

分类号：
学 号：2012408015

密 级
单位代码：10759

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



饲用乳酸菌的分离筛选及其活菌制剂在围产期奶牛和新生犊牛保健中的初步应用

学 位 申 请 人	杨龙龙
指 导 教 师	刘根强教授
申 请 学 位 类 别	兽医硕士
专 业 名 称	兽医
研 究 方 向	兽医技术服务
所 在 学 院	动物科技学院

中国·新疆·石河子

2014 年 5 月

分类号：
学 号：2012408015

密 级
单位代码：10759

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



饲用乳酸菌的分离筛选及其活菌制剂在围 产期奶牛和新生犊牛保健中的初步应用

学 位 申 请 人	杨龙龙
指 导 教 师	剡根强教授
申 请 学 位 类 别	兽医硕士
专 业 名 称	兽医
研 究 方 向	兽医技术服务
所 在 学 院	动物科技学院

中国·新疆·石河子

2014 年 5 月

**To separation of lactic acid bacteria and yeast cultures for the
application of cow and newborn calf perinatal care**

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Dotctor of Veterinarian

By

Yang Long-long

Veterinarian Master

Dissertation Supervisor: **Prof.Yan Gen-Qiang**

May,2014

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人所呈交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：


时间：2014年 5 月 5 日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：

时间：2014年 6 月 5 日

导师签名：

时间：2014年 5 月 日

中文摘要

为筛选和研发用于围产期奶牛及新生犊牛抗应激、调节免疫的微生态制剂，本研究从健康牛瘤胃中分离筛选出 2 株具有抑菌活性及益生性的乳酸菌作为菌株，经生化鉴定 2 株菌分别为嗜酸乳杆菌、发酵乳杆菌。经扩大培养后制成乳酸菌活菌制剂，与商品化酵母活菌培养物混合形成乳酸菌—酵母培养物微生态制剂，将该制剂用于围产期奶牛及新生犊牛，通过观察其产奶量，犊牛健康状况，增重及检测血钙、磷和细胞因子变化，探讨自制乳酸菌制剂的应用效果。结果如下：

1. 乳酸菌分离菌株具有良好的益生性，生长速度快，且能在 25℃— 40℃之间良好生长呈兼性厌氧；具有很好的耐药性；能在 pH 为 3.0 和 0.3%牛胆盐时良好生长；具有一定的抑菌作用，对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌圈分别为 18.3mm 和 16.4mm。是良好的微生态制剂候选菌株。
2. 分离株在自制的大麦芽培养基中生长良好。取大麦芽汁 500ml，水 500ml，胰蛋白胨 10g，酵母膏 7.5g，碳酸钙 3g，制成固体培养基涂布分离株，培养 24h 增菌为 3.5×10^8 CFU/mL，MRS 固体培养基 24h 增菌为 3.2×10^8 CFU/mL；在菌体浓度上能达到 MRS 培养基的 1.1 倍；在制作成本上明显低于 MRS 培养基。可作为分离株的大量增菌培养基。
3. 对 50 头围产期奶牛产前和产后 28 天分组连续拌料饲喂自制乳酸菌制剂 2ml/头，酵母活菌 2g/头，AD3、VE 合剂 2g/头，总产奶量比对照组高 2kg；血钙含量明显高于对照组；血清中 CD4⁺、CD8⁺和 IFN- γ 明显高于对照组，但 IL-1、IL-2 和 IL-6 均低于对照组，结果表明自制乳酸菌制剂具有增加血钙及免疫调节作用。
4. 对 50 头犊牛自出生到第六周共 42 天分组连续拌乳饲喂自制乳酸菌制剂 3ml/头，酵母活菌 3g/头，亚硒酸钠 3ml/头，试验组整体生长情况要优于对照组，平均体重高于对照组 2.0kg；腹泻发病率明显低于对照组；血钙含量明显高于对照组；血清中 CD4⁺、CD8⁺和 IFN- γ 明显高于对照组，但 IL-1、IL-2 和 IL-6 均低于对照组，结果表明自制乳酸菌制剂具有降低腹泻，增加血钙，增重及免疫调节作用。

关键词：乳酸菌；奶牛；围产期；细胞因子；

Abstract

For screening and research and development for perinatal cows and newborn calves anti-stress , immune probiotics , in this study were isolated from healthy bovine rumen screened two strains of lactic acid bacteria with antimicrobial activity and resistance as strains. After expanding culture into lactic acid bacteria preparation , and commercialization of viable yeast cultures were mixed to form lactic acid bacteria - probiotics yeast culture preparation for the transition cows and newborn calves by observing their milk production, calf cattle health, weight gain and detection of blood calcium, inorganic phosphorus and cytokines . Discussion of lactic acid bacteria - probiotics yeast culture application effect , the results were as follows:

1 Isolates can grow fast to grow well at room temperature between 40 °C and between anaerobic, has good resistance to most drugs are not sensitive to resistance rates of 80%, and can at pH 3.0 and 0.3 % bovine bile grow well when , with good antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* inhibition zones were 18.3mm and 16.4mm.

2 Number of high -density growth medium with homemade malt juice , solid and liquid media were prepared , using MRS solid medium were cultured 37.8 yuan per liter , 24h enrichment was 3.2×10^8 CFU / mL, malt share the surrounding market , made of wort , malt juice taken 500ml, water 500ml, tryptone 10g, yeast extract 7.5g, Malt juice 3g solid medium made of calcium carbonate added 2.38 yuan per liter of bacterial culture , 24h enrichment to 3.5×10^8 CFU / mL, the experimental results show that the large solid medium wort below MRS solid medium at 18.8 times the cost in the cell concentration can reach 1.1 times the MRS medium .

3 The bacteria of lactic acid bacteria and yeast cultures homemade cows in perinatal care , the experimentally measured experimental group childbirth 24h average milk yield of 16.55kg, birth control 24h average milk yield of 15.42kg;. Experimental high in the control group, 1.13kg, week average milk yield higher 2kg; prenatal 7 days hypocalcemia incidence of 45% , while 80% of production , post-natal declined. Therefore, in this study, lactic acid bacteria and yeast added EM cultures , the control decreased serum calcium . Measured in the control group in the event of the week prenatal hypocalcemia was 31% , reaching a maximum of 46.1% of antenatal ; experimental group prenatal low incidence rate of 16.6% calcium , there are significant differences between the control group. CD4 +, CD8 +, IFN- γ IL-1, IL-2 and IL-6 were involved in the immune response , activation of macrophages, and improve defenses against viruses and parasites .

4 Against lactic acid bacteria and yeast cultures homemade newborn calf care in the first 10 days in the control group and the experimental group was born calves and two calves weighing less, weight gain is not obvious , because the time period is feeding colostrum and transition milk , produce stress on the calf which affects weight gain . From 10 days to 15 days, the rate of weight gain of calves began to accelerate at the end of feeding, although the two calves weight did not show significant differences , but overall growth to the test group than the control group , the average weight is higher than control group 2.0kg. Test group and the control group were diarrhea occurred , but not the same degree of diarrhea in 1-10 days in the experimental group and the control group there is a greater difference in diarrhea , 6.0% higher than the experimental group , the difference was significant . CD4 +, CD8 +, IFN- γ IL-1, IL-2 and IL-6 were involved in the immune response , activation of macrophages, and improve defenses against viruses and parasites .

Key words : Lactic acid; Perinatal; Cytokines;Bovine

目录

中文摘要.....	I
ABSTRACT	II
符号说明	VII
前言.....	IX
第一章:文献综述.....	1
一:牛消化道正常菌群概况及微生态制剂应用进展	1
1.1 牛瘤胃正常菌落	1
1.2 牛肠道正常菌群	1
1.3 生态制剂的研究进展	2
1.4 应用在 DFM 产品中的微生物.....	2
1.4.1 营养作用.....	2
1.4.2 免疫调节作用.....	3
1.4.3 屏障作用.....	3
1.4.4 其他作用.....	3
二 围产期奶牛生理特点.....	3
2.1 围产期营养代谢障碍性疾病的发病趋势	4
2.2 围产期奶牛营养代谢病的重要性.....	4
2.3 围产期奶牛的主要应激反应	5
2.3.1 脂肪肝和能量负平衡.....	5
2.3.2 临床和亚临床低钙血症.....	5
2.3.3 亚急性瘤胃酸中毒.....	5
2.3.4 乳酸中毒机理.....	6
2.3.5 挥发性脂肪酸中毒机理.....	6
2.3.6 氧化应激、抗氧化剂和免疫.....	7
2.3.7 分娩和子宫健康.....	8
2.3.8 胎衣不下发病机理和危险因素	9
2.3.9 产后子宫细菌学和子宫内膜炎发病机理	9
2.4 围产期奶牛的代谢状态.....	10
三 犊牛肠道微生态.....	11
3.1 犊牛消化系统特点.....	11
3.2 犊牛瘤胃微生物菌群的建立和发展.....	11
3.3 犊牛胃肠道正常菌群的生理作用.....	12
第二章:试验部分.....	13
试验一:犊牛瘤胃乳酸菌的分离与鉴定	13
1 材料与方法.....	13
1.1 材料.....	13
1.1.1 病料采集.....	13

1.1.2 主要试剂.....	13
1.1.3 主要仪器试剂及对照菌株.....	13
1.1.4 药敏纸片.....	13
1.2 方法.....	14
1.2.1 菌种的分离和形态学观察.....	14
1.2.2 乳酸菌的鉴定.....	14
1.2.3 耐酸、耐碱试验.....	14
1.2.4 培养温度与耐氧性.....	14
1.2.5 标准生长曲线的绘制.....	14
1.2.6 耐药性试验.....	14
1.2.7 抑菌性试验.....	15
2 结果.....	15
2.1 菌种的分离和形态观察.....	15
2.2 生化鉴定结果.....	16
2.3 耐酸耐碱结果.....	17
2.4 培养温度与耐氧性结果.....	17
2.5 标准曲线.....	18
2.6 药敏实验结果.....	18
2.7 抑菌性实验结果.....	19
3 讨论.....	20
试验二： 乳酸菌增菌扩大培养基的筛选及优化.....	22
1 材料与方法.....	22
1.1 菌种.....	22
1.2 材料.....	22
1.2.1 主要仪器.....	22
1.3 方法.....	22
1.3.1 大麦芽汁的制备.....	22
1.3.2 番茄汁的制备.....	22
1.3.3 胡萝卜汁的制备.....	22
1.3.4 增菌培养基的制备.....	23
1.3.2 不同固体增菌培养基对乳酸菌培养的效果观察.....	23
1.3.3 不同液体增菌培养基乳酸菌培养的效果观察.....	23
1.3.4 乳酸菌增菌培养及收集.....	23
1.3.5 杂菌检测.....	23
1.3.6 动物安全性实验.....	23
2 结果.....	23
2.1 不同固体增菌培养基中乳酸菌的生长状况.....	24
2.2 不同液体增菌培养基中乳酸菌的生长状况.....	24
2.3 菌液收集与杂菌检测.....	25
2.3 动物安全性实验结果.....	25
3 讨论.....	25

试验三：乳酸菌和酵母培养物对围产期奶牛保健的应用效果观察.....	25
1 材料与方法.....	26
1.1 材料.....	26
1.1.1 菌株和药品.....	26
1.1.2 试剂.....	26
1.1.3 主要仪器.....	26
1.1.4 试验围产期奶牛.....	26
1.2 方法.....	26
1.2.1 围产期奶牛分组.....	26
1.2.3 实验日粮及其饲养管理.....	26
1.2.4 实验饲养周期.....	27
1.2.5 实验数据的采集.....	27
2 结果.....	27
2.1 血液中钙含量的测定结果.....	27
2.2 血液中无机磷含量的测定结果.....	28
2.3 血液中细胞因子的测定结果.....	28
2.3 分娩后奶牛产奶量的统计结果.....	30
3 讨论.....	30
试验四：乳酸菌和酵母培养物对犊牛保健的应用研究.....	32
1 材料与方法.....	33
1.1 材料.....	33
1.1.1 菌株和药品.....	33
1.1.2 试剂.....	33
1.1.3 主要仪器.....	33
1.1.4 试验新生犊牛.....	33
1.2 方法.....	33
1.2.1 实验动物分组.....	33
1.2.3 实验日粮及其饲养管理.....	33
1.2.4 实验饲养周期.....	34
1.2.5 实验数据的采集.....	34
1.2.6 测定指标及方法.....	34
2 结果.....	34
2.1 血液中钙含量的测定结果.....	34
2.2 血液中无机磷含量的测定结果.....	35
2.3 血液中细胞因子的测定结果.....	35
2.4 犊牛增重的测定结果.....	37
2.5 犊牛腹泻的统计结果.....	38
3 讨论.....	39
结论.....	41

创新点.....	42
参考文献:	43
作者简介.....	50

符号说明

英文缩写	中文名称	英文全称
g	克	gram
s	秒	second
ml	毫升	millitliter
L	升	liter
μ L	微升	minute liter
min	分钟	minute
mg	毫克	milligram
ng	纳克	nanogram
pg	皮克	picogram
LB	普通培养基	Luria-Beraani medium
PH	酸碱度	Hydrogenion concentration
mmol	毫摩尔	millimole

前言

益生菌 (Probioic), 这一概念最早来源于希腊语, 意思是 “对生命有益” (Forlife)。2001 年 FAO/WHO 将其定义为 “一类活的微生物, 以合适的数量摄入后能给机体带来益处”^[1]。早在 1857 年法国著名微生物学家巴斯德就在牛奶和变酸的牛奶中发现了乳酸杆菌; 到 1908 年俄国的梅契尼科夫最先提出了“酸奶长寿论”, 将乳酸杆菌作为对机体有益的细菌正式介绍给世人。至今已有 150 多年的历史了。

乳酸杆菌是肠道正常菌群的重要组成部分, 大量研究表明乳酸杆菌的有益作用可以概括为四个方面: 1、产生消化酶促进机体营养物质的消化和吸收。2、产生营养物质 (如维生素) 以及短链脂肪酸、抗氧化剂、氨基酸等等, 对健康有重要作用。3、竞争性抑制有害微生物和清除有害菌产生的毒素。4、对免疫系统的活化有调节作用, 从而预防和治疗某些疾病, 如炎症性肠病等消化系统炎症性疾病、过敏性疾病等^[4]。

奶牛在围产期的营养状况对自身疾病的发生有直接影响。在这个时期奶牛要经历生理、内分泌、免疫、营养代谢上的变化及由此产生的一系列刺激, 对于高产奶牛, 由于奶牛的 Ca、P 的流失出现负平衡, 容易发生乳热、酮病、脂肪肝、胎衣不下、子宫炎等疾病。

新生犊牛最先接触的微生物是来自乳汁及环境中的微生物, 其中以大肠杆菌占多数, 通过人工口服微生态制剂, 有利于肠道正常优势菌群如乳酸菌的生长, 以减少由于致病性大肠杆菌性腹泻及菌群失调, 提高免疫力, 和成活率。

根据国内外报道, 乳酸菌作为新型无残留的绿色添加剂, 是通过改善微生态平衡而产生有益影响。并能直接进行饲喂, 唐志刚、刘辉、Bruno 等多位国内外学者研究表明益生菌能提高畜禽类的生产性能, 提高免疫力, 是代替抗生素的首选。但肖建根等学者研究表明益生菌的菌株特性对应用效果影响最大。生产上应用的大多数益生菌株提取自土壤、水环境中, 这种生态环境与动物肠道生理环境相差甚远, 动物胃肠道内的酸性环境、胆盐和厌氧环境很大程度上制约了许多微生物的生长。所以选用动物体内的正常菌株作为微生态活菌制剂菌种开发利用成为众多学者关注的问题。本研究拟从健康牛瘤胃液中分离鉴定乳酸菌, 筛选出耐酸耐碱、抑菌及耐药菌株, 通过筛选适宜培养基增菌培养后制成活菌制剂, 用于围产期奶牛及新生犊牛保健。通过观察其生产性能, 检测血液中钙、无机磷及细胞因子变化来探明其应用效果, 研究结果为奶牛养殖中饲料添加乳酸菌制剂的应用前景提供初步依据。

第一章: 文献综述

一: 牛消化道正常菌群概况及微生态制剂应用进展

家畜的消化道常寄居有多种微生物。微生物之间存在着共生和拮抗的关系, 它们之间和微生物与宿主之间, 均保持着相对的生态平衡, 能有规律地适应各自的环境而生存。在正常条件下, 对宿主无害而且有益的微生物称为正常微生物群。正常菌群作为宿主的组成部分, 可影响宿主的生长发育、消化吸收、营养转化和肠道形态结构等^[1]。胃肠道菌群与宿主在共同历史进化过程中形成了微生物生态系, 这是微生物长期演化适应的结果。保持消化道微生物正常菌群对机体的生理平衡甚为关键, 对畜禽的生长发育和抵抗疾病具有重要意义^[2]。微生物主导着胃肠内所进行的一系列消化代谢过程。动物与正常微生物群落之间共生关系的实质就是营养关系。反刍动物的瘤胃、马属动物的盲肠都是这种营养关系的典型表现, 如蛋白质代谢、碳水化合物代谢、脂肪代谢和维生素的合成和消耗等^[3]。

1.1 牛瘤胃正常菌落

牛瘤胃中存在着极其复杂的微生物区系, 主要有原虫和细菌两大类。瘤胃内容物中通常每 ml 含原虫 10^8 个, 细菌 10^{10} 个, 微生物浆液约占瘤胃液的 10%, 原虫和细菌溶剂各站一半。牛瘤胃中的原虫主要包括全毛虫和贫毛虫, 全毛虫又分为密毛属和均毛属; 贫毛虫有分为内毛属、双头属、前毛属和头毛属; 其中以内毛虫和双毛虫最多, 约占纤毛虫总数的 85%–98%。其主要功能能摄食和发酵淀粉, 发酵产生挥发性脂肪酸、 CO_2 。而且能消化分解纤维素等。牛瘤胃中的细菌根据底物利用和发酵产生的终产物不同可分为纤维消化菌、半纤维消化菌、淀粉分解菌、利用糖类细菌、利用酸菌、蛋白分解菌、产氨菌、产甲烷菌、脂肪分解菌和维生素合成菌 10 大类。瘤胃微生物中的原虫和细菌供同作用主要完成以下几种重要的生理功能: (1) 纤维素的分解; (2) 糖的合成分解; (3) 蛋白质的合成分解; (4) 合成维生素 B 和维生素 K 等。

