

地顶孢霉培养物对奶牛体细胞数与乳中病原菌的影响

李洋, 窦秀静, 王一臻, 林聪, 张幸怡, 张广宁, 刘岩, 张永根

(东北农业大学动物科学技术学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 试验选用5只泌乳后期荷斯坦牛, 研究地顶孢霉培养物作为新型饲料添加剂对乳中体细胞数和病原菌相对表达量的影响。采用自体试验, 前后配对试验设计, 测定日粮添加ATC前后, 乳中体细胞数和五种病原菌的相对表达量。结果表明: 日粮中添加30g ATC后, 能够显著降低乳中的体细胞数和无乳链球菌、金黄色葡萄球菌以及大肠杆菌的相对表达量。并在停止添加ATC一周后, 体细胞数和无乳链球菌的相对表达量仍然处于较低水平。综上所述: ATC能够通过抑制乳中的病原菌数量从而降低体细胞数, 具有提高乳腺健康和改善奶牛生产性能的潜力, 是一种新型的饲料添加剂。

关键词: 地顶孢霉培养物; 奶牛; 体细胞数; 病原菌

乳中体细胞数和致病菌含量是生鲜乳安全监测的重要指标, 与乳制品安全紧密相连, 且在一定程度上反映了奶牛机体的健康情况^[1]。当奶牛健康状态低下时, 自身免疫力会降低, 使得外界病原菌更易侵袭乳房从而导致乳房炎的产生^[2], 给奶业生产造成巨大的损失。因此, 开发能够预防乳房炎且具有抗生素替代作用的新型绿色饲料添加剂迫在眉睫。我国是中草药大国, 虫草类物质作为我国传统药材, 其调节免疫^[3]、抗炎^[4]、抗菌^[5]等作用早已被人们熟知。而古尼虫草是我国稀有的虫草类药材, 含有同冬虫夏草相似的药理成分, 具有提高睡眠、调节免疫、提高记忆力、镇静和止痛等作用^[6,7]。古尼虫草中存在很多重要的次级代谢产物, 如虫草酸、虫草素、多糖和抗紫外线成分等^[8]。古尼虫草具有优秀的药理功能, 但是昂贵的价格限制了其在动物生产中的应用和发展。因此, 替代古尼虫草的人工培养物应运而生。地顶孢霉培养物是由从古尼虫草分离的地顶孢霉菌经人工发酵而得到的产品, 含有虫草素、虫草酸、多糖、甾醇和氨基酸等与古尼虫草相似的功能性成分。如果能够合理地将地顶孢霉培养物应用到动物生产中, 使其活性成分或作用转移到肉蛋奶等家畜产品上, 将具有重大的意义。

前人已经证明添加地顶孢霉培养物能够提高仔猪增重^[9], 提高蛋鸭的体重和产蛋率, 改善蛋品质^[10]。同时, 地顶孢霉菌丝体能够显著提高肝纤维化大鼠的免疫能力^[11], 地顶孢霉发酵液提取物具有优于维生素E的自由基清除能力^[12]。另外, 许多研究也发现地顶孢霉培养物所含有的功能性成分能够提高白虾的生产

性能和免疫能力^[13]。具有相似功能性成分的虫草类产品也能够改善小鼠的抗氧化能力和免疫能力^[14]。以上研究已经证明, 地顶孢霉培养物在改善动物免疫机能方面具有很大的潜力, 但在奶牛生产中尚缺乏应用。因此, 本试验旨在研究地顶孢霉培养物对奶牛乳中体细胞数量和病原菌相对表达量的影响, 为地顶孢霉培养物在奶牛生产中的应用提供理论基础和数据支持。

1 材料与方法

1.1 试验样品来源

地顶孢霉培养物(Acremonium Terricola culture, ATC)来自合肥迈可罗生物工程有限公司。地顶孢霉培养物由古尼虫草上提取的地顶孢霉菌经SDAY培养基斜面培养, 察氏培养基液体培养和发酵罐人工发酵等三级发酵法得到的灭活的虫草类真菌饲料添加剂, 含有26.84%粗蛋白(CP), 5.00%粗纤维(CF), 3.06%粗脂肪(EE), 4.04%粗灰分(Ash)和61.06%无氮浸出物(NFE)(干物质基础)。其中功能性成分含量分别是: 虫草酸84.50 g/kg, 虫草多糖44.60 g/kg, 虫草素0.432 g/kg, 甾醇0.597 g/kg, 总氨基酸218.1 g/kg。

