室氣體減量額度，這些沼氣再利用的過程產生的減量額度，可成為養豬畜牧業者本業外的額外收入，增加畜牧業者對使用沼氣再利用或是沼氣發電的誘因。溫室氣體減量額度是執行溫室氣體抵換專案所產生，稱之為「減量額度」。依環保署公布之抵換專案方法學，養豬畜牧業廢水透過厭氧發酵用於沼氣發電或再利用可成為一項抵換專案。由於專案開發從開始到完成所花費之成本與時間相當大，且現行方法學的內容繁雜，對畜牧業者而言過於繁瑣，使得多數養豬畜牧業者即便有興趣，但因申請與執行方法過於複雜而放棄。因此，直到 109 年才有第一個養豬畜牧業沼氣發電再利用的抵換專案(漢寶農業可再生能源專案計畫書，2020；漢寶農畜產第三期廢水場沼氣發電計畫，2020)，分別取得每年 12,912 以及 14,630 t CO₂e 之抵換專案的減量額度，是臺灣通過「溫室氣體減量及管理法」後，養豬畜牧業沼氣發電再利用減量額度開發的首例。

臺灣的抵換專案的減量計算是建立在聯合國京都議定書中清潔發展機制(clean development mechanism, CDM)所開發的方法學。為確保 CDM 專案的減量效益，並獲得具長期的、實際可測量的、額外性的減排量，在 UNFCCC 轄下之 CDM 執行理事會(Executive board, EB)建立的「基線與監測方法學(baseline and monitoring methodologies)」，以供各國執行 CDM 專案活動(CDM project activity)時，作為登錄(register)專案與確證(validation)之指引。然而，將近 20 年的實務操作後，很多的研究已經指出，CDM 專案的開發被認為是相當耗時與成本高的，特別是在外加性(additionality)的論證上，也常有很大爭議(Hayashi *et al.*, 2010)。如何簡化 CDM 專案的開發成本，降低過量的數據要求，但又能確保專案的環境完整性(environmental integrity)，已成了 CDM 執行理事會(EB)近 10 年來重要的課題(Hayashi *et al.*, 2010)。

為確保實質減碳建立環境完整性，CDM 的方法學建構在相對嚴謹的架構下執行，其中，外加性便是確保其嚴謹性(stringency)的重要一環。然而，外加性的論述由於過於主觀，或為確保專案的嚴謹性所需投入的大量成本分析，都成了推動 CDM 的障礙(Hayashi *et al.*, 2010)。標準化基線法(standardized baselines)是 CDM 方法學中為降低交易成本，強化透明度、客觀性與可預測性，以加速 CDM 的推動，所創造的操作措施，其發展的背景是為降低傳統方法學對大量數據的需求，同時仍能維持足夠的嚴謹度以回應對環境完整性的要求。因此，標準化基線法要面對的挑戰是：避免低估了專案的價值與外加性造成減碳額度的信用低估(under-crediting)，同時，又須避免高估信用(over-crediting)，造成環境完整性的受損(Schneider *et al.*, 2012)。

標準基線的設計原則包括：(1) 效能基準(performance standard)、(2) 同質性(homogeneous group)專案類型擇優彙整、(3) 正面表列技術等(UNDP, 2013)。第一種透過比較相似類型專案的效能基準，訂出基線排放係數，例如電力排放係數，是相對最多使用的方法。第二種是將同質性專案擇優彙整，利用「在過去五年相同社會、經濟、環境和技術條件下，類似項目活動的平均排放量在同一類別位中，位居前 20% 者」(Lee *et al.*, 2005)定義標準基線排放係數。韓國的住宅減碳標準基線方法學便是採用這個原則(Specific CO₂ emissions in residential buildings in Republic of Korea (version 01.0), 2020)。第三種正面表列技術則是利用效能穿透性方法(performance penetration approach)，決定符合外加性的對應技術，並予以正向表列(CDM Executive Board, 2011; Hermwille *et al.*, 2013; UNDP, 2013)。透過標準基線方法學將可獲得標準基線的排放係數，換言之，在減量額度的計算上，標準基線的排放係數將是預設值(default value)，對專案開發者而言，僅需知道他的減碳標的物的專案開發量(例如：在養頭數、稻米量、水稻田面積、樓地板面積等)，便可計算出減排量。

豬隻的甲烷排放係數之計算方法包括有：IPCC 國家溫室氣體排放盤查指引(IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories)(IPCC, 2006; 2019)、CDM 方法學(CDM methodology, 2019)以及沼氣流量量測法(Su and Chen, 2018)等。依據 IPCC 指引，豬隻的甲烷排放包括豬隻的腸胃發酵以及糞尿管理活動產生之排放，計算方法皆分為方法 1(Tier 1)、方法 2(Tier 2)和方法 3(Tier 3)三個層級的計算方法。Tier 1 是簡化的估計方法，由區域別、溫度別等分類確認排放係數預設值，與年均飼養頭數之乘積計算甲烷排放量。以臺灣為例，屬亞洲區、年均溫度介於 22 – 24 度，所得之排放係數為 5 kg CH₄/head/year(IPCC, 2006; 行政院環境保護署，2022b)。而 Tier 2 則是先使用該國家本土之特定參數(如豬隻糞便揮發性固體物含量等)計算排放係數，再以此計算溫室氣體排放量。Tier 3 則是若該國的飼養管理方法與 IPCC 指引提供之方程式設計背景差異太大，則可以為國家特定方法開發模型或使用量測的方法來量化排放因子，Tier 3 的使用需經過廣泛的國際同儕審查，以確保估計模式的準確性和/或精確度(IPCC, 2006; 2019)。CDM 的方法學則是採用小規模減量方法學「AMS – III.H 廢水處理之甲烷氣回收專案」第 19.0 版(CDM

methodology, 2019)，利用飼養豬隻排放之糞尿經廢水處理系統處理，透過厭氧消化槽降解化學需氧量 (chemical oxygen demand, COD) 同時產生甲烷的過程，計算未進行甲烷回收的基線排放量 (baseline emission, BE)，以及進行甲烷回收破壞或再利用的專案活動排放量 (project emission, PE)。兩者的差值即為該養豬場產生之甲烷量，經回收破壞或再利用所對應之溫室氣體減排量 (以二氧化碳當量表示之)。藉由溫室氣體減排量與在養頭數，可計算以二氧化碳當量為單位之豬隻的甲烷排放係數。沼氣流量量測法是指飼養豬隻產生之廢水經厭氧發酵後，有機物分解產生之甲烷，經由甲烷收集系統量測甲烷流量，利用理想氣體方程式及甲烷濃度計算產生之甲烷量的一種方法。藉由甲烷量與在養頭數可計算豬隻的甲烷排放係數 (Su and Chen, 2018)。