1.2 牛肠道正常菌群

根据研究报道牛大肠菌落可达到 10^9 个但个体差异显著。其中以拟杆菌、螺旋菌构成最优势菌群, 其次是肠杆菌和链球菌, 约 10^5 – 10^7 个双歧杆菌和乳杆菌含量较少, 且随着年龄变化而变化, 其他菌种时有时无, 很不固定。的小肠和大肠微生物与瘤胃相似, 也受膳食和牛年龄的影响, 从各个部位分离的黏附性 *Lactobacilli* 的数量为 10^4 – 10^7 CFU/cm²。Gilliand 等 (1980) ^[4]研究表明 *Lactobacilli* 在牛小肠和大肠的量分别为 10^6 – 10^7 和 10^4 – 10^7 CFU/g 干重, 而 *Coliforms* 的量分别为 10^4 – 10^7 和 10^4 – 10^7 CFU/g 干重。最终完成定植的犊牛直肠内容物中, 双歧杆菌、真杆菌为优势菌群, 为 10^7 – 10^8 CFU/g, 然后依次为乳杆菌、梭菌 10^7 CFU/g, 类杆菌、大肠杆菌、消化球菌 10^6 CFU/g, 肠球菌 10^5 CFU/g^[5]。

1.3 生态制剂的研究进展

研究瘤胃微生物的目的是提高饲料利用、动物生产和健康以及动物食品安全。这些目标可以通过促进适度发酵，瘤胃紊乱最小化和祛除病原菌来达到。一些饲料添加剂已经应用于提高动物生产性能和饲养效率，以及预防疾病等。抗生素、益生菌（直饲微生物，DFM）和益生元（微生物生长启动子）已被研究用来改善家畜的瘤胃和肠道微生物生态系统和发酵性能。在欧洲，动物饲养中促进生长的维生素或抗菌素的应用由于其潜在的危害已被禁止应用，例如微生物抗药性基因的扩散^[6]，或者牛奶和牛肉中抗生素污染和残留。因此，很多研究者已探索出可替代策略来增强动物性能和健康。最近，DFM 逐渐被评估可用来替代抗生素或减少抗生素的应用。“益生菌”一词被定义为“一种可以通过促进肠微生物平衡从而有益于宿主动物吸收饲料的补充微生物”^[7]。该词已被用来描述有活力的微生物培养，培养抽提物，酶制剂或那些产品的各种复合^[8]。DFM 只是一个与益生菌相关的狭隘定义，并且被定义以食品添加剂为基础的微生物。DFM 在生产实践的应用效果决定于用量、饲喂时间、DFM 的菌株和动物消化道内环境状况。以瘤胃为靶器官的 DFM 在瘤胃中必须是可生存并且在运输过程中能保持活性，因此对 DFM 的研究被局限于少数品种。现已发现杆菌类是反刍动物 DFM 的最好选择。

1.4 应用在 DFM 产品中的微生物

应用于反刍动物的 DFM 的菌群包括乳酸杆菌，双歧杆菌，肠球菌，链球菌，芽孢杆菌和丙酸杆菌，它们已经在人类和单胃动物益生菌中普遍应用，或者作为奶制品的添加益生菌。其他像巨型球菌与普雷沃氏菌也已经作为 DSM 被应用于稳定或促进瘤胃功能。这些微生物 DSM 菌株可被分为乳酸生产和乳酸利用菌群和其他菌群。在反刍动物，瘤胃是 DFM 到达和吸收的首个器官。DFM 在瘤胃中生长，并改善它的微生物生态系统和发酵性能。肠道还可以为 DFM 提供生长空间。瘤胃中乳酸生产和利用与饲养效率与动物健康密切相关。虽然大多数 DFM 是细菌，但真菌 DFM 添加剂也在反刍动物饲养中普遍应用^[9]。大多数商业酵母产品包括酵母属真菌与曲霉属真菌。

1.4.1 营养作用

乳酸发酵可使乳蛋白的消化率提高。乳酸菌产生的乳酸能使乳蛋白缓慢生成膜，使凝乳粒子变小，在消化酶作用下，增大其表面积，利于蛋白质的分解^[10]。肠道菌群与营养调节的研究已得到广泛的应用，部分肠道菌能产生有机酸，尤其乳酸杆菌和链球菌将产生乳酸，降低肠道 pH 值、使肠道酸化，提高铁、钙、磷的利用率，促进维生素 D 和铁的吸收，激活蛋白酶原^[11]。同时乳酸菌在肠道中可为低聚糖发酵供给有益的乙酸、丙酸和丁酸，保持肠道功能正常状态^[12]。有一些乳酸菌能产生淀粉酶、脂肪酶、蛋白酶等，还有的对植物性碳水化合物有很强的降解作用，可提高饲料利率，促进营养物质吸收^[13]。

1.4.2 免疫调节作用

在免疫防御系统中，微生物通过刺激机体免疫系统而发挥免疫防御能力，如刺激肠系淋巴结的发育；提高淋巴细胞的增殖能力；增加白细胞的数量和浆细胞的形成等^[14]。动物胃肠道内某些微生物能够激活机体吞噬活性，提高机体抗感染能力。如胃肠道内的双歧杆菌对巨噬细胞具有明显的激活作用^[3]。许多研究结果表明，乳酸菌及其发酵。

1.4.3 屏障作用

生物屏障是机体重要的防御系统，其中的非特异性免疫防御系统，如肠道粘膜及覆盖的微绒毛膜，正常的微生物密布其表面，形成稳定的非特异性免疫性防御系统，它是预防病原体入侵和保护上皮免受微生物侵害的重要组成部分。动物生长发育的不同阶段中，不同种类和数量的正常微生物群定植在胃肠道黏膜，与肠粘膜紧密结合，在肠粘膜的某些部位形成一层膜菌群，构成一道生物学屏障。如胃肠道内某些内源性微生物(主要指革兰氏阳性杆菌和球菌)与肠黏膜紧密结合构成的生物屏障，可以阻止致病菌定植与入侵，保护动物机体免受感染。

1.4.4 其他作用

部分乳酸菌可以激发体内的抗肿瘤作用，减少体内可导致致癌物、畸变剂和致癌剂产生的酶活力。乳酸菌在生长过程中通过降解胆盐促进胆固醇的分解代谢，从而减少胆固醇含量，降低血清胆固醇水平。有研究表明嗜酸乳杆菌菌体细胞可以吸收胆固醇而降低介质中胆固醇的含量^[15]。另外，胃肠道内的双歧杆菌可以使过度增殖的革兰氏阴性杆菌减少到正常水平，以减少内毒素释放量，控制内毒素血症的发生。

二 围产期奶牛生理特点

奶牛围产期是指产前三周到产后三周这一特殊时间段。过渡期奶牛承受妊娠、分娩、泌乳启动等生理应激，经历由低能饲料向高能饲料转换而带来的饲养应激，而且还要面对由于干物质摄入减少而营养需求增加所致的能量负平衡

(negative energy balance, NEB) 营养应激。正是由于过渡期奶牛处于这样一种生理剧烈变动阶段，使得生殖、消化等生理机能，能量、矿物质等营养物质的代谢，及神经内分泌的调节极易发生失常和紊乱，导致营养代谢障碍性疾病的发生。传统上认为，围产期营养代谢障碍性疾病是指酮病、脂肪肝、低钙血症、低镁血症等疾病，现包括瘤胃酸中毒、胎衣不下、皱胃变位和蹄叶炎等疾病。在过去的几十年里奶牛经过了密集的基因选择，使牛奶产量达到了新的高度。同时，在经济利益的驱使下，奶业也得到了很大的发展。无论是放牧型和还是集约化养殖，只有与经济效益密切联系时，奶牛健康和福利才会被关注。因此，无论是在以增加单位成本的产出为目标的集约化养殖，还是以“低成本”或“简单管理”

的草原放牧型养殖模式的奶牛场都有可能存在不利于动物健康的问题。低钙血症、低镁血症、酮病等围产期疾病是与生产所需的能量或钙代谢的“输入”和“输出”失衡相关^[16]。

2.1 围产期营养代谢障碍性疾病的发病趋势

尽管在临床、亚临床、生物化学和分子水平等方面对围产期疾病的认识已经有了显著的提升,但是其发病率在很多管理好的牛群中仍然与数十年前的报道的数据相差不多。根据 Dublin 大学奶牛群健康协会的研究^[17], 在很多奶牛群中其发病率仍然处在一个令人难以置信的高度。这与 Kelton 的调查结果一致,从 1979 年到 1995 年, 临床低钙血症(乳血热)、胎衣不下、子宫炎、酮病、皱胃变位、囊性卵巢疾病、生产瘫痪以及乳腺炎的发病率在逐年增加^[18]。然而, 很多人认为围产期疾病发病率的增长可能与盲目追求产奶量有莫大的关系, 产奶量本身和围产期疾病的关系是非常复杂的。其它群体性围产期疾病, 如胎衣不下和产奶量并没有直接联系。然而, 考虑到围产期疾病和产奶量间复杂的关系, 围产期疾病更可能是由于摄入和产出的不平衡或者难产造成的, 而不是只与产出有关。

Ingvartsen 等指出泌乳初期能量平衡和产奶量之间并不存在联系, 而泌乳初期的负能量平衡是饲料摄入和产奶量共同作用的结果^[19]。因此, 高产奶牛围产期疾病的发病率高和低产奶牛围产期疾病的发病率低, 这种说法是错误的。也就是说给低产奶牛以营养或环境相关的刺激, 与没有遭受同样刺激的高产奶牛相比, 其更可能发生某种特定的围产期疾病。

2.2 围产期奶牛营养代谢病的重要性

过渡期奶牛的围产期疾病不是相互无关联的。酮病、脂肪肝、临床低钙血症、胎衣不下、子宫炎和皱胃变位在病因学上是密切相关的。例如, 过肥的干奶期奶牛更易发生酮病和脂肪肝, 这两种疾病可能直接降低免疫力或者造成严重的能量负平衡^[20]。免疫抑制被认为是造成胎衣不下的最主要^[21]。过肥的干奶期牛也较易发生低钙血症, 它可以加剧免疫抑制, 而且可能引起难产和胎衣不下^[22]。因此, 酮病、乳热通过不止一种病因学途径互相关联, 并且与胎衣不下有关。由于这些内部联系, 过渡期奶牛的围产期疾病常常引起级联反应, 传染性疾病或其他围产期疾病的发病率增加, 繁殖能力下降, 牛奶产量下降以及生产瘫痪增加。所以, 围产期疾病的预防对围产期结束以后的奶牛健康和生产效益都有关系。许多研究表明, 过肥干奶期奶牛发生乳热的几率是其他奶牛的四倍; 发生乳热的奶牛在泌乳后发生乳腺炎的概率增加八倍^[23]; 分娩前发生能量负平衡 (NEB) 的奶牛较易在泌乳期发生皱胃变位^[24]; 分娩后发生严重的能量负平衡或乳热会降低生产性能^[25], 瘤胃酸中毒奶牛更易发生免疫抑制、严重的 NEB 和蹄叶炎^[26]。

2.3 围产期奶牛的主要应激反应

2.3.1 脂肪肝和能量负平衡

脂肪组织中脂肪酸动员以供应泌乳的营养需求，这是大部分哺乳动物体内由内分泌系统严密调控的一种本能生理现象。然而，奶牛血液中非酯化脂肪酸（nonesterified fatty acid, NFFA）的浓度的增加导致肝细胞内甘油三酯的积累和肝功能的损伤。肝脏的脂肪浸润对于奶牛生产性能影响非常大，因为代谢所需的葡萄糖大约 85%来自于肝脏。并且，肝在能量的合成与代谢、分娩以及免疫各方面都处于关键位置。事实上，在整个干奶期维持高纤维或低能量饲料对奶牛是有利的^[27]。可以使用饲料添加剂预防脂肪肝，如丙二醇和瘤胃保护胆碱。丙二醇阻止脂类分解，而胆碱促进肝脏脂肪酸以低密度脂蛋白的形式输出。因为它们作用的模式不同，所以它们可以协同组成一个有效的供能机制^[28]。许多研究证明，对于脂肪肝的发生，奶牛的管理（牛群的变换、饲料变更等）可能是比营养更重要的因素。营养和管理与围产期奶牛脂肪肝的发生显著相关，泌乳后期的饲喂和储能情况也很重要，因为干奶期过肥的奶牛比较瘦的奶牛在产犊前动员更多的脂肪组织^[29]。

2.3.2 临床和亚临床低钙血症

临床和亚临床低钙血症是常见多发病，二者与奶牛许多围产期疾病的发生有关。与低钙血症相关的疾病包括难产、子宫脱出、皱胃变位、酮病以及免疫抑制^[30]。临床低钙血症的发病率为 3.5%–7%^[31]。其中亚临床低钙血症的发病率为 33%，乳热的发病率为 5%^[32]。同样，大约 50%的老龄奶牛存在亚临床低血钙症，随泌乳次数的增加，乳热的发病率也增加，可达 9%。目前，强调饲料阴阳离子差（DCAD）在预防乳热上的作用。De Garis 和 Lean 利用荟萃分析，指出 DCAD 对产乳热发病率的影响呈线性关系。低镁血症是低钙血症发生的一个重要因素，血液镁浓度影响乳热的发生^[33]。据报道，除了饮食中的镁浓度外，饮食中钙和磷的水平对产乳热的发生也有影响。干物质（DM）的钙浓度在 1.1%–1.3%间时，乳热发病的几率最高，同时饲料中磷的浓度超过所需也能增加乳热发生的风险。De Garis 和 Lean 报道，饲料暴露时间过长会降低饲料中阴阳离子差值，高钙饲料可以缓解这种状况。DeGaris 和 Lean 指出增加分娩奶牛饲料的暴露时间会增加乳热发病率^[34]。高钙饲料可以很好的预防乳热的发生^[35]。

2.3.3 亚急性瘤胃酸中毒

据报道，在美国 19%的奶牛在泌乳早期和 26%的奶牛在泌乳中期发生 SARA。近期澳大利亚和爱尔兰的数据表明，10%–15%的主要以黑麦草为主要牧草的放牧奶牛发生 SARA^[36]。SARA 在病因学上与泌乳时的蹄叶炎、食欲减少且不定、体况差、奶低脂综合征、后腔静脉综合征、皱胃变位/溃疡、瘤胃炎、免疫抑制和发炎有关^[36]。泌乳早期的奶牛和干物质摄入高峰期时的奶牛最易发生 SARA；泌乳

早期的奶牛是由于瘤胃吸收的减少、瘤胃微生物群系失调以及高能饲料大量摄入所造成。

2.3.4 乳酸中毒机理

反刍动物摄食过多易发酵碳水化合物饲料后，碳水化合物经微生物作用释放出大量葡萄糖，使瘤胃中葡萄糖浓度急剧升高，由于能量和碳源充足，几乎所有微生物生长速度都加快，尤其是仅依靠葡萄糖生存的产乳酸菌——牛链球菌 (*Streptococcus bovis*) 的数量显著增加，产生大量的乳酸，pH 值降低。此时瘤胃微生物群落发生显著变化，主要是乳酸利用菌——主要包括反刍兽新月单胞菌 (*Selenomonas ruminantium*) 和埃氏巨型球菌 (*Megasphaera elsdenii*) 的变化当瘤胃 pH 值低于 5.8 时，*S. bovis*、*S. ruminantium* 和 *M. elsdenii* 三种微生物的生长速度均随着瘤胃液 pH 值的下降而减缓，但是 *S. bovis* 相对于 *S. ruminantium* 和 *M. elsdenii* 更能耐受较低的酸度，因而其生长速度随 pH 值降低而减缓的幅度较后两者要小。*S. bovis*、*S. ruminantium* 和 *M. elsdenii* 在瘤胃液中最终消失的 pH 阈值分别为 4.8、5.4 和 5.6，因此在瘤胃 pH 值高于 5.5 情况下由于乳酸利用菌的代谢作用，瘤胃液中乳酸含量通常较低。但随着瘤胃 pH 值进一步下降，*S. bovis* 利用碳水化合物产生大量的乳酸由于不能被及时吸收利用，致使瘤胃内乳酸浓度蓄积，乳酸酸度 (pKa=3.1) 是 VFA 酸度 (pKa=4.8) 的 10 倍，瘤胃酸度剧烈上升，pH 值继续下降至 5.5 左右，此时如果瘤胃碳源和能源充足，*S. bovis* 继续生长繁殖，产生的乳酸导致瘤胃 pH 值进一步下降，大部分细菌包括乳酸利用菌数量减少，瘤胃中乳酸开始大量积累。当 pH 值低于 5 甚至更低时，瘤胃低 pH 值环境使大部分细菌包括 *S. bovis* 死亡，而这时却为瘤胃中另一种产乳酸菌——乳酸杆菌 (*Lactobacillus*) 创造了适宜的生长繁殖条件，接替 *S. bovis* 继续产生大量乳酸，其代谢终产物为 L-型和 D-型乳酸，乳酸进一步增多，从而引发急性瘤胃酸中毒。如果 pH 值降至 5.5 左右时，瘤胃内碳源和能源不足，*S. bovis* 生长受到抑制，并最终与乳酸利用菌数量保持相对平衡，瘤胃乳酸浓度维持一定水平，pH 值长时间维持在 5.0~5.5 之间，这时就表现为亚急性瘤胃酸中毒。

2.3.5 挥发性脂肪酸中毒机理

反刍动物瘤胃在发酵过程中产生大量挥发性脂肪酸 (VFA)，这些 VFA 不断被瘤胃壁吸收或流入后消化道，同时被唾液缓冲物质中和，保持着边产生、边吸收、边流通的动态平衡。因此，有些研究者提出瘤胃酸中毒是由于瘤胃内产生过量 VFA 超过瘤胃粘膜吸收能力和唾液缓冲能力所造成的，致使 VFA 在瘤胃大量累积，降低了瘤胃 pH 值^[24]，并使瘤胃 pH 值长时间维持在较低水平^[35]。当反刍动物采食过量的易发酵碳水化合物后，瘤胃微生物发酵碳水化合物底物产生大量的 ATP 和 VFA。由于能量和底物充足，促进了所有瘤胃微生物的生长，瘤胃中 VFA 浓度很快升高，造成瘤胃 pH 降低，牛链球菌代谢产生的乳酸也可以被乳酸利用

