

黄江丽,张志红,王东升,等. 不同植物提取物组合对湖羊体外发酵及其生长的影响[J]. 江苏农业科学,2019,47(14):189-193.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.14.044

不同植物提取物组合对湖羊体外发酵及其生长的影响

黄江丽, 张志红, 王东升, 何 力, 计少石, 丁建南

(江西省科学院生物资源研究所,江西南昌 330096)

摘要:为研究开发反刍家畜降甲烷、促生长调节剂,采用体外产气法初步研究不同植物提取物、本试验构建的 1 株工程菌(1 株表达 α -淀粉酶酵母菌的酵母菌)及其不同组合对湖羊瘤胃发酵过程的影响。体外发酵试验表明,博落回提取物既有良好的降甲烷效果,又基本不影响微生物蛋白(membrane cofactor protein,简称 MCP)产生;发酵 12、24 h,对照组的甲烷产量分别为 7.62%、11.74%,而博落回处理组分别为 4.92%、6.14%;发酵 36 h 的微生物蛋白含量对照组为 410 mg/L,而博落回处理组为 408 mg/L;添加一定水平的工程菌在基本不影响 MCP 产生的前提下具有一定的降甲烷效果(降低甲烷产量 12.9%);博落回提取物与大蒜油和工程菌组合处理组与对照组相比,能抑制 35.4% 的甲烷产生,而其微生物蛋白产量还略高于正对照组,博落回提取物与肉桂油和工程菌组合处理组与对照组相比,抑制 20.2% 的甲烷产生,微生物蛋白产量则基本与对照持平。进一步的动物试验表明,博落回提取物与大蒜油按一定比例组合加以一定量的活化工程菌,能降低甲烷生成促进湖羊生长。

关键词:湖羊;植物提取物;降甲烷;微生态生长促进剂

中图分类号: S826.5;S816.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)14-0189-04

反刍动物瘤胃内产生的甲烷是有机物发酵的必然产物。据报道,反刍动物产生的甲烷会造成 2%~12% 能量的损失^[1]。同时,牛、羊等反刍家畜是超强温室气体——甲烷的主要排放源,全球数十亿头反刍家畜每年排出的甲烷达数亿吨,导致温室效应不断加剧。目前我国牛、羊等反刍家畜的年存栏数已达 3 亿头,随着牛、羊制品需求量的不断上升,这一数字还在不断刷新,而与此同时我国肩负的温室气体减排任务却十分艰巨。如何在满足日益增加的牛、羊制品需求的同时,逐步减少温室气体排放是各国经济、社会发展过程中遇到的重大挑战,具有“降甲烷”和“促生长”双重功效的微生态制剂为应对这一挑战提供了切实可行的途径。目前,抗生素离子载体等已经成功地用于降低瘤胃中能量和蛋白质的损失。由于抗生素在乳、肉中残留及其对人类健康影响的风险,公众越来越重视抗生素等促生长剂在畜禽生产中的使用情况^[2]。因此,开发天然的瘤胃调控剂对提高反刍动物生产性能和保护环境均有重大意义。

植物提取物具有天然无耐药性、毒副作用小等优势,近年来被广泛应用于反刍动物瘤胃调控研究中。本试验采用体外产气法初步研究不同植物提取物、本试验构建的一株工程菌(1 株表达 α -淀粉酶酵母菌的酵母菌)及其不同组合对湖羊瘤胃发酵过程的影响,再结合动物试验,筛选出 1 组降甲烷效果良好、有一定促生长作用的微生态生长促进剂,可为各种反刍家畜降甲烷微生态生长促进剂的研究提供借鉴。

收稿日期:2018-03-12

基金项目:国家自然科学基金(编号:31460614);江西省科技支撑计划(编号:20161BBF60102);国家科技支撑计划(编号:2012BAD39B05-4)。

