

谷氨酰胺和 *L*-肉碱对低温下肉羊瘤胃纤维分解菌的影响

李士泽 高福久 杨玉英 姜宁 赵雅楠 李玉恒 杨焕民 计红

(黑龙江八一农垦大学动物科技学院, 大庆 163319)

摘要: 本试验研究了饲料中添加谷氨酰胺和 *L*-肉碱对低温下肉羊瘤胃纤维素分解菌的影响,旨在了解谷氨酰胺和 *L*-肉碱在减缓低温应激中的作用,为生产实践中应用抗应激剂提供理论依据和参考。试验选用9只健康东北细毛羊×德国肉用美利奴杂交肉羊,采用 $L_0(3^4)$ 正交试验设计,设3个谷氨酰胺水平(0、0.6%、1.2%)与3个 *L*-肉碱水平(0、75、150 mg/kg)。试验羊在低于正常饲养温度(由10℃降至0℃)条件下,饲喂添加不同水平谷氨酰胺和 *L*-肉碱的饲料。结果表明,谷氨酰胺有降低瘤胃白色瘤胃球菌相对含量的趋势($P>0.05$),*L*-肉碱能显著降低瘤胃白色瘤胃球菌的相对含量($P<0.05$),二者复合使用有缓解瘤胃白色瘤胃球菌相对含量下降的趋势;谷氨酰胺能显著提高瘤胃黄化瘤胃球菌相对含量($P<0.05$),*L*-肉碱有提高瘤胃黄化瘤胃球菌相对含量的趋势($P>0.05$),二者复合使用能进一步提高瘤胃黄化瘤胃球菌的相对含量($P>0.05$);谷氨酰胺和 *L*-肉碱有降低瘤胃产琥珀酸丝状杆菌相对含量的趋势($P>0.05$),但二者复合使用有缓解瘤胃产琥珀酸丝状杆菌相对含量下降的趋势。结果提示:谷氨酰胺和 *L*-肉碱在低温下复合使用能缓解瘤胃白色瘤胃球菌、产琥珀酸丝状杆菌相对含量的下降,提高瘤胃黄化瘤胃球菌相对含量。经比较分析,低温环境下肉羊饲料谷氨酰胺和 *L*-肉碱的添加量分别为1.2%和75 mg/kg时可有效改变瘤胃微生物菌群,提高机体抵抗冷应激的能力。

关键词: 低温;谷氨酰胺;*L*-肉碱;瘤胃纤维分解菌

中图分类号: S816.7;S826

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2011)03-0499-07

寒冷是北方高寒地区动物特别是新生动物的一种普遍的应激因素。寒冷应激可导致动物生长缓慢、抗病性差,严重者造成死亡,使畜牧业遭受巨大损失,成为制约北方畜牧业发展的重要因素之一。随着集约化养殖的快速发展,动物应激源也越来越多,目前的抗应激措施已远远满足不了实际生产需要,急需研究用于抗应激的新方法和新药物^[1]。应激对动物可造成多方面的影响,而且不同应激源对动物造成的影响也是不同的,因此,单一抗应激添加剂不可能完全或最大限度地消除或缓解应激带来的危害,将几种有效的抗冷应激添加剂按一定比例添加于饲料中,可能会更有效地防治冷应激^[2]。研究表明,谷氨酰胺和 *L*-肉碱都是具有多种功能的营

养添加剂,具有很多其他饲料添加剂所不具有的优点,而且它们均具有抗应激、抗疲劳、抗氧化等功能^[3-4]。

寒冷对动物能量代谢有明显影响。研究表明动物暴露于临界温度下限时,机体静止能量代谢率会上升,同时产热量也将增加。绵羊暴露于0℃下,其产热量比在20℃下增加2.14倍^[5]。动物进行急性冷暴露时,饲料能量将从维持生产性能转向产生大量的体能来维持体温恒定。目前,人们对谷氨酰胺和 *L*-肉碱对肉鸡在低温下的抗应激作用进行了研究^[6],但在反刍动物上的研究国内外尚未见报道。反刍动物能够有效地消化粗饲料,依靠的是瘤胃中的大量微生物,其中细菌在纤维分解过程中发挥了

