



动物饲料质量与 安全性评估

动物饲料质量与安全性评估

翻译 李树龙

审校 刘洪霞

中国农业出版社
联合国粮食及农业组织
2012·北京

图书在版编目 (CIP) 数据

动物饲料质量与安全性评估 / 联合国粮食及农业组织编; 李树龙译. —北京: 中国农业出版社, 2012. 12
ISBN 978-7-109-17430-6

I. ①动… II. ①联…②李… III. ①饲料-质量管理-安全评价 IV. ①S816

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2012) 第 281618 号

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)

(邮政编码 100125)

责任编辑 刘爱芳

北京市达利天成印刷装订有限责任公司印刷 新华书店北京发行所发行
2012 年 12 月第 1 版 2012 年 12 月北京第 1 次印刷

开本: 889mm×1194mm 1/32 印张: 5.375

字数: 150 千字

定价: 40.00 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

本出版物的原版系英文，即 *Assessing Quality and Safety of Animal Feeds*，由联合国粮食及农业组织于 2004 年联合出版。此中文翻译由中国农业科学院农业信息研究所安排并对翻译的准确性及质量负全部责任。如有出入，应以英文原版为准。

ISBN 978-92-5-505046-6（粮农组织）

ISBN 978-7-109-17430-6（中国农业出版社）

本信息产品中使用的名称和介绍的材料，并不意味着联合国粮食及农业组织（粮农组织）对任何国家、领地、城市、地区或其当局的法律或发展状态、或对其国界或边界的划分表示任何意见。提及具体的公司或厂商产品，无论是否含有专利，并不意味着这些公司或产品得到粮农组织的认可或推荐，优于未提及的其他类似公司或产品。本出版物中表达的观点系作者的观点，并不一定反映粮农组织的观点。

版权所有。粮农组织鼓励对本信息产品中的材料进行复制和传播。申请非商业性使用将获免费授权。为转售或包括教育在内的其他商业性用途而复制材料，均可产生费用。如需申请复制或传播粮农组织版权材料或征询有关权利和许可的所有其他事宜，请发送电子邮件至：copyright@fao.org，或致函粮农组织知识交流、研究及推广办公室出版政策及支持科科长：Chief, Publishing Policy and Support Branch, Office of Knowledge Exchange, Research and Extension, FAO, Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Rome, Italy。

© 粮农组织 2004 年（英文版）

© 粮农组织 2012 年（中文版）

联合国粮食及农业组织 (FAO) 中文出版计划丛书

译审委员会

主 任 屈四喜

副主任 童玉娥 王本利 孟宪学 罗 鸣

编 委 张蕙杰 宋会兵 赵立军 蔺惠芳

钱 钰 徐 猛 张 巍 傅永东

田 晓 刘爱芳 贾 焰 郑 君

前 言

饲料和牧草的组成成分不是一成不变的。饲料分析可以为农民提供一些使动物饲料养分得到最大化利用的相关信息，为饲料配料商能生产出适合不同动物生产体系的饲料混合物而提供一些信息；为研究人员能把动物生产性能与饲料特征关联起来而提供一些信息；以及为植物育种人员能使新品种的营养价值得到优化而提供一些信息。另外需要关注的是动物饲料中的不良污染物，这些都有可能直接影响到动物源食品的安全性。本书汇集了来自联合国粮农组织（FAO）电子杂志 AGRIPPA 上的与上述主题相关的六大综述，并出版发行。

由 Irene Mueller-Harvey 发表的这篇主题文章，主要讲述了当前饲料分析程序和提高标准的流程。作者就如何实现质量控制、质量保证、实

实验室认可以及能力验证这一系列问题进行了阐述。对一些标准的且广为人们接受的方法进行了介绍，同时也对饲料分析方面的一些最新进展进行了介绍。本文所涵盖的主题包括以下内容：样品准备；主要成分分析（干物质，灰分和矿物质，粗蛋白，脂肪，纤维和淀粉）和植物次级产物分析（单宁酸、霉菌毒素和其他污染物）。另外，本文阐述了利用近红外光谱技术分析整个样本的发展状况，同时还分析了该技术通过直接预测动物反应这种作用在传统的过瘤胃饲料分析中的潜力。

由于遗传差异，导致了饲料组成成分有所不同，进而也导致了饲料加工工艺有所不同。由 Gizzi 和 Givens 撰写的这篇文章认为：这些因素对于复合饲料生产商、农民以及政策制定者都是非常重要的。数据的多变性可能是由于获取信息的方法不同所致。化学分析程序和动物研究协定也会因所参与的实验室或研究所的不同而不同。了解饲料在化学和营养特性方面的差异，对于畜

牧业生产中的饲料信息的有效利用将是非常重要的。

由 Harinder Makkar 撰写的这篇文章，阐述了体外产气法在评价反刍动物饲料资源的营养价值方面的潜力。此项技术能够筛选出在瘤胃中具有高效微生物蛋白合成的饲料或者饲料组分，并且所筛选的这些饲料或饲料组分还具有较高的干物质消化率，同时也为最大化提高饲料效率的饲喂策略的发展提供了基础。另外，此项技术为研究各种天然和人工合成复合物质的功效以及研究这些复合物质对瘤胃发酵的负面或正面作用提供了一种实验工具。

Felix D'Mello 的研究涵盖了动物饲料的微生物学，这些动物饲料包括牧草、谷物、油料籽副产品以及复合饲料。他在文中指出，在牧草的青贮过程中，乳酸菌对于牧草发酵具有很好的促进作用。乳酸菌和酵母菌培养物具有一些有益特性，比如可以作为减少农场动物腹泻率并提高其生长性能的饲料益生素。动物饲料可能会被一些

有害细菌污染，比如沙门氏菌、李斯特菌以及大肠杆菌等。谷物和油料籽副产品经常被真菌以植物病原体形式污染，或者在储存过程中被污染。由于这些真菌的某些种和菌株会产生一些真菌毒素，所以就会对农场动物产生一些严重的不利影响。作者在文中对那些可以降低有害真菌流行的可行方法进行了探讨，同时也对那些可以控制这些饲料污染物（特别是真菌毒素）的管理条例进行了探讨。

再接下来的一篇文章中，D'Mello 博士对于那些由人为因素和自然因素所造成的多种污染物和毒素进行了综述。作者认为：重金属、放射性核物质、真菌毒素、植物毒素、抗生素、微生物病原体在谷物、全价饲料和牧草中的分布，会对农场的畜牧业生产力以及所得产品的安全性产生影响。另外，作者也对污染避免的方法以及控制与立法的区域性进行了考虑。

最后一篇文章由 Peter Hughes 和 John Heritage 一起撰写，文中对于目前出现的、围绕着

以抗生素作为食用动物生长促进剂的争论进行了探讨。当这些药物以低剂量形式用于动物饲料时，被认为可以提高动物产品的品质，使肉中的脂肪含量降低，蛋白质含量提高。与此同时，这些药物还有助于控制人畜共患病原体的污染，比如沙门氏菌、弯曲杆菌、大肠杆菌以及肠球菌。抗生素的使用（特别是低剂量）与病原菌的抗性选择有关。使用抗生素生长促进剂可能会导致细菌对临床或者兽医实践中所用的抗生素产生抗药性，进而影响抗菌化疗的继续使用。文章还对以抗生素作为生长促进剂的使用状况进行了综述，并考察了其他一些可提高肉类质量的替代方法。

出版本书的目的是为了就动物饲料对食品质量、食物安全 and 环境影响等问题提供一些最新信息，进而对那些日益被公众和个体消费者所密切关注的风险进行管理基础的改善。

相关的文章会陆续出版，也可以登录网站查阅相关信息，登录的网址是：<http://www.fao.org/agrippa/>。同行评议和编辑的文章

刊登在 AGRIPPA 系统上，读者可以即时查询。
涵盖的主题包括了畜牧生产、动物营养与饲养以及耕作制度。

Samuel Jutzi

司长

联合国粮农组织动物生产及卫生司

缩 略 语

ADF	酸性洗涤纤维
ATP	三磷酸腺苷
AAFCO	美国官方饲料管制协会
AOAC	官方农业化学家协会
BSE	疯牛病
CE	毛细管电泳
CF	粗纤维
CP	粗蛋白
CT	缩合单宁
CRM	有证参考物质
DAS	蛇形菌素
DDE	二氯二苯二氯乙烯
DDT	二氯二苯三氯乙烷
DM	干物质
DOM	有机物的消化率
DON	脱氧雪腐镰刀菌烯醇
E - As	酶联抗体
EE	醚提取物
ELISA	酶联免疫吸附法
EU	欧盟
FAPAS	食品分析能力评价体系
FDA	食品与药品管理局
GATT	关税和贸易总协定

GE	总能量
GMO	转基因生物
HPLC	高压液相色谱
HT	水解单宁
LAB	乳酸菌
MALDI - TOF MS	基质辅助激光解析电离飞行时间质谱
ME	代谢能
MIC	最低抑菌浓度
mMBM	哺乳动物的肉骨粉
MRSA	耐甲氧西林金黄色葡萄球菌
MS	质谱
NDF	中性洗涤纤维
NFE	无氮提取物
NIR	近红外光谱
NIV	雪腐镰刀菌烯醇
NOAH	国家动物卫生办公室
OM	有机物
OP	有机磷农药
OTA	赭曲毒素 A
PCBs	多氯联苯
PCR	聚合酶链反应
PDA	马铃薯葡萄糖琼脂
PEG	聚乙二醇
PTS	能力验证计划
SAC	苏格兰农学院
SCFA	短链脂肪酸
SMCO	S-甲基半胱氨酸亚砷
VAM	有效分析测定
VFA	挥发性脂肪酸

TLC	薄层色谱法
TSE	传染性海绵状脑病
vCJD	变异型克罗伊茨费尔特-雅各布病
VTEC	产 vero 毒素大肠杆菌
ZEN	玉米赤霉烯酮
WHO	世界卫生组织

目 录

前言	v
缩略语	xi
现代饲料分析技术	
——I. Mueller - Harvey	1
饲料成分的变化及其对畜牧业生产的影响	
——G. Gizzi 和 D. I. Givens	39
体外产气法评价饲料资源营养品质的最新研究进展	
——Harinder P. S. Makkar	54
动物饲料的微生物学	
——J. P. F. D'Mello	85
动物饲料中的污染物和毒素	
——J. P. F D'Mello	101
食用动物中的抗生素生长促进剂	
——Peter Hughes 和 John Heritage	123

现代饲料分析技术

I. Mueller-Harvey

英国雷丁大学 农学系

本综述介绍了饲料分析所采用的规程，重点介绍了快速分析法。对单一化学成分进行分析，比较容易标准化，而对一些营养上非常重要但定义又不太明确的物质，比如油、纤维以及淀粉，对这些物质进行标准化相对较难。实验室间比对结果具有很大的波动性，无法令人信服。因此，通过质量控制手段，饲料分析师可以通过协调共识，达成一个普遍接受的标准分析程序。然而不幸的是，目前针对动物饲料分析的有证参考物质（CRMs）和能力计划还很少见。对于那些亲营养物或者抗营养物的复杂混合物，比如鞣酸，其结构与功能的关系目前还没有得到很好阐明，因此，目前还没有特定分析方法推荐给植物育种人员。最后，“分析测量可追溯性”的概念现已被“饲料护照”的概念所替代，被解读为“饲料可追溯性”。饲料可追溯性对于下面所讲述的、牛饲料中的肉骨粉问题以及大豆新品种问题将变得越来越重要，因为它们可能引发疯牛病（BSE）风险和转基因生物（GMOs）纠纷。