菌发酵和代谢掉，因此在此阶段瘤胃的乳酸含量很低。当 VFA 产生的速度超过瘤胃吸收时，pH 值开始下降，当瘤胃 pH 值低于 6.5 以后，反刍兽新月单胞菌等乳酸利用菌的生长随着瘤胃 pH 值的降低，活性显著下降，但牛链球菌能更耐受酸性环境，因而其生长速度受瘤胃 pH 值的影响要小于乳酸利用菌。牛链球菌仍可以发酵产生大量的乳酸，但是乳酸利用菌却无法及时代谢乳酸最后导致乳酸在瘤胃中的累积，使得瘤胃 pH 值进一步降低。过低的瘤胃 pH 值会造成大多数瘤胃微生物死亡，大量内毒素从死亡的细菌菌体细胞壁中裂解出来，内毒素就会通过感染受损的瘤胃上皮移位进入血液^[37]，形成内毒素血症，导致微循环障碍，发生缺氧，从而使糖代谢过程沿着无氧酵解途径进行，结果形成大量乳酸，再次加重了酸中毒，形成恶性循环。当瘤胃 pH 值下降至 4.5 以下时，由不同种类细菌使组胺酸脱羧，生成高浓度组胺，使瘤胃液组胺含量增加，然后组胺吸收入血致使血中组胺含量增加。而瘤胃过多的组胺不仅使全身组织胺含量上升，还会进一步加重由乳酸中毒引起的瘤胃上皮细胞的损伤，成为加剧瘤胃酸中毒病情恶化的主要因素^[38]。近期的研究对理解 SARA 发病机理有很大的帮助。例如，饲料的摄入或周期饲喂模式可诱导 SARA 的发生这一公认的观点已经被 Plaizier 等频繁质疑，他们指出减少饲料摄入并不能减少与 SARA 相符的瘤胃 pH。并提出了一个假设：饲料摄入的减少与 SARA 相关可能是由于奶牛各器官发生了炎症，而不是瘤胃纤维素消化的影响，这对理解 SARA 有很大的帮助。他们观测到 SARA 能导致血浆淀粉样急性期蛋白（APPs）和血液结合珠蛋白的增加。然而，高精日粮诱导的 SARA 能增加血液中 APPs 的浓度，减小纤维颗粒大小并不诱导 SARA。瘤胃（和大肠）内革兰氏阴性菌的脂多糖内毒素造成急性炎症，而且像大肠杆菌和其他肠杆菌科细菌产生的致病因子，通过门静脉入肝，可能与此炎症过程有关^[36]。Enemark 指出在 SARA 和免疫抑制之间有很强的生理学联系。SARA 引起的代谢性酸中毒可能导致葡萄糖依赖性的胰岛素分泌减少，皮质醇分泌的增加，吞噬作用和中性粒细胞迁移速度的减缓^[25]。

在牧场，由于各种因素共同存在使 SARA 的诊断仍然是个问题，包括瘤胃 pH 的准确测量，SARA 发生后的示病症状的出现，SARA 的临床表现多样以及示病症状和很多其他疾病重叠。然而，瘤胃穿刺（rumenocentesis）技术在美国已广泛应用。其他 SARA 诊断的先进技术包括瘤胃内置探针的使用，以及瘤胃戊酸脂和净尿酸基础分泌物的使用^[25]。然而，牛群群体的 SARA 诊断很可能会继续以牛群的调查为基础，但要了解其诊断的困难以及临床表现往往滞后的事实。由于 SARA 对奶牛福利和生产效益的影响是负面且不可逆的，所以围产期疾病的预防仍将是优先考虑的。

2.3.6 氧化应激、抗氧化剂和免疫

与围产期差的管理相关的感染性疾病，如乳腺炎，发生的原因之一是奶牛发生过围产期免疫抑制。免疫抑制的程度可以被各种因素加剧，例如能量负平^[39]、低钙血症^[29]以及皮质醇循环水平的增加^[40]。另外，受到妊娠晚期需求限制的奶

牛，在生产或者泌乳高峰时易发生氧化应激或者生成代谢性活性氧^[41]。免疫细胞对氧化应激非常敏感，细胞膜上有高浓度的易被过氧化的多不饱和脂肪酸，当受到刺激时，它们生成大量的代谢性活性氧。在奶牛代谢性活性氧的产生增加时，几种微量元素和维生素可能对维持合适的抗氧化平衡起作用。这些可能有用的微量元素包括铜（Cu）、硒（Se）、锌（Zn）、铬（Cr）。另外，维生素 E 和 β-胡萝卜素具有抗氧化的作用。大量研究数据表明，这些微量元素和维生素可以减少围产期奶牛乳腺炎和胎衣不下的发病率。例如，在妊娠最后的 9 周内添加铬增补剂可以显著降低胎衣不下的发病率^[42]。在泌乳期第 34 天用大肠杆菌感染乳腺细胞，从产前 60 天到产后 42 天给奶牛补充铜，其牛奶中大肠杆菌和体细胞的量、临床得分、直肠温度均比未添加组低^[43]。维生素对乳腺炎和胎衣不下的作用已经被 Weiss 和 Miller 等证^[44, 45]。然而，β-胡萝卜素也是如此，作用效应依赖于增补的维生素 E 或者 β-胡萝卜素/维生素 A 的情况。特别的是，在干奶期饲喂奶牛干草、苜蓿和谷物秸秆的储存饲草时，血浆维生素 E 和 α-生育酚的浓度会降低^[46]。对于微量元素，增补的形式很大程度的影响着增补剂在消化系统(GIT)的吸收^[47]。使用螯合技术生产的一种电中性微量元素增补剂，可能增加吸收量。避免消化系统内矿物质间的相互作用的消极影响，这是由于矿物质阴离子在到达小肠绒毛的稳定水化层和阴离子粘液层造成的。很多报道指出，与无机非螯合微量元素增补剂相比，有机螯合微量元素增补剂添加后，能通过减少奶牛体细胞数增强体质。

2.3.7 分娩和子宫健康

健康和提高免疫力等方^[20]。在处理子宫感染时，要区别产后不久恶露正常排出的奶牛和直肠温度升高、饲料摄入减少、有胎衣不下病史以及子宫收缩缓慢的奶牛。胎衣不下可以影响 5%-10%的奶牛的产犊并且增加发生子宫炎和子宫内膜炎的危险。临床上，子宫内膜炎影响 15%-20%的产后 4-6 周的奶牛；另外 30%-35%的产后 9 周的奶牛有亚临床子宫内膜炎发生。一般来说，子宫内膜炎的治愈可以提高怀孕率。对于控制奶牛临床和亚临床子宫内膜炎的发病率，可在大约产后 35 天和 49 天时注射两次前列腺素（PG）并用抗生素治疗感染的奶牛，其他方法效果不明显^[20]。子宫感染和胎衣不下的最主要的后果是造成生产性能降低，这是造成国内外许多养殖场经济损失的一个关键因素。奶牛产前 1-2 周和产后 2-3 周很多免疫功能都受到抑制^[48-50]。围产期奶牛免疫系统受损的确切机制目前还不清楚，除了分娩前后奶牛能量、维生素、矿物质摄入减少，能量负平衡和机体脂肪和蛋白质的动员以及怀孕后期孕酮和雌激素水平的剧烈变动，以及在产犊时皮质酮的大量产生的促进作用^[51, 52]，泌乳时激素和能量的也在免疫力抑制方面发挥一定的作用。严重能量负平衡的奶牛在一些免疫功能上具有更加明显的抑制作用^[53]。患胎衣不下和子宫炎的奶牛在疾病发生前几周对免疫功能损害更加严重

^[53-55]。

2.3.8 胎衣不下发病机理和危险因素

胎衣不下是在产后 24 小时内胎衣不能及时排出，尽管很多学者将胎衣不下定义为 12h 或者 24h，奶牛一般在 24 小时之内就会排出，而且 95% 的牛在 12h 之内就会排出^[56]。一旦发生胎衣不下，胎衣平均保留 7 天，而且可能导致子宫细菌感染及功能退化^[57]。能导致胎衣不下的因素有双胞胎、难产、死胎、助产分娩、流产、乳热症以及年龄的增大和季节冲突因素等^[58]。导致胎衣不下的关键在于分娩后绒毛与肉阜粘连不能及时的分离，子宫缺乏运动性导致胎衣不下。奶牛产前处于能量负平衡状态时，血液中含有高浓度的游离脂肪酸，导致 80% 的奶牛患胎衣不下，同样因为游离脂肪酸的影响，当血液中维生素 E 浓度低时更容易得胎衣不下。近亲交配也可能导致免疫应答能力降低^[59]，有证据显示患胎衣不下的奶牛与正常牛比较，在产前 2 周和分娩时白细胞数量（尤其是嗜中性粒细胞），趋化性、氧化爆发能力以及 IL-8 浓度明显减少^[60]。最近发现细胞内的钙离子在奶牛的免疫功能（单核细胞）方面起着重要作用，低钙血症和免疫功能之间可能存在着相关性^[61]。这种联系不仅仅体现在由于低血钙而导致子宫收缩能力降低，也可以解释乳热和胎衣不下之间的关系

2.3.9 产后子宫细菌学和子宫内膜炎发病机理

许多研究发现在产后初期子宫一般都会被细菌感染^[62]，大约 80-100% 的奶牛产后前两周都会有子宫细菌污染。在产后前两周感染化脓棒状杆菌、埃希氏杆菌属、假单胞菌、链球菌、葡萄球菌、巴斯德菌、梭菌和拟杆菌的一种或多种在子宫内都可出现，健康奶牛产后 3-4 周子宫内细菌数量和种类基本上减少到最低^[63]。产后子宫细菌的增生决定于细菌种类和产犊间隔。与慢性子宫炎症相关的细菌是化脓杆菌。最近的研究显示产后 1 周子宫感染由大肠杆菌主导，化脓杆菌在第二周起着主导作用，随后导致子宫内膜炎^[64]。三周后在化脓杆菌的作用下，阴道开始排脓、持续性感染、子宫内膜组织炎症加重和损害生产性能。这些感染导致子宫发炎，子宫复旧延迟以及降低生育力^[65]。此外，子宫感染和发炎会导致怀孕侧卵巢卵泡功能损害及黄体的持续时间。最近的研究报道指出子宫内细菌病原体的大量滋生会导致第一主导淋巴结变小，这会在排卵时导致黄体酮浓度降低^[66]。子宫炎是导致全身症状的子宫炎症，包括发热、红棕色子宫发臭排泄物、反应迟钝、食欲不振、心跳加快以及生产性能降低。这些症状基本上在产犊后 7 天发生。采食量和奶牛的状况和子宫炎的发生有一定的关系^[67]。患严重的子宫炎牛在有临床症状之前比正常牛进食量少 2-6kg。在患子宫炎的牛中，一般是大肠杆菌和各种厌氧细菌混合感染^[68]。子宫炎的最大危险因素是胎衣不下，但是其他的能减少进食量和降低免疫力的因素也增加子宫炎的发生危险性。被感染的奶牛病情逐渐加重，因此患子宫炎的牛需要系统性的抗生素治疗。有数据证明大多 1mg/kg 的头孢噻唑可以为子宫内的大肠杆菌的治疗浓度^[69]。从最近的研究来看，理想的治疗时间是在产后 5-10 天，可使 67-77% 的病牛退烧和排出恶露^[70]。对于

防治随后相关的疾病（例如皱胃移位）暂时还缺少有效的数据。奶牛的精神状态和食欲的变化可以作为进一步筛选检查时的指标之一。子宫内膜炎是不伴有全身症状的子宫炎症，以粘膜化脓、慢性子宫细菌感染和子宫排出恶露为特点，多在产后三周后发生。组织学上定义子宫内膜炎是以子宫内膜上皮细胞被破坏、炎症细胞的浸润以及淋巴细胞的聚集、血管充血和基质水肿。子宫内膜炎可以引起受孕率降低、增加治疗花销、生产性能降低、劳动力以及副产品危险的增加。研究报告指出，患子宫内膜炎的奶牛降低 27% 的怀孕率，平均增加 32 天的空怀期，比未得子宫内膜炎的牛高出 1.7 倍的由于生产性能低下导致的淘汰率^[71]。

2.4 围产期奶牛的代谢状态

奶牛从妊娠晚期到泌乳早期会发生血浆胰岛素含量减少和生长激素含量增加，这两种激素在分娩的时候会急剧升高^[72]。推测 3, 5, 3-三碘甲腺原氨酸的含量也可能发生变化，但还没有这方面的报道。胚胎晚期血浆中的雌激素和胚胎着床初期的孕酮含量增加，但在产犊时又立即减少。为了维持妊娠，干奶期孕酮的浓度升高，但是在分娩前大约两天，孕酮的含量快速降低^[73]。奶牛产犊当天，糖皮质激素和催乳素浓度升高，分娩第二天后恢复到接近产前的水平^[74]。妊娠后期，内分泌状态发生的改变和干物质摄入的减少会影响奶牛代谢，导致体脂和肝糖原的动员。产前三周奶牛的干物质摄入量逐渐减少，产前最后一周会急剧减少。干物质减少的程度会有所不同，但典型的是，小奶牛和成年奶牛会减少 30%^[75]。奶牛产前干物质摄入减少的原因还不清楚，可能和内分泌有关。比如，血液中雌性激素的变化或者是雌性激素和孕酮的比率，这些都可能会影响食物的摄入^[76]。产前 17 天至产前 2 天，血浆中非酯化脂肪酸（NEFA）的浓度几乎是成倍增长的，直到分娩完成。目前还不清楚，起初血浆中增加的 NEFA 有多少是通过改变内分泌状态和限制能量导致的干物质摄入减少引起的。围产期奶牛强制饲喂会减小 NEFA 降低的幅度，但不会完全清除 NEFA^[77]。未发生干物质摄入减少的奶牛，产前 1 天之前直到产后 1 天血浆中 NEFA 的含量会增加^[78]。

这些研究表明，至少产前血浆 NEFA 的增加部分是由激素诱导产生的。产犊后血浆 NEFA 浓度迅速降低，但是仍然高于产前。肝脏是食源性脂肪酸作用的主要位点^[79]。因为反刍动物不能象运输极低密度脂蛋白和甘油三酯那样有效的运出脂肪酸，大量的脂肪酸是在肝脏进行酯化，并储藏。产后第一天开始，肝脏甘油三酯大量增加，且在肝脏中的浓度保持稳定或者在产后有微量的增加^[80]。目前还不清楚初产小奶牛产后 1d 对脂肪肝不易感的原因。血浆酮体浓度反映肝脏甘油三酯的浓度，并且血酮浓度在产后可能会增加，直至奶牛发生临床酮病。分娩时肝脏甘油三酯和糖原比率可能是奶牛对酮病易感程度的一个指标。血浆葡萄糖浓度在产前保持稳定或者轻微的增加，分娩时显著增加，然后在分娩后立即减少^[76]。产犊时血糖浓度增加可能是由于胰高血糖素和糖皮质激素浓度的升高，促使储存的肝糖原消耗而增加。虽然，为了乳糖合成需要，乳腺组织对葡萄糖的需要在不

断增加，但是，直到产后第 14 天肝脏糖原储备才开始增加。这可能反映了为了满足泌乳需要，奶牛增强了糖异生能力。除了产犊时血浆 α -氨基酸氮浓度暂时性减少，在整个过渡期血浆 α -氨基酸氮浓度都在升高^[79]。Kunz 等^[80]研究表明，整个过渡期白蛋白保持稳定，这表明机体有充足的蛋白质供应。很明显，新陈代谢变化的大部分都和产后 1 天开始的围产期有关。奶牛发生过度紊乱会产生许多不需要的代谢变化结果，这些变化要么发生在过渡期，要么是“程序式的”发生在过渡期后的几周。例如，奶牛肝脏甘油三酯增加，糖原减少，这些变化严重程度可能会使奶牛在产后几周后有发生临床酮病的倾向。如果皱胃变位和瘤胃充满有关，那么产前干物质摄入减少的程度可能是决定奶牛是否会形成这种紊乱的重要因素。应该采取更重要的措施来增加能量摄入，减少体脂来源的脂肪酸动员，预防肝糖原的过度消耗。

三 犊牛肠道微生态

3.1 犊牛消化系统特点

初生犊牛的消化系统虽然具备了 4 个胃室，但是瘤胃、网胃和瓣胃尚未开始发育，皱胃是犊牛唯一具备消化功能的胃室，犊牛主要靠皱胃和小肠中分泌的消化酶来降解脂肪、碳水化合物和蛋白质，犊牛出生后 2~3 周瘤胃功能尚未建立，其消化和代谢与单胃动物的消化系统在许多方面相似。然而犊牛又不同于单胃动物，饲喂牛奶和代乳品等液体饲料后十分钟之内，由于凝乳酶、胃蛋白酶及胃酸对酪蛋白和脂肪的作用，液体饲料在皱胃中形成凝块。凝乳酶可特异性的与酪蛋白结合，大部分的酪蛋白与脂肪凝聚成块，胃蛋白酶缓慢降解，这一过程大约要 12-18 个小时^[81]。犊牛从出生到断奶采食干饲料，需要经历液体饲喂、液体到固体过渡阶段和反刍阶段三种不同的生理消化过程^[82]，但是，与成年动物比，幼年反刍动物瘤胃内的菌群种类单一，而且优势菌群的种类也不同，可能原因是在幼龄期间仅消化吸收乳，而乳通过食管沟直接进入皱胃，因此，瘤胃内微生物区系尚未健全。在动物成年前，瘤胃内细菌菌群发生很大变化。兼性厌氧细菌在羔羊 2 日龄时数量很高，随后降低。很多动物在 4 日龄，即在采食固体饲料之前，已建立纤维降解细菌菌群^[83]。在一般情况下，幼畜在出生前几周不采食固体饲料，因此，瘤胃内细菌种群的早期建立并不依赖于固体饲料。但是，建立后的细菌种群或整个微生物区系可受日粮显著影响。到动物成年时，其瘤胃内已建立一个相对稳定的微生物区系，但该区系仍可受日粮等因素的影响^[84]。由最初从牛奶获得营养到瘤胃功能的建立、微生物的发酵过程，经历了巨大的生理和代谢转变^[85]。