本研究以國內三家豬隻在養頭數規模在 1000 頭以上之養豬場的採樣數據，以及文獻蒐集之數據為基礎，探討臺灣本土養豬畜牧業廢水處理之減碳潛力，並設計可供本土養豬畜牧業者評估其減量額度開發潛力所需的簡易評估工具。為提高臺灣養豬業者參與抵換專案的誘因，本研究參照標準基線方法學之原則，提出一個可用於本土養豬畜牧業沼氣破壞或再利用的標準基線方法學，其中，本研究採用聯合國小規模 CDM 方法學 AMS.III.H. 及理想氣體方程式等二種方法，推估本土豬隻甲烷排放係數並與現有之數據比較。

材料與方法

I. 文獻蒐集與分析

本研究以文獻數據以及本研究自行採樣數據進行不同計算評估方法的分析，文獻使用行政院農業委員會畜產試驗所於 2017 年發行養豬場沼氣發電實例手冊 (養豬沼氣發電實例手冊, 2017) 所提供的數據進行計算分析，手冊中針對三場豬隻飼養規模分別為 28,000 頭 / 日 (20,000 頭以上)、3,200 頭 / 日 (3,000 頭以上) 及 2,200 頭 / 日 (2,000 頭以上) 之養豬畜牧場內之概況、廢水處理效率及沼氣利用現況進行介紹。另，本研究亦收集過往政府的委託計畫研究成果，進行豬隻甲烷排放係數分析 (蘇, 2010; 2011)。本研究也透過政府公開資訊，蒐集飼養規模達 1,000 頭以上的國內養豬場之水污染防治措施計畫許可申請文件 (行政院環境保護署水污法相關公開資訊平臺, 2022)，針對許可文件中的每日最大飼養量、每日最大處理水量以及原污水 COD 設計值等共三項之基本資訊進行蒐集，分析國內豬隻每天的 COD 單位產生量。

II. 田野調查與採樣分析

針對單獨養豬場進行田野調查與水質採樣分析，主要對象為養豬場規模 1,000 頭以上之畜牧業者，以其養豬場作為本土數據實測來源，本研究調查三家養豬場，分別位於彰化、雲林、屏東，COD 水樣採集頻率為每季一次，採樣點分別為固液分離後原水、厭氧池出流水及放流水。水樣採樣方法參考 NIEA W109.53B 事業放流水採樣方法，以附有伸縮式長柄之圓筒手動採水設備，以採樣器分別採取足量之固液分離後原水、厭氧池出流水及放流水三個採樣點之水樣，水樣採取後以 PP 材質之樣品瓶保存，並將裝瓶後之樣品移入攜帶式保冷箱保存和運送 (環境檢驗所, 2021)。所有 COD 樣品皆於採樣後 24 小時內分析完畢。彰化牧場沼氣流量紀錄使用 VA550 工業型氣體流量計，準確度 m.v. 1.5% & f.s. $\pm 0.3\%$ 。彰化牧場 2021 年整年度沼氣量為 974,831.5 m³。

III. 化學需氧量分析

水樣 COD 分析使用 HACH COD Digestion Vials 進行分析，將 2 mL 水樣加入 COD 試管中，以 150℃ 加熱 2 小時，再以分光光度計於 620 nm 下進行測定，分光光度計使用 HACH DR900 Multiparameter Portable Colorimeter，偵測範圍為 20 – 15,000 mg/L。

IV. CDM 小規模方法學 AMS.III.H. 廢水處理之甲烷氣回收專案

本研究採用養豬畜牧業可應用之 CDM 小規模減量方法學「AMS – III.H 廢水處理之甲烷氣回收專案」第 19.0 版 (CDM methodology, 2019) 進行溫室氣體減量額度之估算。本研究蒐集國內三間養豬畜牧場一整年度之固液分離後原水、厭氧池出流水及放流水 COD 數據，計算其溫室氣體減量額度與豬隻甲烷排放係數。本研究將專案範疇邊界定為從固液分離有機物 (豬糞尿) 後，液態廢棄物進入廢水處理設施，故不考慮電力使用及污泥所造成之溫室氣體減排納入本研究專案邊界中。同時，因本研究針對已使用沼氣發電之養豬畜牧場，紅泥沼氣袋已為牧場既有設備，因此本研究專案邊界不考慮相關洩漏排放或廢水處理系統未裝設沼氣回收裝置造成的排放量。依上述邊界設定結果，可將原方法學之複雜計算方程式 (CDM methodology, 2019) 簡化為方程式 1 – 3，其中，專案活動所獲得之專案減排總量如方程式 1 所示，ER_y 代表第 Y 年的減排總量、BE_y 代表第 Y 年減排前之基線排放量、PE_y 代表第 Y 年減排後的專案活動排放量。

$$ER_y = BE_y - PE_y \dots\dots\dots (1)$$

$$BE_y = BE_{ww, treatment, y} + BE_{ww, discharge, y} \dots\dots\dots (2)$$

$$PE_y = PE_{ww, discharge, y} \dots\dots\dots (3)$$

其中 $BE_{ww, treatment, y}$ 為廢水處理系統之基線排放量、 $BE_{ww, discharge, y}$ 為處理後廢水 (放流水) 中含可降解之有機碳產生之基線排放量、 $PE_{ww, discharge, y}$ 為處理後之廢水 (放流水) 中含可降解之有機碳產生之專案活動排放量，相關排放量的計算方法分別如下：

$$BE_{ww, treatment, y} = Q_{ww, y} \times GWP_{CH_4} \times B_{0, ww} \times COD_{inflow, i, y} \times \eta_{COD, BL, i} \times UF_{BL} \times MCF_{ww, treatment, BL, i} \dots\dots\dots (4)$$

$$BE_{ww, discharge, y} = Q_{ww, y} \times GWP_{CH_4} \times B_{0, ww} \times COD_{discharge, BL, y} \times UF_{BL} \times MCF_{ww, discharge, BL, i} \dots\dots\dots (5)$$

其中，

$Q_{ww, y}$ = 於 Y 年，廢水處理量 (m^3)

GWP_{CH_4} = 甲烷全球暖化潛勢 (選用 25)

$B_{0, ww}$ = 於 Y 年，廢水產生甲烷的能力 (方法學預設值， $0.25 \text{ kg CH}_4/\text{kg COD}$)

$COD_{inflow, i, y}$ = 於 Y 年，基線情境下，厭氧廢水處理系統「i」之進流 COD 濃度 (ton/m^3)

$\eta_{COD, BL, i}$ = COD 去除效率

$MCF_{ww, treatment, BL, i}$ = 甲烷校正因子：因由厭氧消化槽甲烷回收，根據方法學指引，取 0.8

UF_{BL} = 模式不確定性校正因子 (根據方法學指引，取 0.89)

$COD_{discharge, i, y}$ = 於 Y 年，基線情境下，厭氧廢水處理系統「i」之放流 COD 濃度 (ton/m^3)

$MCF_{ww, discharge, BL, i}$ = 甲烷校正因子：因排放至海洋、河川或湖泊，根據方法學指引，取 0.1

$$PE_{ww, discharge, y} = Q_{ww, y} \times GWP_{CH_4} \times B_{0, ww} \times COD_{ww, discharge, PJ, y} \times UF_{BL} \times MCF_{ww, discharge, PJ, i} \dots\dots\dots (6)$$