收稿日期:2010-08-12

基金项目:大庆高新区创新基金项目(DQGX08YF038);2010年度黑龙江省高等学校科技创新团队建设计划项目

作者简介:李士泽(1966—),男,黑龙江绥化人,教授,博士,主要从事动物生理学与生物化学教学与科研。E-mail: lishize1@sina.com

重要的作用。白色瘤胃球菌、黄化瘤胃球菌和产琥珀酸丝状杆菌是被公认的瘤胃三大优势纤维分解菌,所以研究冷应激条件下谷氨酰胺和 L-肉碱对瘤胃内主要纤维分解菌的影响具有十分重要的意义^[7-8]。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

谷氨酰胺:购自黑龙江哈尔滨伊事达生物工程有限公司,日本进口分装,呈白色粉末,含量为 99.9%;L-肉碱:河南郑州福润德生物工程有限公司生产,食品级,纯度 99.9%。

1.2 试验动物与饲料

选择 9 只健康且安装永久性瘤胃瘘管的东北细毛羊×德国肉用美利奴的杂交肉羊[体重(32~35) kg],以营养需要配制玉米-豆粕-青干草型饲料为基础饲料,舍饲,自由饮水,每日喂料 2 次(06:00 和 18:00),先粗后精。基础饲料组成及营养水平见表 1。

表 1 基础饲料组成及营养水平(风干基础)

Table 1 Composition and nutrient levels of the basal diet (air-dry basis) %

项目 Items	含量 Content
原料 Ingredients	
青干草 Hay	65.00
玉米 Corn	17.40
麦麸 Wheat bran	4.00
豆粕 Soybean meal	11.00
尿素 Urea	0.80
食盐 NaCl	0.55
预混料 Premix ¹⁾	1.25
合计 Total	100.00
营养水平 Nutrient levels ²⁾	
消化能 DE/(MJ/kg)	10.36
粗蛋白质 CP/(g/d)	121.63
钙 Ca/(g/d)	3.47
磷 P/(g/d)	2.61
食盐 NaCl(g/d)	7.76
中性洗涤纤维 NDF	50.06
酸性洗涤纤维 ADF	28.56

¹⁾ 预混料为每千克饲料提供 Premix provides following per kilogram of the diet: VA 14 400 IU, VD 2 880 IU, VE 288 mg, Co 21 mg, Cu 40 mg, I 13 mg, Fe 668 mg, Mn 155 mg, Se 105 mg, Zn 382 mg, Ca 2.78 g, P 0.6 g。

²⁾ 消化能为计算值,其余为实测值。DE is a calculated value, and the other nutrients are measured values.

1.3 试验设计

采用 L₉(3⁴) 正交试验设计,设 3 个谷氨酰胺水平(0、0.6%、1.2%)与 3 个 L-肉碱水平(0、75、150 mg/kg),正交试验设计见表 2。9 只肉羊随机分成 3 组,每组 3 个重复,试验羊饲养温度由 10 ℃ 降至 0 ℃ 时,分别于冷处理 0、3、6、9 和 12 h 5 个时间点采集瘤胃液和血液,而且试验期间一直保持低温冷暴露。其中试验 1 为对照组,试验 2~9 为试验组,对照组饲喂基础饲料,不添加任何添加剂,其他各试验组分别按试验设计添加不同水平的谷氨酰胺和 L-肉碱,预试期 7 d,正试期 2 d,试验期间隔 10 d。

表 2 正交试验设计

Table 2 Orthogonal experimental design

试验 Experiment	谷氨酰胺 Glutamine/%	L-肉碱 L-carnitine/(mg/kg)
1	0	0
2	0.6	0
3	1.2	0
4	0	75
5	0	150
6	0.6	75
7	0.6	150
8	1.2	75
9	1.2	150

