郭政宏,周　彪,严亨秀. 藏猪源解淀粉芽孢杆菌的益生性、安全性和应用性研究[J]. 江苏农业科学,2017,45(14):137 - 140.
doi:10.15889/j.issn.1002 - 1302.2017.14.038

藏猪源解淀粉芽孢杆菌的益生性、安全性和应用性研究

郭政宏, 周　彪, 严亨秀
(西南民族大学生命科学与技术学院,四川成都 610041)

摘要:探讨 1 株来自藏猪粪便中具有一定体外益生潜力的解淀粉芽孢杆菌 SWUN - TP23 在动物体内的益生性、安全性及添加到饲料中的应用性。结果表明,按 10^8 CFU/mL 饲喂小鼠对其生长性能影响最大,可促进小鼠胸腺和脾脏发育,日均增质量较对照组提高 1 倍左右,在肉眼和光学显微镜下观察小鼠心、肝、脾、肺、肾等内脏均未发现明显的病理变化;将解淀粉芽孢杆菌 SWUN - TP23 添加到发酵饲料中,可降解一定量的黄曲霉毒素 B_1。试验表明,该菌株能提高小鼠生长性能,增强小鼠的免疫力,安全无毒,且添加到发酵饲料中还能在一定程度上降低饲料中黄曲霉毒素 B_1 的含量,具有一定的应用价值。

关键词:藏猪;解淀粉芽孢杆菌;益生性;安全性;黄曲霉毒素 B_1
中图分类号: S852.6　　**文献标志码:** A　　**文章编号:**1002 - 1302(2017)14 - 0137 - 03

解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)是一种在形态、生理生化、培养特征等方面与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)非常相似的芽孢杆菌,在生长繁殖过程中能产生许多淀粉酶、蛋白酶、抑菌物等代谢产物[1]。2007 年,解淀粉芽孢杆菌 FZB42 全基因组序列的测定,使人类对这种芽孢杆菌有了更多的了解,同时也了解了淀粉芽孢杆菌在多方面的研究应用[2];如在动物饲养研究中,González - Ortiz 等用解淀粉芽孢杆菌 CECT5940、屎肠球菌 CECT4515 复合制剂饲喂成年狗,促进了营养物质的消化吸收、降低了粪便中致病菌的含量[3];在环境保护研究中,高大响等从健康鸡粪便中分离到 1 株具有除臭作用的解淀粉芽孢杆菌[4]。李超等从滇池富营养化水中分离筛选得到 1 株对鱼腥藻生长具有抑制效果的解淀粉芽孢杆菌 DC1[5]等。黄曲霉毒素(aflation,简称 AFT)是由黄曲霉等真菌产生的次级代谢产物,具有抑制免疫、致癌的作用,威胁着畜牧业及饲料工业,其中影响最大、分布最广的就是黄曲霉毒素 B_1(aflatoxin B_1,简称 AFB_1),目前,利用微生物对 AFB_1 进行生物降解,具有特异性强、效率高等优点[6]。

动物体外肠道模型与动物机体胃肠道环境有一定的差异,一株潜在的益生菌能否在动物体内产生益生作用,终须进行动物试验等应用性研究。此次试验主要探讨解淀粉芽孢杆菌 SWUN - TP23 对动物生长性能的影响、对动物的安全性及添加到饲料中对黄曲霉毒素 B_1 的降解能力,以期为解淀粉芽孢杆菌 SWUN - TP23 应用于畜牧生产提供一定的参考依据。

收稿日期:2016 - 03 - 17
基金项目:四川省应用基础研究(编号:2014JY0038)。
作者简介:郭政宏(1990—),男,重庆垫江人,硕士研究生,主要从事动物微生物研究。E - mail:guozhenghong2010@163.com。
通信作者:严亨秀,博士,教授,主要从事病理学、药理学(兽)研究。E - mail:yanhengxiu@hotmail.com。

1　材料与方法

1.1　试验菌株

西南民族大学生命科学与技术学院现代生物技术中心在前期试验中分离筛选到的具有一定体外益生潜力的解淀粉芽孢杆菌 SWUN - TP23。

1.2　主要试剂

胰酪胨大豆肉汤培养基(trypticase soy broth,简称 TSB),购于青岛海博生物技术有限公司;黄曲霉毒素 B_1,购于美国 SUPELCO 公司;Mayer 氏苏木素染液、伊红复染液,购于珠海贝索生物技术有限公司;黄曲霉毒素 B_1 ELISA 试剂盒,购于南昌博恒生物制品有限公司。