1. 引言

大多数牧草以及副产物饲料的成分都是变化的。只有极少数物质组成成分是不变的，比如乳清粉，它通常不需要进行分析（Schingoethe, 1991）。饲料分析可以为以下人员提供一些相关信息：

- 可以就如何使动物饲料中的养分得到最大化利用这一问题为农民提供一些相关信息；
- 可以为饲料配料商能生产出适合不同动物生产体系的饲料混合物而提供一些相关信息；
- 可以为植物育种人员能使所培育新品种的营养价值得到优化而提供一些信息（Madsen 等，1997；Wrigley，1999）。

在过去的几年里，许多快速的分析测试方法被开发出来，这些分析测试方法在面对需要作出快速决定的时候，或者处理大样本的时候（比如货物入境、贸易状况、污染地点或者植物育种计划），是非常有用的。

本综述涵盖了推进质量保证和分析控制方面发展的主要议题。同时，实验室认证和有用地址的相关信息也一并列出。随后的章节阐述了广为大家所接受的标准分析方法，强调了需要特别关注的领域，同时也介绍了饲料分析的最新研究进展。本文涵盖的主题包括：样品制备，主要成分分析（干物质，灰分和矿物质，粗蛋白，脂肪，纤维和淀粉）和植物次级产物（单宁酸、霉菌毒素和其他污染物）分析。本文阐述了利用近红外光谱技术分析整个样本的发展状况，同时还分析了该技术通过直接预测动物反应这种作用在传统的过瘤胃饲料分析中的潜力。

涉及动物生产的饲料评价和日粮配方的一些基本信息，读者可以查阅以下书籍：Wiseman 和 Cole (1990)，Minson (1990)，AFRC (1993)，Fahey 等 (1994)，Givens 等 (2000a)。一些分析方法的详细方案可以在 MAFF (1986)，Watson (1994)，AOAC (1995) 以及相关网站中找到（附录 1）。

本综述仅简要介绍了几种与次级产物分析相关的色谱和质谱技术。这里将不包括利用新体外消化率技术、热解质谱技术、核磁共振技术或者其他分光镜技术进行全样本分析，因为这些技术在别处已有介绍（Mauricio 等，1999；Givens 等，2000a）。

2. 饲料分析中的质量控制、保证、认证以及能力测定

2.1 实验室间的偏差

自从 19 世纪“高科技农业”开始以来，对获取一些可比较的有用数据的方法进行统一，显得越发必要 (Midkiff, 1984)。不同的实验方法可能导致差异明显的结果，同时也容易造成监管混乱。1884 年，官方农业化学家协会 (AOAC) 召开了第一次会议，在此次会议上解决了肥料分析方面的问题，随后在 1886 年召开的会议上，饲料测定议题也被包含到会议议题中来。1896 年，AOAC 主席声明：协会多年的经验表明，食品和饲料的分析问题，是协会工作中所面临的最为困难的问题之一，这一点已经通过协会经历得到充分体现。由于大家都注意到了这样一个事实，即 AOAC 涉及面越来越广，所以 AOAC 于 1965 年将名字改为“官方分析化学家协会” (Midkiff, 1984)。

1985 年，一篇在食品实验室进行的铅 (Pb) 和镉 (Cd) 分析数据的质量报告显示，这些数据精确性很差，它们的有效性也受到质疑 (Patey, 1996)。各种各样的饲料分析数据也同样存在类似问题。这表明饲料分析在某种程度上滞后于食品分析。为了阐明这个问题的重要性，特别选择了几个例子进行了如下说明。

Bailey 和 Henderson 在 1990 年就认为，改进油和糖测定方法的需求是非常迫切的，因为这些方法在 15 个饲料实验室中的精确性都比较差。从商业角度上讲，这些数据具有非常重要的作用，因为在制定标签说明时以及在进行含能量评估时，都要用到它们。Lanari 等人于 1991 年将一项酿酒废糟、干甜菜渣、苜蓿以及干草的研究委托给了 20 个饲料分析实验室。结果显示，平均油含量（以醚提取物作为测定结果）的变异系数非常大，结果无法令人接受，油的平均含量为 3.5%（变异系数为 17.8）；木质素的平均含量为 5.4%（变异系数为 27.3）；中性洗涤纤维 (NDF) 的平均含量为 55.6%（变异系数为 7.4）。干物质

(DM)、粗蛋白 (CP)、粗纤维 (CF)、灰分、酸性洗涤纤维 (ADF) 以及总能 (GE) 的变异系数为 5% 或者更少。Beever 等人 1996 年向 10 个商业化饲料实验室提交了两份截然不同的玉米青贮料。他们的结论是：与饲料评估有关的几种分析结果，实验室间偏差很大，比如，有机物 (OM) 消化率、半体内瘤胃降解率、气体生产动力学、体外消化率、代谢能 (ME) 和总能量 (GE) 等。

体外和体内消化率测定结果表明：不同实验室间也出现了类似偏差。1994 年 Madsen 和 Hvelplund 向分布于 17 个国家的 23 个实验室派发了 5 份饲料样本进行分析，结果发现，当在牛或者羊的瘤胃内用尼龙袋法进行蛋白分解率测定时，不同实验室间的测定结果偏差太大，无法令人接受。但在同一个实验室内，数据偏差却在可接受的范围内。他们推断：样品制备与处理以及尼龙袋本身在实验室间也存在着相当大的差异，同时他们也对尼龙袋法的操作流程给出了一些详细建议。作者还建议：应该配制一种标准饲料，这样所有实验室都可以利用这样一种标准饲料进行分析程序的常规检验。3 个实验室间的 Tilley-Terry 小环实验结果表明：这是一种非常稳定的方法，可用于粗饲料有机物消化率的测定 (Madsen 等, 1997)。然而，此种方法在用于精饲料时却遇到了一些问题，这也彰显了仔细地进行标准化是非常必要的。毫无意外，饲料生产商目前已经转用一种酶分析法，所得结果预计会有更好的重复性 (Madsen 等, 1997)。

用于预测体内消化率的多种体外消化率测定技术之间差异很大 (例如瘤胃液技术与基于纤维素的技术之间) (De Boever 等, 1994; Aufrère 和 Michalet-Doreau, 1988)。显然，方法间的这类差异需要进行解决。

所有这些数据都支持像前言中的说法，即饲料分析是一件很困难的任务。严格按照方法的详细要求进行分析是非常必要的，特别是所用方法本身指定可以分析的那些成分，比如粗脂肪、中

性洗涤纤维、木质素，它们完全是凭经验得出的部分内容，从化学的角度上讲还没有明确定义（Bailey 和 Henderson, 1990）。1995 年，Zeeman 和 Bonn 也都建议，应该对淀粉有一个国际定义。然而，大的偏差可能会将分析方法所存在的问题突出出来，进而更应加强严密调查。比如，中性洗涤纤维值过高这个问题，很可能源于淀粉的不完全溶解。近年来，Thiex 等人（1996）调查结果显示：发现所报道的维生素 A 的测定结果偏差很大，美国官方饲料管制协会（AAFCO）开展了一项饲料校验样品计划，而这些维生素 A 的测定结果就是由它们记录的。在动物饲料及宠物饲料分析中，为减少维生素 A 的测定误差，他们也提出了多项建议。

2.2 质量保证计划的好处

通过对饲料粮不同分析方法的相关文献进行总结后发现，报告值的偏差是否是由于遗传因素、环境因素或者实验室间差异造成的，这点到目前还无法判定。因此，Petterson 等人 1999 年推荐使用质量保证计划、实验室间的评价计划以及参考物质。

世界卫生组织（WHO）的全球环境监测计划检测了多个能提供食品污染数据的欧盟实验室的能力（Weigert 等，1997）。这个全球环境监测计划涉及 5 种能力检测以及 21 个国家的 136 个实验室，这些实验室都采用了他们自认为是最好的分析方法对微量金属（奶粉中的 Pb、Cd 与 Hg）、农药（菠菜粉中的有机氯、有机磷和菊酯）、菠菜粉中的硝酸盐以及以坚果为基料的动物饲料中的黄曲霉毒素进行了分析。分析报告所给出的精确度分别为：微量金属为 60%，农药为 41%，硝酸盐为 43%，黄曲霉毒素为 88%，棒曲霉毒素为 53%（平均准确度为 68%）。

Key 等人（1997）总结了 1990—1996 年英国食品分析能力评估体系（FAPAS）的结果。针对猪饲料（水分、灰分、油、蛋白质、纤维素和铜），只有 76% 的实验室获得了令人满意的结果。对于营养成分分析，有 80% 的实验室获得的结果令人满意。

英国食品分析水平评估计划研究也表明，有些分析难度很大。黄曲霉毒素数据的满意度为 91%，兽药残留量数据的满意度为 81%，滴滴伊（DDE）数据的满意度为 86%，滴滴涕（DDT）数据的满意度为 71%，钙数据的满意度为 65%。令人惊诧的是，对于钙的分析方法，这些年来几乎没有什么新进展。实验室间比对与能力检测可以将那些不合适的方法给暴露出来，比如，用一些免疫测试来分析兽药残留量。然而，一旦实验室定期参与了能力检测（如食品分析能力评估体系），所得结果的平均精确率将会得到提高。

Horwitz (1993) 发现，在生物科学领域，涉及分析方法的绝大多数实验往往会在同一个实验室里进行。其他实验室也没有必要再进行方法验证，因为即使进行了，也认为是无价值的，因为用一个评论者的话说“结果偏差太大”。然而，在最近的 20 年里，人们逐步意识到实验室间的合作研究，将是评价分析方法变异性的唯一之路，同时，通过调整计划满足了人们对高质量数据越来越强的需求。

2.3 怎样获取有效数据

英国贸易与工业部于 1994 年开展了一项有效分析测定计划（VAM），该计划包含以下四项主要原则。

2.3.1 原则一：应当利用合适的验证方法进行测量

合适的验证方法应该提供关于分析技术性能的相关信息，比如，准确性、精确度、复现性、操作范围、选择度以及检出限。当报告一项测定值时，也应该给出它的不确定性，这是必需的。否则，数据使用者不可能知道这些数据的可信度到底有多少。需要认识到这样一件事情，即“不确定”这个单词可能会导致一些沟通问题，因为对于一个非专业人员来说，他可能会把统计术语“误差”曲解成“不准确数据”（Williams, 1996）。