3.2 犊牛瘤胃微生物菌群的建立和发展

犊牛出生 6 h 后可检测到大肠杆菌、类杆菌和梭菌，12 h 后，双歧杆菌、

乳杆菌、真杆菌、类杆菌等正常菌群全部检测出来,并以大肠杆菌、类杆菌和梭菌为优势菌。随着厌氧菌大量增殖,需氧菌和兼性厌氧菌逐渐下降,出生三天后在其网状瘤胃中发现了能分解纤维素和产生甲烷的微生物,1周后形成以乳杆菌、双歧杆菌为优势菌群的微生态区系,1-3周后出现了纤维素分解菌、乳酸发酵菌和 Coliforms,此后乳酸发酵菌的数量下降,双歧杆菌、乳酸杆菌在1d龄、2d龄的检出数量不高,但随后迅速增殖,7d龄时即成为优势菌群,至15d龄后才缓慢降低,但直至断奶前一直为优势菌群。何昭阳(2000)报道^[86],犊牛一出生就开始口服复合产酸菌,并跟踪检测直肠的主要正常菌群数,直肠的主要正常菌群没有表现出提前定植的趋势。在第7天时,对照组双歧杆菌和乳酸杆菌为优势菌群,数量可达到9~10(logCFU/g)肠球菌在2日龄时即达到肠球菌的最高对数均值,与大肠杆菌共同成为消化道优势菌群,之后乳酸菌数量随日龄缓慢降低。9-13周后牛的瘤胃微生物和成年牛的相似^[87]。

3.3 犊牛胃肠道正常菌群的生理作用

家畜的消化道常寄居有多种微生物。微生物之间存在着共生和拮抗的关系,它们之间和微生物与宿主之间,均保持着相对的生态平衡,能有规律地适应各自的环境而生存。在正常条件下,对宿主无害而且有益的微生物称为正常微生物群。正常菌群作为宿主的组成部分,可影响宿主的生长发育、消化吸收、营养转化和肠道形态结构等^[1]。胃肠道菌群与宿主在共同历史进化过程中形成了微生物生态系,这是微生物长期演化适应的结果。保持消化道微生物正常菌群对机体的生理平衡甚为关键,对畜禽的生长发育和抵抗疾病具有重要意义^[2]。微生物主导着胃肠内所进行的一系列消化代谢过程。动物与正常微生物群落之间共生关系的实质就是营养关系。反刍动物的瘤胃、马属动物的盲肠都是这种营养关系的典型表现,如蛋白质代谢、碳水化合物代谢、脂肪代谢和维生素的合成和消耗等^[3]。

第二章：试验部分

试验一：犊牛瘤胃乳酸菌的分离与鉴定

摘要：为分离筛选对犊牛和围产期奶牛有益生效果的乳酸菌菌株，本试验采用 API 50CHL 对从牛瘤胃中分离的 60 株乳酸菌进行生化鉴定，对鉴定出的菌株进行耐酸、耐碱、耐氧、生长温度、耐药和抑菌性测定。结果显示，经生化鉴定出的 3 株菌分别为嗜酸乳杆菌 (*L.acidophilus*)、发酵乳杆菌 (*L.fermentum*) 和乳明串珠菌 (*L.holzapfelii*)，分别命名为 L1、L2 和 L3。其中，L1 耐酸性最强，L2 耐碱性最强，L1 在 37 到 40 °C 之间均生长良好且兼性厌氧；L1、L2、L3 耐药率分别为 80%、67%、53%；3 株乳酸菌对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均有不同程度的抑制作用；L1 抑菌效果最好，抑菌直径为 18.3 mm 和 16.4 mm。提示，L1、L2 可作为益生性乳酸菌活菌制剂的候选菌株。

关键词：乳酸菌；抑菌特性；生化特性

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 病料采集

无菌采集新疆石河子市某规模化屠宰场健康犊牛瘤胃液吸取上清有生理盐水稀释至 10^{-4} 待分离鉴定。一份直接冷冻。

1.1.2 主要试剂

Rogosa SL agar、MRS 培养基均购自 Sigma 公司；API 50CHL 试剂盒购自 BioMerieux France 公司；营养琼脂 (NA) 石河子大学微生物免疫实验室常规配制。

1.1.3 主要仪器试剂及对照菌株

CO2 培养箱、生物安全柜 (BHC-II-A/B3 型)、CX21 光学显微镜 (OLMPUS)、麦氏比浊管 (自制)、CR22E 高速冷冻离心机、超低温冰箱、隔水式恒温培养箱 (GSP-9720MBE)。对照菌株嗜酸乳杆菌购自亚芯公司；指示菌株大肠杆菌、金黄色葡萄球菌均由石河子大学预防兽医传染病实验室提供。

1.1.4 药敏纸片

抗菌药物纸片均购自杭州微生物有限公司。即：阿洛西林 (Azlocillin, AZL)、青霉素 (Penicillin, P)、氨苄青霉素 (Ampicillin, AMP)、阿莫西林 (Amoxicillin, AMC)、先锋 V (Kefzol, KZ)、庆大霉素 (Gentamicin, CN)、链霉素 (Streptomycin, STR)、阿米卡星 (Amikin, AMK)、新霉素 (Neomycin, N)、恩诺沙星 (Enrofloxacin, ENR)、氯霉素 (Chloramphenicol, C)、氟苯尼考 (Florfenicol, FFC)、林可霉素 (Lincomycin, CD)、红霉素 (Erythromycin, E)、

呋喃唑酮(Furazolidone, F)。

1.2 方法

1.2.1 菌种的分离和形态学观察

将瘤胃液取回后吸取 0.5ml 进行倍量稀释直至 10^{-6} ，分别取 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} 的稀释液，将稀释好的瘤胃液接种于灭菌 SL 培养基中每个平板 3 滴，晾干后置 CO_2 厌氧培养箱中 37°C 培养 48h，选取生长良好的单个菌落接种于灭菌后的 MRS 培养基中，之后 37°C 厌氧环境下培养 24 h，选取形态一致的菌落，涂片，革兰氏染色，镜检观察菌体的形态及染色特性。挑取单个菌落编号，用 20%甘油 MRS 保存于 -70°C 冰箱中。

1.2.2 乳酸菌的鉴定

将检测好的革兰氏阳性细菌再用 API 50 CHL Kits 做生化反应鉴定。取 5 个板条（共 50 孔）放到蜂窝状孵育槽中，并在槽中加 10 ml 的去离子水，保湿；用培养好的液体 RMS 进行比浊，稀释到 0.2McFarland ($5 \text{ McFarland} \approx 10^9 \text{ CFU/ml}$)，取 0.5ml 悬液加入 API 50 CHL 介质中；混合液加满板条中的小杯，用石蜡油封口，盖上板条盖子，放 37°C ， CO_2 厌氧培养箱中培养 48h。根据板条上小杯颜色的变化观察结果：产酸的是阳性反应，溶液中的溴甲酚紫指示剂变成黄色；葡萄糖苷试验（第 25 孔）由紫色变为黑色是阳性反应。记录结果，用 Biomerieux API Identification 程序自动分析结果。

1.2.3 耐酸、耐碱试验

将试验菌株和对照菌株分别接种于 pH 为 3.0、4.0、4.5、5.0 的 MRS 培养基中和含 0.1%、0.2%、0.3%、0.4% 牛胆盐的 MRS 固体培养基中， 37°C 厌氧环境培养 48 h 后观察结果，有菌体生长为阳性，无菌体生长为阴性。

1.2.4 培养温度与耐氧性

将试验菌株与对照菌株分别稀释至 10^4 CFU/mL ，分别放置于 4°C 、室温、 30°C 、 37°C 、 40°C 和厌氧罐、5% CO_2 、10% CO_2 下培养 24 h 后，用酶标仪测定 $D_{600 \text{ nm}}$ 值。

1.2.5 标准生长曲线的绘制

将已活化的试验菌与对照菌按照 1.0 分别接种于 MRS 液体培养基中，取 250 μL 加入 96 孔微板中， 37°C $D_{600 \text{ nm}}$ 每 30 分钟测定一次记录 $D_{600 \text{ nm}}$ 值。

1.2.6 耐药性试验

将培养好的菌液用移液枪吸取 50 μL 置于 MRS 琼脂平板，用涂布器进行涂匀，数分钟后，待菌液干燥后，再在每个平板上均匀贴上 5 片不同的药敏制品，置于 37°C 恒温培养箱中培养 18~24 h 后测量抑菌圈的直径，根据抑菌圈的大小判断对抗菌药的敏感性（Khan 等，2002）纸片标准参考美国国家临床实验室标准化委员会（NCCLS）药敏制品国际标准判定结果，试验方法参照兽医微生物学（陆

承平, 2007)。

1.2.7 抑菌性试验

将试验菌株和对照菌株接种于 MRS 培养基中, 37 °C 培养 24h 后离心, 取上清并测定 pH, 上清通过打孔法进行抑菌试验, 测量抑菌圈大小。指示菌用普通肉汤活化, 同时设有未接种的 MRS 培养基为空白对照。全部放置 37 °C 厌氧培养 24 h 后观察结果, 测量抑菌圈大小 (李云岗等, 2008)。试验结果用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析。

2 结果

2.1 菌种的分离和形态观察

稀释的瘤胃液经 SL 完全选择培养基完全选择后得到 60 株菌, 在 MRS 培养基上形成边缘整齐, 表明光滑的乳白色菌落 (图 1A, B); 将菌落进行革兰氏染色, 油镜下可看到棒状的阳性杆菌和串珠样阳性球菌。(图 2C, D)。

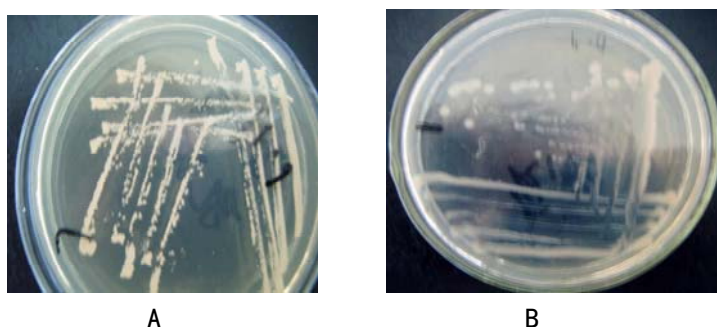


图 1 MRS 培养基上的菌落特征

Figure 1: Colonies of characteristics on MRS medium

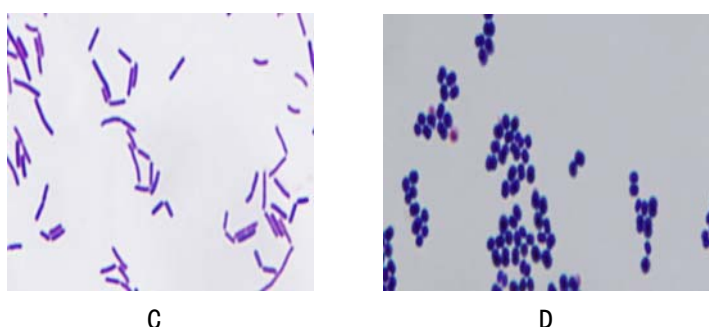


图 2: MRS 培养基上的菌落的革兰氏染色特性 (X1000)

Figure 2: Gram staining characteristics of colonies on MRS medium (X1000)

2.2 生化鉴定结果

API 50 CHL Kits 生化反应结果 (图 3) 用 BioMerieux API Identification 程序自动分析结果显示 (表 1), 60 株菌中 34 株为嗜酸乳杆菌 (*L.acidophilus*) 鉴定百分率为 95.4 %, 命名为 L1; 18 株为发酵乳杆菌 (*L.fermentum*) 为 98.7 %, 命名为 L3; 8 株为乳明串珠菌 (*L.holzapfelii*) 为 96.7 %, 命名为 L3。



图 3: API 50 CHL Kits 生化反应结果 (L1)

Figure 3: Results of API 50 CHL Kits biochemical reaction

注: 黄色为+, 紫色为-, 第 25 小杯黑色为+

表 1 L2 和 L3 的 API 50 CHL 生化反应结果

Table 1: Results of L2 and L3 API 50 CHL biochemical reaction

		L2		L3		L2		L3	
		24	48	24	48	24	28	24	48
0	0								
1	GLY			+					
2	ERY								
3	DARA								
4	LARA	+	+						
5	RIB	+	+						
6	DXYL	+	+						
7	LXYL								
8	ADO								
9	MDX	+	+						
25	ESC								
26	SAL								
27	CEL								
28	MAL					+	+	+	+
29	LAC					+	+	+	+
30	MEL					+	+		
31	SAC					+	+	+	+
32	TRE							+	+
33	INU								
34	MLZ								+

10	GAL	+	+	+	+	35	RAF		+	
11	GLU	+	+	+	+	36	AMD			
12	FRU				+	+	37	GLYG		
13	MNE						38	XLT		
14	SBE						39	GEN		
15	RHA						40	TUR	+	+
16	DUL						41	LYX		
17	INO						42	TAG		
18	MAN						43	DFUC		
19	SOR						44	LFUC		
20	MDM						45	DARL		
21	MDG						46	LARL		
22	NAG	+	+	+	+	47	GNT	+	+	
23	AMY					48	2KG	+	+	
24	ARB					49	5KG			

2.3 耐酸耐碱结果

由表 2 可知，L1、L2 能在 pH 为 3.0 的培养基中良好生长，pH 为 4.5 时 L3 能良好生长，对照菌在 pH 为 4.0 是能良好生长；L2、L3 和对照菌能在 0.3 % 的牛胆盐环境下良好生长，L1 能在 0.2% 的牛胆盐下良好生长。

表 2 耐酸耐碱实验结果

Table 2: Results of Acid and alkali resistant

	L1	L2	L3	对照菌
pH=3.0	++	++	-	+
pH=4.0	++	+++	+	++
pH=4.5	+++	+++	++	+++
pH=5.0	++	++	+++	+++
0.1%牛胆盐	++	++	+++	+++
0.2%牛胆盐	++	++	++	++
0.3%牛胆盐	-	++	++	+
0.4%牛胆盐	-	-	-	-

注：+表示阳性实验，++表示良性实验，+++表示优性生长，-表示阴性实验

Note: + indicates a positive test, ++ indicates a benign experiment, +++ indicates excellent growth, - indicates a negative test

2.4 培养温度与耐氧性结果

由表 3 可知，L1 在 37℃- 40℃之间均生长良好且兼性厌氧；L2、L3 和对照菌株在厌氧条件下生长良好；4 株菌均在 4℃ 下生长缓慢。

表 3 不同条件下的乳酸菌生长 $D_{600\text{ nm}}$ 值

Table 3: Results of Lactic acid bacteria grown under different conditions, the value of $D_{600\text{ nm}}$

菌株	4℃	室温	30℃	40℃	37℃ 5%CO ₂	37℃ 10%CO ₂	37℃ 厌氧
----	----	----	-----	-----	-----------------------	------------------------	--------

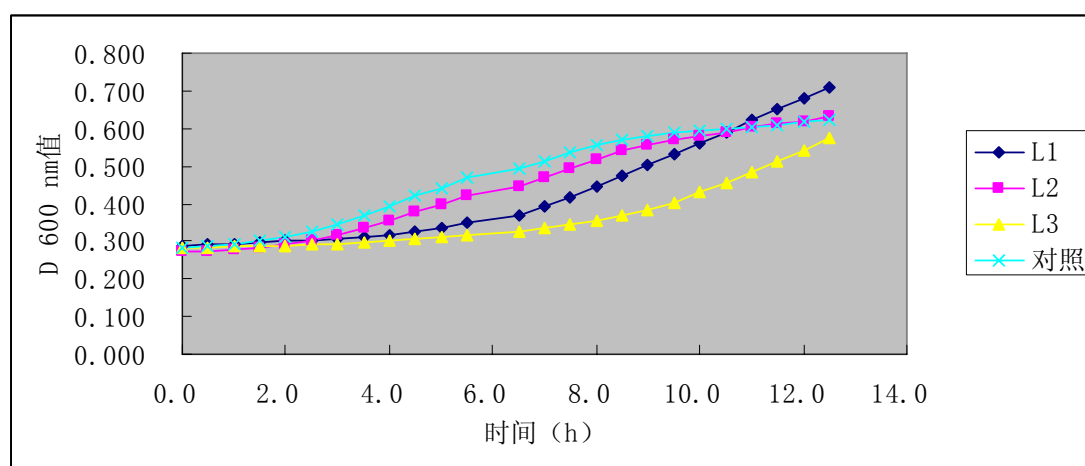
L1	0.241	2.216	2.162	2.348	2.262	2.267	2.226
L2	0.226	1.977	2.158	2.037	2.273	2.268	2.447
L3	0.198	1.838	2.116	1.996	2.207	2.215	2.223
对照菌株	0.213	2.133	2.143	2.038	2.253	2.326	2.467

2.5 标准曲线

将已活化的试验菌与对照菌按照 1.0 分别接种于 MRS 液体培养基中，取 250 μ L 加入 96 孔微板中，37 $^{\circ}$ C $D_{600\text{ nm}}$ 每 30 分钟测定一次记录 $D_{600\text{ nm}}$ 值后绘制曲线（表 4）。

表 4 试验菌与对照菌在 $D_{600\text{ nm}}$ 下的标准曲线

Table4: Results of Test bacteria and fungus control standard curve at D 600 nm



2.6 药敏实验结果

根据药敏纸片在培养基上与乳酸菌产生的抑制圈大小来判定乳酸菌株对各种药物的敏感性（图 4 E, F），结果显示（表 6）实验菌株与对照菌株差异不明显，L1 耐药率为 80%；L2 为 67%；L3 为 53%；对照菌为 73 %。其中对 AZL、CN、STR、AMK、N 和 F 耐药率都在 100%；对 P、AMC、ENR、FFC、CD 和 E 的耐药率都在 50 %以上；只有 C 的高敏率为 50%以上。