1.2 试验设计与日粮管理

试验采用自体试验, 前后配对试验设计^[15,16]。选用5头产奶量接近(25.74±0.87 kg/d)、体重相近(637±25 kg)、胎次相同(3胎)、泌乳期相近(230±6天)、体细胞数相近(34.29±4.79万个/mL)的泌乳奶牛。奶牛每天07:00和19:00饲喂两次, 06:30、

表 1 TMR 日粮组成及营养水平

项目	含量(干物质基础, %)
全株玉米青贮	25.0
苜蓿	17.0
羊草	12.7
玉米	23.9
豆粕	9.0
豆皮	5.4
麦麸	4.5
磷酸氢钙	1.0
石粉	0.5
盐	0.5
预混料 ^①	0.5
总计	100.0
干物质	43.6
产奶净能 ^②	6.4
粗蛋白	13.2
中性洗涤纤维	47.5
酸性洗涤纤维	26.9
淀粉	29.4
钙	1.01
磷	0.54

注: ①全混和日粮中每千克预混料含有 Mn 6000 mg, Fe 4800 mg, Zn 9000 mg, Cu 2600 mg, I 120 mg, Se 80 mg, Co 70 mg, V_A 30000 IU, VD₃ 36000 IU, and V_E 465 IU.
②产奶净能为计算值, 其他指标为实测值。

12:00 和 18:30 挤奶 3 次, 自由饮水。试验期共 35d。1~7d 为试验前期 (Pre-trial), 奶牛饲喂 TMR 日粮 (日粮配方见表 1); 8~28d 为试验期 (Trial), 奶牛饲喂 TMR 日粮和 30g 地顶孢霉培养物; 29~35d 为试验后期 (Post-trial), 奶牛再次饲喂 TMR。在预饲期晨饲前, 将 ATC 与 100 g 左右的基础日粮进行混合, 预先饲喂给奶牛, 待奶牛完全采食后, 继续饲喂其他基础日粮, 以保证奶牛对 ATC 的完全采食^[16]。

1.3 测定指标及方法

乳中体细胞数的测定: 于试验前期, 试验期和试验后期的最后 2d 收集奶样, 每次挤奶时弃掉头三把奶后, 收集 100mL 奶样, 按照 4:3:3 的比例, 将早、中、晚的奶样进行混合, 加入防腐剂后送往实验室, 采用利拉伐体细胞计数仪记录体细胞数量。

乳中病原微生物的测定: 于试验前期、试验期和试验后期的最后 2d 收集奶样后, 按照 4:3:3 的比例, 将早、中、晚的奶样进行混合, 并立即保存于 -80℃ 冰箱内, 以备菌群 DNA 的提取。

原奶中总 DNA 的提取采用细菌 DNA 提取试剂盒 (美国, Sigma 公司), 具体操作步骤参照说明书。荧光定量所用仪器为 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪,

Real-time PCR SYBR Green I RT-PCR 试剂盒购自大连宝生物公司。Real-time PCR 扩增反应参数包括: 95℃ 变性 7 min, 55℃ 1 min, 72℃ 3 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 7 min。特异性引物序列由生工设计, 具体序列见表 2。本试验中, 乳中病原菌有乳房链球菌 (*Streptococcus uberis*)、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和停乳链球菌 (*Streptococcus dysgalactiae*)。试验通过荧光定量方法, 测定不同细菌相对于总菌的基因倍数。所有试验重复 3 次。基因的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行计算。

表 2 乳中菌的 PCR 引物序列

目标菌	引物	基因号
总细菌	5' CCTACGGGAGGCAGCAG	JQ170163.1
	3' ATTACCGCGGCTGCTGG	
乳房链球菌	5' TCGGCAATGGGGGAACC	KT376984.1
	3' GGATTTTCCACTCCCATTACCGTTC	
停乳链球菌	5' GTTGTTAGAGAAGAATGATGGTGGG	KR819487.1
	3' AAGTTCTCCAGTTTCCAAAGCGT	
无乳链球菌	5' TGAGGCTTGGTGTACTACTAGACTGAT	CP012480.1
	3' ATTGCTCCTTTCAAATAACTAACCTGTG	
金黄色葡萄球菌	5' CCGAAGGGGAAGGCTCTATC	KT390730.1
	3' TAAGTGTTAGGGGGTCCGC	
大肠杆菌	5' CGTCAATGAGCAAAGGTAATAACT	KT630840.1
	3' TCGGATGTGCCAGATGG	