现在已经可以提供一些（Bailey 和 Henderson, 1990）分析测试和实验室能力的统计学评价的指南。实验室间的精确度通常

是一个集中函数。Horwitz 研究小组发现，实验室内的数据偏差大体相当于实验室间数据偏差的 $1/2 \sim 2/3$ ，这样将这个数据作为一个“基准值”，用于判定以前未被验证的分析方法（Bailey 和 Henderson, 1990）。

2.3.2 原则二：质量保证协议应当包含有证参考物质（CRMs），以确保测定结果的可追溯性

有证参考物质主要应用于以下几个方面：

- 在常规分析条件下测量值的校正和验证；
- 内部质量控制和质量保证计划；
- 对于标准方法正确应用的验证；
- 新测定方法的开发与验证。

不幸的是，在饲料分析中，仅有少数有证参考物质可用于分析方法的验证，特别是对于近似分析（Crosby, 1995）。但是，针对矿物质的有证参考物质仅存在于两种动物饲料中：干草粉（Ca、K、Mg、P、S、Zn、I、N、凯氏 N）和黑麦草（As、B、Cd、Cu、Hg、Mn、Mo、Ni、Pb、Sb、Se、Zn）（Maier 等, 1990；见附录有证参考物质供应商介绍）。关于内部参考物质的生产信息可以参考 1998 年 Walker 和 Brookman 的文章。把外部的参考物质和内部的参考物质都列入所有分析流程中，是一种很好的做法。

2.3.3 原则三：对于特殊测定，实验室应当寻求一种独立评估它们实验室能力的方法，最好参加国家和国际的能力验证计划（PTS）

- 能力验证计划可以独立地对分析实验室的能力进行评判。
- 一种分析方法的真实浓度可以通过将已知分析量加到基础物质上来确定，也或者最好是由一组分析人员通过协商而确定的数值来进行确定。一项评判分析方法的合作研究也已经有指南（AOAC, 1988），附录 1 列出了几项能力验证计划。

2.3.4 原则四：实验室应该寻求一种独立的审批他们质量保证安排的方法，最好是通过一项认可的质量标准进行认证和注册登记这样一种方法

应该认识到，只有某些认证计划才适合于那些开展化学分析的实验室，例如，NAMAS M10, ISO 90025, ISO/IEC 17025, EN 4501。关于如何准备认证这一问题，通用指南中已经明确给出（EURACHEM/WELAC, 1998）。Gangaiya 和 Morrison 于 1992 年列出了发展中国家实验室在设定质量保证时存在的一些普通问题。附录 1 列出了几个认证机构。

3. 样品制备

好的分析数据要求样品必须具有整体的代表性，并且，它们在运输到实验室的过程中以及在制备过程中（干燥和碾磨）也必须保证其整体性。相关饲料指南请参考 Feeding Stuffs (1988), AOAC (1995), Crosby (1995) 和 Wrigley (1999)。干燥处理可能会对青贮饲料中的某些物质的分析结果产生不良影响，比如糖、微生物、微量元素（F、Se、B）、氨以及挥发性脂肪酸（VFAs）（MAFF, 1986）。在研磨羽扇豆和鹰嘴豆种子的时候，需要特别注意（Petterson 等, 1999）。

4. 水分

测定饲料水分含量方法有多种，烘干步骤包括 105℃ 烘干 16 小时，125℃ 烘干 4 小时，135℃ 烘干 3 小时（AOAC, 1995）。蜜糖应该在 70℃ 干燥，因为其挥发性物质的含量比较高（Petterson 等, 1999）。烘干法对于青贮饲料以及高脂肪饲料的处理是有一些问题存在的；95~100℃ 下或低于 70℃ 下的真空干燥（AOAC, 1995）、卡尔费休法或甲苯蒸馏法可作为烘干法的替代技术（Crosby, 1995; Cherney, 2000）。1994 年 Baker 等人发现，不同实验室之间水分含量的测定值偏差非常显著，这主要是

由于烤炉的温度梯度具有可变性所致 (Givens, 个人交流)。

5. 灰分

粗灰分一般通过 600℃ 高温灰化 2 小时或者在 500~550℃ 灰化 12~16 小时来测定 (Midkiff, 1984; Petterson 等, 1999)。1995 年 Crosby 针对那些不易灰化的样品列举出了一些专门的技术。分析固体饲料样品中的微量 Cu 元素含量所利用的无火焰原子吸收光谱法, 是一种很有发展前景的技术 (Anzano 等, 1994)。但是目前, 此类分析技术的样品剂量必须限定在 2~4 毫克。因此, 这项技术还需要进一步开发, 以便能在饲料分析中广泛应用。

6. 粗蛋白

粗蛋白数据是用来评定饲料蛋白值的一个标准 (Cherney, 2000)。Lakin (1978) 和 Midkiff (1984) 分别就凯氏定氮测量法 (选择催化剂、温度和消化时间) 的历史发展和关键点进行了总结。杜马斯技术是测定总氮含量的另一种方法, 样本燃烧后再测定总氮含量, 目前已经有多种商业化设备来进行此项指标的测定, 单个样品的总氮含量测定仅需要 2~5 分钟就可以完成。杜马斯技术的关键问题是要求的样品剂量只能在 20~500 毫克。样本应该被充分研磨, 最好进行干燥, 以避免贵重试剂的频繁更换。因此, 对于一些物质的最好测定方法, 比如青贮饲料, 目前仍然需要用凯氏定氮法, 因为干燥可能会令样品中的氨态氮丢失。

但是, 凯氏定氮法所需的有毒腐蚀性试剂, 却是该方法的主要缺点。

总的来说, 杜马斯法测定的全氮值总是略高于凯氏定氮法的全氮值, 因为在杜马斯全氮值中也包含了硝酸盐和一些有机化合物, 这些成分很难被酸消化 (Lakin, 1978; Petterson 等,

1999)。因此，对于一些生物基质样品（比如，水果、蔬菜、鱼）的测定结果可能会出现一些异常偏差，凯氏定氮法与杜马斯定氮法所测的氮比值低至 0.15（Simonne 等，1997）。

动物饲料中总氮值换算成粗蛋白值时，往往用到 6.25 这个因子值。但是，不同食物中的氨基酸含量是不同的，因此，把总氮量换算成粗蛋白时，建议使用不同的因子值（Petterson 等，1999）。因子值可以在 5.14（谷物和油料种子）~6.38（乳制品）变化。但是由于对这些因子值的普遍有效存在质疑，所以作者在报道粗蛋白含量时，还需要同时报道出他们计算过程中所使用的因子值（Lakin，1978）。

有人指出：在可以进行蛋白质测定的实验室当中，还没有一种大家能够普遍接受的染料结合法（Petterson 等，1999）。最近，Strong 和 Duarte（1992）介绍了一种简单而又快速地测定小麦、水稻和大豆蛋白质的方法，即双缩脲法。此方法被广泛应用于不同谷物上。这种方法仅需要一个搅拌器、一些试剂、550 纳米的比色计以及对操作者进行少量培训。此方法需要用其他方法所得到的蛋白值进行初始校正。由于这种方法在 5 分钟内就能完成测定，因此，深得谷物和饲料商人的喜爱。

7. 纤维分析

认识到所有的纤维测定都利用了“经验法”这一点很重要，也就是说，这种方法决定了最后的结果，分析方案中出现任何偏差，都会导致不同的结果发生（Midkiff，1984；Crosby，1995）。Midkiff（1984）总结了粗纤维分析方法的发展历程。Cherney（2000）对 Weende 概略分析体系与 Van Soest 体系进行了比较，其中 Weende 概略分析体系起源于 19 世纪，至今几乎未进行任何改变；Van Soest 体系开发于 20 世纪 60 年代。他指出在饲料评价系统中，要警惕使用粗纤维、无氮提取物（NFE）、醚提取物（EE），因为它们很难把消化部分从非消化部分中彻底分开。

Van Soest 体系目前被广泛应用于饲料评价中，因为它在评价重要的营养参数时（比如，碳水化合物），提供了一些非常有用的测量方法（Goering 和 Van Soest, 1970；AOAC 法, 1973.18）。

自从几个研究小组对于原始的手动方法进行改进以来（Cherney 等, 1989；Van Soest 等, 1991），Chai 和 Uden（1998）也介绍了一种简单的、基于烤箱的分析流程。另一个改进方法则是由 Pell 和 Schofield（1993）开发的微量中性纤维洗涤法，此法可对小样本进行分析（10~50 毫克）。Moore 和 Hatfield（1994）对那些引用结构和非结构碳水化合物组成成分和分析方法的、并涉及反刍动物和单胃动物的研究进行了全面回顾。Mertens（1997）认为，目前唯一可以对所有类型饲料进行纤维分析的方法，是由国家牧草检验协会推荐的方法（Under-sander 等, 1993；Hintz 和 Mertens, 1996；也可参考附录 1 给出的网站）

从中性洗涤纤维中清除淀粉是非常困难的，为此，需要对 α -淀粉酶进行过夜预处理（McQueen 和 Nicholson, 1979），或者在中性洗涤纤维提取的最后 30 分钟内以及在过滤过程中用热稳定的 α -淀粉酶进行预处理（Cherney 等, 1989）。一些纤维素提取困难的样本还可以用 8 摩尔的尿素进行预处理（Van Soest 等, 1991）。淀粉去除不干净会影响到过滤。然而，纤维分析误差还可能源于老旧的坩埚，因为坩埚在过高温度下或者在马弗炉中进行频繁的冷热交替处理可能会受到损伤（Crosby, 1995）。

Fibretec（Tecator, Hoenganaes, Sweden）和最近开发的 FibreAnalyzer（ANKOM Technology Co., Fairport, NY, USA）都是用来提取中性洗涤纤维和酸性洗涤纤维的设备。研究发现，用这两种设备可以对绝大多数饲料进行纤维素提取，而且所得结果具有可比较性。但以我们的经验看，在淀粉含量高的饲料中进行中性洗涤纤维的分析，最好选用 FibreAnalyzer，因为它能够更有效地清除淀粉（基于未发表的数据）。

8. 淀粉

淀粉含有两种最基本的成分：直链淀粉和支链淀粉。直链淀粉聚合物含有 2 000 多个葡萄糖单体，通过线性的 1→4 糖苷键进行连接。支链淀粉是由高度分支的聚合物组成的，含有 2 000~220 000 个葡萄糖单体，并通过 1→4 糖苷键和 1→6 糖苷键连接。因此，合适的提取技术对于淀粉分析的成功与否非常重要（Petterson 等，1999）。

淀粉在进行提取和水解前（Faichney 和 White, 1983; Aman 和 Graham, 1990; Hall, 1997），需要先在沸水中用 80% 的酒精进行预处理，以去除低分子质量糖，然后进行凝胶处理和增溶处理，最后再进行淀粉测定。淀粉分析中遇到的主要问题是：淀粉不能完全溶解以及不能与酶进行充分接触。McCleary 等人（1994; 1997）报道了一个环实验，该实验共涉及 29 家实验室，它们都用 Megazyme 酶试剂盒对谷物产品和一些动物饲料进行了总淀粉含量分析，该实验表现出了非常好的一致性，因此，这种试剂盒被 AOAC 方法（996.11）所采纳（Petterson 等，1999）。