1.3　主要仪器

电子分析天平(梅特勒 - 托利仪器有限公司)、光学显微镜、病理图像分析系统(日本 OLYMPUS 公司)、微量移液器(德国 EPPENDORF 公司)、石蜡包埋机、普通石蜡切片机,(德国 LEICA 公司)、病理组织漂烘仪(常州中威电子仪器有限公司)、细胞超声破碎仪(昆山市超声仪器有限公司)。

1.4　试验动物

Balb/c 小鼠 25 只(SPF 级),雌性,6 ~ 7 周龄,体质量 20 ~ 25 g,购于四川大学实验动物中心,饲养于 SPF 级动物房。

1.5　小鼠饲喂试验

1.5.1　益生性试验　挑取菌株接种于胰酪胨大豆肉汤培养基(TSB)中,37 ℃培养 12 h,调整细菌浓度为 10^6、10^7、10^8、10^9 CFU/mL。将 25 只小鼠随机分成 5 组,每组 5 只,设置空白对照组、10^6、10^7、10^8、10^9 CFU/mL 组。每组每只小鼠分别灌服 0.5 mL 无菌 TSB 液体培养基,10^6、10^7、10^8、10^9 CFU/mL 的菌株菌液。连续灌胃 21 d,每天观察并记录小鼠活动量、增质量、有无腹泻等。正常饲喂 21 d 后,将各组小鼠处死,解剖取出脾脏和胸腺,称质量并记录,计算胸腺指数和脾脏指数[7]。胸腺指数 = 胸腺质量(mg)/体质量(g);脾脏指数 =

脾脏质量(mg)/体质量(g)。

1.5.2　安全性试验　解剖观察各组小鼠内脏器官是否有肉眼可见的病理变化,并取小鼠心、肝、脾、肺、肾制作病理石蜡切片显微观察是否有组织病变。

1.6　对黄曲霉毒素 B_1(AFB$_1$)降解试验

1.6.1　确定菌株有无降解 AFB$_1$ 能力　取 10 mL 经过 12 h 培养的菌株菌液,4 ℃条件下 5 000 r/min 离心 30 min,分离上清液和菌体沉淀,上清液用 0.22 μm 孔径滤器过滤并于 4 ℃保存备用,菌体沉淀用无菌 TSB 液体培养基洗涤离心 2 次,加入 10 mL 无菌生理盐水制成菌体沉淀悬液备用;另取 10 mL 菌株发酵液,4 ℃条件下 5 000 r/min 离心 30 min,弃上清液,将菌体沉淀用无菌 TSB 液体培养基洗涤离心 2 次,加入 10 mL 无菌 TSB 液体培养基制成菌悬液,再将菌悬液进行超声波破碎,4 ℃条件下 10 000 r/min 离心 20 min,离心后的上清液用 0.22 μm 孔径滤器过滤制得胞内液,并于 4 ℃条件下保存备用。将 400 μL 全菌液、菌株上清液、菌体沉淀悬液、胞内液及无菌 TSB 液体培养基中分别加入到 100 μL 黄曲霉毒素 B_1 标准液中,于 37 ℃恒温培养箱中避光反应 48 h,用黄曲霉毒素 B_1 ELISA 试剂盒对黄曲霉毒素 B_1 的降解量进行测定并计算降解率[6]。黄曲霉毒素 B_1 降解率 =(1 - 试验组黄曲霉毒素 B_1 含量/对照组黄曲霉毒素 B_1 含量)×100%。

1.6.2　降解 AFB$_1$ 应用试验　将 1 kg 饲料平均分成试验组和对照组,按料 : 水 = 2 : 1(即 2 kg 饲料中加 1 kg 水)的比例,在试验组饲料中加入 250 mL 菌株发酵混合液,在对照组饲料中加入 250 mL 无菌 TSB 液体培养基,并充分搅拌均匀,于 37 ℃恒温培养箱中发酵 15 d;在饲料发酵开始后第 0、1、3、5、7、9、11、13、15 天,分别采集样品 10 g,用黄曲霉毒素 B_1 ELISA 试剂盒检测发酵饲料中的黄曲霉毒素 B_1 的含量,并计算降解率。