1.4 数据处理及统计分析

利用 7500 System Software 分析 Real-time PCR 结果, 数据分析采用 SAS 9.1 软件进行统计分析, 多重比较采用 Duncan 法, 数据以平均值 ± 标准误的形式表示。

2 结果与分析

2.1 地顶孢霉培养物对奶牛乳中体细胞数的影响

由表 3 可知, 试验期和试验后期, 乳中体细胞数显著低于试验前期 (P=0.003), 试验期和试验后期体细胞数差异不显著, 说明 ATC 的有效作用时间至少持续 1 周。

2.2 地顶孢霉培养物对乳中病原微生物相对数量的影响

图 1 显示的是 ATC 对乳中病原菌的影响。与试

表 3 地顶孢霉培养物对乳中体细胞数的影响

项目	试验前期	试验期	试验后期	SEM	P 值
体细胞数量	34.29 ^a	23.22 ^b	26.61 ^b	2.13	0.003

注: 同行肩标不同小写字母表示差异显著 (P<0.05), 相同字母表示差异不显著 (P>0.05) 下同。

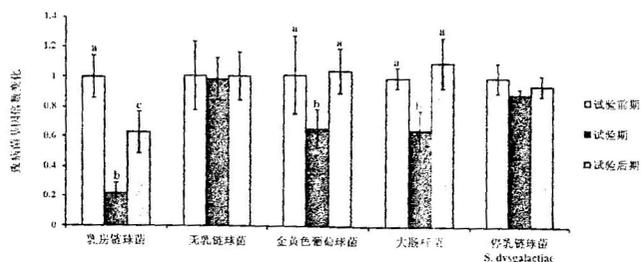


图1 地顶孢霉培养物对乳中病原菌的影响

验前期相比, ATC 的添加显著降低了乳房链球菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的丰度 ($P<0.05$)。试验后期, 几种病原菌的丰度均有所回升。然而, 乳房链球菌的基因相对表达量仍然低于试验前期 ($P<0.05$)。试验期间, 停乳链球菌与试验前期相比有降低趋势 ($P=0.07$), 但是 ATC 对无乳链球菌的基因表达量没有影响 ($P=0.91$)。

3 讨论

乳中体细胞数是奶牛乳腺健康的重要指标。体细胞数越高, 乳房的健康程度越差, 感染几率越高, 奶牛的乳房炎发病率也会相应提高^[17]。本试验中, ATC 对乳中体细胞数量有显著降低作用, 可能与 ATC 功能性成分的抗氧化作用有关。国内外大量试验已经证明, 虫草类物质以及活性成分(虫草多糖、虫草素)具有调节免疫抑制鼠^[18]、正常小鼠^[14]以及水生动物^[13]抗氧化的能力。而前人研究已经证明, 维生素 E 和硒等抗氧化剂能够提高患乳房炎水牛的抗氧化能力和细胞防御力, 从而降低体细胞数量^[19]。同时, Umesh 等也证明, 抗氧化剂的摄入能够提高水牛谷胱甘肽过氧化物酶活性和总抗氧化能力, 并降低乳中体细胞数量^[20]。因此, ATC 的功能性成分是该添加剂发挥作用的基础。而本试验中 ATC 对乳中病原菌丰度的调节也是降低体细胞数的重要原因。对乳中病原菌的检测在前人研究中也多有报道。当乳中体细胞数超过 10 万时, 体细胞数与乳房感染间存在着高度相关性^[21]。而导致乳房感染和体细胞数升高的最主要致病菌有金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和无乳链球菌^[22]。本试验中, 在试验期, 金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和无乳链球菌的丰度显著降低, 即可能与 ATC 中功能性成分的抗菌作用有关。前人研究证明, 虫草素和虫草多糖具有抑制梭菌^[5]和肠道内大肠杆菌^[23]等有菌的作用。因此, 可以推测, ATC 在控制乳腺病原菌方面具有巨大的潜力。但是, 具体的机理还不清楚, 有待进一步研究。