1.4 试验仪器

质粒小提试剂盒(TIANprep Mini Plasmid Kit) 购自北京天根有限公司,荧光定量试剂盒(SYBR[®] Rremix EX Tag[™]) 购自大连宝生生物公司,Line-Gene K 实时荧光 PCR 仪(杭州博日),PCR 仪(P×2 Thermal Cycler,美国),Gel Doc2000 紫外凝胶成像系统(美国 Bio-Rad)。

1.5 瘤胃微生物总 DNA 的提取

瘤胃微生物样品的采集:试验的各时间点采集瘤胃液和内容物 100 mL,然后将瘤胃液和内容物经 4 层纱布过滤后 -20 ℃ 保存,以上条件均在无菌条件下完成。

瘤胃微生物总 DNA 提取:方法同试剂盒。

DNA 的进一步纯化:将以上提取的 DNA,用普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒对 DNA 进一步纯化,然后用紫外分光光度计测定其浓度值以及 260 nm 和 280 nm 的 OD 比值(应在 1.9~2.0)。所纯化的 DNA 用于制作标准曲线。

1.6 引物的设计与合成

本试验所研究的白色瘤胃球菌、黄化瘤胃球菌

的引物参考 David 等^[9],产琥珀酸丝状杆菌的引物参考 Denman 等^[10],引物序列见表 3。

表 3 3 种纤维分解菌的引物序列
Table 3 Primer sequences of three cellulolytic bacteria

纤维分解菌 Cellulolytic bacteria	引物序列 Primer sequences	产物大小 Product size/bp
白色瘤胃球菌 <i>Ruminococcus albus</i>	F:5'-TGTTAACAGAGGGAAGCAAAGCA-3' R:5'-TGCAGCCTACAATCCGAACTAA-3'	58
黄化瘤胃球菌 <i>Ruminococcus flavefaciens</i>	F:5'-TGGCGGACGGGTGAGTAA-3' R:5'-TTACCATCCGTTTCCAGAAGCT-3'	71
产琥珀酸丝状杆菌 <i>Bacteroides succinogenes</i>	F:5'-GTTTCGGAATTACTGGGCGTAAA-3' R:5'-CGCCTGCCCTGAACTATC-3'	121

1.7 目的片段的扩增

白色瘤胃球菌、黄化瘤胃球菌和产琥珀酸丝状杆菌以瘤胃总 DNA 为模板进行 PCR 扩增,分别以各自特异性引物进行 PCR 反应。PCR 反应体系为 50 μL ,组成如下:10 \times 缓冲液(2.5 mmol/L,含 Mg^{2+})5 μL ,dNTP(2.5 mmol/L)4 μL ,上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL ,Ex Taq 酶(5 U/ μL)0.25 μL ,瘤胃微生物总 DNA 模板(10 ng/ μL)1 μL ,无菌双蒸去离子水 37.75 μL 。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,共 40 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,最后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保温。

1.8 重组标准质粒的制备

按照琼脂糖凝胶 DNA 片段回收纯化试剂盒说明对 PCR 产物进行纯化、回收。按照 pMD 18-T Vector 试验盒的说明书将纯化 PCR 产物与 pMD 18-T 载体连接,连接体系为 10 μL ,反应组成为 pMD 18-T Vector 1 μL 、纯化 PCR 产物 3 μL 、连接酶 5 μL 、灭菌双蒸去离子水 1 μL ,于 16 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h 后加入到 200 μL 感受态细胞(*E. coli*)中,热击转化后加入 1 mL 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的 LB 液体培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 180 r/min 振荡 1 h。按照质粒 DNA 提取试验盒的操作要求提取质粒 DNA,以原有 PCR 引物对质粒 DNA 进行扩增,根据扩增特异条带的大小鉴定重组子后进行测序鉴定,测序由上海博亚生物技术有限公司完成,根据测序结果在 GenBank 上利用 BLAST 进行序列的同源性分析。