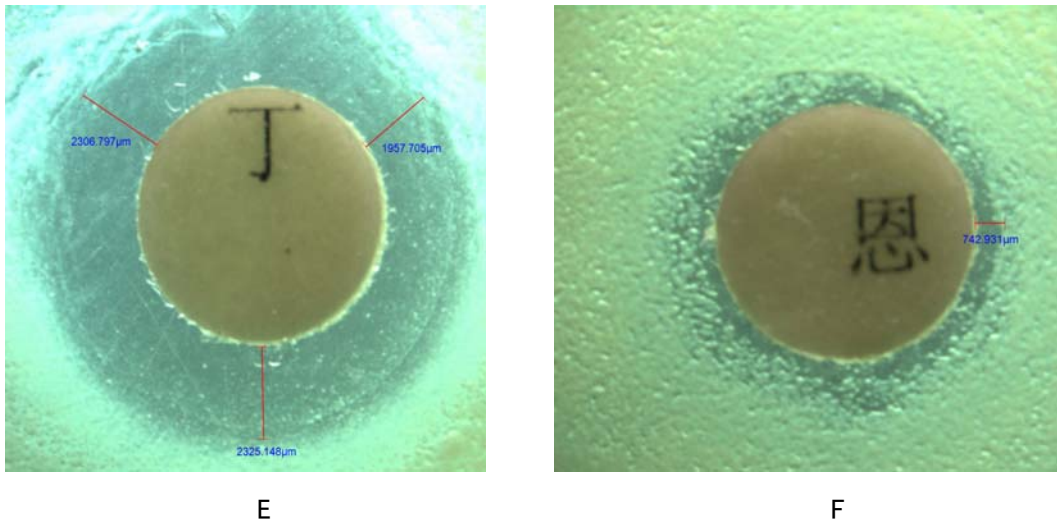


图 4: 药敏实验结果

Figure 4: Results of susceptibility testing

注: E 中“丁”为阿米卡星, F 中“恩”为恩诺沙星

Note: E in the "D" as amikacin, F in the "en" of enrofloxacin

表 5 15 种抗菌药物对乳酸菌药敏实验结果

Table5: The results of lactic acid bacteria susceptibility to antimicrobial agents

抗生素	菌株数量 (个)			高敏菌株 比例 (%)	中敏菌株 比例 (%)	耐药菌株 比例 (%)
	敏感 (S)	中敏 (I)	耐药 (R)			
AZL	0	0	4	0	0	100
P	1	1	2	25	0	50
AMP	1	2	1	25	50	25
AMC	0	2	2	0	50	50
KZ	0	3	1	0	75	25
CN	0	0	4	0	0	100
STR	0	0	4	0	0	100
AMK	0	0	4	0	0	100
N	0	0	4	0	0	100
ENR	0	1	3	0	25	75
C	2	1	1	50	25	25
FFC	0	1	3	0	25	75
CD	0	1	3	0	25	75
E	0	1	3	0	25	75
F	0	0	4	0	0	100

2.7 抑菌性实验结果

由表 6 可以看出 L1、L2、L3 和对照菌代谢产物对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌均出现了抑菌环 (图 5 G, H), MRS 液空白对照对各致病菌都未出现抑菌圈 (图 5 I)。其中 L1 对大肠杆菌的抑制效果最强, 抑菌圈直径达到 18.3mm; L2 对金黄色葡萄球菌的抑制效果最强, 抑菌圈直径达到 16.5mm。而未接种的 MRS 培养基对致病菌无抑菌现象。

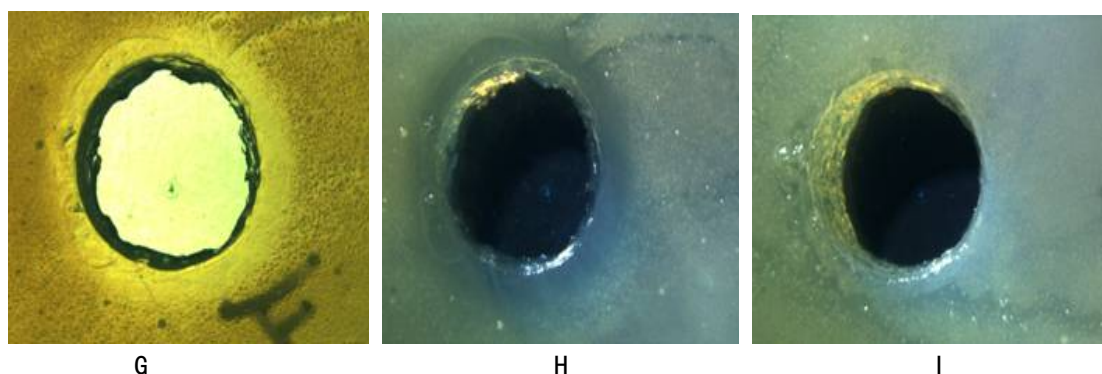


图 5: 抑菌性实验结果

Figure 5: Results of the antimicrobial

注: G 为乳酸菌对金黄色葡萄球菌的抑菌圈, H 为乳酸菌对大肠杆菌的抑制圈, I 为空白对照

Note: G is lactic acid bacteria *Staphylococcus aureus* inhibition zone, H is the inhibition of lactic acid bacteria *Escherichia coli*, I was the control

表 6 不同菌株对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径

Table6: The results of Different strains of *E. coli* and *Staphylococcus aureus* inhibition zone diameter

菌株	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌
L1	18.3 ± 0.17	16.4 ± 0.26
L2	17.6 ± 0.35	16.5 ± 0.22
L3	17.4 ± 0.31	15.3 ± 0.17
对照	17.6 ± 0.29	16.2 ± 0.26

3 讨论

3.1 根据国内外报道, 乳酸菌作为新型无残留的绿色添加剂, 是通过改善微生态平衡而产生有益影响。并能直接进行饲喂, 从 90 年代开始乳酸菌为主的益生菌合剂在畜禽生产中的应用与开发以成为国内外学者研究热点。唐志刚等; 刘辉等; Bruno 等多位国内外学者研究指出益生菌能提高畜禽类的生产性能, 提高免疫力, 代替抗生素的首选。但是肖建根等学者研究表明益生菌的菌株特性对应用效果影响最大。生产上应用的大多数益生菌株提取自土壤、水环境中等, 这种生态环境与动物肠道生理环境相差甚远, 动物胃肠道内的酸性环境、胆盐和厌氧环境很大程度上制约了许多微生物的生长。与此相比附着于胃肠道内的微生物经过胃肠道自身的筛选, 能适应胃肠道环境且能大量繁殖。所以因选用动物体内的正常菌株作为菌种开发利用。

3.2 近几年来, 益生菌制剂的发展速度较快, 在防治动物疾病、控制药物残留、提高饲料资源利用率和改善动物产品品质等方面展示出了巨大的潜力, 大量研究表明益生菌制剂具有良好的前景, 但是益生菌制剂多数是为了维护正常的微生态平衡, 不仅需要适宜动物体内环境的菌株, 而且需要长期不断补充才能发挥益生菌制剂的作用。本实验从牛瘤胃液中分离的 60 株, 生化鉴定出 3 株乳酸菌并将

应用于市场的乳酸菌做为对照菌，进行了一系列的试验与筛选，其中耐药性最好的为 L1 为 80%。4 株乳酸菌均有较好的耐酸碱性和抑菌性，但各菌株之间存在明显差异。L2 耐酸性最强，但与 L1 差异不明显；对照菌耐碱性较强与 L3 无差异；与 L1、L2 有差异，但差异不明显；L1 在室温到 40℃ 之间均生长良好且兼性厌氧，具有良好的应用价值，适宜在条件不全的基层单位培养应用；L1、L2 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌具有较强的抑菌效果，因此这两株菌具有良好的应用前景。

3.3 本研究显示，自牛瘤胃中分离的乳酸菌在耐酸碱性和抑菌性上都有良好的特性。Bauer 等研究表明乳酸菌可以通过产生酸性代谢产物，酸化肠道，降低肠道 pH，从而抑制病原性细菌生长。刘文华等研究表明乳酸菌对大肠杆菌形成的抑菌圈直径为 16mm，对金黄色葡萄球菌的抑菌直径为 14mm；分离乳酸菌对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的生长具有抑制作用，即对 G⁺菌和 G⁻菌均有一定的抑制效果。吴慧芬等研究表明排除酸的影响，乳酸菌对大肠杆菌还有 22 %-53 %的抑菌效果，对葡萄球菌还有 8 %-36 %的抑菌效果，说明乳酸菌代谢产物具有良好的抑菌效果，与本实验一致。

试验二： 乳酸菌增菌扩大培养基的筛选及优化

摘要：为自制乳酸菌制剂筛选出适合分离株乳酸菌的扩大增菌培养基，本实验采用单因素变化法对乳酸菌的培养基成分进行了筛选和优化，经过优化后筛选出了大麦芽汁培养基为优化增菌培养基，后对分离株进行扩大增菌培养，收集菌液后进行杂菌检测，动物安全性实验。结果表明：大麦芽培养基在制作成本上明显优于经典乳酸菌培养基 MRS；培养 24h 后，菌体浓度可达到 3.5×10^7 CFU/mL，是 MRS 培养基的 1.1 倍；在收集的菌液 2×10^{10} CFU/ml 中未检测到大肠杆菌和金黄色葡萄球菌，连续给小鼠灌服自制乳酸制剂 7 天后无死亡，解剖后观察内脏病变，实验小鼠与对照小鼠无明显差异，为自制乳酸菌制剂在临床应用提供保障。

关键词：增殖培养基；乳酸菌

1 材料与amp;方法

1.1 菌种

试验菌株从瘤胃液中自分离，经过实验室诊断确定为乳酸菌。

1.2 材料

伊红美蓝琼脂培养基、兔血平板实验室常规配制，MRS培养基购于北京奥博星生物技术有限责任公司，MRS固体培养基用于计数。大麦芽，胡萝卜，番茄均购自当地市场。

1.2.1 主要仪器

实验所用仪器、药品、实验动物均由石河子大学微生物免疫实验室提供主要有电子天平、高压锅、方板、无菌工作台、二两式中药磨粉机、榨汁机。

1.3 方法

1.3.1 大麦芽汁的制备

取干麦芽 100g 打碎磨粉，100g 麦芽 400ml 蒸馏水 65℃水浴 3-4 小时完成糖酵解，与碘液无变色证明糖酵解完毕。后用纱布过滤后，在用滤纸过滤，经 121℃高压灭菌 30min 分装后备用。

1.3.2 番茄汁的制备

将新鲜番茄洗净煮熟后剥皮，用榨汁机打碎后用纱布过滤后用滤纸过滤，一份番茄汁加一份水经121℃高压灭菌15min后分装备用。

1.3.3 胡萝卜汁的制备

将新鲜胡萝卜洗净后用榨汁机打碎，用一份胡萝卜肉与一份水混匀后加热，边加热边搅拌，煮沸后用纱布过滤在用滤纸过滤，经121℃高压灭菌15min后分装

备用。

1.3.4 增菌培养基的制备

(1) 取大麦芽汁500ml，水500ml，胰蛋白胨10g，酵母膏7.5g，碳酸钙3g，调节pH为6.4后121℃高压灭菌20min。

(2) 番茄汁培养基 取番茄汁500ml，水500ml，胰蛋白胨10g，酵母膏7.5g，碳酸钙3g，调pH为6.5后经121℃高压灭菌20min。

(3) 胡萝卜培养基 取胡萝卜汁500ml，水500ml，胰蛋白胨10g，酵母膏7.5g，碳酸钙3g，调pH为6.5后经121℃高压灭菌20min。

(4) 改良番茄胡萝卜培养基 番茄汁500ml，胡萝卜汁200ml，水300ml，胰蛋白胨5g，酵母膏7.5g，碳酸钙3g，调pH为6.5后经121℃高压灭菌20min。

1.3.2 不同固体增菌培养基对乳酸菌培养的效果观察

MRS培养基、大麦芽汁培养基、番茄汁培养基、胡萝卜培养基、改良番茄胡萝卜分别制成固体培养基，每个培养基分为三部分，用移液枪在每个培养基上点30 μ l 10^6 CFU/mL，涂布器涂匀阴干后放入CO₂温箱中37℃培养24小时后用平板计数法计算活菌数。

1.3.3 不同液体增菌培养基乳酸菌培养的效果观察

MRS培养基、大麦芽汁培养基、番茄汁培养基、胡萝卜培养基、改良番茄胡萝卜分别制成液体培养基，每个试管中接种 10^6 CFU/mL后放入CO₂温箱中37℃培养24小时后用稀释法计算活菌数。

1.3.4 乳酸菌增菌培养及收集

将大麦芽固体培养基倒入高压烘干好的方板，晾干后用长棉签将分离株乳酸菌均匀涂布在培养基表面，阴干后放入CO₂温箱中37℃培养24小时，后用大麦芽液体培养基冲洗培养基上的菌落收集菌液稀释平板法计算活菌数。

1.3.5 杂菌检测

在伊红美蓝琼脂平板、兔血平板上涂布自制乳酸菌制剂，观察菌落生长。

1.3.6 动物安全性实验

连续7天给健康小白鼠灌服自制乳酸菌制剂 2×10^{10} CFU/ml/天，与未灌服的健康小白鼠作对照，观察小白鼠的健康状况，在第10天将全部小白鼠脱臼处死后解剖，检测小白鼠内脏是否出现病变。

2 结果

2.1 不同固体增菌培养基中乳酸菌的生长状况

MRS培养基、大麦芽汁培养基、番茄汁培养基、胡萝卜培养基、改良番茄胡萝卜分别制成固体培养基，每个培养基分为三部分，用移液枪在每个培养基上点 $30\ \mu\text{L}\ 10^6\ \text{CFU/mL}$ ，涂布器涂匀阴干后放入 CO_2 温箱中 37°C 培养24小时后用平板计数法计数。试验结果（表7）表明大麦芽汁培养基与其他几种培养基差异显著，适宜作为扩大增菌培养基。

表7：固体培养基计数实验结果

Table 7: The results of solid culture medium the counts

培养基	接种浓度	计数结果
大麦芽汁培养基	$10^6\ \text{CFU/mL}$	$3.5\times 10^8\ \text{CFU/mL}$
番茄汁培养基	$10^6\ \text{CFU/mL}$	$1.4\times 10^8\ \text{CFU/mL}$
胡萝卜汁培养基	$10^6\ \text{CFU/mL}$	$1.5\times 10^8\ \text{CFU/mL}$
改良番茄胡萝卜汁培养基	$10^6\ \text{CFU/mL}$	$2.8\times 10^8\ \text{CFU/mL}$
MRS固体培养基	$10^6\ \text{CFU/mL}$	$3.2\times 10^8\ \text{CFU/mL}$

2.2 不同液体增菌培养基中乳酸菌的生长状况

MRS培养基、大麦芽汁培养基、番茄汁培养基、胡萝卜培养基、改良番茄胡萝卜分别制成液体培养基 4mL 每管，用移液枪在每个培养基中加 $50\ \mu\text{L}\ 10^6\ \text{CFU/mL}$ ，放入 CO_2 温箱中 37°C 培养24小时后用稀释倍数法计数。试验结果（表8）表明大麦芽汁培养基与其他几种培养基差异不明显，且低于固体培养基。不适宜作为增菌培养基。

表8：液体培养基计数实验结果

Table 8: Results of Liquid culture medium the count

培养基	接种浓度	计数结果
大麦芽汁培养基	$10^6\ \text{CFU/mL}$	$1.2\times 10^7\ \text{CFU/mL}$
番茄汁培养基	$10^6\ \text{CFU/mL}$	$1.0\times 10^7\ \text{CFU/mL}$
胡萝卜汁培养基	$10^6\ \text{CFU/mL}$	$1.3\times 10^7\ \text{CFU/mL}$
改良番茄胡萝卜汁培养基	$10^6\ \text{CFU/mL}$	$1.3\times 10^7\ \text{CFU/mL}$

2.3 菌液收集与杂菌检测

方板法增菌培养分离株乳酸菌，用大麦芽液体培养基冲洗收集，检测活菌数为 2×10¹⁰CFU/ml；观察伊红美蓝琼脂平板未出现紫黑带金属光泽的菌落，在兔血平板上未出现溶血环的菌落。分离株乳酸菌增菌收集液中未检测到大肠杆菌和金黄色葡萄球菌。

2.3 动物安全性实验结果

在对小白鼠连续灌 7 天灌服自制乳酸菌制剂时，小白鼠精神状态良好，在第 10 天脱臼处死解剖后，全部小白鼠内脏没有病变。

3 讨论

本实验选用牛瘤胃液中分离的乳酸菌为原料，对分离株乳酸菌扩大增菌培养基进行筛选和优化，确立分离株乳酸菌的最佳的培养基为：大麦芽汁 500ml，水 500ml，胰蛋白胨 10g，酵母膏 7.5g，碳酸钙 3g 制成的大麦芽汁固体培养基，24h 增菌为 3.5×10⁸ CFU/mL，在菌体浓度上能达到 MRS 培养基的 1.1 倍。这与雷星宇等确定的优化培养基：葡萄糖 32%，碳素钙 0.84%，番茄汁 33%，蛋白胨 1%，牛肉膏 1%，磷酸钾 0.2%，硫酸镁 0.058%，24h 菌体浓度可达到 4.75×10⁹CFU/mL 是 MRS 培养基的 2 倍的研究结果基本一致。确立了自制乳酸菌制剂的扩大增菌培养基。

对分离株乳酸菌进行扩大增菌培养后，收集的菌液中活菌数为 2×10¹⁰CFU/ml 中未检测到大肠杆菌和金黄色葡萄球菌，连续给小鼠灌服自制乳酸制剂 7 天后无死亡，解剖后内脏与健康小鼠无异，为自制乳酸菌制剂在临床应用提供保障。

试验三： 乳酸菌和酵母培养物对围产期奶牛保健的应用效果观察

摘要：为了研究自制乳酸酵母培养物对围产期奶牛的保健效果，故选取围产期奶牛 50 头随机分为 4 组进行比较实验：在不同围产时间采取奶牛的尾静脉血，利用钙和无机磷测定试剂盒、细胞因子试剂盒测试，记录奶牛分娩后的产奶量结果表明，实验组与对照组围产期奶牛发生低血钙的概率为 16.6%和 46.1%，一周平均产奶量高于对照组 2kg。血清中 CD4⁺、CD8⁺和 IFN- γ 明显高于对照组，但 IL-1、IL-2 和 IL-6 均低于对照组，结果表明自制乳酸菌制剂具有免疫调节作用。

关键词：乳酸菌；奶牛；围产期；血钙；细胞因子

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和药品

试验菌株均分离自牛瘤胃液中，经实验室鉴定为乳酸菌，筛选后编号 L1（嗜酸乳杆菌）和 L2（发酵乳杆菌）制为合剂活菌数为 10^{10} CFU/ml 4℃保存；对照菌株（嗜酸乳杆菌）购自台湾亚芯公司活菌数为 10^{10} CFU/g 4℃保存；酵母粉购自湖北宜昌市安琪酵母股份有限公司酵母活菌数为 2×10^{11} CFU/g。VD3、VE 由西部牧业股份有限公司良种繁育场提供。