2　结果与分析

2.1　小鼠饲喂试验

2.1.1　益生性试验　由表 1 可知,不同浓度的解淀粉芽孢杆菌 SWUN - TP23 对小鼠生长性能有不同的影响,其中按 10^8 CFU/mL 饲喂小鼠对其生长性能影响最大,可使日均增质量较对照组提高 1 倍左右;同时,与对照组比较,菌株对小鼠胸腺指数和脾脏指数均有一定促进作用,这说明解淀粉芽孢杆菌 SWUN - TP23 不但能提高小鼠生长性能,还能在一定程度上促进小鼠免疫器官发育。

表 1　菌株 SWUN - TP23 对小鼠生长和免疫指数的影响(n = 5)

组别	胸腺指数(mg/g)	脾脏指数(mg/g)	日均增质量(g)
对照组	3.13 ± 0.33	3.71 ± 0.16	0.34 ± 0.25
10^6 CFU/mL	3.28 ± 0.82	3.72 ± 0.45	0.43 ± 0.31
10^7 CFU/mL	3.69 ± 0.87	3.99 ± 0.86	0.55 ± 0.14 *
10^8 CFU/mL	4.02 ± 0.58 *	4.27 ± 0.39 *	0.69 ± 0.22 **
10^9 CFU/mL	3.77 ± 0.53	4.11 ± 0.34 *	0.58 ± 0.29 *

注:“*”“**”表示与对照组相比,分别在 0.05、0.01 水平上差异显著。

2.1.2　安全性检测　任何菌株在生长代谢过程中不但能产生水解酶类等,也可能会产生一些毒素,通过安全性试验可检测解淀粉芽孢杆菌 SWUN - TP23 是否会产生对宿主有害的毒素等。通过试验,在对照组和各试验组小鼠饲喂期间,各组小鼠精神状态无差异,无腹泻情况发生,无类似中毒症状出现,解剖后肉眼观察心、肝、脾、肺、肾等内脏无病变,光学显微镜下观察病理切片无明显病理变化(图 1)。

2.2　对黄曲霉毒素 B_1 降解试验

2.2.1　菌株对 AFB$_1$ 的降解能力　由图 2 可知,解淀粉芽孢杆菌 SWUN - TP23 培养液不同组分对 AFB$_1$ 降解率各不相同,与对照相比,全菌液和上清液降解能力较强,分别为 42.13%、31.57%;菌体沉淀悬液降解能力较差,仅为 3.48%;胞内液基本没有降解能力。因此,可认为解淀粉芽孢杆菌 SWUN - TP23 能代谢产生对黄曲霉毒素 B_1 具有一定降解作用的物质,且该物质主要存在于菌株培养液的上清液中。

2.2.2　降解 AFB$_1$ 应用试验　由图 3 可知,在第 13 天时,对照组发酵饲料中黄曲霉毒素 B_1 的含量为 10.88 μg/kg,已超过国家安全限量(10 μg/kg)[8],而试验组发酵饲料中黄曲霉毒素 B_1 的含量为 6.85 μg/kg,低于国家安全限量,说明在饲料中添加解淀粉芽孢杆菌 SWUN - TP23 能够在一定程度上降低饲料中 AFB$_1$ 含量,以提高饲料饲喂动物的安全性。

3　讨论

动物体质量的增加与减少是动物机体对营养物质代谢能力和健康状况最直接的反映,益生性试验结果说明各个浓度的解淀粉芽孢杆菌 SWUN - TP23 都能提高小鼠的生长性能,其中按 10^8 CFU/mL 饲喂小鼠可使日均增质量较对照组提高 2 倍左右,究其原因可能是解淀粉芽孢杆菌 SWUN - TP23 定植于小鼠肠道中,促进了肠道对蛋白质等营养物质的分解吸收,从而提高了小鼠的生长性能。除此之外,安全性试验结果表明,该菌株不会代谢产生使动物机体中毒的物质,影响饲喂动物安全。