1.9 标准曲线的制备

提取鉴定为阳性的重组质粒 DNA,用分光光度计测定其浓度,制得标准品,将标准品按 10 倍梯度

稀释成 $10^3 \sim 10^7$,用作模板在实时荧光定量 PCR 仪上进行扩增,建立反映质粒浓度与 C_t 值关系的定量标准曲线。

1.10 实时荧光定量 PCR

以 SYBR[®] Rremix EX Tag[™] 试剂建立 25 μL 反应体系,包括 SYBR Green I 荧光染料预混剂 12.5 μL ,上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μL ,质粒 DNA 模板 2 μL 和双蒸去离子水 9.5 μL 。反应条件 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s 并采集荧光信号,共 40 个循环。在荧光定量 PCR 过程中,为保证样品中目的基因相对含量的准确性,每种样品设 2 个重复。

1.11 试验统计与分析方法

所有试验结果经 SPSS 13.0 软件分析各组在冷暴露前与冷暴露后不同时间点的差异显著性, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

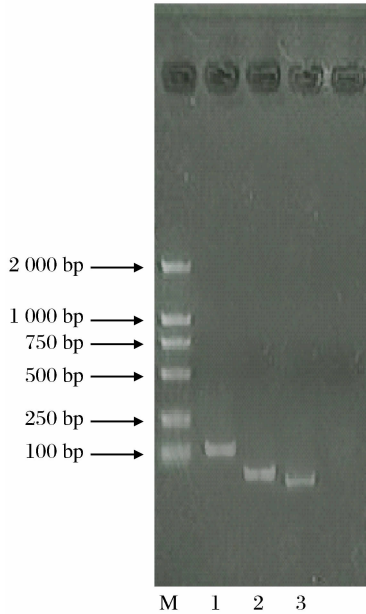
2.1 目标片段的扩增

3 种瘤胃细菌 PCR 扩增所获得的目的片段凝胶回收后的电泳图见图 1,产物大小与设计时一致,分别为 121、71、58 bp。

2.2 谷氨酰胺和 L-肉碱对冷暴露肉羊瘤胃内白色瘤胃球菌的影响

由表 4 可见,谷氨酰胺对冷暴露前后肉羊瘤胃内白色瘤胃球菌相对含量影响不显著($P > 0.05$);L-肉碱显著降低瘤胃白色瘤胃球菌相对含量($P < 0.05$),随冷暴露时间延长,瘤胃内白色瘤胃球菌相对含量呈先升高后降低趋势,其中 150 mg/kg L-

肉碱组在冷暴露9 h时比对照组降低了19.31%；谷氨酰胺和L-肉碱二者复合使用时瘤胃内白色瘤胃球菌相对含量趋于稳定,差异不显著($P>0.05$)。



M: DNA Marker DL2000; 1: 产琥珀酸丝状杆菌 *Bacteroides succinogenes*; 2: 黄化瘤胃球菌 *Ruminococcus flavefaciens*; 3: 白色瘤胃球菌 *Ruminococcus albus*。

图1 目的片段电泳图

Fig. 1 Electrophoretogram of objective fragments

2.3 谷氨酰胺和L-肉碱对冷暴露肉羊瘤胃内黄化瘤胃球菌的影响

由表5可见,谷氨酰胺能显著提高瘤胃内黄化瘤胃球菌相对含量($P<0.05$),随冷处理时间延长,瘤胃内黄化瘤胃球菌相对含量呈先下降后升高的趋势,其中0.6%谷氨酰胺组在冷暴露9 h时,瘤胃内黄化瘤胃球菌相对含量比对照组提高了7.45%;L-肉碱对瘤胃内黄化瘤胃球菌相对含量影响不显著($P>0.05$);谷氨酰胺和L-肉碱组复合使用时,随着冷暴露时间的延长,瘤胃黄化瘤胃球菌相对含量呈先下降后升高趋势($P>0.05$),其中1.2%谷氨酰胺、75 g/kg L-肉碱复合添加在冷暴露后9 h时,瘤胃内黄化瘤胃球菌相对含量比对照组提高了11.97%。