其中，

$Q_{ww, y}$ = 於 Y 年，廢水處理量 (m^3)

GWP_{CH_4} = 甲烷全球暖化潛勢 (選用 25)

$B_{0, ww}$ = 於 Y 年，廢水產生甲烷的能力 (方法學預設值， $0.25 \text{ Kg CH}_4/\text{Kg COD}$)

UF_{BL} = 模式不確定性校正因子 (根據方法學指引，取 1.21)

$COD_{ww, discharge, PJ, y}$ = 於 Y 年，厭氧廢水處理系統之放流 COD 濃度 (ton/m^3)

$MCF_{ww, discharge, PJ, i}$ = 甲烷校正因子：因排放至海洋、河川或湖泊，根據方法學指引，取 0.1

V. 理想氣體方程式計算豬隻甲烷排放係數

本研究亦比較不同方法計算排放係數的差異。利用實際之沼氣流量，參考 Su 與 Chen 以理想氣體方程式 ($PV = nRT$) 進行每隻豬每年產生之甲烷排放量計算 (Su and Chen, 2018)，以甲烷之純度校正，計算方程式如下：

$$\text{甲烷排放係數 (kg CO}_2\text{e/year/head)} = \left(\frac{P \times B \times \frac{C}{100} \times 10^3 \text{ L}/m^3}{R \times T} \right) \times MW_{CH_4} \times 10^{-3} \frac{\text{kg}}{\text{g}} \times GWP_{CH_4} \dots\dots\dots (7)$$

其中，

B：豬隻沼氣產量 ($m^3/\text{head}/\text{year}$)

C：甲烷純度 (%)

P：1 atm

R：0.0821 L · atm/mol · K

T：298 K

GWP_{CH_4} ：25

結果與討論

I. 評估養豬畜牧場廢水二氧化碳減量額度

本研究分別針對彰化、雲林、屏東三間不同規模之養豬畜牧場進行分析，彰化場飼養量為 46,000 頭 / 日，此牧場內總計有 2 座完整之廢水處理設施；雲林場飼養量為 20,000 頭 / 日；而屏東場飼養量則為 4,200 頭 / 日。三家牧場皆已完成建置沼氣發電設備並進行發電。表 1 為本研究於 110 年至三間牧場採樣分析之水質 COD 濃度，以此為基礎利用小規模方法學 AMS.III.H. 廢水處理之甲烷氣回收專案，進行牧場廢水二氧化碳減量額度的計算，牧場整年度個別之二氧化碳轉換潛勢如圖 1 所示。個別而言，彰化場的廢水是最具有二氧化碳轉換潛勢，其減量額度為 14,000 t CO₂e/year，雲林場之減量額度為 7,050 t CO₂e/year，屏東場之減量額度則為 512 t CO₂e/year。究其原因主要是因為彰化場的廢水量與飼養量是三場中最高的。

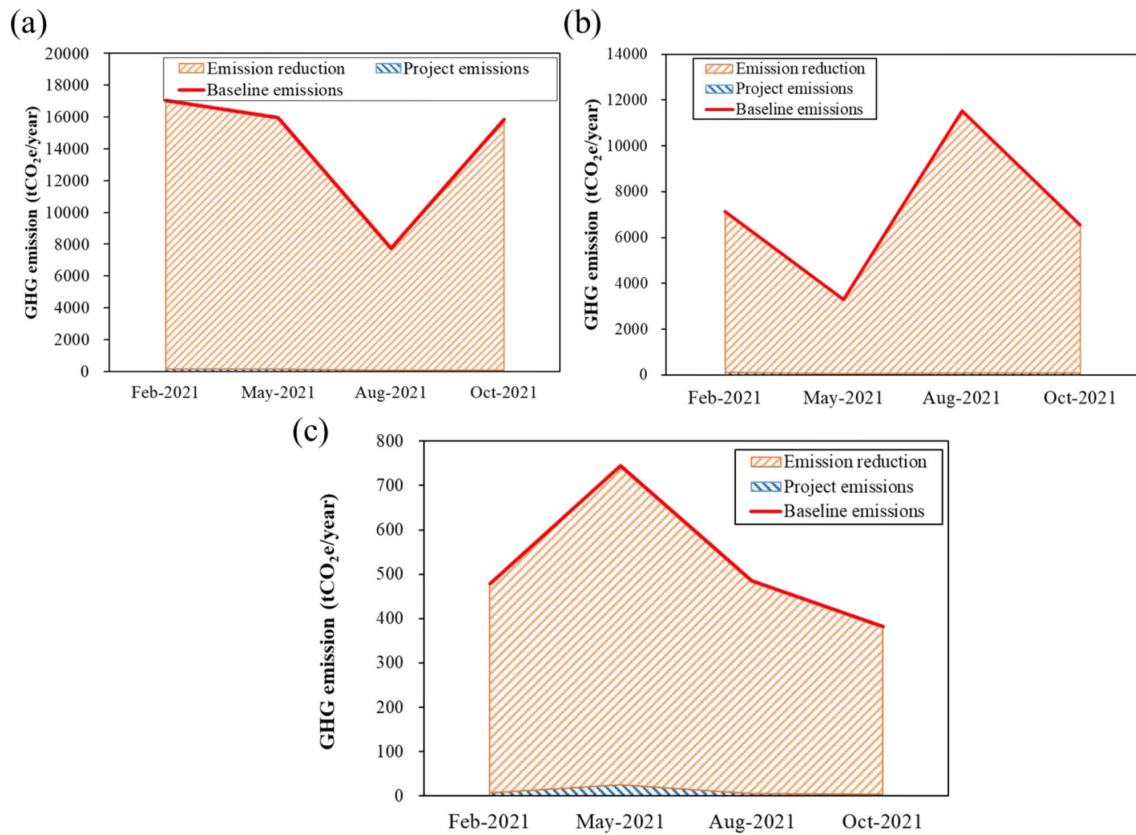


圖 1. 養豬畜牧場 110 年整年度廢水二氧化碳當量轉換潛勢 (a) 彰化場 46,000 頭 / 日、(b) 雲林場 20,000 頭 / 日、(c) 屏東場 4,200 頭 / 日。

Fig. 1. The GHG emission reduction potential estimated by the conversion of wastewater quality in the course of 2021. (a) Changhua farm 46,000 head/day, (b) Yunlin farm 20,000 head/day, and (c) Pingtung farm 4,200 head/day.