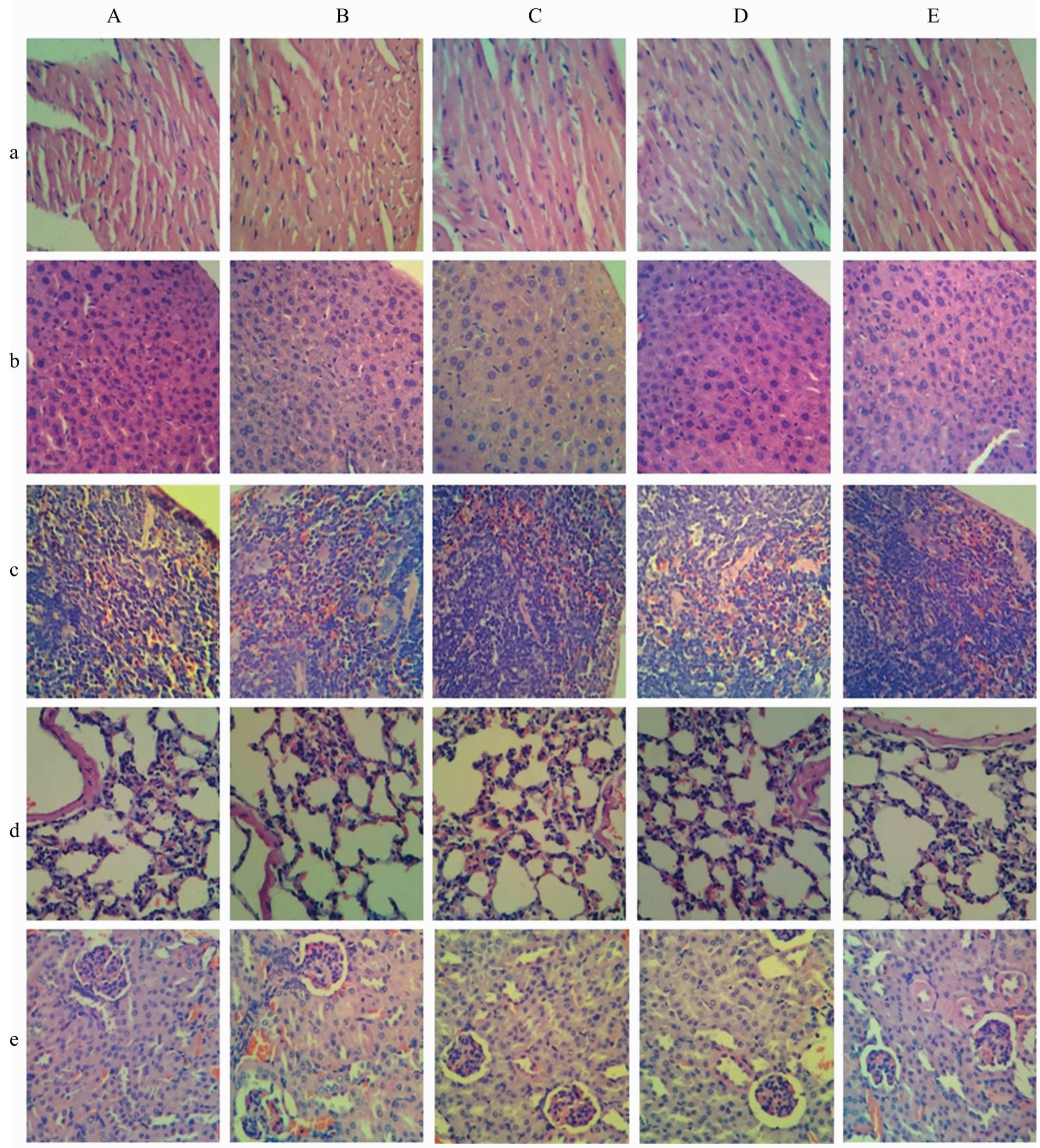
饲料霉变、霉菌毒素残留与污染是在畜牧业生产中很严重的问题。饲料或环境中各种霉菌孢子在适宜的环境下会萌发成各种霉菌,并迅速生长使饲料结块、发霉,产生霉菌毒素,污染饲料与环境[9-10],其中危害最大的就是黄曲霉毒素 B_1。通过降解应用性试验研究,将解淀粉芽孢杆菌 SWUN - TP23 添加到发酵饲料中能在一定程度上降低饲料中黄曲霉毒素 B_1 的含量,保证饲料对动物的安全性;在降解黄曲霉毒素应用性试验中,菌株对黄曲霉毒素降解率为 37.04%,较降解能力试验中 42.13% 低,可能是由于菌株在不同生长环境中增殖速率等不同导致的。

4　结论

通过对菌株益生性、安全性和降解黄曲霉毒素 B_1 能力的研究,解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)SWUN - TP23 对小鼠安全无毒,能提高小鼠生长性能,增强免疫力,且将解淀粉芽孢杆菌 SWUN - TP23 添加到发酵饲料中还能在一定程度上降低饲料中黄曲霉毒素 B_1 的含量。

参考文献:

[1]张　娟,杨彩梅,曹广添,等. 解淀粉芽孢杆菌及其作为益生菌的应用[J]. 动物营养学报,2014,26(4):863 - 867.