2.4 谷氨酰胺和L-肉碱对冷暴露肉羊瘤胃内产琥珀酸丝状杆菌的影响

由表6可见,谷氨酰胺对冷暴露前后肉羊瘤胃内产琥珀酸丝状杆菌相对含量的影响不显著($P>0.05$);随着冷暴露时间的延长,L-肉碱对瘤胃内产琥珀酸丝状杆菌相对含量的影响呈先升高后下降的趋势($P>0.05$),其中75 mg/kg L-肉碱在冷暴露后9 h时,瘤胃内产琥珀酸丝状杆菌相对含量比对照组降低12.91%;二者复合使用对瘤胃产琥珀酸丝状杆菌相对含量影响不显著($P>0.05$),呈先降低后趋于稳定的趋势。

表4 谷氨酰胺和L-肉碱对冷暴露肉羊瘤胃白色瘤胃球菌相对含量的影响

Table 4 Effects of glutamine and L-carnitine on relative content of *Ruminococcus albus* in rumen of sheep under low temperature

组别 Groups	时间 Time/h				
	0	3	6	9	12
1	8.35 ± 0.14	9.07 ± 0.17	8.89 ± 0.09	9.22 ± 0.14	8.95 ± 0.15
2	8.19 ± 0.24	8.58 ± 0.14	8.30 ± 0.16	7.58 ± 0.05	8.55 ± 0.11
3	8.21 ± 0.16	8.61 ± 0.05	7.47 ± 0.20	9.12 ± 0.21	7.61 ± 0.07
4	8.13 ± 0.08 ^{ab}	7.46 ± 0.16 ^b	8.52 ± 0.16 ^a	8.49 ± 0.05 ^a	8.41 ± 0.14 ^{ab}
5	8.03 ± 0.14 ^a	8.31 ± 0.11 ^a	8.42 ± 0.17 ^a	7.44 ± 0.15 ^b	8.37 ± 0.22 ^a
6	9.14 ± 0.21	8.30 ± 0.17	8.41 ± 0.12	8.44 ± 0.16	8.43 ± 0.10
7	8.68 ± 0.19	8.71 ± 0.09	8.20 ± 0.05	8.10 ± 0.04	8.15 ± 0.05
8	9.10 ± 0.24	8.92 ± 0.14	8.57 ± 0.06	8.66 ± 0.12	9.06 ± 0.14
9	9.01 ± 0.15	9.07 ± 0.15	7.81 ± 0.01	8.44 ± 0.16	8.83 ± 0.07

同行数据肩标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),相同或无字母表示差异不显著($P>0.05$)。下表同。

In the same row, values with different small letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$), while with the same letter or no letter superscripts mean no significant difference ($P>0.05$). The same as below.

表 5 谷氨酰胺和 L-肉碱对冷暴露肉羊瘤胃黄化瘤胃球菌相对含量的影响

Table 5 Effects of glutamine and L-carnitine on relative content of *Ruminococcus flavefaciens* in rumen of sheep under low temperature