表 1. 牧場廢水處理單元水質 COD 濃度

Table1. The inflow and effluent COD concentrations of wastewater in anaerobic digesters for three pig farms

	Sampling time	COD (mg/L)		COD Removal efficiency ((A-B)/A) × 100
		Raw water after solid-liquid separation (A)	Anaerobic digester effluent (B)	
Changhua farm	1 st treatment plant	Wastewater flowrate = 503.4 CMD (m ³ /day)		
	2021/02	12,450	955	92.3%
	2021/05	13,940	1,091	92.2%
	2021/08	7,190	600	91.7%
	2021/10	11,900	606	94.9%
	2 nd treatment plant	Wastewater flowrate = 400 CMD (m ³ /day)		
	2021/02	10,100	857	91.5%
	2021/05	7,760	1,215	84.3%
	2021/08	3,220	412	87.2%
	2021/10	8,480	454	94.6%

表 1. 牧場廢水處理單元水質 COD 濃度 (續)

Table1. The inflow and effluent COD concentrations of wastewater in anaerobic digesters for three pig farms (continued)

	Sampling time	COD (mg/L)		COD Removal efficiency ((A-B)/A) × 100
		Raw water after solid-liquid separation (A)	Anaerobic digester effluent (B)	
Yunlin farm	Wastewater flowrate = 351.05 CMD (m ³ /day)			
	2021/04	14,350	1,990	86.1%
	2021/06	6,890	1,200	82.6%
	2021/09	21,320	1,194	94.4%
	2021/10	12,550	1,155	90.8%
Pingtung farm	Wastewater flowrate = 84 CMD (m ³ /day)			
	2021/03	4,270	798	81.3%
	2021/06	5,680	368	93.5%
	2021/09	4,030	495	87.7%
	2021/10	3,200	422	86.6%

評估牧場每隻豬所產生的甲烷排放量 (以二氧化碳當量表示), 以養豬畜牧場在養頭數計算各牧場每隻豬一年的甲烷減量額度, 可得其豬隻甲烷排放係數, 彰化、雲林、屏東分別為 305 ± 93.1 、 352 ± 169 及 122 ± 34.5 kg CO₂e/head/year。進一步分析各牧場的規模、甲烷減量額度與豬隻甲烷排放係數之關係, 如圖 2 所示當牧場規模越大, 其牧場的甲烷減排總量則越高, 換言之, 當牧場規模越大, 其沼氣發電效益應當也越大。另一方面, 固液分離後原水 COD 值則是影響單位廢水量減排效益的主因, 屏東場固液分離後原水的 COD 值明顯較另兩場偏低, 造成單位廢水量溫室氣體減量效益顯著低於其他兩場。以本研究採樣所得之結果而言, 彰化、雲林、屏東各場廢水中甲烷能轉換之二氧化碳當量平均分別為 15.5 ± 4.7 、 20.1 ± 9.6 及 6.1 ± 1.7 t CO₂e/year/CMD。

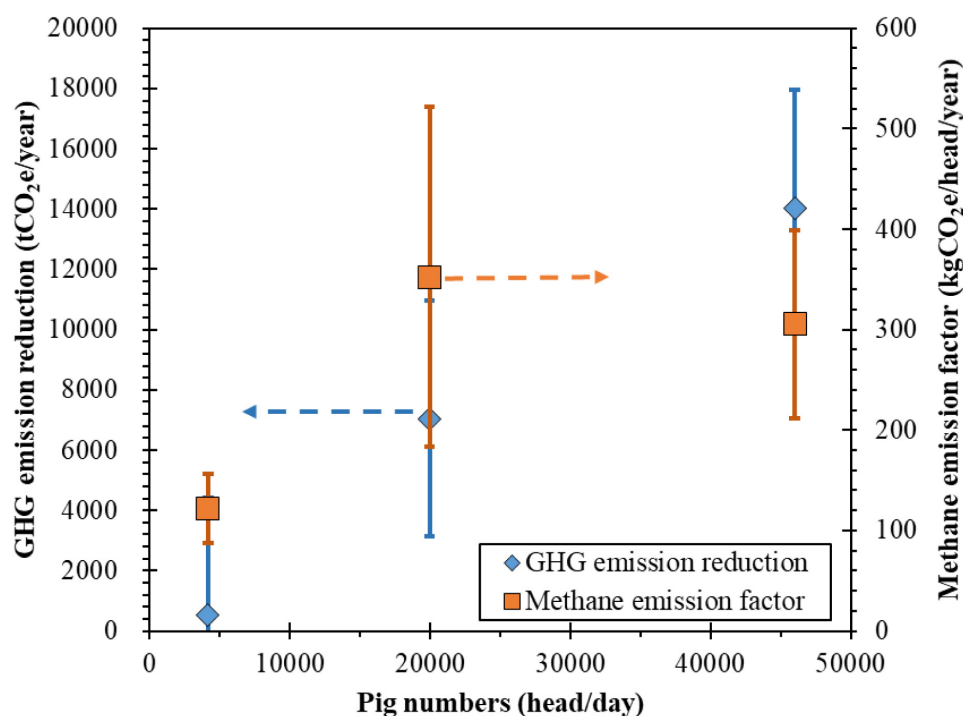


圖 2. 養豬畜牧場規模與溫室氣體減量額度及豬隻甲烷排放係數之關係。

Fig. 2. The GHG emission reduction and the methane emission factor in association with pig numbers.

以標準基線方法學的開發而言, 提供一個可以辨識甲烷排放係數有效性的配套工具, 有其必要性。本研究透過政府公開資訊, 收集國內養豬場的水污染防治措施計畫 (簡稱水措計畫), 透過其中的基本數據, 可以歸納出以養豬廢水 COD 值為基礎的 CDM 方法學, 可用以辨識甲烷排放係數有效性的判準方法。圖 3 為本研究利用收集國內 33 場養豬頭數 1,000 頭以上之一貫場的水措計畫資料, 計算每頭豬隻每天產生之 COD 值 (g/head/

day)，該限制值 LV (limit value) 的計算如下：

$$LV_{\text{(每頭豬隻每天產生之 COD 值 (g/head/day))}} = (Q \times \text{COD}_0) \div P \dots\dots\dots (8)$$

其中，

Q = 每日最大處理水量 (CMD)

COD₀ = 原廢水水質化學需氧量 (mg/L)

P = 豬隻在養頭數 (head)