作者简介:黄江丽(1980—),女,湖南郴州人,硕士,助理研究员,主要从事微生物生态学研究。E-mail:jiangli_35@tom.com。

通信作者:丁建南,博士,研究员,主要从事微生物生态学研究。

E-mail:jiannanding@yahoo.com.cn。

1 材料与方法

1.1 体外发酵试验

1.1.1 试验材料 用于本研究的肉桂油、大蒜油、薄荷油、丁香油均购自江西省吉安盛大香料油有限公司,肉桂油的主要成分为肉桂醛和苯乙醛,含量分别为 85.61%、7.36%;大蒜油的主要成分为丙级二硫化丙烯,含量为 59.86%;薄荷油主要成分为 L-薄荷醇,含量为 51.58%;丁香油的主要成分为丁香酚,含量为 85.13%。博落回提取物(博落回总碱含量 $\geq 60\%$ 、血根碱含量 $\geq 40\%$)由中科院亚热带研究所提供,莫能菌素(有效成分含量为 40%)购自江西南昌兽医防疫站。供试工程菌(1 株表达 α -淀粉酶酵母菌的酵母菌,菌种保藏号为 CCTCCM 2014390)为笔者所在研究室重组构建所得。工程菌的活化:用接种环挑取一定量的工程菌,于 100 mL LED 培养基中 30℃ 振荡培养 16 h 左右即达到生长峰值。

1.1.2 体外瘤胃发酵试验设计 2014 年 4—12 月体外试验分 3 批在笔者所在单位动物营养分析实验室进行。(1)降甲烷天然植物提取物的筛选。试验设负对照组(CK 组,未添加组)和正对照组即莫能菌素组(添加 60 mg/L 莫能菌素组),5 个处理组分别为肉桂油组、博落回提取物组、大蒜油组、薄荷油组、丁香油组。各处理组浓度统一用量为 500 mg/L,每个处理设 5 个重复,分别在 12、24、36 h 测定 CH_4 含量,发酵结束后测定发酵液 pH 值,并把发酵液保存在 4℃ 冰箱中,用于微生物蛋白(membrane cofactor protein,简称 MCP)含量测定。(2)1 株表达 α -淀粉酶酵母菌的体外发酵试验。试验设负对照组(CK 组,未添加组)和正对照组(添加 60 mg/L 莫能菌素组),处理组接种活化的工程菌 1 mL,设 5 个重复。发酵 24 h 测定 CH_4 含量,并测定发酵液 pH 值,微生物蛋白含量。(3)降甲烷天然植物提取物与工程菌组合的体外发酵试验。试验设负对照组(未添加组)和正对照组莫能菌素组(添加 60 mg/L

莫能菌素)。处理组添加不同比例的植物提取物并接种活化工程菌,组合 1 为博落回提取物+大蒜油,组合 2 为博落回提取物+肉桂油,组合 3 为博落回提取物+大蒜油+工程菌,组合 4 为博落回提取物+肉桂油+工程菌,天然提取物添加量 500 mg/L,工程菌添加量 1 mL/50 mL,每个处理设 5 个重复。分别在 12、24、36 h 测定 CH₄ 产量,发酵结束后测定发酵液 pH 值,并把发酵液保存在 4 ℃ 冰箱中,用于微生物蛋白含量测定。

1.1.3 体外培养 采用 Mauricio 等的压力读取式体外产气系统^[3]进行体外瘤胃发酵培养。体外发酵瘤胃液取自湖羊养殖基地——乐平市三王牧业有限公司的 5 只体质量为 (35±3) kg 的成年矮管湖羊。在试验当天晨饲前抽取湖羊瘤胃液,4 层纱布过滤至预热处理后的收集瓶,在 39 ℃ 水浴中保温,冲入 CO₂ 厌氧备用。在体外培养前,将发酵底物(稻草粉、玉米粉和黄豆粉按照 2:1:0.3 比例)及相应量的天然植物提取物和莫能菌素预先装入 100 mL 产气瓶中,然后准确抽取 40 mL 人工唾液。将产气瓶用 CO₂ 饱和后密封,并于 39 ℃ 恒温培养箱内过夜,再吸取 10 mL 瘤胃液于产气瓶中,混匀,产气瓶置于 39 ℃ 恒温培养箱中培养。厌氧人工瘤胃缓冲液的配制按 Menke 等的方法^[4]配制。