直链淀粉和支链淀粉的比率取决于淀粉的来源。淀粉消化率与淀粉总含量之间的关联不大，因为直链淀粉与支链淀粉的比率以及处理过程都会影响到淀粉的消化程度（Allen 等，1997; Reynolds 等，1997）。快速黏度分析仪可以测定谷物中淀粉的糊化特性，Wrigley（1999）推断，这种黏度特性可能与淀粉的消化率有关，但这点还有待进一步研究确认。

9. 粗脂肪

植物源性饲料的脂肪组成，主要包括单酰基甘油、甘油二酯、三酰基甘油、游离脂肪酸和磷脂。饲料中也时常掺杂些动物性脂肪或者其他废料。根据所使用的处理程序，加热或者储藏都会导致非皂化物、氧化脂肪酸和聚合脂肪酸产生，这些物质都对

脂肪值有贡献，但却没有什么营养价值（Edmunds, 1990）。Midkiff (1984) 对于粗脂肪分析法的发展历史以及引起问题的样品类型进行了阐述。

目前有几种官方测定方法可用于动物饲料的粗脂肪分析（AOAC 945.16 和 920.38; MAFF 1986）。粗脂肪分析法是一类经验性方法，操作流程的详细细节都必须严格遵守。它们都是基于水解或未水解情况下进行溶剂萃取。利用石油醚（40~60℃）通过 EU 流程 A 进行粗脂肪的提取，对干燥残渣进行称重（Feeding Stuffs 1988）。EU 流程 B 中需要酸水解预处理步骤。但是，在动物饲料分析中，建议先用石油醚（0~60℃）进行脂肪提取（EU 流程 A），接着在用石油醚（40~60℃）进行再萃取前（EU 流程 B），要先进行酸解。这样可以将酸消解过滤时造成的损失降到最低，在保护性脂肪（即脂肪酸钙、镁盐）存在的情况下，这种损失可能就会发生（Edmunds, 1990; Crosby, 1995）。

如果饲料中含有奶制品，无论分析 EU 流程 A 或者 B，都不能获得满意的结果。此种饲料需要用罗紫-哥特里法，因为强碱预处理可以使蛋白胶囊里面的包藏油脂游离出来（ISO 1211: 1984）。同样，罐装狗食品需要在水解后用一系列的溶剂进行萃取（Budde, 1952; Midkiff, 1984; AOAC 954.02）。

如果用乙醚，而不是用某些方法推荐的石油醚，那将会产生一些问题。如果样品或者溶剂中的水分没有被完全去除，测试的结果将会偏高，因为一些诸如尿素和糖的化合物，有可能会微溶于含少量水分的乙醚中（Midkiff, 1984; AOAC 920.39）。

在溶剂萃取时，应当非常小心。溶剂通常会在索格斯利特（索氏）萃取器下端的一个电子加热源与上端的一个水冷却系统之间进行循环。使用该设置经常会出现一些事故。因此，最近开发了一些不同类型的萃取器（Brown 和 Mueller-Harvey, 1999）。Soxhlo 设备，既不需要加热，也不需要冷却水，它是基于一个干

柱程序上的一种设备。将样品装到一个柱子中，萃取液通过这个柱子慢慢滴落。用 Soxflo 程序和 Soxhlet 程序进行粗脂肪萃取的数值非常接近。如果样品干燥和装料程序用 Soxhlet 程序进行评价，在 60~90 分钟内将会得到一个良好可信的粗脂肪数据。

10. 植物次级产物：单宁

尽管植物的次级产物种类有很多，但在这里我们只探讨单宁。其主要原因是动物营养中的单宁问题，长期困扰着大家。分析技术手段常常被误用，数据也常被误读。然而，这里将提到霉菌毒素和其他植物次级产物的快速分析问题，因为可能会污染或者影响到动物饲料的营养价（请参阅第 11 部分的相关内容）。

单宁是由多种酚类化合物组成的，相对分子质量范围在 500~28 000（Jones 等，1976；Mueller-Harvey 和 McAllan，1992；Schofield 等，2001）。有些可以很容易地被一些水溶性溶剂萃取，而另外一些却很难，可以以纤维结合单宁或者蛋白结合单宁的形式来进行测定（Jackson 等，1996；Reed，1986）。关于缩合单宁（CT）或者水解单宁（HT）的命名问题和分类问题可能会出现一些误解，因为一些缩合单宁在氧化条件下相对容易降解，而一些水解的单宁在水解时却非常不易降解（Mueller-Harvey，1999；2001）。

单宁可以造成动物的阳性和阴性反应，比如可以导致动物死亡，也可以提高动物生长率（Butter 等，1999；Mueller-Harvey，1999）。尽管许多动物研究都涉及单宁饲料，但对动物生产与单宁结构间的关系，却研究的很少。单靠一直使用比色法来分析单宁，很难取得新进展（Pettersen 等，1999）。Lowry 等（1996）用一句话进行了简单表述：“吸光度测量的简单性把提取重要数据的问题给掩饰起来了。”

一种常规试剂会因酚类化合物的不同而使给色量不同，其中也包含单宁（Folin 和 Ciocalteu，1927）。然而，酚类和单宁通

常以混合物的形式存在，不能对它们进行定量分析，除非利用可代表所检查材料的确切成分的分离标准物。对于缩合单宁和水解单宁的色谱分析法的流程，可以参考 Graham (1992), Waterman and Mole (1994) 和 Hagerman (网址) 上面的介绍。

Porter 等 (1986) 建议对正丁醇/盐酸法进行改进。这种方法在分析缩合单宁时是非常出色的。但是，出于量化目的，只有当分离单宁作为校正标准时才能用此方法，因为单宁结构会对给色量有显著影响 (Giner-Chavez 等, 1997)。即便在同一物种内，也可能会有明显的结构性变化，这也说明在量化工作中从不同的种质中得到分离单宁标准物 (Stewart 等, 1999) 这一做法是正确的。最近，一种基于加酸 4-二甲氨基肉桂醛法 (DMACA-HCl) 的缩合单宁分析法见于报道 (Li 等, 1996)。这种方法比香草醛-HCl 方法更灵敏，因为香草醛-HCl 法容易受到水的干扰 (Terrill 等, 1990)。DMACA 分析法也被成功应用于薄层色谱 (TLC) 板上，同时也作为一种组织化学分析方法。这种方法还没有对单体黄烷醇的干扰进行充分的检验。

2001 年，Mueller-Harvey 曾对水解单宁的分析方法进行了概述。此外，最好有一些分析方法可用来检测水解单宁，因为精确定量需要有分离标准物 (Hagerman 等, 1997)。此外，仅有少数几种已知的物种可以产生没食子单宁，里面的没食子酸在测定前可以被水解 (Willis 和 Allen, 1998)。通常情况下，没食子单宁和鞣花单宁往往一起以混合物的形式出现。尽管游离鞣花酸可通过 HPLC 来检测 (Mueller-Harvey 等, 1987)，但是对鞣花单宁的测定还是非常难的。然而，如上所述，很多其他所谓的水解单宁并不释放没食子酸或者鞣花酸。

当筛选新的饲料作物时，建议用另外一些分析方法分析单宁，以便克服比色法测试带来的一些问题，比如，Yb 沉淀法 (Reed 等, 1985; Giner-Chavez 等, 1997; Krueger 等, 2000a) 和/或是一个蛋白质或者聚合物结合分析法 (Makkar 等, 1987;

Dawra 等, 1988; Makkar 等, 1993)。如果有可以检测放射性的设备, 也可以通过 ^{125}I 标记的 BSA (Hagerman 和 Butler, 1980), 或者用 ^{14}C -聚乙二醇来测定单宁 (Silanikove 等, 1996)。后面的这个方法可以直接估算饲料中的单宁, 无需提前萃取。

Yb 法可以沉淀所有的酚类化合物 (单宁、黄酮类以及其他酚类化合物), 这些物质与丁醇-HCl 缩合单宁呈正相关 (Reed 等, 2000)。这种方法的优势在于, 它不需要标准物就可以通过重量分析法来测定酚类物质。有意思的是, 每克样本附着的 PEG 量与体外 N 的消化率呈显著的正相关, 是一种比色度法更有意义的测定方法 (Jones 和 Palmer, 2000)。香草醛-HCl 与缩合单宁测定的相关性比丁醇-HCl 的相关性更好。

鉴于比色法出现的一些问题, 人们惊奇地发现, 薄层色谱法 (TLC) 至今还未被广泛应用。TLC 法揭示了缩合单宁 (CT) 对水解单宁 (HT), 低分子质量 CT 对高分子质量 CT, CT 或者 HT 的亚类 (原青花素或者原翠雀定, 没食子鞣质或者鞣花单宁) 的存在情况, 以及基于色度的半定量信息 (Mueller-Harvey 等, 1987)。不同种属来源的单宁也可以用反相 HPLC 法 (Mueller-Harvey 等, 1987)、尺寸排阻色谱法 (Yanagida 等, 1999; Hedqvist 等, 2000)、正相色谱法所得分析结果进行比较 (Tanaka 等, 1984; Okuda 等, 1989; Hagerman 等, 1992)。Okuda 等在 1989 年对单宁的质谱分析法进行了综述。最近, 有研究者 (Guyot 等, 1997; Marais 等, 2000) 利用电喷雾质谱法 (ESI-MS) 对单宁分子质量进行了测定。MALDI-TOF 质谱法的最新研究进展是成功应用于复杂的单宁混合物的分子质量和组成成分的测定 (Hedqvist 等, 2000; Krueger 等, 2000a, b)。

11. 霉菌毒素和其他饲料污染物的免疫测定技术

霉菌毒素会对人类和动物造成严重危害。饲料中的霉菌毒素与其他许多有机化合物一起, 可以用一些仪器 [HPLC、气相色

谱 (GC)、毛细管电泳 (CE)] 或者生化技术 (免疫分析法) 来进行测定。

1995 年, Skeritt 和 Appels 介绍了酶联免疫吸附法 (ELISAs) 的原理, 并介绍了不同的分析技术 (直接或者间接分析法、夹心法或者竞争性分析法)。例如, 在直接竞争性 ELISA 方法中, 酶联抗体 (E-As) 包被孔板或试管表面, 这些都由试剂盒提供。操作人员萃取饲料样品后, 把萃取物直接铺到孔板表面。一些重要化合物 (比如抗原) 结合到 E-As 上, 因此, 可以把 E-As 从板子表面释放出来。E-As 被洗掉, 将酶底物加到未被洗涤的、结合 E-As 中。最后的测定结果是, 抗原浓度与颜色深度成负相关: 抗原浓度越高, 就会有更多的 E-As 被洗掉, 最后反应的给色量就会越小。

目前有多种商业性的试剂盒, 用于食品和动物饲料中的黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮、其他真菌毒素、生物碱、硫代葡萄糖苷、杀虫剂、除草剂、杀菌剂、各种环境污染物以及维生素等。Morgan (1995) 将这些 ELISA 技术进行了总结, 并列出了供应商的联系地址。Schneider 等 (1991) 开发了一种有趣的试纸条技术, 可以同时检测多种真菌毒素。