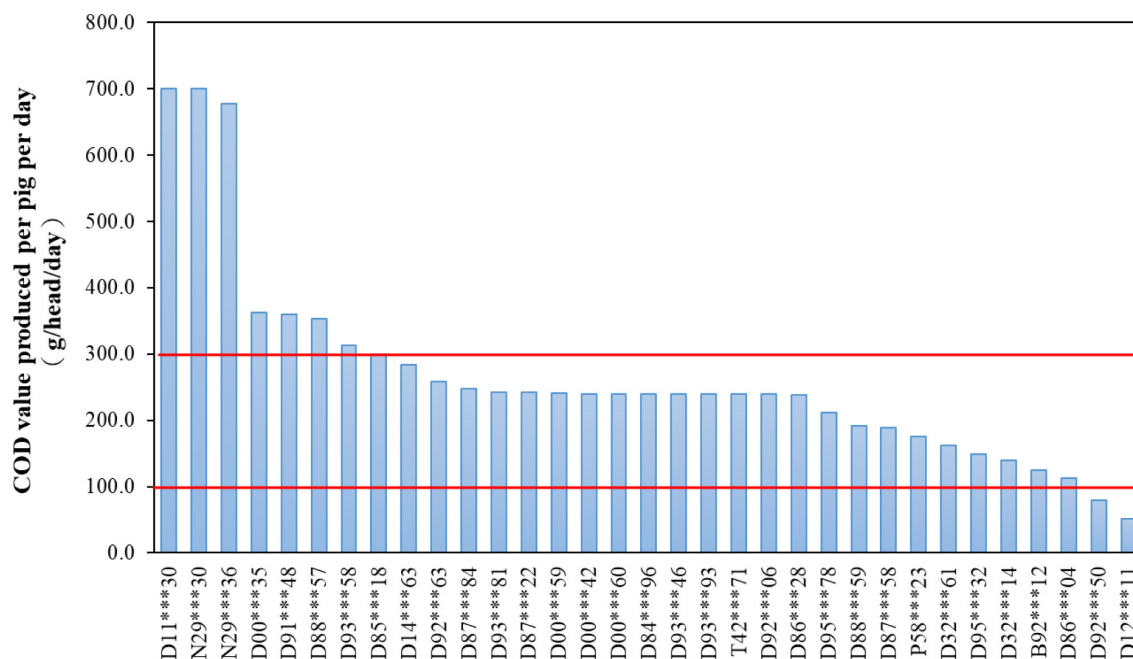


圖 3. 以水措計畫資料計算臺灣每頭豬隻每天產生之 COD 值 (LV 值, g/head/day)。

Fig. 3. The daily COD value per pig (LV value) in Taiwan estimated by the data of the water pollution control measure plans (Limit value (LV), g/head/day).

扣除其中最高值的三間養豬場與最低值的二間養豬場，整體而言，有 24 間養豬場的 LV 值介於 100 – 300 g/head/day，換言之，在減碳潛力的評估上，每頭豬每天能排放的 COD 值介於 100 – 300 g 應是合理的範圍。以臺灣本土數據而言，實際排放至廢水處理場之污染量為平均每頭豬每天產生約 30 公升廢水量，COD 為 250 g，SS 為 150 g (楊，2004)，與上述利用水措計畫資料彙整並計算的 LV 值之結果一致，故可作為判斷養豬場所提供的 COD 數據是否具備可用性之原則。

表 2 彙整本研究現場採樣之數據、各場之水措資料及本研究分析所得之數值，同時也將文獻養豬沼氣發電實例手冊 (2017) 所提供之數據進行了分析，包括以 CDM 方法學進行減碳量、計算其 LV 值、COD 去除率等，以比較造成不同養豬場甲烷排放係數差異的原因。結果顯示所有牧場的厭氧池出流水 COD 移除率皆大於 80% 以上，彰化場、雲林場、28,000 頭牧場及 3,200 頭牧場各項數值雖然皆不相同，但其 LV 值皆介於 100 – 300 g/head/day。分析結果顯示出，當 LV 值在 100 – 300 g/head/day，不同牧場間之甲烷排放係數相近 (346 ± 32.2 kg CO₂e/head/year)，與 Su 及 Chen (2018) 之建議值接近。就標準差而言，表 2 所示的甲烷排放係數的標準差達 827 kg CO₂e/head/year，但僅考慮 LV 值在 100 – 300 g/head/day 間的排放係數，則其標準差為 32.2 kg CO₂e/head/year，顯示，LV 值可作為甲烷排放係數的有效判定指標。而屏東的每頭豬隻產生的 COD 量相對偏低 (LV = 85.9 g/head/day)，與固液分離後原水 COD 值偏低有關，實務上而言，正常的飼養過程中，豬隻不應該產生過低量的豬糞尿，故當 LV 值過低時，進一步分析豬隻飼養狀況、廢水廠水質管理等可能造成的原因有其必要性。另一方面，2,200 頭牧場 LV 值異常高 (LV = 1,470 g/head/day)，則與廢水產出量偏高以及其 COD 值異常的高有關。以臺灣本土數據而言，每頭豬隻平均每天產生約 250 g COD (楊，2004)，該牧場高出將近 6 倍的 COD 排放量，與近 2 倍的廢水排放量，因此，以 2,200 頭牧場的數據所得之甲烷排放係數應屬不合理。本研究建議當養豬場的 LV 值未介於 100 – 300 g/head/day 時，所得之甲烷排放係數需被排除。故本研究排除屏東場與 2,200 頭牧場所得之甲烷排放係數 (養豬沼氣發電實例手冊，2017)。

表 2. 彰化牧場、雲林牧場、屏東牧場及其他牧場的 LV 值

Table 2. LV values of Changhua farm, Yunlin farm, Pingtung farm and others

Farm	Maximum daily Pig numbers	Maximum daily wastewater flowrate	Wastewater produced per pig per day	COD of raw water after solid-liquid separation	COD removal efficiency	Methane emission factor	LV
	P (head/day)	Q (CMD)	(Q/P) (L/head/day)	COD _o (mg/L)	(%)	(kg CO ₂ e/head /year)	(g/head/day)
Changhua (first)	26,000	503.4	19.4	11,370	94.9	331	220
Changhua (second)	20,000	400	20	7,390	89.4	272	148
Yunlin	20,000	351.05	17.6	13,778	88.5	352	242
Pingtung	4,200	84	20	4,295	87.3	122**	85.9
28,000 head*	28,000	737	26.3	8,438	95.0	342	222
3,200 head*	3,200	162.3	50.7	5,388	86.6	383	273
2,200 head*	2,200	149.3	67.9	21,679	96.9	2,310**	1,470

* The source of raw data (A practical handbook of swine biogas power generation, 2017)

** Abnormal value based on the LV test.

II. 比較不同計算方法之豬隻甲烷排放係數與牧場規模之關係

本研究利用二種不同方法計算不同牧場之豬隻甲烷排放係數：方法一為 CDM 的方法學，方法二則是依方程式 7 理想氣體方程式進行計算 (Su and Chen, 2018)。表 3 彙整本研究自行採樣之三間養豬畜牧場與文獻之數據。依小規模 CDM 方法學 AMS.III.H.，以養豬畜牧場廢水 COD 值削減量計算所得之豬隻平均甲烷排放係數為 346 ± 32.2 kg CO₂e/head/year (已利用 LV 值排除有效度不足之數據)；實際沼氣產量以理想氣體方程式計算所得之豬隻甲烷排放係數則介於 178 到 293 kg CO₂e/head/year 之間。Su 及 Chen (2018) 研究臺灣北中南三處的養豬畜牧場，豬隻規模介於 9,800 – 18,000 頭之間，三場的 COD 平均去除率為 77%。平均甲烷排放係數為 14.4 kg CH₄/head/year (以 GWP_{CH₄} 值取 25 換算為二氧化碳當量之排放係數為 360 kg CO₂e/head/year)。我國 2021 國家溫室氣體排放清冊報告 (行政院環境保護署, 2022b) 有關豬隻糞尿處理甲烷之排放係數，採用 IPCC 指引 (2006) 甲烷排放係數建議值 5 kg CH₄/head/year (IPCC, 2006)，換算為二氧化碳當量之排放係數為 125 kg CO₂e/head/year。由於 IPCC 指引針對亞洲地區的估計是以將近 40% 的豬隻糞尿管理屬濕式處理做推估 (IPCC, 2006)，若以