1.1.4 测定指标及方法 CH₄ 和 CO₂ 含量的测定采用 Gasboard 3200L 便携红外沼气分析仪(武汉四方光电科技有限公司),发酵液 pH 值用梅特勒-托利多酸度计直接测定,菌体蛋白含量的测定采用 Makkar 等的试验原理和试验方法^[5-6],用嘌呤法测定体外菌体蛋白含量。

1.1.5 统计分析 试验数据采用 Excel 2003 整理,运用 SPSS 18 统计软件进行统计分析,采用 LSD 法进行多重比较。

1.2 动物试验

1.2.1 试验材料 试验羊由乐平市三王牧业有限公司提供,请专业人员装好矮管,恢复良好后再供试验用。试验于 2015 年 3—9 月在乐平市三王牧业有限公司湖羊养殖基地进行。

1.2.2 试验方法 试验选择 15 只体质量为 33~39 kg 的成年湖羊作为研究对象,试验设 1 组负对照组(CK 组,未添加组)和 1 组正对照组莫能菌素组(添加 60 mg/L)和 3 个处理组:组合 1,博落回提取物+低浓度大蒜油+工程菌;组合 2,博落回提取物+高浓度大蒜油+工程菌;组合 3,博落回提取物+肉桂油+工程菌。各组之间博落回提取物和工程菌的添加量一致,分别为每只羊添加 21 mg/d 博落回提取物和活化的工程菌 1 mL;组合 1 的大蒜油添加量为每只羊添加 70 μL/d;组合 2 的大蒜油添加量为每只羊添加 700 μL/d;组合 3 的肉桂油添加量为每只羊添加 175 μL/d。每组设 3 只湖羊重复,预饲期 10 d,正式试验 15 d,处理组将添加物每天直接添加到精料中喂食。精料和粗料分开饲喂,每只羊饲喂 400 g/d 精料(分 2 次)、950 g/d 粗料,精粗比为 3:7,09:00—10:00 第 1 次饲喂,15:00—16:00 第 2 次饲喂,定时定量饲喂湖羊。粗料由苜蓿草和花生秧组成,精料由玉米粉、黄豆粉和麸皮组成。每天记录饲料剩余情况,正式试验 3 d 后采集 1 次瘤胃液,分析瘤胃液各项指标性能并发酵 24 h 后测定甲烷产量、瘤胃液 pH 值、微生物蛋白等指标。试验结束后再取瘤胃液进行分析,并对羊的体质量进行称量。

1.2.3 测定指标与方法 CH₄ 和 CO₂ 含量的测定采用 Gasboard 3200L 便携红外沼气分析仪(武汉四方光电科技有

限公司),发酵液 pH 值用梅特勒-托利多酸度计直接测定,菌体蛋白含量的测定采用 Makkar 等的嘌呤法^[5-6]测定体外菌体蛋白含量。

1.2.4 统计分析 试验数据采用 Excel 2003 整理,运用 SPSS 18 统计软件进行统计分析,采用 LSD 法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 体外发酵试验

2.1.1 植物提取物对甲烷产生、发酵液 MCP 和 pH 值的影响 先通过查阅文献初步确定初筛对象,再经过大量反复的体外发酵试验,筛选出部分降甲烷效果较好的植物提取物(表 1)。由表 1 可见,与负对照组相比,肉桂油、博落回提取物、大蒜油、薄荷油、丁香油在发酵 12 h 时,均有不同程度抑制甲烷产生的效果,其中肉桂油的抑制效果最明显,大蒜油次之,博落回提取物、薄荷油、丁香油这 3 种抑制效果接近。发酵到 24 h 时,肉桂油抑制甲烷产生效果依然最显著,大蒜油次之,而丁香油已无抑制效果。发酵到 36 h 时,肉桂油的抑制效果比较明显,甚至超出正对照组莫能菌素组,其他的均基本已经恢复与对照相同的产甲烷水平。

表 1 不同时间点各处理组的 CH₄ 含量变化情况

组别	CH ₄ 含量(%)		
	12 h	24 h	36 h
负对照组	7.62a	11.74a	7.54a
肉桂油	1.88d	2.54e	4.96b
博落回提取物	4.92b	6.14c	7.60a
大蒜油	3.66c	4.98d	7.44a
薄荷油	5.14b	5.14d	7.28a
丁香油	5.38b	13.24a	7.70a
莫能菌素	3.68c	7.92b	5.80b