1.1.2 试剂

钙测定试剂盒和无机磷测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所；奶牛免疫细胞表面抗原分子白介素-I、白介素-II、白介素-VI、干扰素- γ 、CD4+和 CD8+均购自上海蓝基生物科技有限公司。

1.1.3 主要仪器

Power Wave XS2 连续波长酶标仪；37℃温箱；4℃冰箱。

1.1.4 试验围产期奶牛

围产期健康奶牛，由新疆西部牧业股份有限公司良种繁育场提供。

1.2 方法

1.2.1 围产期奶牛分组

对良种繁育场9#圈的围产期奶牛进行观察，挑选胎次相同，体重、体况相近，品种相同的围产期奶牛。围产期奶牛50头，随机分3组，10头围产期奶牛除基础日粮外只添加VD3、VE为对照组，其余为实验组，实验1组20头围产期奶牛在基础日粮中添加L1、L2、酵母粉和VD3、VE拌料饲喂，实验2组20头围产期奶牛在基础日粮中只添加对照菌株、酵母粉和VD3、VE拌料饲喂，所有实验组与对照组基础日粮相同。

1.2.3 实验日粮及其饲养管理

围产期奶牛日粮组成见(表9)实验组与对照组在饲养管理方式上保持不变，乳酸菌酵母粉使用方法直接拌料饲喂。每天一次早上饲喂，饲草饲料由专职人员饲喂，饲养方式、管理模式及环境条件一致。

表9：围产期奶牛日粮组成 (mmol/L)

Table9: Results of Perinatal dairy cows composition (mmol / L)

	样本 (头)	乳酸菌	酵母粉 (g)	VD3、VE (g)	基础日粮	饲喂时间 (天)
实验1组	20	2ml	2	2	相同	28
实验2组	20	2g	2	2	相同	28
对照组	10	0	0	2	相同	28

1.2.4 实验饲养周期

实验从产前 2 周到产后 2 周，共计 28 天。

1.2.5 实验数据的采集

三组围产期奶牛于饲喂前、饲喂第 7 天、第 14 天和产后 5 天采取血样，所有血样均为尾静脉采集。分离血清后用于测定血液中的 Ca 和 P（实验步骤参照南京建成生物工程研究所所产钙测定试剂盒和无机磷测定试剂盒的说明书）以及白介素-I、白介素-II、白介素-VI、干扰素- γ 、CD4+和 CD8+（实验步骤参照上海蓝基生物科技有限公司所产奶牛免疫细胞表面抗原分子白介素-I、白介素-II、白介素-VI、干扰素- γ 、CD4+和 CD8+ ELISA 试剂盒操作手册）。记录奶牛分娩后 3 周内的产奶量。实验数据以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，应用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析。

2 结果

2.1 血液中钙含量的测定结果

本实验测得血液中钙含量（表10）其中对照组在生产前一周时低血钙的发生率为31%，产前达到最高的46.1%。与实验组差异极显著。

表10: 血液中钙含量测定结果 (mmol/L)

Table10: Results of Calcium in the blood assay results (mmol / L)

	实验1组	实验2组	对照组
饲喂前	2.90±0.61	2.93±0.53	2.82±0.62
产前二周	3.16±0.4	3.12±0.39	2.91±0.52
产前一周	3.25±0.82	3.18±0.66	2.24±0.91

产后一周	3.36±0.43	3.22±0.54	2.53±0.85
------	-----------	-----------	-----------

2.2 血液中无机磷含量的测定结果

血液中无机磷含量（表11），可明显看出在产前一周时无机磷的含量明显减少，分娩后有再度升高，实验组基本能与钙含量保持在1:1，保持微平衡。

表11：血液中无机磷含量测定结果

Table 11: Results of Determination of inorganic phosphorus levels in the blood (mmol/L)

	实验1组	实验2组	对照组
饲喂前	2.76±0.63	2.84±0.51	2.85±0.63
产前二周	2.86±0.53	2.89±0.85	2.91±0.52
产前一周	3.02±0.32	3.05±0.66	2.76±0.54
产后一周	3.14±0.42	3.11±0.54	2.83±0.62

2.3 血液中细胞因子的测定结果

本实验测得血液中细胞因子含量（表 12—17），结果表明实验 1 组与实验 2 组存在差异但差异不显著，实验 1 组与对照组存在显著差异，实验 1 组 CD4+、CD8+及干扰素 γ 的增加量要高于对照组，白细胞介素 IL-1、IL-2 及 IL-6 的含量实验 1 组趋于下调，低于对照组。

表12：免疫细胞表面抗原分子CD4+的含量（ng/ml）

Table 12: Surface antigen of CD4 + molecule content of immune cells(ng / ml)

	实验1组	实验2组	对照组
饲喂前	0.35±0.03	0.33±0.05	0.38±0.03
产前二周	0.44±0.05	0.40±0.06	0.39±0.04
产前一周	0.48±0.02	0.42±0.06	0.36±0.06
产后一周	0.51±0.04	0.43±0.05	0.38±0.08

表13：免疫细胞表面抗原分子CD8+的含量（ng/ml）

Table 13: Results of Surface antigen of CD8 + molecule content (ng / ml) of immune cells

	实验1组	实验2组	对照组
饲喂前	61.2±4.06	62.4±6.51	61.4±6.62
产前二周	64.1±5.53	63.8±5.85	62.1±4.52
产前一周	67.3±8.32	65.4±7.66	63.6±6.54
产后一周	67.8±6.42	66.9±6.54	65.2±5.62

表14: γ 干扰素的含量 (ng/ml)

Table 14: Results of interferons γ levels (ng / ml)

	实验1组	实验2组	对照组
饲喂前	142.2±24.51	145.3±25.61	143.2±26.83
产前二周	151.2±18.66	153.0±22.13	146.5±28.52
产前一周	153.9±25.48	154.5±31.36	150.4±18.22
产后一周	158.1±16.23	159.6±22.54	151.6±15.11

表15: 白细胞间介素-1的含量 (pg/ml)

Table15: Results of Interleukin-1 levels (pg / ml)

	实验1组	实验2组	对照组
饲喂前	806.1±172	812.6±166	759.2±184
产前二周	682.9±162	753.5±206	815.6±162
产前一周	463.2±157	549.2±186	895.5±214
产后一周	406.4±240	520.5±226	874.6±197

表16: 白细胞间介素-2的含量 (pg/ml)

Table16: Results of Interleukin-2 levels (pg / ml)

	实验1组	实验2组	对照组
饲喂前	585.5±98	561.2±114	599.2±140
产前二周	308.2±65	335.4±106	496.6±160
产前一周	226.8±84	261.2±87	463.5±154

产后一周	187.2±102	206.2±85	387.2±134
------	-----------	----------	-----------

表17: 白细胞间介素-6的含量 (pg/ml)

Table17: Results of Interleukin-6 levels (pg / ml)

	实验1组	实验2组	对照组
饲喂前	612±125	591±114	614±185
产前二周	563±164	557±154	590±181
产前一周	502±106	494±95	565±151
产后一周	420±118	406±106	522±160

2.3 分娩后奶牛产奶量的统计结果

由表（18）可知以拌料方式连续饲喂自制乳酸菌制剂，一周平均产奶量高于对照组 2kg。实验组整体产奶量优于对照组。

表18: 奶牛分娩后产奶量的情况 (kg/d)

Table18: Results of milk yield of situation (kg / d) cows after delivery

	实验组	对照组
第一周	20.86±3.57	18.88±2.31
第二周	26.53±4.06	22.38±2.68
第三周	28.31±3.12	25.93±3.56

3 讨论

由于围产期奶牛处于高应激状态，能量负平衡，致使机体免疫力下降使得这一时期成为酮病、产后瘫痪、子宫炎等围产期疾病的高发时期体内钙磷水平低下，补充电解质、益生菌、EM能维持微生态平衡减少应激，纠正负平衡，减少产科、营养代谢病。实验结果如下：

3.1 一般认为血液中的钙含量低于2.2mmol/L是称为低血钙，研究表明在产前7天时低血钙的发生率为45%，生产时为80%，产后逐渐下降。测得对照组在产前一

周时低血钙的发生率为31%，产前达到最高46.1%；实验组产前低血钙的发生率为16.6%，实验组明显低于对照组。

3.2 围产期奶牛分娩后产生初乳，初乳是指奶牛分娩后7d内特别是3d内所分泌的乳汁，新鲜初乳色泽黄而浓稠、酸度高、具有特殊的乳腥味和苦味。其蛋白质、脂肪、无机盐的含量均显著高于常乳，而乳糖含量较之常乳低。初乳中不仅含有丰富的营养物质，而且还含有大量的生物活性物质。研究表明，初乳不仅可提供幼畜生长发育所必需的营养成分，而且还具有免疫功能和改善胃肠道、提高生产性能等作用。本实验测得实验组分娩24h平均产奶量为16.55，对照组分娩24h平均产奶量为15.42kg；实验组高于对照组1.13kg，一周平均产奶量高于对照组2kg。

3.3 CD4和CD8分别出现在不同功能亚群的T细胞表面，在同一T细胞表面中只表达其中一种，因此T细胞可分化成俩大亚群，CD4+的T细胞和CD8+的T细胞主要表现为抗感染作用，抗肿瘤效应。本实验表明实验组中CD4+和CD8+的含量均表现出上调作用，且明显高于对照组，说明T细胞被激活，使巨噬细胞被吸引、聚集、激活，增强了对慢性细菌感染（如布氏杆菌、结核杆菌等）、病毒性感染及寄生虫病的防御力。

3.4 IFN- γ 主要是由抗原和丝裂原刺激的CD4+和CD8+T细胞产生，其次是NK细胞，IFN- γ 具有很强的免疫调节作用，包括激活巨噬细胞以增强其吞噬功能和杀伤肿瘤能力，抑制病毒增殖，对体液免疫和细胞免疫都有很强的调节作用，即高浓度时抑制，低浓度时增强。本实验表明对照组与实验组INF- γ 的含量都在持续增长，但实验组增长明显高于对照组，机体对病毒的抵抗能力在增强。

3.5 IL-1和IL6是一种多效性促炎症细胞因子，在机体防疫机制中起重要作用。在正常生理状态下血清中IL-1和IL-6的含量较低，但在炎症、创伤等病理情况下，血清中IL-6的含量会显著升高。本实验结果表明实验组出现了下调作用，且含量明显低于对照组，说明自制乳酸菌制剂抑制了炎性因子的生长。

3.6 IL-2 T细胞生长因子(TCGF)主要是由T辅助细胞在抗原刺激或活化的CD4+T细胞和CD8+T细胞产生的具有广泛生物活性的细胞因子。是所有T细胞亚群的生长因子，并可促进活化B细胞增殖，故为调控免疫应答的重要因子，也参与抗体反应、造血和肿瘤监视。在正常情况下含量较低。实验结果为对照组中IL-2的含量明显高于实验组，是否由于使用自制乳酸菌制剂后出现下调作用，其原因与机理尚不清楚，有待进一步的研究。

通过使用乳酸菌和及酵母培养物在围产期奶牛的保健得出，能促进钙、无机磷等大量元素的吸收，提高营养物质的吸收，提高奶牛的初乳量及产奶量，刺激单核巨噬细胞，提高免疫力。大量研究表明，在奶牛日粮中添加微生态制剂可以缓解热应激性，提高奶牛的产奶量和乳品质水平。Bath等发现，乳酸菌发酵过程中能产生大量乳酸、乙酸能提高奶牛的泌乳量，尤其是对提高乳脂率效果明显；周联高等(2008)用酵母培养物替代奶牛日粮中等量精料，结果显示试验组30d后乳脂率、乳蛋白率、分别比对照组提高了0.61%和0.66%；邵伟等(2010)也研究证实

微生态制剂可以减缓产奶量的下降趋势。本实验测得实验组分娩24h平均产奶量为16.55，对照组分娩24h平均产奶量为15.42kg；实验组高于对照组1.13kg，一周平均产奶量高于对照组2kg，与本研究结果一致，说明饲喂乳酸菌和酵母培养物能提高奶牛的初乳量及产奶量，刺激单核巨噬细胞，提高免疫力。

试验四：乳酸菌和酵母培养物对犊牛保健的应用研究

摘要：自制乳酸菌与商品酵母活菌制剂，用于新生犊牛保健，对犊牛的增重、腹泻进行了监测，并在不同时间段采集犊牛血清，进行血清检测钙、无机磷、CD4+、CD8+、IFN- γ IL-1、IL-2 和 IL-6。从 10 天到 15 天时，犊牛增重速度开始加快，在饲喂结束时，虽然两组犊牛体重没有表现出显著性差异，但试验组整体生长情况要优于对照组，平均体重高于对照组 2.0kg。实验组与对照组的犊牛均发生了腹泻，但实验组的犊牛腹泻发生率低于对照组 6.0%，差异显著。血清中 CD4+、CD8+和 IFN- γ 明显高于对照组，但 IL-1、IL-2 和 IL-6 均低于对照组，结果表

明自制乳酸菌制剂具有免疫调节作用。

关键词：乳酸菌；犊牛；增重；细胞因子

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和药品

试验菌株均分离自牛瘤胃液中，经实验室鉴定为乳酸菌，筛选后编号 L1（嗜酸乳杆菌）和 L2（发酵乳杆菌）制为合剂活菌数为 10^{10} CFU/ml 4℃ 保存；对照菌株（嗜酸乳杆菌）购自台湾亚芯公司活菌数为 10^{10} CFU/g 4℃ 保存；酵母粉购自湖北宜昌市安琪酵母股份有限公司酵母活菌数为 2×10^{11} CFU/g。亚硒酸钠 VE 由西部牧业股份有限公司良种繁育场提供。

1.1.2 试剂

钙测定试剂盒、无机磷测定试剂盒和碱性磷酸酶测试盒均购自南京建成生物工程研究所；奶牛免疫细胞表面抗原分子白介素-I、白介素-II、白介素-VI、干扰素- γ 、CD4+和 CD8+均购自上海蓝基生物科技有限公司。

1.1.3 主要仪器

Power Wave XS2 连续波长酶标仪；37℃温箱；4℃冰箱。

1.1.4 试验新生犊牛

围产期健康奶牛所产犊牛，由新疆西部牧业股份有限公司良种繁育场提供。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组

新生犊牛 50 头，随机分 3 组，其中对照组 10 头新生犊牛在基础日粮无添加为对照组，其余为实验组。实验 1 组 20 头新生犊牛在基础日粮中添加 L1、L2、酵母粉和亚硒酸钠 VE 肌注 2 次，实验 2 组 20 头新生犊牛在基础日粮中只添加对照菌、酵母粉和亚硒酸钠 VE 肌注 2 次。基础日粮为当日牛乳。

1.2.3 实验日粮及其饲养管理

犊牛日粮组成见（表 19）实验组与对照组在饲养管理方式上保持不变，乳酸菌酵母粉使用方法直接融于牛乳中饲喂。每天一次早上饲喂，饲草饲料由专职人员饲喂，饲养方式、管理模式及环境条件一致。亚硒酸钠 VE 肌注 5ml/头，休药期为 20 天。

表19: 犊牛日粮组成 (mmol/L)

Table19: Results of Calf diet composition (mmol / L)

	样本(头)	乳酸菌	酵母粉(g)	亚硒酸钠VE(ml)	基础日粮	饲喂时间(天)
实验1组	20	3ml	3	5	相同	42
实验2组	20	3g	3	5	相同	42
对照组	10	0	0	0	相同	42

1.2.4 实验饲养周期

实验自出生第1天到犊牛6周，共计42天。

1.2.5 实验数据的采集

四组新生犊牛于饲喂第1天、饲喂第5天、第15天和第25天采取血样，所有血样均为尾静脉采集。分离血清后用于测定血液中的Ca和P（实验步骤参照南京建成生物工程研究所所产钙测定试剂盒、无机磷测定试剂盒的说明书）以及免疫细胞表面抗原分子白介素-I、白介素-II、白介素-VI、干扰素- γ 、CD4+和CD8+（实验步骤参照上海蓝基生物科技有限公司所产奶牛免疫细胞表面抗原分子白介素-I、白介素-II、白介素-VI、干扰素- γ 、CD4+和CD8+ ELISA试剂盒操作手册）。实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示，应用SPSS18软件进行统计学分析。

1.2.6 测定指标及方法

(1) 生长性能指标体重：正式试验期为30天，分别在第1天、第10天、第20天、第30天，测量其胸围、体斜长和高度。体重=胸围²(m)×体斜长(m)×系数98.7

(2) 腹泻指数测定（试验开始后，记录腹泻个体和持续时间，最后以每组犊牛发生腹泻的头日数除以总饲养头日数计算出腹泻率。）腹泻率100%=腹泻头数/总数

2 结果

2.1 血液中钙含量的测定结果

血液中的钙对营养物质的吸收有直接作用，新生犊牛处于骨骼发育期，需要大量的应用物质，添加乳酸菌对血液中钙含量的测定见（表20）一般认为血液中的钙含量低于2.2mmol/L是称为低血钙，其中围产期对照组所出生的犊牛发生低血钙为60%；围产期实验1组所出生的犊牛发生低血钙为13.3%；围产期实验2组所出生的犊牛发生低血钙为6%；围产期实验3组所出生的犊牛发生低血钙为10%。

表20: 血液中钙含量测定结果 (mmol/L)

Table 20: Results of Calcium in the blood assay results (mmol/L)

	实验1组	实验2组	对照组
--	------	------	-----

出生	2.92±0.51	2.51±0.68	2.03±0.42
五日龄	3.56±0.42	3.12±0.52	2.26±0.52
十五日龄	3.85±0.52	3.68±0.36	3.04±0.41
二十五日龄	4.11±0.23	4.02±0.84	3.55±0.85

2.2 血液中无机磷含量的测定结果

犊牛血液中无机磷含量（表21），可明显看出在出生时血液中无机磷含量较少，添加后持续增长，对照组血液中无机磷含量高于血钙含量，实验组基本能与钙含量保持在1:1，保持微平衡。

表21：血液中无机磷含量测定结果（mmol/L）

Table 21: Results of Inorganic phosphorus in the blood assay results (mmol / L)

	实验1组	实验2组	对照组
出生	3.12±0.21	2.43±0.62	2.33±0.42
五日龄	3.74±0.33	2.94±0.72	3.08±0.52
十五日龄	4.01±0.46	3.58±0.52	3.64±0.41
二十五日龄	4.23±0.73	4.12±0.64	4.35±0.85