表 3. 不同計算方法分析之豬隻甲烷排放係數

Table 3. Analysis of the methane emission factor with different calculation methods

Calculation methods Pig numbers	Methane emission factor (kg CO ₂ e/head/year)		Methane purity (%)	Sources of raw data
	CDM Methodology AMS-III.H.	Ideal gas equation		
46,000 head/day (Changhua)	305	284	81.2	This work
28,000 head/day	342	—	—	A practical handbook of swine biogas power generation, 2017
20,000 head/day (Yunlin)	352	—	—	This work
4,200 head/day (Pingtung)	122*	—	—	This work
3,200 head/day	383	178	55.7	A practical handbook of swine biogas power generation, 2017
2,200 head/day	2,310*	293	59.2	A practical handbook of swine biogas power generation, 2017

* Abnormal value based on the LV test.

臺灣幾乎 100% 採用濕式的廢水處理估計，甲烷排放係數可達 313 kg CO₂e/head/year，與本研究所得結果及 Su 和 Chen (2018) 的研究結果相近。

圖 4 為本研究分析彙整之豬隻甲烷排放係數。結果顯示，CDM 方法學所得之結果，以 LV 值排除異常值後，各牧場之豬隻甲烷排放係數 (346 ± 32.2 kg CO₂e/head/year) 與 Su 及 Chen (2018) 之建議值相似。而以實際沼氣量和理想氣體方程式分析所得之結果，因為沼氣產量與沼氣純度都是重要的影響參數，不同牧場間之沼氣純度落差不小，整體呈現較為分散。然而，值得注意的是，對每日飼養頭數 2,200 頭的牧場而言，該場的 LV 值異常，致使 CDM 方法學計算產生異常高的豬隻甲烷排放係數 (2,310 kg CO₂e/head/year)，但透過實際沼氣量的推估，可得相對合理的係數值 (293 kg CO₂e/head/year)，顯示以實際沼氣量和理想氣體方程式仍是有效的評估方法；另一方面，該場亦提供了以 LV 值作為判定 CDM 方法學計算結果有效性的依據。因此，本研究提出以厭氧池出流水 COD 移除率 $\geq 80\%$ 和 LV 值介於 100 – 300 g/head/day 二項條件，作為評估養豬廢水溫室氣體排放潛勢有效性的判定依據。

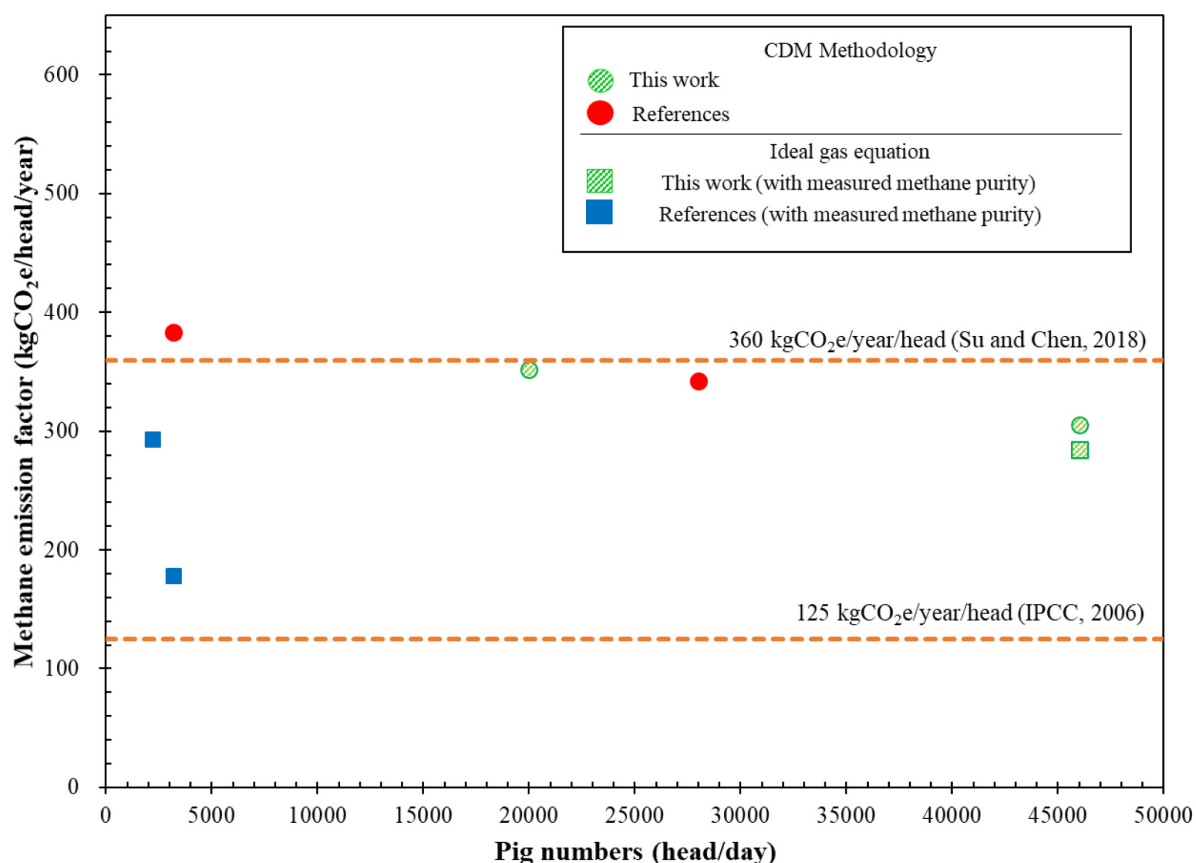


圖 4. 以不同方法計算不同規模畜牧場之豬隻甲烷排放係數之比較。

Fig. 4. Comparison of methane emission factors determined by different methods in association with pig numbers.