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著,下表同。

发酵 12 h 时,肉桂油抑制产甲烷效果明显高于莫能菌素组,大蒜油的抑制效果与莫能菌素组相当,其他组的抑制效果不同程度地低于莫能菌素组;发酵 24 h 时,肉桂油的抑制效果极显著高于莫能菌素组,然后依次是大蒜油、薄荷油、博落回提取物,而丁香油组则显著高于莫能菌素组,与负对照组相当,即丁香油在 24 h 已无抑制效果;发酵到 36 h 时,则除了肉桂油抑制效果高于莫能菌素外,其他的抑制效果都不同程度地低于莫能菌素组,均与负对照组相当,即除肉桂油组外,其他试验组已无抑制效果。

MCP 是反刍动物最主要的氮源供应者,pH 值是一项反映瘤胃内环境稳态的指标。本试验取发酵 36 h 后的发酵液并测定其 pH 值和 MCP 含量。由表 2 可知,除博落回提取物处理的发酵液 MCP 含量与正负对照组接近外,其他处理均不同程度低于正负对照组,以大蒜油含量最低;各处理 pH 值与正负对照差异均不显著,说明不同处理对瘤胃环境影响不大。

2.1.2 1 株表达 α-淀粉酶酵母菌的体外发酵试验 初步了解到,瘤胃液体外发酵 24 h 即能大致确定各项指标的变化。因此,为节省工作量,低甲烷活性菌群的选育只选取发酵 24 h 这一时间点测定各项指标。由表 3 可知,发酵 24 h 时,与负对照组相比,工程菌处理组(降低 12.9%)有部分降甲烷效果,但没有正对照组效果明显。而微生物蛋白含量与

负对照组略有下降但明显高于正对照组,而各处理的 pH 值变化不大。说明工程菌处理组在影响微生物蛋白产量和瘤胃环境较小的前提下,能同时抑制甲烷的产生,是一种潜在的理想添加剂。

表 2 各处理组对发酵液 MCP 含量和 pH 值变化情况

组别	MCP 含量(mg/L)	pH 值
负对照组	410a	6.86a
肉桂油	324b	6.88a
博落回提取物	408a	6.88a
大蒜油	283b	6.85a
薄荷油	367a	6.90a
丁香油	386a	6.85a
莫能菌素	395a	6.85a

表 3 工程菌处理 24 h 后甲烷、MCP 含量及 pH 值的变化

组别	CH ₄ (%)	MCP 含量(mg/L)	pH 值
负对照组	6.82a	586a	6.88a
工程菌	5.94a	529a	6.86a
莫能菌素	4.21b	391b	6.87a

2.1.3 降甲烷天然植物提取物与工程菌组合的体外发酵试验 通过不同组合和添加不同的天然植物提取物并接种活化的工程菌反复进行瘤胃液的体外发酵试验,筛选出各项指标相对理想的组合。由表 4 可知,与负对照组相比,不同组合处

理均有抑制甲烷的效果,其中组合 3 效果最为明显,约降低 32.5%,而其微生物蛋白还显著高于正对照组;其次是组合 1 和组合 4,分别约降低 30.1%、20.5%,而组合 1 的微生物蛋白含量则略低于组合 4。莫能菌素作为正对照,抑制甲烷效果均比各处理显著,但由于其强抑制甲烷产生,而导致微生物蛋白含量也是最低。另外,从表 4 还可以看出,各处理的 pH 值比较接近,无明显变化。综合考虑各项指标变化可以得知,组合 3 和组合 4 是比较理想的处理组合。

表 4 不同处理 24 h 后甲烷、MCP 含量及 pH 值的均值变化

组别	CH ₄ 含量(%)	MCP 含量(mg/L)	pH 值
负对照组	7.45a	572a	6.90a
组合 1	5.21c	557a	6.88a
组合 2	6.18b	491b	6.89a
组合 3	5.03c	580a	6.87a
组合 4	5.92b	567a	6.85a
莫能菌素	3.61d	438b	6.86a