A—空白组；B—10^6 CFU/mL组；C—10^7 CFU/mL组；D—10^8 CFU/mL组；E—10^9 CFU/mL组；a—心；b—肝；c—脾；d—肺；e—肾

图1　内脏组织病理学观察(400×)

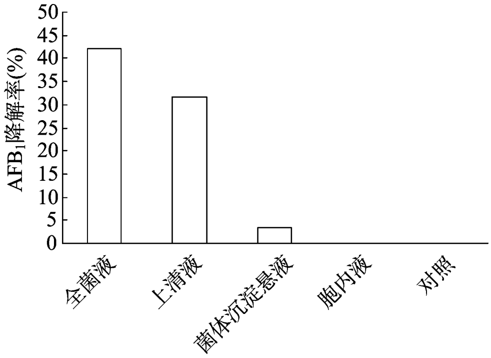


图2　解淀粉芽孢杆菌 SWUN-TP23 培养液不同组分对 AFB_1 降解率

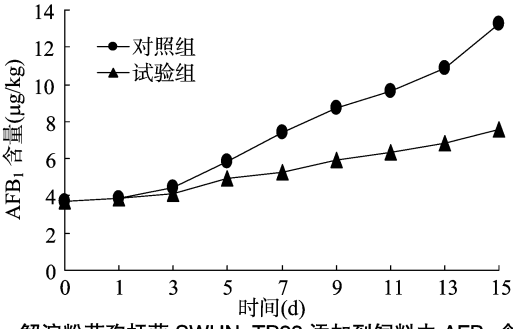


图3　解淀粉芽孢杆菌 SWUN-TP23 添加到饲料中 AFB_1 含量变化

[2] Chen X H, Koumoutsi A, Scholz R, et al. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth - promoting bacterium Bacillus amyloliquefaciens FZB42[J]. Nature Biotechnology, 2007, 25(9):1007 - 1014.

[3] Gonzálezortiz G, Castillejos L, Mallo J J, et al. Effects of dietary supplementation of *Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940 and *Enterococcus faecium* CECT 4515 in adult healthy dogs[J]. Archives of Animal Nutrition, 2013, 67(5):406 - 415.

郭海燕,程国虎,李拥军,等. 长江三角洲白山羊皮肤毛囊结构的观察[J]. 江苏农业科学,2017,45(14):140 - 142.
doi:10.15889/j.issn.1002 - 1302.2017.14.039

长江三角洲白山羊皮肤毛囊结构的观察

郭海燕, 程国虎, 李拥军, 张 昊, 秦康乐
(扬州大学动物科学与技术学院/江苏省动物遗传繁育与分子设计重点实验室,江苏扬州 225009)

摘要:长江三角洲白山羊是国内外唯一以生产优质笔料毛为特征的肉、皮、毛兼用型山羊品种,其所生产的优质笔料毛是制作高档毛笔的独特原料,由于其独特的产毛性能,又有笔料毛山羊之称。利用冷冻切片技术来比较生产优质笔料毛型个体与非优质笔料毛型个体颈脊部及背部皮肤毛囊的结构,旨在寻找 2 种性状毛囊结构的区别。结果表明,优质笔料毛型个体与非优质笔料毛型个体颈脊部及背部皮肤毛囊结构无差异,但 2 种笔料毛型个体颈脊部初级毛囊密度显著低于优质型个体背部初级毛囊密度。

关键词:长江三角洲;白山羊;冷冻切片技术;笔料毛;毛囊结构;毛囊密度
中图分类号: S827.1 **文献标志码:** A **文章编号:**1002 - 1302(2017)14 - 0140 - 03

长江三角洲白山羊(别称海门山羊)是我国唯一以生产优质笔料毛为特征的肉、皮、毛兼用的山羊品种,其所产的笔料毛具有毛色洁白、挺直有峰、富有弹性等特点,是制湖笔的优良原料。在生产加工中通常把笔料毛分为 3 类 23 个品种。其中,一类毛为低档毛,主要有上爪峰、粗爪峰、中短峰、提短峰、拣南峰等;二类毛为中档毛,主要有脚爪峰、细长峰、黄尖峰、白黄尖等;三类毛为高档毛(即优质笔料毛),主要有细光峰、粗光峰、透爪峰、长盖峰等,其中以三类毛里的细光峰最为名贵[1]。长江三角洲白山羊所生产的优质笔料毛是三类毛,其与一类毛、二类毛的主要区别是髓质的分布,一类毛、二类毛髓质分布于整个毛干,而三类毛毛干上段透明或呈点状髓,中段髓质少,下段充满髓质[2]。