ELISAs 技术被监管部门、质量控制实验室以及科研实验室等应用。此技术只需对使用者进行少量培训就可以掌握, 并可以在一些小实验室或者野外条件下使用。这种技术具有经济快速的特点, 特别适用于现场监测贮粮, 并快速评价所交易的动物饲料中的最大残留量是否超标。另外, 此种技术也可用在可疑泄漏物的检验上。高通量样本将那些大量阴性非污染样本的排除变得容易多了。但也建议, 针对某一污染物给出阳性测定结果的样本, 还需要用常规仪表技术进行重复分析, 避免基质干扰, 进而保证数据的准确性 (Petterson 等, 1999)。

在分析动物饲料中的黄曲霉毒素时, 一些商业试剂盒与标准的 AOAC 方法具有很好的可比性 (Trucksess 等, 1989 和 1990;

Cochrane, 1991), 可在不到 3 分钟的时间内就能完成定量或者半定量测定。一些商业试剂盒已获得 AOAC 认证 (Trucksess 等, 1989)。可将 ELISAs 技术进行一些改变, 使其对不管单个化合物还是复杂化合物、亲本化合物还是代谢产物, 甚至对一些异构体, 都具有可选择性。有人报道, ELISAs 技术在分析牛奶样本中的黄曲霉毒素 M 时, 具有非常高的灵敏性 (Kawamura 等, 1994)。在当前令人关注的欧洲疯牛病危机中, Holst 等 (2000) 就评价过将商业化 ELISA 技术用在猪肉和牛肉食物热处理的检测中的适用性。

需要特别注意的问题。像其他一些分析方法一样, 也需要对 ELISA 操作过程进行认真评价, 因为一些用于分析萃取的溶剂可能会影响到抗体性能 (Morgan, 1995)。在一项实验室间的研究发现, ELISA 测定技术实验用 ZON (玉米赤霉烯酮) 检测试剂盒给出了非常令人满意的结果, 但用 DON (呕吐毒素) 检测试剂盒的测定精确度却很低 (Schuhmacher 等, 1997)。Matthews 等人 (1996) 调查了在实验室或者野外用来测定三种有机磷杀虫剂 (OP) 的商业试剂盒。作者发现, 它们与气相色谱法 (GC) 具有很好的正相关 (r 值为 88%~98%)。但是, 由于试剂盒随带的实验流程有些令人费解, 因此, 作者提供了一个更好的实验流程, 服务于粮店管理者、磨坊主和麦芽制造商。研究也发现, 试剂盒的应用范围也不像制造商声明的那样广。另外, 一些抗体与结构相关的化合物间的交互反应也时有发生。尽管如此, 研究发现, ELISA 测定技术在测定贮粮的有机磷农药 (OP) 残留量时, 其结果还是可靠的。

ELISAs 技术遇到的常见问题是: 洗涤不完全、移液问题、试剂和板子的温度控制不够、共轭物的降解 (这样会限制与抗体的很好结合) 以及酶活性降低 (Gee 等, 1995)。样本基质问题也很常见, 这种问题可以通过在未污染基质或者空白基质中的标准品进行比较来检测。标准物添加的回收率研究可能会发现基质

问题。另外，样本基质溶液的稀释曲线，可以和标准品的校正曲线进行比较。如果两条斜线不平行，则说明可能存在基质效应。

最后，当购买一个测试试剂盒时，还应考虑到以下标准：试剂盒价格、灵敏度、交叉反应性、配套基质的适用性、独立工作者所公布验证的可靠性，以及技术支持（Gee 等，1995）。

12. 近红外光谱技术（NIRS）在全样本分析中的应用

Deaville 和 Flinn（2000）对近红外光谱技术的基本原理进行了简洁而清晰的介绍。Shenk 和 Westerhaus（1995）对近红外光谱技术的应用进行了详尽浅显的综述，同时对近红外光谱的数学处理过程进行了详细阐述。Givens 和 Deaville（1999）也对与饲料分析和动物营养有关的近红外光谱技术进行了综述。

- 与传统技术相比，近红外光谱技术有如下优点：
- 快速，因为很少需要或者几乎不需要样本制备；
- 可现场对全样本进行分析，即是一种非损伤性技术，可以同时多个参数进行测定；
- 精确度高；
- 高通量，这使得近红外光谱技术在单样本分析上非常经济；
- 环保：不需要试剂、无化学废物。

此技术的缺点如下：

- 适合饲料主要成分分析，却不适合微量成分的分析；
- 需要非常小心地进行校正，因为此技术具有基质特异性；
- 所选择的数据处理方法复杂，这会对初学者产生困惑；
- 校正程序非常耗时，仅仅当后来分析的样本量很大时才值得去做；
- 设备非常昂贵。

近红外光谱技术开发于 20 世纪 50 年代，并于 20 世纪 60 年

代用于定量分析，70 年代用于饲料分析（Norris 等，1976）。在 20 世纪 70 年代晚期，近红外光谱技术已经成为用于谷物蛋白质测定的常规方法。近红外光谱的波段范围在 730~2 500 纳米，这些红外区特别适合定量分析（Givens 和 Deaville，1999）。水分的主要吸收波段在 1400~1 450 纳米，脂肪族 C—H 键的波段在 2 310 纳米、1 725 纳米、1 400 纳米和 1 210 纳米，O—H 键的波段在 2 100 纳米和 1 600 纳米，N—H 键在 2 180 和 2 055 纳米之间。光谱以反射率倒数的对数来表示，但它提供的直接信息却不多。在饲料基质中的多种成分会产生一系列的重叠波段，构成一条平滑的波形线。但是，光谱倒数对数的一阶和二阶导数则可用来解决上述产生的波段重叠问题。

近红外光谱数据一般需先进行数学预处理，以减少光散射的干扰（Barnes 等，1989）。然后，在多种不同的多元校验法中，用其中之一将足够大的、并具有代表性的样本光谱数据与主要的“湿化学”数据联系起来（Blanco 等，1997）。最后，通过校验程序用一组独立样本来进行校验（Shenk 等，1989）。

在进行近红外光谱技术校验时，需要特别注意（参考 Deaville 和 Flinn 于 2000 年写的文章）。校验应该在至少 50 个样本基础上进行，通常情况下需要 150 个以上的样本。Given 和 Deaville 于 1999 年曾指出，近红外光谱技术，充其量只能算次级技术，因为它需要利用已知成分的样本进行校验，而且这些已知成分通常都使用一些标准方法（初级技术）进行测定。如果初级技术没有明确样本化学组成时，就容易出现问题。比如，为测定水分含量，在 100℃ 度条件下干燥，未必能明确水分含量，或者 $6.25 \times$ 总氮量未必能充分描述蛋白质含量（Shenk 和 Westerhaus，1995）。

需要着重强调的是，样本制备必须一致，因为颗粒大小的变化、残留水分含量和包装密度都会对近红外光谱产生不利影响。但是，新近开发的近红外光谱软件，比如噪音重复力文件，它可

以成功地减少近红外光谱技术对残留样本水分的灵敏性 (Baker 等, 1994; Shenk 和 Westerhaus, 1995)。另外, 利用一个粗糙的运输隔室, 可以遮护到鲜草青贮的较大表面, 进而也就不需要干青贮料 (Park 等, 1999a, b)。

近红外光谱技术已被列为官方 AOAC 技术, 用于粗蛋白、酸性洗涤纤维 (AOAC 989.03) 和水分的测定 (AOAC 991.01; Barton 和 Windham, 1998)。此外, 此技术还被应用于饲料粮中淀粉和非淀粉类多糖、脂肪和油、代谢能、昆虫或者杂草种子污染 (Wrigley, 1999) 以及干牧草的分析 (Murray, 1993)。它可以用来鉴定饲料, 执行真实性核查 (De Boever 等, 1993)。另外, 针对热害蛋白、真菌污染以及掺假等问题, 可以通过现代模式识别软件来进行鉴别 (Givens 和 Deaville, 1999)。把在昂贵扫描设备开发的校正系统通过网络转移到廉价的过滤装置上, 这也是可能的 (Puigdomènech 等, 1997)。这个 ISI 克隆软件也可以成功地把用于新鲜青贮料分析的近红外光谱校正系统, 从 Foss 设备上转移到 Bran & Luebbke 设备上 (Park 等, 1999b)。

现在, 研究人员正朝着一个目标努力: 可以直接预测动物饲料的功能特性, 即养分供给和生产反应, 比如增重、乳脂和蛋白或者肉的成分等, 而不是测量饲料的组成成分 (Wrigley, 1999)。目前已经可以成功预测的内容包括体内有机质的消化率 (Barber 等, 1990); 代谢能含量 (Givens 等, 1992); 随意采食量 (Deaville 和 Flinn, 2000)。今后也可能预测与营养相关的产物, 比如乳酸菌, 挥发性脂肪酸 (VFAs) 和基于 800 份新鲜饲料校准的累积气体体积 (Deaville 和 Flinn, 2000)。其终极目标就是制订这样一份食谱, 即该食谱可以使动物生产能力和成本效率最大化, 使不利的环境效应降到最低 (Givens 和 Deaville, 1999)。

13. 结论

本综述描述了饲料分析的一般过程, 包括近年来一些快速分

析技术的最新进展，例如纤维分析技术 FibreAnalyzer、脂肪分析技术 Soxhlo、用于淀粉快速分析的新型酶试剂盒，以及用于霉菌毒素和其他饲料污染物分析的 ELISAs 技术，同时还包括了近红外光谱学技术在全价饲料分析中的进展。

饲料分析与其他分析相比，看起来难度可能更大些 (Midkiff, 1984; Key 等, 1997)。分析一种化学成分明确的化合物，比较容易在实验室间进行标准化。但对于那些成分不十分明确，可从营养角度讲却非常重要的参数，如油脂类、纤维、淀粉或者动物饲料的消化率等，分析起来难度较大。更好地理解这些参数，将有利于改进它们的测量方法。

通过对几个实验室间的数据比较发现，数据波动太大，令人无法信服。因此，非常有必要在各饲料分析实验室之间，共同努力制定一个大家都一致认同的分析流程。针对矿物质、杀虫剂和环境食品污染物而生产的有证参考物质 (CRMs)，通过国际努力，已经取得了长足进步。但对于饲料分析的有证参考物质不多，而对于中性洗涤纤维的有证参考物质却更没有，因为还缺乏一些动物饲料的能力计划。

植物育种人员目前有几种分析技术可用，这些分析技术主要用来测定单一而又简单的、能产生有益或者有害效应的组分（氨基酸、n-3 脂肪酸、矿物质、霉菌毒素、硫代葡萄糖苷、生物碱）(Wrigley 1999)。

但是，对于那些亲营养物或者抗营养物的较为复杂的混合物，比如，淀粉、单宁、凝集素等，结构与功能的相关性仍然还没有明晰，因此，还没有一种专门的分析方法可以推荐用在植物育种计划中 (Caygill 和 Mueller-Harvey, 1999)。同样，一旦有益的目标化合物被明确地鉴定出来，那么对一些生物活性化合物的检测，比如植物雌激素或抗氧化剂，那么就可以被植物育种人员广泛使用。