2.2 动物试验

2.2.1 试验对瘰管湖羊采食量的影响 图 1 为动物试验用瘰管湖羊。由于添加的博落回提取物和精油有刺激味特别是大蒜油比较明显,所以在饲喂瘰管羊的过程中发现直接饲喂会比较严重影响羊的采食量(表 5),而莫能菌素可能是由于采用无水乙醇处理而严重影响试验羊的食欲。



图1 动物试验用瘰管湖羊

表 5 不同处理 7 d 平均剩料量

组别	采食量(g/d)
负对照组	1 298.29c
组合 1	1 252.76b
组合 2	1 263.38b
组合 3	1 259.67b
莫能菌素	1 222.00a

表 6 动物试验 3 d 后不同组合处理对瘤胃液的影响

组别	MCP 含量(mg/L)	氨态氮含量(mg/L)	pH 值
负对照组	278b	76c	6.76b
组合 1	513a	138a	6.52c
组合 2	296b	107b	6.41c
组合 3	466a	110b	6.71b
莫能菌素	375b	106b	6.95a

2.2.2 试验对瘰管湖羊瘤胃液的影响 动物试验 3 d 后各处理对瘰管羊瘤胃液的影响总结见表 6,由于试验仪器故障,甲烷的产生量没收集到数据。由表 6 可知,与负对照组相比,除组合 2 的微生物蛋白含量提高较少外(提高 6.5%),组合 1 和组合 3 均显著提高了微生物蛋白量(提高 84.5%和 67.6%),也同时均高于正对照莫能菌素的微生物蛋白量(提高 36.8%和 24.3%);组合 2 略高于负对照组,而低于正对照组。与负对照相比,组合 1 氨态氮含量显著提高(81.6%),组合 2 和组合 3 的氨态氮含量分别提高 40.8%、44.7%;3 个组合氨态氮含量均高于正对照组(分别为 30.2%、0.9%、3.8%)。与负对照组相比,组合 1 和组合 2 的 pH 值明显降低,而组合 3 的 pH 值变化不大,而正对照组的 pH 值则显著高于各处理组。

由表 7 可知,与负对照相比,组合 1 和组合 2 降甲烷效果明显,甲烷产生量分别降低 18.5%和 23.7%,不过均低于莫能菌素的抑制效果(甲烷产生量降低 48.4%),有可能是与莫能菌素添加量过大有关系;组合 3 无抑制产甲烷效果,反而促进了甲烷生成。与负对照组相比,除组合 2 的微生物蛋白含量略有降低外(降低 1.8%),与 3 d 动物试验后的瘤胃液变化相同,组合 1 和组合 3 均显著提高了微生物蛋白量(35.4%、37.2%),但略低于正对照组莫能菌素的微生物蛋白含量;与负对照组相比,与 3 d 动物试验后的瘤胃液变化相反,组合 1 氨态氮含量显著降低 44.4%,组合 2 和组合 3 的氨态氮含量变化不大(组合 2 降低 7.3%和组合 3 提高 6.0%)。各处理组的瘤胃液 pH 值变化均不大,表明整个瘤胃液系统

状态基本稳定。综合考虑表 6、表 7 动物试验羊瘤胃液各个指标变化结果可知,组合 1 是比较理想的降甲烷微生态调控剂配方,而组合 3 在动物试验 3、7 d 对瘤胃液的降甲烷效果存在截然相反的效果,具体原因有待进一步研究分析。

表 7 动物试验 7 d 不同组合处理对瘤胃液的影响

处理	甲烷 (%)	MCP 含量 (mg/L)	氨态氮含量 (mg/L)	pH 值
负对照组	5.58b	393b	151a	6.53a
组合 1	4.55b	532a	84b	6.23a
组合 2	4.26b	386b	140a	6.49a
组合 3	8.58a	539a	160a	6.61a
莫能菌素	2.88c	554a	105b	6.72a