组别 Groups	时间 Time/h				
	0	3	6	9	12
1	8.25 ± 0.08	7.77 ± 0.15	7.92 ± 0.05	8.19 ± 0.05	8.34 ± 0.16
2	8.42 ± 0.12 ^{ac}	8.07 ± 0.06 ^{ab}	7.76 ± 0.14 ^b	8.80 ± 0.21 ^c	8.26 ± 0.10 ^{ab}
3	8.40 ± 0.21 ^a	8.17 ± 0.16 ^a	7.85 ± 0.20 ^b	8.13 ± 0.14 ^a	8.36 ± 0.08 ^a
4	8.11 ± 0.04	8.40 ± 0.21	8.08 ± 0.11	7.89 ± 0.08	7.72 ± 0.15
5	8.09 ± 0.15	8.33 ± 0.16	9.21 ± 0.28	7.98 ± 0.14	8.02 ± 0.21
6	9.00 ± 0.18 ^b	7.97 ± 0.07 ^a	7.87 ± 0.04 ^a	8.15 ± 0.18 ^a	8.10 ± 0.05 ^a
7	8.66 ± 0.17	8.67 ± 0.15	8.31 ± 0.06	8.36 ± 0.16	8.69 ± 0.08
8	8.50 ± 0.21 ^a	8.24 ± 0.22 ^a	8.83 ± 0.24 ^{ab}	9.17 ± 0.24 ^{ab}	8.56 ± 0.14 ^a
9	8.98 ± 0.25 ^a	8.27 ± 0.08 ^{ab}	8.52 ± 0.16 ^{ab}	8.62 ± 0.11 ^{ab}	8.62 ± 0.19 ^{ab}

表 6 谷氨酰胺和 L-肉碱对冷处理肉羊瘤胃产琥珀酸丝状杆菌相对含量的影响

Table 6 Effects of glutamine and L-carnitine on relative content of *Bacteroides succinogenes* in rumen of sheep under low temperature

组别 Groups	时间 Time/h				
	0	3	6	9	12
1	7.85 ± 0.12	8.75 ± 0.26	8.82 ± 0.24	9.14 ± 0.24	8.86 ± 0.11
2	7.65 ± 0.21	7.88 ± 0.14	8.09 ± 0.10	8.86 ± 0.24	7.95 ± 0.16
3	8.38 ± 0.28	8.52 ± 0.27	8.53 ± 0.09	8.43 ± 0.14	8.52 ± 0.17
4	7.59 ± 0.08 ^{ab}	8.34 ± 0.26 ^a	8.21 ± 0.24 ^a	7.96 ± 0.04 ^{ab}	8.19 ± 0.14 ^a
5	7.88 ± 0.14	7.98 ± 0.18	8.32 ± 0.17	8.28 ± 0.07	8.24 ± 0.05
6	8.70 ± 0.27	8.32 ± 0.07	8.64 ± 0.11	8.86 ± 0.19	8.79 ± 0.21
7	9.47 ± 0.31	7.99 ± 0.15	8.28 ± 0.21	8.04 ± 0.24	9.14 ± 0.14
8	9.34 ± 0.26	8.59 ± 0.18	8.71 ± 0.14	8.64 ± 0.13	8.61 ± 0.24
9	9.43 ± 0.28	8.61 ± 0.26	8.43 ± 0.08	8.74 ± 0.07	9.27 ± 0.24

3 讨论

白色瘤胃球菌和黄化瘤胃球菌均能产生大量的纤维素酶和半纤维素酶,其中主要是木聚糖酶。黄化瘤胃球菌的很多菌株都可以降解十分坚固的纤维素种类,如棉花纤维^[11],而白色瘤胃球菌中的有些菌株不具有纤维降解活性^[12]。产琥珀酸丝状杆菌在瘤胃中普遍存在,只能以葡萄糖、纤维二糖、纤维素和果胶为碳源,具有很强的纤维降解能力,是瘤胃纤维分解菌的优势菌株之一,但不能降解木聚糖,其纯培养菌具有很强的降解结构性坚韧物质(如秸秆)的能力,能够降解一些黄化瘤胃球菌所不能降解的某些同质异晶体纤维素^[13]。