2.3 血液中细胞因子的测定结果

本实验测得血液中细胞因子含量（表 22—27），结果表明实验 1 组与实验 2 组存在差异但差异不显著，实验 1 组与对照组存在显著差异，实验 1 组 CD4+、CD8+及干扰素 γ 的增加量要高于对照组，白细胞介素 IL-1、IL-2 及 IL-6 的含量实验 1 组趋于下调，低于对照组。

表22：免疫细胞表面抗原分子CD4+的含量（ng/ml）

Table 22: Results of Surface antigen of CD4 + molecule content of immune cells(ng / ml)

	实验1组	实验2组	对照组
--	------	------	-----

出生	0.43±0.04	0.41±0.06	0.38±0.06
五日龄	0.45±0.05	0.43±0.02	0.36±0.07
十五日龄	0.48±0.02	0.45±0.07	0.35±0.12
二十五日龄	0.53±0.06	0.48±0.05	0.38±0.45

表23: 免疫细胞表面抗原分子CD8+的含量 (ng/ml)

Table 23: Results of Surface antigen of CD8 + molecule content of immune cells(ng / ml)

	实验1组	实验2组	对照组
出生	61.2±4.06	62.4±6.51	61.4±7.82
五日龄	65.4±4.63	63.2±6.85	62.1±8.52
十日龄	67.3±8.32	65.4±7.66	63.6±7.54
十五日龄	71.8±6.51	68.6±6.54	65.2±9.22

表24: γ 干扰素的含量 (ng/ml)

Table 24: Results of interferonsy levels (ng / ml)

	实验1组	实验2组	对照组
出生	142.2±22.51	141.3±25.61	140.2±26.83
五日龄	158.2±19.53	153.0±24.13	146.5±41.52
十日龄	160.9±25.23	157.5±33.36	150.4±26.22
十五日龄	164.1±16.83	162.6±22.54	154.6±20.11

表25: 白细胞间介素-1的含量 (pg/ml)

Table 25: Results of Interleukin-1 levels (pg / ml)

	实验1组	实验2组	对照组
出生	886.1±159	934.6±208	941.2±220
五日龄	752.9±182	787.5±196	900.6±265

十日龄	522.2±227	568.2±286	884.5±304
十五日龄	456.4±235	573.5±226	865.6±254

表26: 白细胞间介素-2的含量 (pg/ml)

Table26: Results of Interleukin-2 levels (pg / ml)

	实验1组	实验2组	对照组
出生	585.5±122	561.2±105	623.2±123
五日龄	465.2±108	489.4±159	620.6±159
十日龄	368.8±162	406.2±168	596.5±111
十五日龄	289.2±162	342.2±185	523.2±183

表27: 白细胞间介素-6的含量 (pg/ml)

Table27: Results of Results of Interleukin-6 levels (pg / ml)

	实验1组	实验2组	对照组
出生	642±144	691±108	722±165
五日龄	563±159	557±158	682±173
十日龄	522±186	564±121	621±123
十五日龄	420±108	506±156	602±186

2.4 犊牛增重的测定结果

由(表 28)可以看出,以饮奶方式连续饲喂乳酸菌,从犊牛出生到饲养 30 天结束,各时间段试验组与对照组犊牛体重均差异不显著。第 10 天两组犊牛体重与出生时相差不大,增重不明显,这段时间处于饲喂初乳和常乳过渡阶段。从 10 天到 15 天时,犊牛增重速度开始加快,在饲喂结束时,虽然最终体重仍没有表现出显著的差异,但试验组整体生长情况优于对照组,两者平均体重相差 2kg (图 6)。

表28: 犊牛在不同日龄增重的情况

Table28: Results of The situation Calf weight gain of different ages

	实验组	对照组
出生	38.6±1.77	37.8±1.31

五日龄	40.0±1.66	38.3±1.86
十日龄	43.2±1.46	41.6±2.48
十五日龄	47.6±1.96	46.5±2.95

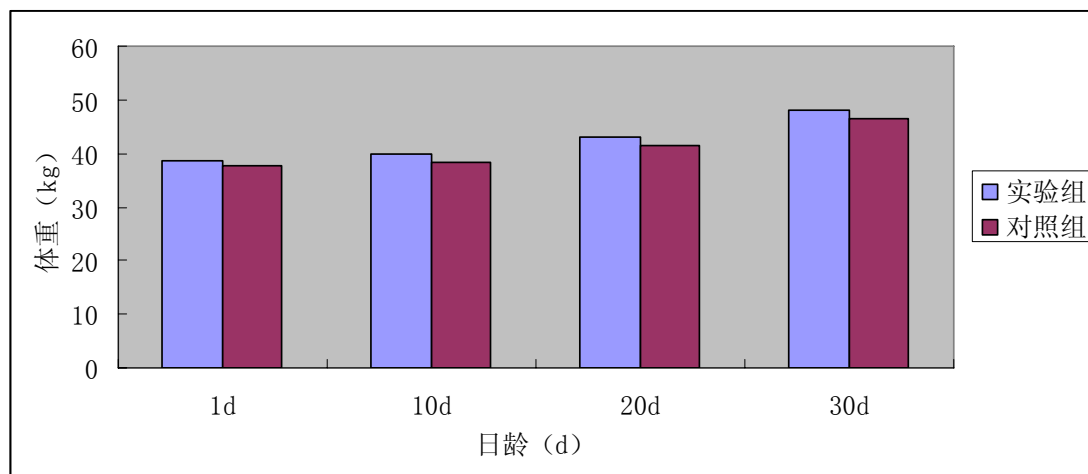


图 6: 犊牛在不同日龄增重的情况

Figure 6: The situation Calf weight gain of different ages

2.5 犊牛腹泻的统计结果

由(表 29)可以看出实验组与对照组均发生了腹泻,但腹泻程度有一定差别,在 1-10 天时实验组与对照组腹泻发生差别较大,高出实验组 6.0%,差异显著。其它时间段两组犊牛腹泻水平相接近。试验全期,对照组腹泻率高于试验组。

表29: 犊牛在不同日龄腹泻的情况

Table29: Results of The situation Calf diarrhea in different age

	实验组	对照组
1-10日龄	2.0 %	8.0 %
11-20日龄	4.0 %	4.0 %
21-30日龄	4.0 %	4.0 %

3 讨论

新生犊牛最先接触的微生物是来自乳汁及环境中的微生物，其中以大肠杆菌占多数，通过人工口服微生态制剂，有利于肠道正常优势菌群如乳酸菌的生长，以由于致病性大肠杆菌性腹泻及菌群失调，提高免疫力，和成活率。实验结果如下：

3.1 血液中的钙对营养物质的吸收有直接作用，新生犊牛处于骨骼发育期，需要大量的应用物质，一般认为血液中的钙含量低于 2.2mmol/L 是称为低血钙，其中围产期对照组所出生的犊牛发生低血钙为60%；围产期实验1组所出生的犊牛发生低血钙为6%；围产期实验2组所出生的犊牛发生低血钙为13.3%；说明在围产期时对围产期是对奶牛添加自制乳酸菌酵母粉合剂能减少犊牛低血钙的发生率。

3.3 CD4和CD8分别出现在不同功能亚群的T细胞表面，在同一T细胞表面中只表达其中一种，因此T细胞可分化成俩大亚群，CD4+的T细胞和CD8+的T细胞主要表现为抗感染作用，抗肿瘤效应。本实验表明实验组中CD4+和CD8+的含量均表现出上调作用，且明显高于对照组，说明T细胞被激活，使巨噬细胞被吸引、聚集、激活，增强了对慢性细菌感染（如布氏杆菌、结核杆菌等）、病毒性感染及寄生虫病的防御力。

3.4 IFN- γ 主要是由抗原和丝裂原刺激的CD4+和CD8+T细胞产生，其次是NK细胞，IFN- γ 具有很强的免疫调节作用，包括激活巨噬细胞以增强其吞噬功能和杀伤肿瘤能力，抑制病毒增殖，对体液免疫和细胞免疫都有很强的调节作用，即高浓度时抑制，低浓度时增强。本实验表明对照组与实验组INF- γ 的含量都在持续增长，但实验组增长明显高于对照组，机体对病毒的抵抗能力在增强。

3.5 IL-1和IL6是一种多效性促炎症细胞因子，在机体防疫机制中起重要作用。在正常生理状态下血清中IL-1和IL-6的含量较低，但在炎症、创伤等病理情况下，血清中IL-6的含量会显著升高。本实验结果表明实验组出现了下调作用，且含量明显低于对照组，说明自制乳酸菌制剂抑制了炎性因子的生长。

3.6 IL-2 T细胞生长因子(TCGF)主要是由T辅助细胞在抗原刺激或活化的CD4+T细胞和CD8+T细胞产生的具有广泛生物活性的细胞因子。是所有T细胞亚群的生长因子，并可促进活化B细胞增殖，故为调控免疫应答的重要因子，也参与抗体反应、造血和肿瘤监视。在正常情况下含量较低。实验结果为对照组中IL-2的含量明显高于实验组，是否由于使用自制乳酸菌制剂后出现下调作用，其原因与机理尚不清楚，有待进一步的研究。

3.7 实验组与对照组均发生了腹泻，但腹泻程度有一定差别，在1-10天时实验组与对照组腹泻发生差别较大，高出实验组6.0%，差异显著。试验全期，对照组腹泻率高于试验组。说明自制乳酸菌制剂能有效的抑制腹泻的发生。

国内外许多试验表明,乳酸菌作为单一制剂或复合制剂在反刍家畜生产中能够促进动物的生长,提高生产性能。王长文(1996)采用由植物乳杆菌、屎链球菌等研制的一种微生态制剂,于犊牛出生后立即口服,结果表明,活菌制剂对增进犊牛生长有显著提高。叶锋等(2004)研究证明,添加微生态制剂犊牛康能够提高犊牛的增重速率,有利于犊牛对营养物质的消化吸收, Bonaldi (1986)报道,将嗜酸乳杆菌单独或配合其他乳酸菌使用,对犊牛日增重有明显提高。生到断奶时的体重。郭本恒(2004)对国外 1978-1990 年间乳酸菌的应用效果进行了总结,数据表明饲喂乳酸菌有利于犊牛的增重,平均增重比例 4.6%。本试验结果显示,第10天对照组与试验组犊牛体重与出生时两组犊牛相差不大,增重不明显,是因为该时间段处于饲喂初乳和常乳过渡阶段,对犊牛产生应激从而影响了增重。从10天到15天时,犊牛增重速度开始加快,在饲喂结束时,虽然两组犊牛体重没有表现出显著性差异,但试验组整体生长情况要优于对照组,平均体重高于对照组 2.0kg。

在现代畜牧业养殖过程中,犊牛经常受到来自消化系统和呼吸系统疾病的侵袭。出生10天以内的犊牛往往由于大肠杆菌和其他致病性微生物的感染而导致腹泻的发生,有的甚至死亡。在犊牛生长阶段,胃肠道疾病的发生不仅减慢了犊牛的生长速度,还降低了平均日增重。王长文(1996)采用添加乳酸菌的微生态制剂饲喂犊牛,结果表明,对降低犊牛腹泻有显著的效果。Jonas(2009)研究表明,给犊牛饲喂屎链球菌显著地降低早期断奶犊牛腹泻的发生,腹泻率从65%降到了25%。王长文(2006)研究了含有乳酸菌的接续产酸型活菌制剂对犊牛小肠微绒毛的影响,认为益生菌有助于犊牛小肠微绒毛及细胞器的正常结构和功能在细胞水平上发挥作用,进而促进犊牛生长和减少下痢发生。通过试验和临床的实践证明,给予动物乳酸菌会显著的改善胃肠道内的生物区系(Johansson, 1993)。因此,在犊牛出生后添加乳酸菌是防治由大肠杆菌引起腹泻的一种重要途径。与本研究结果相似,本试验于犊牛出生后便饲喂乳酸菌和酵母培养物制剂,试验组的腹泻率低于对照组6%,说明饲喂乳酸菌确实改善了肠道环境,起到了调节作用,对腹泻的防治有一定效果。综合上述结果说明在犊牛饲养中添加乳酸菌和酵母培养物能使犊牛提前发育瘤胃,快速增重,提高免疫力,提高成活率,节约饲养成本。

结论

本研究通过对奶牛饲用乳酸菌的分离筛选，增菌扩大培养基的优化及分离株在围产期奶牛及新生犊牛中的初步应用观察，得出如下结论：

- 1) 乳酸菌分离菌株具有良好的益生性，生长速度快，且能在 25℃— 40℃ 之间良好生长呈兼性厌氧；具有很好的耐药性，对多数药物不敏感；能在 pH 为 3.0 和 0.3% 牛胆盐时良好生长；具有一定的抑菌作用，对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌圈分别为 18.3mm 和 16.4mm。是良好的微生态制剂候选菌株。
- 2) 分离株在自制的大麦芽培养基中生长良好。取大麦芽汁 500ml，水 500ml，胰蛋白胨 10g，酵母膏 7.5g，碳酸钙 3g；制成固体培养基涂布分离株，培养 24h 增菌为 3.5×10^8 CFU/mL，MRS 固体培养基 24h 增菌为 3.2×10^8 CFU/mL；在菌体浓度上能达到 MRS 培养基的 1.1 倍；在制作成本上明显低于 MRS 培养基。可作为分离株的大量增菌培养基。
- 3) 对围产期奶牛产前和产后 28 天连续拌料饲喂自制乳酸菌制剂 2ml/头，酵母活菌 2g/头，AD3、VE 合剂 2g/头，总产奶量比对照组高 2kg；血钙含量明显高于对照组；血清中 CD4⁺、CD8⁺ 和 IFN- γ 明显高于对照组，但 L-1、IL-2 和 IL-6 均低于对照组，结果表明自制乳酸菌制剂具有增加血钙及免疫调节作用。
- 4) 对犊牛自出生到第六周共 42 天连续拌乳饲喂自制乳酸制剂 3ml/头，酵母活菌 3g/头，亚硒酸钠 3ml/头，试验组整体生长情况要优于对照组，平均体重高于对照组 2.0kg；腹泻率明显低于对照组；血钙含量明显高于对照组；血清中 CD4⁺、CD8⁺ 和 IFN- γ 明显高于对照组，但 L-1、IL-2 和 IL-6 均低于对照组，结果表明自制乳酸菌制剂具有降低腹泻，增加血钙，增重及免疫调节作用。

创新点

本研究根据奶牛消化道微生态平衡理论，从正常优势菌群的生物学作用出发，自健康犊牛瘤胃液中筛选出 3 株具有生长快、耐酸耐胆盐、耐氧、耐药、具有抑制部分病原菌生长的饲用乳酸菌，其中 2 株表现出了良好的益生性，可作为奶牛用微生态活菌制剂的菌株，其菌株的生物学特性在国内同类研究中尚未报道。

参考文献:

- [1]顾方鸿. 2003. 浅易动物的微生态系统. 浙江畜牧兽医. (1) :9-10
- [2]姚尚旦. 1990. 家畜的微生物环境与疾病. 家畜生态. (4) : 26-30
- [3]孙志洪, 谭支良, 唐志如等. 2007. 动物微生态营养理论在生态畜牧业中的应用. 中国生态农业学报. 15(4) :195-199
- [4]丛佩清, 何昭阳, 刘清河等. 2001. 奶犊牛直肠主要正常菌群的检测及其定植规律. 中国微生物学杂志. 13(3) :140-142
- [5]Gilliland S E, Saley T E, Bush L J.1984.Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *Journal of Dairy Science*, 67:3045-3051
- [6]Hong H. A., L. H. Duc, S. M. Cutting. The use of bacterial spore formers as probiotics [J]. *FEMS microbiology reviews*, 2005, 29(4): 813-835.
- [7] Afric R. F. Probiotics in man and animals [J]. *Journal of Applied Microbiology*,1989, 66(5): 365-378.
- [8] Yoon I. K. Influence of direct-fed microbials on ruminal microbial fermentation and performance of ruminants [J]. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 1995, 8(3): 533-555.
- [9] Kung Jr L. Direct-fed microbials for dairy cows and enzymes for lactating dairy cows: New theories and applications, F, 2001 [C].
- [10]杨建军, 赵红霞. 2002. 乳酸菌及其在畜牧生产中的应用. 畜禽业. (8) : 36-37
- [11]张刚. 2007. 乳酸细菌——基础、技术和应用. 化学工业出版社. 北京. 110-111; 240
- [12]Rofe,R.D.2000.The role of Probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *Nutrition*.(130):396
- [13]张红艳, 岳淑宁, 张强等. 2008. 微生态制剂在饲料工业中的作用机理及研究现状. 畜牧与饲料科学. 29 (6) :141-143
- [14]唐晓丽. 2007. 猪源益生乳酸杆菌的筛选及在断奶仔猪生产中的应用. [硕士学位论文] [D]. 雅安: 四川农业大学
- [15]Gilland S.E,Nelson C.R , Maxwell.1985.Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol*, 49:377~38
- [16] Mulligan F. J., M. L. Doherty. Production diseases of the transition cow [J]. *The Veterinary Journal*, 2008, 176(1): 3-9.
- [17] Kelton D. F., K. D. Lissemore, R. E. Martin. Recommendations for recording and calculating the incidence of selected clinical diseases of dairy cattle [J]. *Journal of dairy science*, 1998, 81(9): 2502-2509.
- [18] Ingvarstsen K. L., R. J. Dewhurst, N. C. Friggens. On the relationship between lactational performance and health: is it yield or metabolic imbalance that cause production diseases in dairy cattle? A position paper [J]. *Livestock Production Science*, 2003, 83(2-3): 277-308.