最后，一个良好分析实践的概念是：通过认证方法和有证标

准物质 (CRMs) 的使用来确保“测量结果的可追溯性”。目前此概念已经被饲料生产商以一种“饲料护照的”形式,被解读为“饲料可追溯性”。结合最近的牛饲料中肉粉和骨粉分析经验,以及导致疯牛病 (BSE) 危机和转基因争端的大豆新品种,“饲料可追溯性”概念将有可能变得越来越重要。

参考文献

- AFRC.** 1993. Energy and protein requirements of ruminants. CAB International, Wallingford, UK.
- AOAC.** 1988. Guidelines for collaborative study procedure to validate characteristics of a method of analysis. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 71: 161 - 171
- AOAC.** 1995. Animal Feed. Chapter 4. in Official methods of analysis'. 16th edition. AOAC International, Arlington, VI, USA. 30 pp.
- Allen, M. S. , Oba, M. & Choi, B. R.** 1997. Nutritionist's perspective on corn hybrids for silage. In Silage: Field to feedbank. NRAES - 99, Northeast Regional Agricultural Engineering Service, Ithaca, New York, pp. 25 - 36.
- Aman, P. & Graham, H.** 1990. Chemical evaluation of polysaccharides in animal feeds. Ch 9. In J. Wiseman & D. J. A. Cole, eds. Feedstuff evaluation, pp. 161 - 177. Butterworths, London.
- Aufrère, J. & Michalet-Doreau, B.** 1988. Comparison of methods for predicting digestibility of feeds. Animal Feed Science and Technology, 20: 203 - 218.
- Bailey, S. & Henderson, K.** 1990. Consequences of inter-laboratory variation in chemical analysis. Ch. 20. In J. Wiseman & D. J. A. Cole, eds. Feedstuff evaluation, pp. 353 - 363. Butterworths, London.
- Baker, C. W. , Givens, D. I. & Deaville, E. R.** 1994. Prediction of organic matter digestibility in vivo of grass silage by near infrared reflectance spectroscopy: effect of calibration method, residual moisture and particle size. Animal Feed Science and Technology, 50: 17 - 26.

- Barber, G. D. , Givens, D. I. , Kridis, M. S. , Offer, N. W. & Murray, I. 1990. Prediction of the organic matter digestibility of grass silage. *Animal Feed Science and Technology*, 28: 115 - 128.
- Barnes, R. J. , Dhanoa, M. S. & Lister, S. J. 1989. Standard normal variate transformation and de-trending of near-infrared diffuse reflectance spectra. *Applied Spectroscopy*, 43: 772 - 777.
- Barton, F. E. , II & Windham, W. R. 1988. Determination of acid detergent fibre and crude protein in forages by near infrared reflectance spectroscopy: collaborative study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 71: 1162 - 1167.
- Beever, D. E. , Cammell, S. B. & Edmonds, S. 1996. Inter-laboratory variation in foodstuff evaluation of two contrasting maize silage samples. *Animal Feed Science*, 62: 685 - 686.
- Blanco, M. , Coello, J. Iturriaga, S. , Maspoch, S. & de la Pezuela, C. 1997. Calibration in near infrared diffuse reflectance spectroscopy. A comparative study of various methods. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 5, 67 - 75.
- Brown, R. H. & Mueller-Harvey, I. 1999. Evaluation of the novel Soxhlet technique for rapid extraction of crude fat in foods and animal feeds. *Journal of AOAC International* 82, 1369 - 1374.
- Butter, N. L. , Dawson, J. M. & Buttery, P. J. 1999. Effects of dietary tannins on ruminants. Chapter 5. In J. C. Caygill & I. Mueller-Harvey, eds. *Secondary plant products-antinutritional and beneficial actions in animal feeding*, pp. 51 - 70. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- Caygill, J. C. & Mueller-Harvey, I. 1999. *Secondary Plant Products-Antinutritional and beneficial actions in animal feeding*. Nottingham University Press, Nottingham, UK, 129 pp.
- Chai, W. H. & Uden, P. 1998. An alternative oven method combined with different detergent strengths in the analysis of neutral detergent fibre. *Animal Feed Science and Technology*, 74: 281 - 288.
- Cherney, D. J. R. 2000. Characterization of forages by chemical analysis. Ch 14. In D. I. Givens, E. Owen, R. F. E. Axford & H. M. Ohmed, eds.

- Forage evaluation in ruminant nutrition, pp. 281 – 300. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Cherney, D. R. J. , Patterson, J. A. & Cherney, J. H.** 1989. Use of 2 – ethoxyethanol and α -amylase in the neutral detergent fiber method of feed analysis. *Journal of Dairy Science*, 72: 3079 – 3084.
- Cochrane, W. P.** 1991. Testing of food and agricultural products by immunoassay. Chapter 4. ACS Symposium Series, 451: 40 – 48.
- Crosby, N.** 1995. Animal Feeds. In A. Townshend, ed. *Encyclopedia of analytical science*, Vol. 1, pp. 120 – 136. Academic Press, London.
- Dawra, R. K. , Makkar, H. P. S. & Singh, B.** 1988. Protein-binding capacity of microquantities of tannins. *Analytical Biochemistry*, 170: 50 – 53.
- Deville, E. R. & Flinn, P. C.** 2000. Near-infrared (NIR) spectroscopy: an alternative approach for the estimation of forage quality and voluntary intake. Chapter 15. In D. I. Givens, E. Owen, R. F. E. Axford & H. M. Ohmed, eds. *Forage evaluation in ruminant nutrition*, pp. 301 – 320. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- De Boever, J. L. , Cottyn, B. G. , Vanacker, J. M. & Boucque, C. V.** 1994. An improved enzymatic method by adding gammanase to determine digestibility and predict energy value of compound feeds and raw materials for cattle. *Animal Feed Science and Technology*, 47: 1 – 18.
- Edmunds, B. K.** 1990. Chemical analysis of lipid fractions. Ch 11. In J. Wiseman & D. J. A. Cole, eds. *Feedstuff evaluation*, pp. 197 – 213. Butterworths, London.
- EURACHEM/WELAC.** 1998. Guidance Document. Accreditation for Chemical Laboratories. Guidance on the interpretation of the EN 45000 series of standards and ISO/IEC guide 25.
- Fahey, G. C. , Collins, M. , Mertens, D. R. & Moser, L. E.** 1994. Forage quality, evaluation, and utilization. American Society of Agronomy, Madison, WI, USA.
- Faichney, G. J. & White, W. T.** 1983. *Methods for the Analysis of Feeds Eaten by Ruminants*. CSIRO, Melbourne, Australia, 36 pp.
- Feeding Stuffs.** 1988. *The Feeding Stuffs (Sampling and Analysis) Regula-*

- tions, 1988 (as amended) . Statutory Instrument No 1144. HMSO, London, UK.
- Folin, O. & Ciocalteu, V.** 1927. On tyrosine and tryptophane determination in proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 73: 424 - 427.
- Gangaiya, P. & Morrison, J.** 1992. Problems of establishing quality assurance in developing country laboratories. LGC plc, Teddington, UK. *VAM Bulletin* 7, 13 - 14.
- Gee, S. J. , Hammock, B. D. & Skerritt, J. H.** 1995. Diagnostics for plant agrochemicals-a meeting of chemistry and immunoassay. Chapter 11. In J. H. Skerritt & R. Appels, eds. *New diagnostics in crop sciences*, pp. 243 - 276. CAB International, Wallingford, UK.
- Giner-Chavez, B. I. , Van Soest, P. J. , Robertson, J. B. , Lascano, C. Reed, J. D. & Pell, A. N.** 1997. A method for isolating condensed tannins from crude plant extracts with trivalent ytterbium *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74: 359 - 368.
- Givens, D. I. & Deaville, E. R.** 1999. The current and future role of near infrared reflectance spectroscopy in animal nutrition: a review. *Australian Journal of Agricultural Research*, 50: 1131 - 1145.
- Givens, D. I. , Baker, C. W. & Zamime, B.** 1992. Regions of normalised near infrared reflectance difference spectra related to the rumen digestion of straws. *Animal Feed Science and Technology*, 36: 1 - 12.
- Givens, D. I. , Owen, E. , Axford, R. F. E. & Ohmed, H. M.** 2000a. Forage evaluation in ruminant nutrition. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Givens, D. I. , Owen, E. & Adesogan, A. T.** 2000b. Current procedures, future requirements and the need for standardization. Ch. 21. In D. I. Givens, E. Owen, R. F. E. Axford & H. M. Ohmed, eds. *Forage evaluation in ruminant nutrition*, pp. 449 - 474. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Goering, H. K. & Van Soest, P. J.** 1970. *Forage Fiber Analyses (Apparatus, Reagents, Procedures, and Some Applications)* . Agricultural Handbook 379, ARS, USDA, Washington, DC. 20 pp.
- Graham, H. D.** 1992. Stabilization of the Prussian blue color in the determination of polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40:

801 - 805.

- Guyot, S. , Doco, T. , Souquet, J-M. , Moutounet, M. & Drilieu, J-F.** 1997. Characterization of highly polymerized procyanidins in cider apple (*Malus sylvestris* var. *Kermierren*) skin and pulp. *Phytochemistry*, 44: 351 - 357.
- Hagerman A. E.** Web site: <http://miavx1.muohio.edu/~hagermae/>
- Hagerman, A. E. & Butler, L. G.** 1980. Determination of protein in tannin-protein precipitates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28: 944 - 947.
- Hagerman, A. E. , Robbins, C. T. , Weerasuriya, Y. , Wilson, T. C. & McArthur, C.** 1992. Tannin chemistry in relation to digestion. *Journal of Range Management*, 45: 57 - 62.
- Hagerman, A. E. , Zhao, Y. & Johnson, S.** 1997. Methods for determination of condensed and hydrolyzable tannins. Chapter12. In F. Shahidi, ed. *Antinutrients and phytochemicals in food*, pp. 209 - 222. American Chemical Society, ACS Symposium Series 662.
- Hedqvist, H. , Mueller-Harvey, I. , Reed, J. D. , Krueger, C. G. & Murphy, M.** 2000. Characterisation of tannins and in vitro protein digestibility of several *Lotus corniculatus* varieties. *Animal Feed Science and Technology*, 87: 41 - 56.
- Hintz, R. W. & Mertens, D. R.** 1996. Effects of sodium sulfite on recovery and composition of detergent fiber and lignin. *Journal of AOAC International*, 79: 16 - 22.
- Horwitz, W.** 1993. International coordination and validation of analytical methods. *Food Additives and Contaminants*, 10: 61 - 69.
- Jackson, F. S. , McNabb, W. C. , Barry, T. N. , Food, Y. L. & Peters, J. S.** 1996. The condensed tannin content of a range of subtropical and temperate forages and the reactivity of condensed tannin with ribulose - 1, 5 - bisphosphate carboxylase (Rubisco) protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 72: 483 - 492.
- Jones, R. J. & Palmer, B.** 2000. In vitro digestion studies using ^{14}C - labelled polyethylene glycol (PEG) 4000: comparison of six tanniniferous