2.2.3 试验对瘻管湖羊体质量的影响 由表 8 可知,组合 1 处理的湖羊体质量增加率比负对照组略高 0.93%,而比正对照高 50.14%,说明组合 1 作为添加剂明显优于莫能菌素。组合 2 的湖羊平均体质量增长率比负对照组高 4.81%,比组合 1 高约 3.9%,这可能与添加的大蒜油浓度略高,能更好地抑制甲烷的同时又对微生物活动影响不大有关系。而组合 3 的湖羊平均体质量增长率远低于对照组,其原因有待进一步的试验求证。在本研究中,综合各项指标及动物试验,组合 1 和组合 2 是相对理想的处理组合,而它们的差别也仅是添加的大蒜油浓度不一样,所以进一步摸索不同的大蒜油添加比例,以达到最佳的降甲烷和促生长效果。

表 8 不同处理对瘻管湖羊体质量的影响

组别	体质量(kg)		平均增长率 (%)	与负对照组 相比(%)
	试验前	试验后		
负对照组	37.00a	39.00a	5.40a	—
组合 1	36.67a	38.67a	5.45a	0.93
组合 2	35.33a	37.33a	5.66a	4.81
组合 3	35.00a	35.33b	0.94c	-82.59
莫能菌素	36.67a	38.00a	3.63b	-32.78

3 讨论

3.1 体外发酵试验

本研究应用体外发酵试验主要测定湖羊发酵液的甲烷产量、MCP 含量及其 pH 值,初步筛选湖羊降甲烷,促生长微生物生态制剂成分及组合。有研究表明,博落回是一种纯天然绿色生物“三药”产品,可以作为防治水果、蔬菜、粮食作物、棉花的病虫害^[7-8]等的生物农药、兽药、医药原料。此外,博落回被欧洲食品安全局认可为用于动物饲料添加剂的资源植物^[9-10]。在奶牛饲料中添加博落回提取物可以增加氮的利用效率,因为博落回提取物加强了瘤胃微生物作用,减少了瘤胃无氨态氮降解作用,从而加强了瘤胃氮的消化^[11];此外,博落回提取物对奶牛的乳房炎具有改善作用。在羊饲料中添加博落回提取物可以帮助改善由于酷暑造成生长性能下降的不良反应,这种改善作用可能是由于抗炎作用和营养吸收加强而形成的^[12]。博落回提取物在湖羊瘤胃体外试验中,低浓度时提高甲烷产生,高浓度时能有效降低甲烷,促进发酵模式由乙酸型向丙酸型转变^[13],所以本研究所采用的博落回提取物添加浓度相对较高,而且没设浓度梯度,其添加浓度的影响有待进一步的研究探索。植物精油在反刍动物瘤胃发酵调控中

的研究比较多^[14-15]。本研究以降甲烷、促生长为主要目标,发现肉桂油、大蒜油和博落回提取物的降甲烷效果良好,而其中只有博落回提取物处理组的 MCP 含量与对照接近,其他都不同程度地导致了 MCP 含量的降低。

饲料中添加酿酒酵母培养物对稳定幼年或成年反刍动物瘤胃内微生物活动、保持正常的 pH 值、降低乳酸生成量、防止酸中毒、促进纤维分解菌生长方面都有积极作用^[16],本研究采用直接添加活化的笔者所在实验室重组的 1 株酵母工程菌,简单易行,结果表明其有一定的抑制甲烷效果,而对瘤胃液的 MCP 含量及 pH 值基本无影响。结合前面试验的结果,本研究进行几种天然植物提取物与工程菌组合的湖羊的体外发酵,筛选出博落回提取物与肉桂油或者大蒜油辅以一定剂量的重组工程菌组合来进行下一步的动物试验,而对各成分的添加比例及相互作用机制则未涉及,有待进一步的研究。