III. 本土養豬業沼氣破壞或再利用溫室氣體減量標準基線方法學之建議

本研究根據前項各項分析，設計標準基線方法學，此標準基線方法學之使用情境為：養豬畜牧場將牧場產生之豬糞尿，經由完整且功能正常的三段式廢水處理設施處理，蒐集並以任一種方式進行破壞或再利用產生的沼氣，其減量的基準設定為將養豬畜牧廢水產生之沼氣，由「不捕集破壞」改為「捕集並破壞」，其計算方法如下所示：

$$\text{溫室氣體減量額度 (tCO}_2\text{e)/year} = \text{豬隻在養頭數 (head)} \times \text{豬隻甲烷排放係數 (tCO}_2\text{e/head/year)} \dots\dots\dots (9)$$

其中，本土之豬隻甲烷排放係數則依據前項的各項分析結果，採預設值 (default value) 直接設定為 0.346 t CO₂e/head/year。養豬畜牧場只要將產生之沼氣蒐集後，以任一形式進破壞或再利用 (例如：直接燃燒、保溫燈燃料、家用瓦斯燃料、發電等)，皆可以使用本方法學進行減量額度的計算。本研究根據前面各項分析討論之結果，設定此標準基線方法學之使用檢核條件，建議使用此標準基線方法學進行溫室氣體減量額度開發之養豬畜牧場，須符合下列所有檢核條件方可適用，檢核條件表 4 所示。

表 4. 養豬畜牧業沼氣破壞或再利用標準基線方法學檢核表

Table 4. A checklist of the proposed domestic standardized baseline methodology for biogas destruction or reuse in the pig husbandry in Taiwan

Check item	Criteria	Inspection method
Quality of discharge water	Comply with the effluent standards for pig husbandry	Check the official water pollution control fee documents and related water quality testing reports for the past year.
LV value	$100 \leq LV \leq 300$	$LV (\text{g/head/day}) = (Q \times \text{COD}_0) \div P$ Q = Maximum daily wastewater flowrate (CMD) COD_0 = Chemical oxygen demand of raw wastewater (mg/L) P = Daily maximum pig numbers (head)
COD removal efficiency (E) of anaerobic digesters	$E \geq 80\%$	Check the certificated water quality testing reports in the past year.
Biogas destruction or reuse equipment	Installation of required equipment	Proof of purchase, installation and use of biogas destruction or reuse equipment (such as combustion towers, insulation lamps, household fuel gas use, and electric generators, etc.) shall be provided.
Wastewater flowrate	Installation of the water flow meter at the discharge point	A water flow meter shall be installed at the discharge point, and the flow rate shall be monitored and recorded once a month. Check the certificated wastewater discharge documents in the past year.
Biogas flowrate	Installation of gas flow meter in the front-end pipeline of biogas destruction or reuse equipment	The front-end pipeline of the biogas destruction or reuse equipment shall be equipped with a gas flow meter. The flow rate shall be monitored and recorded once a month. Proof of purchase and installation of the gas flow meter and the flow meter calibration document of the past year shall be provided.

本研究由於僅有三家養豬場的實測數據與部分文獻資料的參酌，而豬隻甲烷排放係數會受到多種因素的影響，例如：豬舍的設計（如：傳統、高床、混合）、豬舍沖洗頻率、牧場位址之氣候條件、飼料配方、牧場型態（如：一貫場、肉豬場、種豬場等）等。因此，未來可針對不同地區、牧場型態、飼養方式等因素，進一步建立不同條件下牧場所適用之豬隻甲烷排放係數。然就本計畫所提出之方法學而言，其架構已具備合理性與便利性。未來可以根據此架構，採用前述不同條件下適用的本土排放係數，進行我國養豬畜牧業標準基線方法學之設計。

結 論

本研究透過與三家養豬畜牧場合作執行採樣分析，以計算臺灣本土的豬隻甲烷排放係數。執行期間共分 4 季取樣，完成 4 次水樣收集與分析。彰化場的廢水是最具有二氧化碳轉換潛勢的，減量額度為 $14,000 \pm 4,280 \text{ t CO}_2\text{e/year}$ ，雲林場之減量額度為 $7,050 \pm 3,380 \text{ t CO}_2\text{e/year}$ ，屏東場之減量額度則為 $512 \pm 145 \text{ t CO}_2\text{e/year}$ ，顯示牧場飼養規模越大其甲烷減排總量則越高。牧場豬隻甲烷排放係數（以二氧化碳當量表示），彰化、雲林、屏東各場分別為 305 ± 93.1 、 352 ± 169 及 $122 \pm 34.5 \text{ kg CO}_2\text{e/head/year}$ 。在減量額度的開發上，本研究以厭氧池出流水 COD 移除率 $\geq 80\%$ 和 LV 值介於 $100 - 300 \text{ g/head/day}$ 二項條件，作為判斷養豬場的廢水相關數據是否具備可用性之原則。本研究使用自行採樣之數據與文獻數據資料，比較二種不同之計算評估方法所得之豬隻甲烷排放係數，建議可用於標準基線方法學的臺灣本土豬隻甲烷排放係數為 $346 \pm 32.2 \text{ kg CO}_2\text{e/head/year}$ ，此結果與 Su 及 Chen (2018) 提出之甲烷排放係數建議值相近。然而，由於本研究之數據有限，需有更多的研究與相關文獻做比較，故建議未來可進一步針對不同地區、牧場型態、飼養方式等因素，評估建立不同條件下牧場所適用之豬隻甲烷排放係數之可行性。