- shrub legumes and the grass *Panicum maximum*. *Animal Feed Science and Technology* 85, 215 - 221.
- Jones, W. R. , Broadhurst, R. B. & Lyttleton, J. W.** 1976. The condensed tannins of pasture legume species. *Phytochemistry*, 15: 1407 - 1409.
- Kawamura, O. , Wang, D. S. , Liang, Y. X. , Hasegawa, A. , Saga, C. , Visconti, A. & Ueno, Y. 1994. Further survey of aflatoxin M1 in milk powders by ELISA. *Food and Agricultural Immunology*, 6: 465 - 467.
- Key, P. E. , Patey, A. L. , Rowling, S. , Wilbourn, A. & Worner F. M.** 1997. International proficiency testing of analytical laboratories for foods and feeds from 1990 to 1996: the experiences of the United Kingdom food analysis performance assessment scheme. *Journal of AOAC International*, 80: 895 - 899.
- Krueger, C. G. , Dopke, N. C. , Treichel, P. M. , Folts, J. & Reed, J. D.** 2000a. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of polygalloyl polyflavan - 3 - ols in grape seed extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 1663 - 1667.
- Krueger, C. G. , Porter, M. L. , Wiebe, D. A. , Cunningham, D. G. & Reed, J. D.** 2000b. Potential of cranberry flavonoids in the prevention of copper-induced LDL oxidation. Freising-Weihenstephan (Germany), September 11 - 15, 2000. *Polyphenols Communications*, 2: 447 - 448.
- Lakin, A. L.** 1978. Determination of nitrogen and estimation of protein in foods. In R. D. King, ed. *Developments in Food Analysis Techniques*. Vol 1, pp. 43 - 74. Applied Science Publishers, London.
- Lanari, D. , Pinosa, M. , Tibaldi, E. & D'Agaro, E.** 1991. Risultati di due ring test condotti sulla composizione chimica di alcuni alimenti e sulla digeribilità in vivo. *Zootecnica e Nutrizione Animale*, 17: 285 - 295.
- Li, Y-G, Tanner, G. & Larkin, P.** 1996. The DMACA-HCl protocol and the threshold proanthocyanidin content for bloat safety in forage legumes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70: 89 - 101.
- Lowry, J. B. , McSweeney, C. S. & Palmer, B.** 1996. Changing perceptions of the effect of plant phenolics on nutrient supply in the ruminant. *Australian Journal of Agricultural Research*, 47: 829 - 842.

- Madsen, J. & Hvelplund, T.** 1994. Prediction of in situ protein degradability in the rumen. Results of a European ringtest. *Livestock Production Science*, 39: 201 – 212.
- Madsen, J. , Hvelplund, T. & Weishjerg, M. R.** 1997. Appropriate methods for the evaluation of tropical feeds for ruminants. *Animal Feed Science Technology*, 69: 53 – 66.
- MAFF.** 1986. The analysis of agricultural materials. Reference Book 427. 3rd edition. HMSO. 248pp.
- Maier, E. A. , Griepink, B. , Quevauviller, P. , De Angelis, L. & Muntau, H.** 1990. Certified reference materials-hay powder (CRM 129) and rye grass (CRM 281) -for the quality control of analysis of animal feed. *Mikrochimica Acta (Wien)* III, 87 – 99.
- Marais, J. P. J. , Mueller-Harvey, I. , Brandt, E. V. & Ferreira, D.** 2000. Polyphenols, condensed tannins and other natural products in *Onobrychis viciifolia* (Sainfoin) . *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 3440 – 3447.
- Makkar, H. P. S. , Dawra, R. K. & Singh, B.** 1987. Protein precipitation assay for quantitation of tannins: determination of protein in tannin-protein complex. *Analytical Biochemistry*, 166: 435 – 439.
- Makkar, H. P. S. , Blümmel, M. , Borowy, N. K. & Becker, K.** 1993. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 61: 161 – 165.
- Matthews, M. A. , Haverley, M. & Betteridge, J. W.** 1996. Immunoassays for the detection of organophosphorus pesticides on stored grain: assessment of three commercially available kits and recommendations for laboratory and field use. Home-Grown Cereals Authority, London, UK. Project Report No. 122. 46 pp.
- Mauricio, R. M. , Mould, F. L. , Dhanoa, M. S. , Owen, E. , Channa, K. S. & Theodorou, M. K.** 1999. A semi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Animal Feed Science and Technology*, 79: 321 – 330.

- McQueen, R. E. & Nicholson, R.** 1979. Modification of the neutral detergent fibre procedure for cereals and vegetables by using α -amylase. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 62: 676 – 680.
- Midkiff, V.** 1984. A century of analytical excellence. The history of feed analysis, as chronicled in the development of AOAC official methods, 1884 – 1984. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 67: 851 – 860.
- Minson, D. J.** 1990. Forage in ruminant nutrition. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Moore, K. I. & Hatfield, R. D.** 1994. Carbohydrates and forage quality. Chapter 5. In G. C. Fahey, M. Collins, D. R. Mertens & L. E. Moser, eds. Forage quality, evaluation, and utilization, pp. 229 – 280. American Society of Agronomy, Madison, WI, USA.
- Morgan, M. R. A.** 1995. Monitoring safety of plant foods: immunodiagnostics for mycotoxins and other bioactive compounds. Chapter 10. In J. H. Skerritt & R. Appels, eds. New diagnostics in crop sciences, pp. 215 – 242. CAB International, Wallingford, UK.
- Mueller-Harvey, I.** 1999. Tannins: their nature and biological significance. Chapter 3. In J. C. Caygill & I. Mueller-Harvey, eds. Secondary plant products-antinutritional and beneficial actions in animal feeding, pp. 17 – 39. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- Mueller-Harvey, I.** 2001. Analysis of hydrolysable tannins-a review. *Animal Feed Science Technology* (in press) .
- Mueller-Harvey, I. & McAllan, A. B.** 1992. Tannins-their biochemistry and nutritional properties. In I. M. Morrison, ed. *Advances in plant cell biochemistry and biotechnology*, Vol 1, 151 – 217. JAI Press, London.
- Mueller-Harvey, I. , Reed, J. D. & Hartley, R. D.** 1987. Characterisation of phenolic compounds, including flavonoids and tannins, of ten Ethiopian browse species by high performance liquid chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 39: 1 – 14.
- Murray, I.** 1993. Forage analysis by near infrared reflectance spectroscopy. In A. Davies, R. D. Baker, S. A. Grant & A. S. Laidlaw, eds. *Sward*

- management handbook, pp. 285 - 312. British Grassland Society, Reading, UK.
- Norris, K. H. , Barnes, R. F. , Moore, J. E. & Shenk, J. S.** 1976. Predicting forage quality by infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Animal Science*, 43: 889 - 897.
- Okuda, T. , Yoshida, T. & Hatano, T.** 1989. New methods of analyzing tannins. *Journal of Natural Products*, 52: 1 - 31.
- Park, R. S. , Agnew, R. E. & Barnes, R. J.** 1999a. The development of near infrared reflectance spectroscopy calibrations for undried grass silage and their transfer to another instrument using multiple and single sample standardisation. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 7: 117 - 131.
- Park, R. S. , Agnew, R. E. , Gordon, F. J. & Barnes, R. J.** 1999b. The development and transfer of undried grass silage calibrations between near infrared reflectance spectroscopy instruments. *Animal Feed Science and Technology*, 78: 325 - 340.
- Patey, A.** 1996. Quality in quantities. *Chemistry in Britain*, 32: 35 - 37.
- Pell, A. N & Schofield, P.** 1993. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro. *Journal of Dairy Science*, 76: 1063 - 1073.
- Petterson, D. S. , Harris, D. J. , Rayner, C. J. , Blakeney, A. B. & Choct, M.** 1999. Methods for the analysis of premium livestock grains. *Australian Journal of Agricultural Research*, 50: 775 - 787.
- Porter, L. J. , Hristich, L. N. & Chan, B. G.** 1986. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry*, 25: 223 - 230.
- Puigdomènech, A. , Tauler, R. , Casassas, E. & Aragay, M.** 1997. Modeling near infrared instrument differences by chemometric methods: testing for near infrared forage analysis. *Analytica Chimica Acta*, 355: 181 - 193.
- Reed, J. D.** 1986. Relationships among soluble phenolics, insoluble proanthocyanidins and fiber in East African browse species. *Journal of Range Management*, 39: 5 - 7.
- Reed, J. D. , Horvath, P. J. , Allen, M. S. & Van Soest, P. J.** 1985. Gravi-

metric determination of soluble phenolics including tannins from leaves by precipitation with trivalent ytterbium. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36: 255 - 261.

Reed, J. D. , Krueger, C. , Rodriguez, G. & Hanson, J. 2000. Secondary plant compounds and forage evaluation. Chapter 20. In D. I. Givens, E. Owen, R. F. E. Axford & H. M. Ohmed, eds. *Forage evaluation in ruminant nutrition*, pp. 433 - 448. CABI Publishing, Wallingford, UK.

Reynolds, C. K. , Sutton, J. D. & Beever, D. E. 1997. Effects of feeding starch to dairy cattle on nutrient availability and production. In: P. C. Garnsworthy & J. Wiseman, eds. *Recent advances in animal nutrition*, pp. 105 - 134. Butterworths, London.

Schingoethe, D. J. 1991. Pyproduct feeds: feed analysis and interpretation. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 7: 577 - 584.

Schneider, E. , Dietrich, R. , Martlbauer, E. , Usleber, E. & Terplan, G. 1991. Detection of aflatoxins, trichothecenes, ochratoxin A and zearalenone by test strip immunoassay: a rapid method for screening cereals for mycotoxins. *Food and Agricultural Immunology*, 3: 185 - 193.

Schofield, P. , Mbugua, D. M. & Pell, A. N. 2001. Analysis of condensed tannins: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* (in press) .

Shenk, J. S. & Westerhaus, M. O. 1995. The application of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to forage analysis. Chapter 10. In G. C. Fahey, M. Collins, D. R. Mertens & L. E. Moser, eds. *Forage quality, evaluation, and utilization*, pp. 406 - 449. American Society of Agronomy, Madison, WI, USA.

Shenk, J. S. , Westerhaus, M. O. & Abrams, S. A. 1989. Protocol for NIRS calibration: monitoring analysis results and recalibration. In G. C. Marten, J. S. Shenk & F. E. Barton, II, eds. *Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS): analysis of forage quality*, pp. 104 - 110. *Agric. Handbook No. 643*. USDA - ARS. U. S. Government Printing Office, Washington, DC.