3.2 动物试验

由于添加的博落回提取物和精油有刺激味,特别是大蒜油比较明显,所以会比较严重影响羊的采食量,而添加低浓度大蒜油的平均剩料量反而比添加高浓度的大蒜油的略高,其原因有可能与羊的个体差异、试验过程数据收集误差有关,而莫能菌素组可能是采用无水乙醇处理严重影响试验羊的食欲。试验对瘻管湖羊瘤胃液的影响依然是采用体外培养的方法,添加了肉桂油组的组合在动物试验后 7 d 的甲烷产量相比对照还高,在一定程度上说明肉桂油后续有促进甲烷生成的作用,但由于体外试验的局限性,这一结果还有待于更先进、更科学的方法如呼吸室法等来检验。而各处理组对瘤胃液的影响则可以通过研究其瘤胃液微生物的结构变化进行进一步的分析。添加大蒜油的组合处理组与对照组相比均提高了湖羊的体质量增长率,其添加比例有待进一步优化;而添加了肉桂油的组合处理组和添加莫能菌素组的湖羊组体质量增长率反而降低,其原因有待进一步研究。

4 结论

在研究过程中发现,降甲烷的天然植物提取物比较多,但要达到降甲烷的同时,既能提高饲料利用率和生长速率相对较少,笔者通过大量的筛选和反复试验发现,博落回提取物基本具备这三重功效,是一种潜在的理想的反刍动物饲料天然植物添加剂。笔者所在的实验室构建的酵母工程菌也有一定的降甲烷能力,而其对反刍动物瘤胃内环境的影响则有待更深入研究。博落回提取物与大蒜油按一定比例组合并加以一定量的活化工程菌,无论在体外发酵试验还是在瘻管湖羊的动物试验,均降低甲烷生成。但由于博落回提取物与大蒜油的刺激性气味,其适口性还有待大大改善,还应进一步摸索不同的大蒜油添加比例,以达到最佳的降甲烷和促生长效果。

参考文献:

[1]Johnson K A, Johnson D E. Methane emissions from cattle [J]. Journal of Animal Science,1995,73(8):2483-2492.
[2]Sallam S M A, Bueno I C S, Brigide P, et al. Investigation of potential new opportunities for plant extracts on rumen microbial fermentation in vitro [J]. Options Méditerranéennes Série A Séminaires Méditerranéens,2009,85:255-260.

李红欢,陈 朔,康立超,等. 食源性单增李斯特菌毒力岛基因检测与致病性[J]. 江苏农业科学,2019,47(14):193-196.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.14.045

食源性单增李斯特菌毒力岛基因检测与致病性

李红欢¹, 陈 朔¹, 康立超², 钱凌霄¹, 张奇文¹, 杜冬冬¹, 马 勋¹

(1. 石河子大学动物科技学院, 新疆石河子 832003; 2. 新疆农垦科学院分析测试中心, 新疆石河子 832003)

摘要: 为了解食源性单增李斯特菌分离株的毒力岛 1(LIPI-1)和毒力岛 2(LIPI-2)的基因及致病性。利用 PCR 方法对 8 株分离株 LIPI-1 和 LIPI-2 进行基因检测,小鼠腹腔接种分离菌株悬液 5×10^7 CFU/只,进行致病性的初步试验。结果显示,LIPI-1 的 6 个毒力基因除 *actA* 基因检出率为 50.0% 外,*hly*、*prfA*、*plcA*、*plcB*、*mpl* 的检出率为 100.0%; LIPI-2 中 *inlA*、*inlB*、*inlC* 基因检出率为 100.0%,*inlD* 和 *inlE* 基因检出率分别为 87.5% 和 75.0%,*inlF* 和 *inlG* 毒力因子基因的检出率较低,分别为 50.0% 和 37.5%。小鼠致病性试验显示,8 株分离株均能致死小鼠,致死率在 50.0% ~ 100.0%。其中,LM5567 和 LM5570 在 5 d 内全部死亡,致死率为 100.0%,表明这 2 株菌对小鼠有强致病力。说明 LIPI-1 基因检出率高于 LIPI-2 的基因检出率;菌株的致病性与毒力岛基因的携带率无明显相关,但分离株对小鼠均有致病性,提示食品安全不容忽视。本研究为食源性单增李斯特菌毒力岛基因携带率与致病力的关系提供铺垫。

关键词: 食源性单增李斯特菌;毒力岛 1(LIPI-1);毒力岛 2(LIPI-2);致病性;基因检出率

中图分类号: S852.61 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)14-0193-04

李斯特菌属包括单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, LM 或 *L. monocytogenes*)、绵羊李斯特菌(*L. ivanovi*)、英诺克李斯特菌(*L. ivanovi*)、罗氏李斯特菌(*L. rocourtiae*)、默氏李