所有哺乳动物的毛发都是由毛囊产生的,因此毛囊在毛纤维的生长发育中起决定性作用。毛纤维的生长发育依赖毛球中毛母质细胞的增殖与分化,而毛母质细胞的增殖与分化受控于毛乳头[3]。毛干位于毛囊的中央,暴露在皮肤外的为毛发,在皮肤内的为毛根。毛根由外向内又分为真皮鞘(dermal sheath)、外根鞘(ORS)、内根鞘(IRS)。内根鞘决定毛干的性状,它在外根鞘内部向上增殖移动,支撑生长的纤维,到了皮脂腺层,内根鞘细胞退化成碎片,最后消失,释放出毛纤维[4]。笔料毛的生产具有季节性,这可能与毛囊的生长周期有关[5],毛囊生长周期包括生长期(anagen)、退行期(catagen)和休止期(telogen)[6],细胞因子在毛囊生长周期的调控中起重要作用。近年来,有人证明此调节主要来自毛囊干细胞,干细胞有一定的生活周期,随毛囊进入退行期后,其分裂终止[7]。在针对济宁青山羊、辽宁绒山羊、新疆绒山羊、内蒙古绒山羊等毛纤维性状研究过程中,研究者利用切片技术对各种山羊皮肤毛囊进行观察研究[8-12]。而在对长江三角洲白山羊优质笔料毛性状的研究中,目前尚未有研究者对其优质笔料毛和非优质笔料毛着生部位皮肤毛囊结构进行观察。

本试验采用冷冻切片技术对优质笔料毛和非优质笔料毛着生部位皮肤毛囊进行观察研究,探究长江三角洲白山羊优质笔料毛着生部位的皮肤毛囊与其他部位皮肤毛囊是否存在差异,为研究长江三角洲白山羊优质笔料毛性状的形成机理提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验样品的准备 本试验所用长江三角洲白山羊,购

收稿日期:2016 - 03 - 27
基金项目:国家自然科学基金(编号:31572355);江苏省高等教育机构优势学科建设项目(编号:PAPD 2011 - 137)。
作者简介:郭海燕(1992—),女,河南洛阳人,硕士研究生,主要从事遗传育种与繁殖研究。E - mail:1937750042@qq.com。
通信作者:李拥军,博士,教授,博士生导师,主要从事养羊生产与羊的繁育等研究。E - mail:liyj@yzu.edu.cn。

[4]高大响,张雪松,张小华. 一株除臭菌的分离鉴定及其发酵条件的初步研究[J]. 黑龙江畜牧兽医,2011(4):100 - 102.
[5]李 超,吴为中,吴伟龙,等. 解淀粉芽孢杆菌对鱼腥藻的抑藻效果分析与机理初探[J]. 环境科学学报,2011,31(8):1602 - 1608.
[6]孙玲玉,李 超,郝海玉,等. 泰山枯草芽孢杆菌的分离鉴定及其对黄曲霉毒素 B_1 的降解研究[J]. 中国畜牧兽医,2014,41(8):246 - 250.
[7]龚 慧. 猪源益生芽孢杆菌的筛选及发酵工艺研究[D]. 洛阳:河南科技大学,2014.
[8]中华人民共和国卫生部. 食品中黄曲霉毒素 B_1 允许量标准:GB 2761—1981[S]. 北京:中国标准出版社,1982:131.
[9]Vargas E A,Preis R A,Castro L,et al. Co - occurrence of aflatoxins B_1,B_2,G_1,G_2,zearalenone and fumonisin B_1 in Brazilian corn[J]. Food Additives and Contaminants,2001,18(11):981 - 986.
[10]Zaghini A,Martelli G,Roncada P,et al. Mannanoligosaccharides and aflatoxin B_1 in feed for laying hens:effects on egg quality,aflatoxins B_1 and M_1 residues in eggs,and aflatoxin B_1 levels in liver[J]. Poultry Science,2005,84(6):825 - 832.