4 结论

地顶孢霉培养物能够通过抑制乳中的病原菌数量从而降低体细胞数, 具有提高乳腺健康和改善奶牛生产性能的潜力, 是一种新型的饲料添加剂。

参考文献

- [1] Oviedo-Boyso J, Valdez-Alarcón J J, Cajero-Juárez M, et al. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis[J]. *Journal of Infection*, 2007,54(4):399-409.
- [2] 葛君萍. 牛奶中体细胞含量高的成因与对策[J]. *浙江畜牧兽医*, 2004,29(1):45.
- [3] Wu Y, Sun H, Qin F, et al. Effect of various extracts and a polysaccharide from the edible mycelia of *Cordyceps sinensis* on cellular and humoral immune response against ovalbumin in mice[J]. *Phytotherapy Research*, 2006,20(8):646-652.
- [4] Yu R, Song L, Zhao Y, et al. Isolation and biological properties of polysaccharide CPS-1 from cultured *Cordyceps militaris*[J]. *Fitoterapia*, 2004,75(5):465-472.
- [5] Ahn Y, Park S, Lee S, et al. Cordycepin: Selective Growth Inhibitor Derived from Liquid Culture of *Cordyceps militaris* against *Clostridium* spp.[J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2000,48(7):2744-2748.
- [6] 梁宗琦. 我国虫草属真菌研究开发的现状及思考[J]. *食用菌学报*, 2001,8(2):53-62.
- [7] 肖建辉, 方宁, 肖瑜, 等. 古尼拟青霉胞外多糖的免疫抑制活性[J]. *中药材*, 2004,27(3):192-195.
- [8] 黄建忠, 梁宗琦, 刘爱英. 粉被虫草无性型对苏芸金杆菌抗紫外辐射的保护效应[J]. *西南农业学报*, 1992,5(2):63-67.
- [9] 魏建忠, 张玮, 李郁, 等. 地顶孢霉培养物对保育仔猪生产性能及免疫水平的影响[J]. *中国畜牧兽医*, 2009,2:33-35.
- [10] 孙汉巨, 李晓祥, 丁琦, 等. 虫草饲料添加剂对蛋鸭生产性能及鸭蛋品质的影响[J]. *安徽农业科学*, 2011,39(6):3618-3620.
- [11] 李侠, 黄欢, 田小鹏, 等. 地顶孢霉菌丝体对免疫性肝纤维化大鼠的保护作用及其可能机制的研究[J]. 2012,47(2):145-149.
- [12] 程洁, 陈双林. 顶孢霉发酵液提取物清除自由基能力的研究[J]. *食品工业科技*, 2010,31(11):155-157.
- [13] Deng B, Wang Z P, Tao W J, et al. Effects of polysaccharides from mycelia of *Cordyceps sinensis* on growth performance, immunity and antioxidant indicators of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2015,21(2):173-179.
- [14] 朴美子, 王晓东. 蛹虫草黄豆对小鼠的抗氧化及免疫作用[J]. *中国食品学报*, 2014,14(5):32-37.
- [15] 艾晓杰, 马万伦, 刘茗, 等. ISCA 对瘤胃原虫和微生物蛋白质含量及氨基酸组成的影响[J]. *上海交通大学学报: 农业科学版*, 2001,19(2):91-95.
- [16] Sun P, Wang J Q, Deng L F. Effects of *Bacillus subtilis* natto on milk production, rumen fermentation and ruminal microbiome of dairy cows[J]. *Animal*, 2013,7(2):216-222.
- [17] 赵连生, 王加启, 郑楠, 等. 牛奶质量安全主要风险因子分析 VII. 体细胞数和菌落总数[J]. *中国畜牧兽医*, 2012,39(7):1-5.
- [18] Wang M, Meng X Y, Yang R L, et al. *Cordyceps militaris* polysaccharides can enhance the immunity and antioxidation activity in immunosuppressed mice[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012,89(2):461-466.

- [19] Mukherjee R. Selenium and vitamin E increases polymorphonuclear cell phagocytosis and antioxidant levels during acute mastitis in riverine buffaloes[J]. *Veterinary Research Communications*, 2008,32(4):305-313.
- [20] Umesh D, Mahesh Chandra S, Singh S K, et al. Amelioration of altered oxidant/antioxidant balance of Indian water buffaloes with subclinical mastitis by vitamins A, D₃, E, and H supplementation[J]. *Tropical Animal Health and Production*, 2013,45(4):971-978.
- [21] Schukken Y H, Wilson D J, Welcome F, et al. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts.[J]. *Veterinary Research*, 2003,34(5):579-596.
- [22] Souza G N, Brito J R F, Moreira E C, et al. Somatic cell counts variation in dairy cows according to mastitis pathogens.[J]. *Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária E Zootecnia*, 2009,61(5):1015-1020.
- [23] Koh J H, Suh H J, Ahn T S. Hot-water extract from mycelia of *Cordyceps sinensis* as a substitute for antibiotic growth promoters[J]. *Biotechnology Letters*, 2003,25(7):585-590.