- [19] Leblanc S. J. Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: A review [J]. *The Veterinary Journal*, 2008, 176(1): 102-114.
- [20] Houe H., S. Ostergaard, T. Thilsing-Hansen, et al. Milk fever and subclinical hypocalcaemia--an evaluation of parameters on incidence risk, diagnosis, risk factors and biological effects as input for a decision support system for disease control [J]. *Acta veterinaria Scandinavica*, 2001, 42(1): 1.
- [21] Curtis C. R., H. N. Erb, C. J. Sniffen, et al. Association of parturient hypocalcemia with eight periparturient disorders in Holstein cows [J]. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1983, 183(5): 559.
- [22] Leblanc S. J., K. E. Leslie, T. F. Duffield. Metabolic predictors of displaced abomasum in dairy cattle [J]. *Journal of dairy science*, 2005, 88(1): 159-170.
- [23] Buckley F., K. O'sullivan, J. F. Mee, et al. Relationships among milk yield, body condition, cow weight, and reproduction in spring-calved Holstein-Friesians [J]. *Journal of Dairy Science*, 2003, 86(7): 2308-2319.
- [24] Enemark J. The monitoring, prevention and treatment of sub-acute ruminal acidosis (SARA): A review [J]. *The Veterinary Journal*, 2008, 176(1): 32-43.
- [25] Dann H. M., D. E. Morin, G. A. Bollero, et al. Prepartum intake, postpartum dairy cows: The physiological causes, incidence and consequences [J]. *The Veterinary Journal*, 2008, 176(1): 21-31.
- [26] Grummer R. R. Nutritional and management strategies for the prevention of fatty liver in dairy cattle [J]. *The Veterinary Journal*, 2008, 176(1): 10-20.
- [27] Kim I. H., G. H. Suh. Effect of the amount of body condition loss from the dry to near calving periods on the subsequent body condition change, occurrence of postpartum diseases, metabolic parameters and reproductive performance in Holstein dairy cows [J]. *Theriogenology*, 2003, 60(8): 1445-1456.
- [28] Ducusin R. J. T., Y. Uzuka, E. Satoh, et al. Effects of extracellular Ca²⁺ on phagocytosis and intracellular Ca²⁺ concentrations in polymorphonuclear leukocytes of postpartum dairy cows [J]. *Research in Veterinary Science*, 2003, 75(1): 27-32.
- [29] Degaris P. J., I. J. Lean. Milk fever in dairy cows: A review of pathophysiology and control principles [J]. *The veterinary journal*, 2008, 176(1): 58-69.
- [30] Roche J. R. The incidence and control of hypocalcaemia in pasture-based systems [J]. *Acta veterinaria Scandinavica Supplementum*, 2003, 97(141).
- [32] Lean I. J., P. J. Degaris, D. M. Mcneil, et al. Hypocalcemia in dairy cows: meta-analysis and dietary cation anion difference theory revisited [J]. *Journal of dairy science*, 2006, 89(2): 669-684.
- [32] Goff J. P. The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows [J]. *The Veterinary Journal*, 2008, 176(1): 50-57.

- [33] Bramley E., I. J. Lean, W. J. Fulkerson, et al. The definition of acidosis in dairy herds predominantly fed on pasture and concentrates [J]. *Journal of dairy science*, 2008, 91(1): 308-321.
- [34] O'grady L., M. L. Doherty, F. J. Mulligan. Subacute ruminal acidosis (SARA) in grazing Irish dairy cows [J]. *The Veterinary Journal*, 2008, 176(1): 44-49.
- [35] Enemark J. M. D., R. J. Jorgensen, P. S. Enemark. Rumen acidosis with special emphasis on diagnostic aspects of subclinical rumen acidosis: a review [J]. *Veterinarija ir zootechnika*, 2002, 20(42): 16-29.
- [36] Plaizier J. C., D. O. Krause, G. N. Gozho, et al. Subacute ruminal acidosis in Payne J. M., K. G. Hibbitt, B. F. Sansom. *Production disease in farm animals*, F, 1973 [C].
- [37] Kleen J. L., G. A. Hooijer, J. Rehage, et al. Subacute ruminal acidosis (SARA): a review [J]. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 2003, 50(8): 406-414.
- [38] Aschenbach J. R., G. Gabel. Effect and absorption of histamine in sheep rumen: significance of acidotic epithelial damage [J]. *Journal of animal science*, 2000, 78(2): 464-470.
- [39] Ohtsuka H., C. Watanabe, M. Kohiruimaki, et al. Comparison of two different nutritive conditions against the changes in peripheral blood mononuclear cells of periparturient dairy cows [J]. *The Journal of veterinary medical science/the Japanese Society of Veterinary Science*, 2006, 68(11): 1161.
- [40] Burton J. L., S. A. Madsen, L. C. Chang, et al. Gene expression signatures in neutrophils exposed to glucocorticoids: a new paradigm to help explain 'neutrophil dysfunction' in parturient dairy cows [J]. *Veterinary immunology and immunopathology*, 2005, 105(3): 197-219.
- [41] Spears J. W., W. P. Weiss. Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows [J]. *The Veterinary Journal*, 2008, 176(1): 70-76.
- [42] Villalobos-F J. A., C. Romero-R, M. R. Tarrago-C, et al. Supplementation with chromium picolinate reduces the incidence of placental retention in dairy cows [J]. *Canadian Journal of Animal Science*, 1997, 77(2): 329-330.
- [43] Scaletti R. W., D. S. Trammell, B. A. Smith, et al. Role of Dietary Copper in Enhancing Resistance to *Escherichia coli* Mastitis [J]. *Journal of dairy science*, 2003, 86(4): 1240-1249.
- [44] Weiss W. P., J. S. Hogan, D. A. Todhunter, et al. Effect of vitamin E supplementation in diets with a low concentration of selenium on mammary gland health of dairy cows [J]. *Journal of dairy science*, 1997, 80(8): 1728-1737.
- [45] Miller J. K., E. Brzezinska-Slebodzinska, F. C. Madsen. Oxidative stress, antioxidants, and animal function [J]. *Journal of Dairy Science*, 1993, 76(9): 2812-2823.
- [46] Andrieu S. Is there a role for organic trace element supplements in transition cow health? [J]. *The Veterinary Journal*, 2008, 176(1): 77-83.
- [47] Kehrl Jr M. E., B. J. Nonnecke, J. A. Roth. Alterations in bovine neutrophil function during

- the periparturient period [J]. *American journal of veterinary research*, 1989, 50(2): 207.
- [48] Kehrlı Jr M. E., B. J. Nonnecke, J. A. Roth. Alterations in bovine lymphocyte function during the periparturient period [J]. *American journal of veterinary research*, 1989, 50(2): 215.
- [49] Mallard B. A., J. C. Dekkers, M. J. Ireland, et al. Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health [J]. *Journal of Dairy Science*, 1998, 81(2): 585-595.
- [50] Goff J. P., R. L. Horst. Physiological Changes at Parturition and Their Relationship to Metabolic Disorders [J]. *Journal of Dairy Science*, 1997, 80(7):1260-1268.
- [51] Kehrlı Jr M. E., K. Kimura, J. P. Goff, et al. Immunological dysfunction in periparturient cows-what role does it play in postpartum infectious diseases, F,1999 [C].
- [52] Hammon D. S., I. M. Evjen, T. R. Dhiman, et al. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders [J]. *Veterinary immunology and immunopathology*, 2006, 113(1): 21-29.
- [53] Gunnink J. W. Pre-partum leucocytic activity and retained placenta [J]. *Veterinary Quarterly*, 1984, 6(2): 52-54.
- [54] Gilbert R. O., Y. T. Grohn, C. L. Guard, et al. Impaired post partum neutrophil function in cows which retain fetal membranes [J]. *Research in veterinary science*, 1993, 55(1): 15-19.
- [55] Cai T. Q., P. G. Weston, L. A. Lund, et al. Association between neutrophil functions and periparturient disorders in cows [J]. *American journal of veterinary research*, 1994, 55(7): 934.
- [56] Van Werven T., Y. H. Schukken, J. Lloyd, et al. The effects of duration of retained placenta on reproduction, milk production, postpartum disease and culling rate [J]. *Theriogenology*, 1992, 37(6): 1191-1203.
- [57] Laven R. A., A. R. Peters. Bovine retained placenta: aetiology, pathogenesis and [66] Kunz P. L., J. W. Blum, I. C. Hart, et al. Effects of different energy intakes before and after calving on food intake, performance and blood hormones and metabolites in dairy cows [J]. *Animal Production*, 1985, 40(02): 219-231.
- [58] Correa M. T., H. Erb, J. Scarlett. Path analysis for seven postpartum disorders of Holstein cows [J]. *Journal of dairy science*, 1993, 76(5): 1305-1312.
- [59] Joosten I., M. F. Sanders, E. J. Hensen. Involvement of major histocompatibility complex class I compatibility between dam and calf in the aetiology of bovine retained placenta [J]. *Animal genetics*, 1991, 22(6): 455-463.
- [60] Kimura K., J. P. Goff, M. E. Kehrlı, et al. Decreased neutrophil function as a cause of retained placenta in dairy cattle [J]. *Journal of dairy science*, 2002,85(3): 544-550.
- [61] Kimura K., T. A. Reinhardt, J. P. Goff. Parturition and Hypocalcemia Blunts Calcium Signals in Immune Cells of Dairy Cattle [J]. *Journal of dairy science*, 2006, 89(7): 2588-2595.
- [62] Miller H. V., P. B. Kimsey, J. W. Kendrick, et al. Endometritis of dairy cattle: diagnosis,

- treatment and fertility [J]. *Bovine Pract*, 1980, 15(13-23).
- [63] Bondurant R. H. Inflammation in the bovine female reproductive tract [J]. *Journal of Animal Science*, 1999, 77(suppl 2): 101-110.
- [64] Gilbert R. O., N. R. Santos, K. N. Galvao, et al. The relationship between postpartum uterine bacterial infection (BI) and subclinical endometritis (SE) [J]. *J Dairy Sci*, 2007, 90(Suppl 1): 469.
- [65] Bretzlaff K. Rationale for treatment of endometritis in the dairy cow [J]. *The Veterinary clinics of North America Food animal practice*, 1987, 3(3): 593.
- [66] Williams E. J., D. P. Fischer, D. E. Noakes, et al. The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow [J]. *Theriogenology*, 2007, 68(4): 549-559.
- [67] Huzzey J. M., D. M. Veira, D. M. Weary, et al. Prepartum behavior and dry matter intake identify dairy cows at risk for metritis [J]. *Journal of dairy science*, 2007, 90(7): 3220-3233.
- [68] Drillich M., H. J. Sabin, M. Sabin, et al. Comparison of two protocols for the treatment of retained fetal membranes in dairy cattle [J]. *Theriogenology*, 2003, 59(3): 951-960.
- [69] Sheldon I. M., M. Bushnell, J. Montgomery, et al. Minimum inhibitory concentrations of some antimicrobial drugs against bacteria causing uterine infections in cattle [J]. *Veterinary record*, 2004, 155(13): 383-387.
- [70] Drillich M., U. Reichert, M. Mahlstedt, et al. Comparison of two strategies for systemic antibiotic treatment of dairy cows with retained fetal membranes: preventive vs. selective treatment [J]. *Journal of dairy science*, 2006, 89(5): 1502-1508.
- [71] Leblanc S. J., T. F. Duffield, K. E. Leslie, et al. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows [J]. *Journal of Dairy Science*, 2002, 85(9): 2223-2236.
- [72] Kunz P. L., J. W. Blum, I. C. Hart, et al. Effects of different energy intakes before and after calving on food intake, performance and blood hormones and metabolites in dairy cows [J]. *Animal Production*, 1985, 40(2): 219-231.
- [73] Chew B. P., R. E. Erb, J. Fessler, et al. Effects of ovariectomy during pregnancy and of prematurely induced parturition on progesterone, estrogens, and calving traits [J]. *Journal of Dairy Science*, 1979, 62(4): 557-566.
- [74] Edgerton L. A., H. D. Hafs. Serum luteinizing hormone, prolactin, glucocorticoid, and progestin in dairy cows from calving to gestation [J]. *Journal of Dairy Science*, 1973, 56(4): 451-458.
- [75] Grummer R. R., P. C. Hoffman, M. L. Luck, et al. Effect of prepartum and postpartum dietary energy on growth and lactation of primiparous cows [J]. *Journal of dairy science*, 1995, 78(1): 172-180.
- [76] Grummer R. R., S. J. Bertics, D. W. Lacount, et al. Estrogen induction of fatty liver in dairy

- cattle [J]. Journal of dairy science, 1990, 73(6): 1537-1543.
- [77] Bertics S. J., R. R. Grummer, C. Cadorniga-Valino, et al. Effect of prepartum dry matter intake on liver triglyceride concentration and early lactation [J]. Journal of Dairy Science, 1992, 75(7): 1914-1922.
- [77] Vazquez-Anon M., S. Bertics, M. Luck, et al. Peripartum liver triglyceride and plasma metabolites in dairy cows [J]. Journal of dairy science, 1994, 77(6):1521-1528.
- [78] Bell A. W. Lipid metabolism in liver and selected tissues and in the whole body of ruminant animals [J]. Progress in lipid research, 1979, 18(3): 117.107
- [79] Kunz P. L., J. W. Blum, I. C. Hart, et al. Effects of different energy intakes before and after calving on food intake, performance and blood hormones and metabolites in dairy cows [J]. Animal Production, 1985, 40(02): 219-231.
- [80] Grummer R. R. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow [J]. Journal of Animal Science, 1995, 73(9): 2820-2833.
- [81] Heinrichs, A. J., and C. M. Jones, 2003. Feeding the newborn dairy calf. www. Cas.psu.edu
- [82] Davis, C. L. and J. H. Clark. 1981. Ruminant digestion and metabolism. Dev. Ind. Microbiol. 22:247-259
- [83] Fonty G, Gouet P h, Jouany P, et al. 1987. Establishment of the microflora and anaerobic fungi in the rumen of lambs .J. Gen. Microbiol., 133: 1835-1843
- [84] 冯仰廉. 2004. 反刍动物营养学. 北京: 科学出版社. 23-25, 88
- [85] Toullee, R., and P. Guilloteau. 1989. Research into the digestive Physiology of the milk-fed calf. In: Nutrition and digestive Physiology in monogastric farm animals, edited by J. Vanweerdon and J. Huisman. Wageningen, the Netherlands (Pudoc): 37-55
- [86] 何昭阳, 张林波, 张喜悦等. 2000. 复合产酸菌对犊牛正常菌群定植的影响及抗病效果研究. 吉林农业大学学报. 22(2): 80-82
- [87] 郭本恒. 2003. 益生菌. 北京: 化学工业出版社. 438-44
- [88] 肖建根. 2011. 影响益生菌制剂效果的因素研究. 中国畜牧杂志. 47(16)
- [89] 王英, 李文广, 周贞鉴, 等. 医学微生物实验室菌种的保存和保管 [J]. 海南医学院学报, 2006, 12(1): 57~58.
- [90] 王晓旭. 围产期奶牛瘤胃微生物区系的变化及微生态制剂的调控作用[D]. 长春: 吉林大学, 2012: 71~91.
- [91] 王晶. 雏鸡肠粘膜乳酸菌的筛选及其应用研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2009.
- [92] 刘文华, 任慧英, 邹玲, 等. 一株优良乳酸菌的分离鉴定与特性研究[J]. 中国畜牧兽医, (2008) 02-0152-03.
- [93] 李云岗, 田夫林. 猪源乳酸杆菌的分离及 API 系统快速鉴定[J]. 中国农业大学动物医学院, (2008) 01-0022-01.
- [94] 李维炯, 倪永珍, 黄宏坤. 微生态制剂在生态畜牧业中的应用 [J]. 中国农业大学学报, 2003, 8(增刊): 85~92.

- [95]吴惠芬,毛胜勇,朱伟云,等.猪源乳酸菌产乳酸及其抑菌特性研究[J].微生物学通报,(2005)01-0079-06.
- [96]张素辉,曹国文,徐登峰,等.仔猪粪便中乳酸菌的分离鉴定及其抑菌特性的研究[J].饲料工业,2007,28(14):31~33.
- [97]陆承平.兽医微生物学[M].4版.北京:中国农业出版社,2007.
- [98]钱存柔,黄仪秀.微生物学试验教程[M].北京:北京大学出版社,2008.
- [99]Bauer TM, Schwacha H, Steinbruckner R, et al.Small in testinal bacterial overgrowth in human cirrhosis is associated with systemic endotxemia[J].Am Gastroenterol,2002,97(9):2364~2370.
- [100]Khan A ,Dass C,Ramamurthy T,et al. Antibiotic resistance, virulence gene, and molecular profiles of Shiga toxin producing Escheri chiacolii so lates from diverse sources in calcutta [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(6): 2009~2015.
- [101]Rolfe,R.D.The role of Probiotic cultures in the control of gastrointestinal health.[J]. Nutrition.2000,(130):396
- [102]王长文,肖莉,马洪波.2006. 接续产酸型活菌制剂对犊牛小肠微绒毛结构的影响. 江苏农业科学. (4):100~102
- [103]王长文,杨连玉.1996. 三种不同的活菌制剂对奶犊牛防病促生长效果的观察. 吉林农业大学学报. 18(3):1~6
- [104]Jonas Jatkauskas, Vilma Vrotniakienė.2009. effect of a combined pre-and probiotics product on diarrhoea patterns and performance of early weaned calves ,VETERINARIJA IR ZOOTECHNIKA (Vet Med Zoot). T. 48 (70):17~23
- [105]Johansson M., Molin G., Jeppsson B., Nobaek S., Ahrne S. and Bengmark S.1993. Administration of different Lactobacillus strains in fermented oatmeal soup. In vivo colonization of human intestinal mucosa and effect on the indigenous flora. Appl. Environ. Microbiol. (59):15~20
- [106]郭奇苑.2010. 犊牛源乳酸菌的筛选及其应用效果研究[D]. 黑龙江:东北农业大学

作者简介

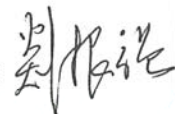
杨龙龙，男，生于 1988 年 11 月，籍贯新疆。2011 年毕业于塔里木大学动物科技学院动物医学专业，获农学学士学位。2012 年考入石河子大学动物科技学院攻读兽医硕士，主要从事动物动物营养与保健。

在学期间发表的文章

- 1 杨龙龙. 牛瘤胃乳酸菌的分离与筛选[J]. 中国畜牧兽医 2014. 9

石河子大学硕士研究生学位论文

导师评阅表

研究生姓名	杨龙龙	学制	2
专业	兽医硕士	研究方向	兽医技术与服务
<p>学术评语：</p> <p>本篇兽医硕士论文以奶牛消化道微生态平衡为理论原理，采用微生物学方法从奶牛瘤胃中分离抗性且易于扩大培养的乳酸菌，其特性符合微生态活菌制剂要求，具有一定的创新性。经活菌制剂对围产期奶牛及新生犊牛应用效果证明具有一定的生物学活性，和初步显示其应用价值。</p> <p>论文的研究内容，研究结果，学术与应用价值，文献综述与写作质量已达到了兽医硕士论文要求与水平。通过培养规划设计与实验实践能力上有显著提高，达到了预期培养目标。</p> <p style="text-align: right;">指导教师签字： </p> <p style="text-align: right;">2014年5月30日</p>			