誌 謝

本研究獲得行政院環境保護署「109 年度補助溫室氣體減量管理及氣候變遷調適研究發展計畫」所補助之計

畫。在本報告中提及之觀點，不代表行政院環境保護署的意見。報告中所提及之商品、供應商名稱或商業產品皆非行政院環境保護署所指定。

參考文獻

- 連興隆。2022。臺灣畜牧業微型碳權標準化基線方法學之開發與可行性探討。行政院環境保護署 109 年度補助溫室氣體減量管理及氣候變遷調適研究發展計畫期末報告。
- 郭猛德、蕭庭訓。2009。沼氣利用技術及實例。現代養豬 31(1)：47-54。
- 漢寶農業可再生能源專案計畫書 (版本 10)。2020。
- 漢寶農畜產第三期廢水場沼氣發電計畫 (版本 9)。2020。
- 環境檢驗所。2021。事業放流水採樣方法 (NIEA W109.53B)。
- 行政院農業委員會。2019。沼氣再利用 (發電) 推廣與沼氣發電機操作手冊。
- 行政院農業委員會。2020。中華民國 109 年 5 月底養豬頭數調查報告。
- 行政院環境保護署。2022a。事業溫室氣體排放量資訊平臺。
- 行政院環境保護署。2022b。2021 年中華民國國家溫室氣體排放清冊報告。
- 行政院環境保護署水質保護網 a。畜牧廢水。
- 行政院環境保護署水質保護網 b。畜牧糞尿資源化。
- 行政院環境保護署水污法相關公開資訊平臺。2022。許可 / 申報 / 復工計畫資料複合查詢。
- 行政院環境保護署事業溫室氣體排放量資訊平臺。2022。AMS.III.H. 廢水處理之甲烷氣回收專案。
- 蘇忠楨。2008。丹麥畜牧業廢棄物處理之沼氣工廠技術介紹。國際農業科技新知 37：3-8。
- 蘇忠楨。2010。畜牧場沼氣能源產生量之現場評估。行政院農業委員會 99 年度科技計畫研究報告。
- 蘇忠楨。2011。養豬場溫室氣體減量策略效益評估。行政院農業委員會 100 年度科技計畫研究報告。
- 蘇忠楨。2014。綠能養豬發展新契機。行政院農業委員會農業知識入口網。
- 養豬場沼氣發電實例手冊。2017。行政院農業委員會畜產試驗所。
- 楊萬發。2004。臺灣地區水污染防治現況。<http://mail.tku.edu.tw/shgau/> 研究成果 / 歷屆發表的文章 / 兩岸交流 / 臺灣地區水污染防治現況 .htm
- CDM methodology. 2019. AMS-III.H.: Methane recovery in wastewater treatment, Version 19.0.
- CDM Executive Board. 2011. Guidelines for the Establishment of sector specific Standardized Baselines-Version 2. UNFCCC. EB65, Annex, 23.
- Hayashi, D., N. Mueller, S. Feige, and A. Michaelowa. 2010. Towards a more standardized approach to baselines and additionality under the CDM. Zurich: Perspectives GmbH.
- Hayashi, D. and A. Michaelowa. 2013. Standardization of baseline and additionality determination under the CDM. Climate Policy. 13(2): 191-209.
- Hermwille, L., C. Arens, and M. Burian. 2013. Recommendations on the advancement of the CDM standardized baselines framework.
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). 2006. IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories.
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). 2019. Refinement to the 2006 IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories.
- Lee, M. K., R. M. Shrestha, S. Sharma, G. R. Timilsina, and S. Kumar. 2005. Baseline methodologies for clean development mechanism projects. UNEP Risø Center, Denmark.
- Schneider, L., D. Broekhoff, J. Fuessler, M. Lazarus, A. Michaelowa, and R. Spalding-Fecher. 2012. Standardized baselines for the CDM-Are we on the right track? Carbon Market Watch Policy Paper.
- Specific CO2 emissions in Residential Buildings in Republic of Korea (version 01.0). 2020. Clean Development Mechanism (CDM) Standardized baselines.
- Su, J. J. and Y. J. Chen. 2018. Monitoring of greenhouse gas emissions from farm-scale anaerobic piggery waste-water digesters, J Agric Sci, 156(6): 739-747.
- UNDP. 2013. Guidance Note Standardized Baselines.

Evaluation of GHG emission reduction potential and investigation of the methane emission factor of standardized baseline methods for pig husbandry in Taiwan ⁽¹⁾

Hsing-Lung Lien ⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾ and Tai-Lin Lin ⁽²⁾⁽³⁾

Received: Sep. 16, 2022; Accepted: Feb. 4, 2023

Abstract

The Taiwan EPA has launched the greenhouse gas (GHG) offset projects to facilitate the reduction of GHG emissions. However, it is difficult to promote the GHG offset project for biogas recovery destruction and/or reuse in the pig husbandry. One of the reasons is cost-intensive and time-consuming during the project development. Thus, the study was aimed at investigating the GHG reduction potential of the domestic pig husbandry and developing a simple evaluation guideline of the GHG reduction potential based on the principles of the standardized baseline methodology. The domestic methane emission factor based on the manure management was evaluated using the UN small-scale clean development mechanism (CDM) methodology AMS.III.H. and the ideal gas equation, respectively. Experiments were conducted in three pig farms located in Changhua, Yunlin, and Pingtung. It was found that the Changhua pig farm had the highest potential of the GHG emission reduction, which was estimated to be $14,000 \pm 4280$ t CO₂e/year. The methane emission factor of Changhua, Yunlin, and Pingtung was determined to be 305 ± 93.1 , 352 ± 169 , and 122 ± 34.5 kg CO₂e/head/year, respectively. The overall COD removal efficiency of anaerobic digesters must be greater than 80% and a LV value (the product of COD values and wastewater flow rates) must be in the range of 100-300 g/head/day were proposed as the essential criteria to justify the availability of the data of the piggery wastewater. As a result, the domestic methane emission factor was recommended to be 346 ± 32.2 kg CO₂e/head/year, which is consistent with that determined by Su and Chen (2018) where the factor was 14.4 kgCH₄/head/year, corresponding to 360 kg CO₂e/head/year.

Key words: Piggery wastewater, Greenhouse gas (GHG) offset project, Methane emission factor, Biogas, Standardized baselines.

(1) Contribution No. 2734 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Department of Civil and Environmental Engineering, National University of Kaohsiung, Taiwan.

(3) New Energy and Electricity Development Center, National University of Kaohsiung, Taiwan.

(4) Corresponding author, E-mail: lien.sam@nuk.edu.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(Abtract)，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、 μm 。
 - (2) 重量：kg、g、mg、 μg 。
 - (3) 體積：L、mL、 μL 。
 - (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 *、^a、^b、^c 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* Schumach) 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。

JOURNAL OF TAIWAN LIVESTOCK RESEARCH

Vol. 56 No. 1

March 2023

CONTENTS

	Page
1. Breeding and promotion of Black Velvet Silky chicken <i>Ming-Yang Tsai, Che-Ming Hung, Cheng-Yung Lin, Yih-Fwu Lin, Der-Yuh Lin, Yu-Shin Cheng, Kuo-Hsiang Hung and Hsiao-Lung Liu</i>	1
2. Study on genetic structure and phylogeny in Chihsin duck using microsatellite markers <i>Yi-Ying Chang, Liang-Yuan Wei, Jih-Yi Chen and Hsiu-Chou Liu</i>	9
3. Effects of cutting growth stages and stay heights on the silage quality of <i>Pennisetum purpureum</i> NP cv. TS3 <i>Jeng-Bin Lin, Nicole Timm, Tsair-Bor Yen and Hsi-Hsun Wu</i>	23
4. Analysis of bacterial diversity in activated sludge from livestock wastewater treatment by next-generation sequencing technology <i>Ren-Bao Liaw, Ya-Ling Huang, Tzu-Hsuan Huang, Jo-Ching Chen and Mei-Ping Cheng</i>	34
5. Effects of male and female chickens on the growth performances, blood characteristics, carcass traits and compare yield earnings for commercial red feather native chicken <i>Cheng-Yung Lin and Hsiu-Lan Lee</i>	46
6. The effects of <i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi and <i>Pueraria lobate</i> (Willd.) Ohwi on the anti-inflammatory activity in cultured macrophage cells and on the incidence of diarrhea for Holstein heifer calf <i>Kuo-Hua Lee, Wen-Hung Lin, Chun-hsuan Chao, Tsung-Yi Lin and Jih-Yi Chen</i> ...	55
7. Effects of growing-finishing pigs in water-pad cooling pig house on growth performance and water quality of wastewater treatment <i>Tein-Ming Su, Yi-Hsiang Weng, Cheng-Hsun Chung, Wei-Zhi Liu and Ting-Hsun Hsiao</i>	66
8. Evaluation of GHG emission reduction potential and investigation of the methane emission factor of standardized baseline methods for pig husbandry in Taiwan <i>Hsing-Lung Lien and Tai-Lin Lin</i>	

行政院
新聞局
出版
登記
證
字
第
六
七
七
號
交
寄

ISSN 0253-9209
DOI: 10.6991/JTLR



9 770253 920004

GPN:2005200015

定價：新臺幣二〇〇元