斯特菌(*L. marthii*)、西尔李斯特菌(*L. seeligeri*)、格氏李斯特菌(*L. grayi*)和威尔斯李斯特菌(*L. welshimeri*) 8 种菌^[1],其中,LM 是食源性李斯特菌病的条件性致病菌,与人的疾病密切相关,可穿越肠道屏障、血脑屏障和胎盘屏障^[2],在临床上引起脑炎、脑膜炎、流产和死胎等,同时该菌可引起家禽坏死性肝炎和心肌炎的病理变化^[3]。对于人类,特别是新生儿、孕妇、老年人及免疫功能缺陷者易引起疾病,致死率达 20% ~ 30%^[4-5],在新生儿和免疫力低下的人群中更高达 70%^[6]。许多国家已将此菌列为食品微生物安全检测项目,

收稿日期:2018-04-28

基金项目:国家自然科学基金(编号:31360614)。

作者简介:李红欢(1994—),女,新疆额敏人,硕士研究生,主要从事人兽共患致病机制与防控研究。E-mail:354950802@qq.com。

通信作者:马 勋,教授,主要从事病原微生物分子诊断、致病机理研究。E-mail:maxun779@126.com。

[3] Mauricio R M, Mould F L, Dhanoa M S, et al. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation[J]. Animal Feed Science & Technology, 1999, 79(4): 321-330.

[4] Menke K H, Raab L, Salewski A, et al. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*[J]. Journal of Agricultural Science, 1979, 93(1): 217-222.

[5] Makkar H P, Becker K. Purine quantification in digesta from ruminants by spectrophotometric and HPLC methods[J]. British Journal of Nutrition, 1999, 81(2): 107.

[6] Zinn R A, Owens F N. A rapid procedure for purine measurement and its use for estimating net ruminal protein synthesis[J]. Canadian Journal of Animal Science, 1986, 66(1): 157-166.

[7] 庞发根. 博落回(*Macleaya C.* (Willd) R. Br.)抗癌活性成分的研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学,2005.

[8] 程 辟,曾建国. 苯并吡啶类生物碱及其衍生物合成研究进展[J]. 有机化学,2012,32(9):1605-1619.

[9] Zeng J G, Liu Y S, Liu W, et al. Integration of transcriptome, proteome and metabolism data reveals the alkaloids biosynthesis in *Macleaya cordata* and *Macleaya microcarpa*[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e53409.

[10] Stiborova M, Vostanova J, Zdarilova A A, et al. *Macleaya cordata*

extract and Sangrovit genotoxicity: Assessment *in vivo* [J]. Biomedical Papers, 2008, 152(1): 35-39.

[11] Aguilar-Hernandez J A, Urias-Estrada J D, Lopez-Soto M A, et al. Evaluation of isoquinoline alkaloid supplementation levels on ruminal fermentation, characteristics of digestion, and microbial protein synthesis in steers fed a high-energy diet[J]. Journal of Animal Science, 2016, 94(1): 267-274.

[12] Estrada-Angulo A, Aguilar-Hernandez A, Osuna-Perez M, et al. Influence of quaternary benzophenanthridine and protopine alkaloids on growth performance, dietary energy, carcass traits, visceral mass, and rumen health in finishing Ewes under conditions of severe temperature-humidity index[J]. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2016, 29(5): 652-658.

[13] 张志红,黄江丽,何 力,等. 博落回提取物对湖羊瘤胃体外发酵和甲烷排放的影响[J]. 江西科学,2017,35(1):1-4,11.

[14] 金恩望,卜登攀,王加启,等. 利用批次培养法研究植物精油对瘤胃体外发酵的影响[J]. 甘肃农业大学学报,2014(2):5-12,20.

[15] 龙 森,景成福,袁 波,等. 植物精油对瘤胃发酵的调控作用[J]. 动物医学进展,2013,34(1):107-111.

[16] Chaucheyras-Durand F, Walker N D, Bach A. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: past, present and future[J]. Animal Feed Science & Technology, 2008, 145(1/2/3/4): 5-26.