本试验研究谷氨酰胺和 L-肉碱对冷暴露肉羊瘤胃中 3 种主要纤维素分解菌数量的变化,探讨瘤胃发酵类型的变化。试验结果表明,虽然谷氨酰胺

对冷处理前后白色瘤胃球菌相对含量影响不显著,但有降低瘤胃白色瘤胃球菌相对含量的趋势;L-肉碱可以显著降低白色瘤胃球菌浓度,随冷处理时间的延长,瘤胃内白色瘤胃球菌相对含量呈先升高后降低的趋势;谷氨酰胺和 L-肉碱复合使用对绵羊瘤胃白色瘤胃球菌相对含量影响不显著,也有降低瘤胃白色瘤胃球菌相对含量的趋势,但随冷处理时间的延长,瘤胃内白色瘤胃球菌相对含量趋于稳定,其中饲料中添加 1.2% 谷氨酰胺、75 mg/kg L-肉碱瘤胃白色瘤胃球菌相对含量数值较高,可能说明此添加剂量有助于低温冷暴露下肉羊瘤胃白色瘤胃球菌的生长。

谷氨酰胺可以显著提高冷暴露后瘤胃内黄化瘤胃球菌相对含量,L-肉碱对瘤胃黄化瘤胃球菌相对含量影响不显著,但有提高黄化瘤胃球菌相对含量的趋势,谷氨酰胺和 L-肉碱复合使用有提高瘤

胃黄化瘤胃球菌相对含量的趋势,其中饲料中添加1.2%谷氨酰胺、75 mg/kg L-肉碱数值较高。本试验中白色瘤胃球菌和黄化瘤胃球菌相对含量的变化趋势正好相反,这可能是由于白色瘤胃球菌的减少减轻了其抑制黄化瘤胃球菌生长的作用,从而达到瘤胃内微生物的生态平衡。

谷氨酰胺对低温暴露下瘤胃产琥珀酸丝状杆菌相对含量影响不显著,但有降低瘤胃产琥珀酸丝状杆菌含量的趋势;L-肉碱有降低瘤胃产琥珀酸丝状杆菌相对含量的趋势,谷氨酰胺和L-肉碱复合使用对瘤胃产琥珀酸丝状杆菌相对含量影响不显著,随冷处理时间的延长,呈先下降后趋于稳定的趋势,数值与对照组相仿。

综合以上分析结果,饲料中单独添加谷氨酰胺或L-肉碱能够降低瘤胃白色瘤胃球菌、产琥珀酸丝状杆菌相对含量,提高瘤胃内黄化瘤胃球菌相对含量,而谷氨酰胺和L-肉碱复合使用时可以减少降低瘤胃白色瘤胃球菌、产琥珀酸丝状杆菌相对含量的作用,进一步提高瘤胃内黄化瘤胃球菌相对含量,从而使瘤胃分解纤维、半纤维和降解十分坚固纤维素的能力增强。在本试验条件下,环境温度由10℃降至0℃时,饲料中添加1.2%谷氨酰胺、75 mg/kg L-肉碱组对冷暴露肉羊具有较好的抗冷应激效果,从而得出本试验条件下谷氨酰胺和L-肉碱的饲料最适添加量分别为1.2%和75 mg/kg。

4 结 论

① 谷氨酰胺和L-肉碱在低温下复合使用能缓解瘤胃白色瘤胃球菌、产琥珀酸丝状杆菌相对含量的减少,提高瘤胃黄化瘤胃球菌的相对含量。

② 低温环境下肉羊饲料谷氨酰胺和L-肉碱的添加量分别为1.2%和75 mg/kg时,可有效改善瘤胃微生物菌群,以维持瘤胃产热平衡。

参考文献:

- [1] 韩永利,李秋风,李建国. 应激添加剂[J]. 中国动物保健,2002,10(5):13-14.
- [2] 陈赞谋,李加棋,黄佑谊. 不同抗应激添加剂对断奶仔猪的影响[J]. 养猪,2004,10(2):14-15.
- [3] 高镇川,姜云侠,张棋. 日粮添加谷氨酰胺对早期断奶仔猪抗氧化能力的影响[J]. 畜牧兽医学报,2002,33(2):104-105.
- [4] 张爱军,沈继红,吴海歌. L-肉碱的研究与应用现状[J]. 中国食品添加剂,2006,10(2):91-93.
- [5] 杨焕名,李士泽. 动物冷应激的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医,1999(3):42-44.
- [6] BUYSE J, JANSSENS G P, DECUYPERE E. The effects of dietary L-carnitine supplementation on the performance, organ weights and circulating hormone and metabolite concentrations of broiler chickens reared under a normal or low temperature schedule [J]. British Poultry Science, 2001, 42:230-241.
- [7] SMITH R J. Glutamine metabolism and its physiologic importance[J]. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition, 1999, 14(4):40-45.
- [8] EDER K, RAMANAU A, HULGER K. Effect of dietary L-carnitine supplementation on the performance of sows[J]. Lohmann Information, 2002, 16:26-27.
- [9] DAVID M S, PAUL J W. Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 75(1):165-174.
- [10] DENMAN S E, McSWEENEY C S. Quantitative (real-time) PCR [M]//MAKKAR H P S, McSWEENEY C S. Methods in gut microbial ecology for ruminants. Dordrecht: Springer, 2005:105-115.
- [11] STEWART C S, DUNCAN S H, FLINT H J. The properties of forms of *Ruminococcus flavefaciens* which differ in their ability to degrade cotton cellulose[J]. FEMS Microbiology Letters, 1990, 72:47-50.
- [12] MORRIS E J, COLE O J. Relationship between cellulolytic activity and adhesion to cellulose in *ruminococcus albus*[J]. Journal of General Microbiology, 1987, 133:1023-1032.
- [13] STEWART C S, PANIAGUA C, DINSDALE D, et al. Selective isolation and characteristics of *bacteroides succinogenes* from the rumen of a cow[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1981, 41:504-510.

Effects of Glutamine and L-carnitine on Ruminal Cellulolytic Bacteria of Sheep under Low Temperatures

LI Shize GAO Fujiu YANG Yuying JIANG Ning ZHAO Ya'nan

LI Yuheng YANG Huanmin JI Hong

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

Abstract: The study was conducted to explore the effects of dietary glutamine and L-carnitine supplementation on the alleviation of cold stress and ruminal cellulolytic bacteria of sheep, and also to provide theoretical evidence and useful reference for the application of anti-stress agent in practice. Nine healthy North East China Merino × German Mutton Merino sheep were selected and $L_9(3^4)$ orthogonal design was adopted which included three glutamine levels (0, 0.6%, 1.2%) and three L-carnitine levels (0, 75, 150 mg/kg) in this experiment. The sheep were bred under low ambient temperatures (from 10 °C to 0 °C), and fed different levels of glutamine and L-carnitine supplemental diets. The results were showed as follows: glutamine had a trend to decrease the relative content of *Ruminococcus albus* (RA) in rumen ($P > 0.05$), L-carnitine could significantly decrease the relative content of RA in rumen ($P < 0.05$), but glutamine combined with L-carnitine had a trend to relieve the RA decreasing; glutamine could significantly increase the relative content of *Ruminococcus flavefaciens* (RF) in rumen ($P < 0.05$), L-carnitine had a trend to increase the relative content of RF in rumen ($P > 0.05$), but glutamine combined with L-carnitine could further increase RF in rumen; glutamine and L-carnitine had a trend to decrease the relative content of *Bacteroides succinogenes* (BS) in rumen ($P > 0.05$), but glutamine combined with L-carnitine had a trend to relieve the BS decreasing. The results suggest that glutamine combined with L-carnitine can relieve the relative contents of RA and BS decreasing, and further increase RF in rumen of sheep under low temperatures. It is known from the results that sheep can get effective changes of the rumen microflora and the ability to resist cold stress when fed diets supplemented with 1.2% glutamine and 75 mg/kg L-carnitine. [Chinese Journal of Animal Nutrition, 2011, 23(3):499-505]

Key words: low temperatures; glutamine; L-carnitine; rumen cellulolytic bacteria