Silanikove, N, Shinder, D, Gilboa, N, Eyal, M. & Nitsan, Z. 1996. Polyethylene glycol binding to plant samples as an assay for the bio-

- logical effects of tannins: predicting the negative effects of tannins in Mediterranean browse on rumen degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 3230 - 3234.
- Simonne, A. H. , Simonne, E. H. , Eitenmiller, R. R. , Mills, H. A. & Cresman III, C. P.** 1997. Could the Dumas method replace the Kjeldahl digestion for nitrogen and crude protein determinations in foods? *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 73: 39 - 45.
- Skerritt, J. H. & Appels, R.** 1995. An overview of the development and application of diagnostic methods in crop sciences. Chapter 1. In J. H. Skerritt and R. Appels, eds. *New diagnostics in crop sciences*, pp. 1 - 32. CAB International, Wallingford, UK.
- Stewart, J. L. , Mould, F. & Mueller-Harvey, I.** 2000. The effect of drying treatment on the fodder quality and tannin content of two provenances of *Calliandra calothyrsus* Meissner. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1461 - 1468
- Strong, F. C. III & Duarte, A. M. A.** 1992. A room-temperature, rapid method for the determination of protein in wheat and other grains by the biuret reaction. *Cereal Chemistry*, 69: 659 - 664.
- Tanaka, T. , Sueyasu, T. , Nonaka, G-I. & Nishioka, I.** 1984. Tannins and related compounds. XXI. Isolation and characterization of galloyl and p-hydroxybenzoyl esters of benzophenone and xanthone C-glucosides from *Mangifera indica* L. *Chem. Pharm. Bull.* , 32: 2676 - 2686.
- Terrill, T. H. , Windham, W. R. , Evans, J. J. & Hoveland, C. S.** 1990. Condensed tannin concentration in *Sericea lespedeza* as influenced by preservation method, *Crop Science*, 301: 219 - 224.
- Thiex, N. , Smallidge, R. & Beine, R.** 1996. Sources of error in vitamin A analysis. *Journal of AOAC International*, 79: 1269 - 1275.
- Trucksess, M. W. , Stack, M. E. , Nesheim, S. , Park, D. L. & Pohland, A. E.** 1989. Enzyme-linked immunosorbent assay of aflatoxins B1, B2, and G1 in corn, cottonseed, peanuts, peanut butter, and poultry feed: collaborative study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 72: 957 - 962.

- Trucksess, M. W. , Young, K. , Donahue, K. F. , Morris, D. K. & Lewis, E.** 1990. Comparison of two immunochemical methods with thin-layer chromatographic methods for determination of aflatoxins. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 73: 425 - 428.
- Undersander, D. Mertens, D. R. & Thiex, N.** 1993. Forage analyses procedures. National Forage Testing Association, Omaha, NE. [也可登陆网址: <http://www.uwex.edu/ces/forage/nfta/ndfiber.htm>]
- Von Holst, C. , Pallaroni, L, Björklund, E. , Unglaub, W. & Anklam, E.** 2000. Control of appropriate heat treatment of animal waste using the ELISA technique: validation and calibration of an analytical method. In: *Proceedings of the 6th International Feed Production Conference. Food Safety: current situation and perspectives in the European Community.* 27 - 28th November 2000. Pisa, Italy. pp. 96 - 105.
- Van Soest, P. J. , Robertson, J. B. & Lewis, B. A.** 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74: 3583 - 3597.
- Walker and Brookman.** 1998. Guidelines for the in-house production of reference materials. LGC/VAM/1998/040. LGC plc, Teddington, UK. 32 pp.
- Waterman, P. G. & Mole, S.** 1994. Analysis of phenolic plant metabolites. Blackwell, Oxford.
- Watson, C. A.** 1994. Official and standardized methods of analysis. 3rd edition. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK. 778 pp.
- Weigert P. , Gilbert, J. , Patey, A. L. , Key, P. E. , Wood, R. & Barylko-Pikielna, N.** 1997. Analytical quality assurance for the WHO GEMS/ Food EURO programme-results of 1993/94 laboratory proficiency testing. *Food Additives and Contaminants*, 14: 399 - 410.
- Williams, A.** 1996. Measurement uncertainty in analytical chemistry. *Accreditation and Quality Assurance*, 1: 14 - 17;
- Willis, R. B. & Allen, P. R.** 1998. Improved method for measuring hydrolyzable tannins using potassium iodate. *Analyst*, 123: 435 - 439. Wilson, T. C. & Hagerman, A. E. 1990. Quantitative determination of ellagic

- acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38: 1678 - 1683.
- Wiseman, J. & Cole, D. J. A.** 1990. *Feedstuff evaluation*. Butterworths, London.
- Wrigley, C. W.** 1999. Potential methodologies and strategies for the rapid assessment of feed-grain quality. *Australian Journal of Agricultural Research*, 50: 789 - 805.
- Yanagida, A. , Kanda, T. , Shoji, T. , Ohnishi-Kameyama, M. & Nagata, T.** 1999. Fractionation of apple procyanidins by size-exclusion chromatography. *Journal of Chromatography*, 855: 181 - 190.
- Zeeman & Bonn.** 1995. Carbohydrates. In A. Townshend, ed), *Encyclopedia of analytical science*, Vol. 1. pp 451 - 525. Academic Press, London.

附 录 1

1. 欲获详情，请参考以下有用网址（教学和培训）

<http://www.lgc.co.uk/best/terp/terpindex.htm>

http://www.agric.rdg.ac.uk/Facilities/FAL/FAL_frame-set.htm

《认证和质量保证》是一本有关化学测量的质量、可比性和可靠性的杂志。

2. 分析方法相关网址

饲料测定方法：http://www.dfrc.wisc.edu/foragetesting_nfta.html

单宁分析方法：<http://miavx1.muohio.edu/~hagermae/>

2.3 与有证标准物质相关的参考地址和网址

National Institute of Standards & Technology

Standard Reference Materials Programme

Building 202, Room 204

Gaithersburg, MD 20878 - 9950, USA

The Office of Reference Materials

Laboratory of the Government Chemist

Queens Road

Teddington

Middlesex TW11 0LY, U. K.

e-mail: orm@lgc.co.uk

<http://www.lgc.co.uk>

Promochem Ltd
6 South Mundells
Haslemere Industrial Estate
Welwyn Garden City
Herts AL7 1EP, U. K.
Fax: +44 1707 396 677
Breitlaender Eichproben und Labormaterial
GmbH
Postfach 8046
4700 Hamm 3, Germany
Fax: +49 2381 403 189
National Institute for Environmental Studies
Japan Environment Agency
P O 16 - 2 Onogawa
Tsukuba
Ibaraki 305, Japan
Fax: (0298) 51 6111

2.4 与环实验或功能验证方案有关的地址和网址

National Forage Testing Association, USA:
[http: //www. dfrc. wisc. edu/foragetesting _
nfta. html](http://www.dfrc.wisc.edu/foragetesting_nfta.html)
Dr V Houba
Department of Soil Science and Plant
Nutrition
Wageningen Agricultural University
P O Box 8005
6700 EC Wageningen/ The Netherlands
Fax: +31 8370 83766

Dr A. Eijgenraam

Bedrijfslaboratorium voor Grond-en

Gewasonderzoek

Postbus 115

6860 Oosterbeek, The Netherlands

Fax: 0031 26 333 7831

(注明: 每年仅供非商业实验室使用的两种饲料样本)

ALASA

P O Box 14105

Verwoerdburg 0140

Republic of South Africa

Fax: +27 12 664 1431

Dr A. L. Patey

FAPAS Secretariat

Ministry of Agriculture, Fisheries and Food

Food Science Laboratory

Norwich Research Park

Colney

Norfolk NR4 7UQ, U. K.

Fax: +44 1603 501 123

2.5 与认证有关的网址

[http: //www. european-accreditation. org](http://www.european-accreditation.org)

[http: //www. aoac. org/techprog/Intro98. htm](http://www.aoac.org/techprog/Intro98.htm)

[http: //www. ukas. com/](http://www.ukas.com/)

[http: //www. info. gov. hk/itc/eng/quality/hkas/hkas..shtml](http://www.info.gov.hk/itc/eng/quality/hkas/hkas.shtml)

饲料成分的变化及其对畜牧业生产的影响

G. Gizzi 和 D. I. Givens

ADAS 营养科学研究室

埃文河畔斯特拉特福

英国

为了精确地满足牲畜的营养需求，了解饲料成分对于营养学家非常关键；为了生产平衡配合饲料，了解饲料成分对于饲料生产商非常关键；为了安排牧草生产，了解饲料成分对农民也非常关键；为了指导这样一类战略，即确保一种具有竞争性、可持续性、环境友好性、食品安全性的农业战略，了解饲料成分对于政策制定者也同样非常关键。饲料成分表、饲料成分数据库以及饲料营养价值都可以提供这些信息。但是，只有当这些数据采集能提供及时而可靠的信息时才有价值。饲料特性的相关数据可能会受到不同类型偏差所影响。从营养学、经济学以及环境学的角度看，如果使用不精确的、低内在偏差和高外在偏差的饲料数据，就会对畜牧业生产造成伤害。

1. 引言

为了满足牲畜的营养需求，精确了解饲料成分是非常必要的。在当今充满竞争的市场环境下（对质量、效率以及环境的要求越来越高），当人们努力通过为动物制备平衡饲料这种方式而使畜牧业获得高的生产水平时，饲料成分信息就显得尤其重要。为了将不同成分按照正确比例混合，生产出有价值的复合饲料，

那么了解饲料成分就显得非常必要。最终，了解原料的化学特性和营养价值，这对于在农场中规划牧草生产就显得非常关键，因为作物生产需要与动物需求相平衡。Topps (1989) 已对饲料成分的一般性内容进行了综述。

从政治角度考虑，饲料成分以及营养价值的相关数据，可以为政策制定者同意将这些相关数据用到发展一个具有竞争力的、可持续的农业上而提供一些关键信息。

饲料通常用其化学成分和营养价值来描述。每种饲料的组成成分的相关信息一般通过化学分析来获得，一般都包括这样一些参数，即干物质含量、蛋白质含量、纤维组分含量、有机物质和脂肪含量。每种饲料的营养价值可以通过动物实验来评价（体内消化率/原位消化率等），同时通过解释一系列成分的输入和输出间差异，提供一些饲料是如何消化和代谢的相关信息。在这些成分当中，可消化的/可降解的有机物质以及可消化或可代谢的能量值，是数据库中最常用的数据，这些数据可以用来预测饲料和日粮的能量供应。

为了提供化学的和营养方面的信息，需要在实验室和基于动物的研究中进行饲料分析，所得数据都收集在饲料成分表中，而且这项数据收集工作已达 200 多年之久。最早报道被出版的数据是 1809 年 Thaer 得出的。最近，数据收集工作已被编入计算机程序中，构建了饲料成分数据库。1963 年，在美国犹他州立大学 (Harris, Asplund 和 Crampton, 1968) 诞生了第一个在电脑上可用的数据库。如今，现代数据库已经成为一个强有力的工具，利用它可以快速地检索、分类、更新和打印数据。

2. 数据来源

饲料成分和营养价值信息在农场、饲料生产商和政府层面上都起着非常重要的作用，因此，输入到数据库的数据信息必须可信且质量高。数据的质量首先取决于数据信息的来源，这些数据

信息可以从文献中提取获得，从实验室里采集得到以及从其他数据库中获得，也或者专门从动物研究和饲料分析中产生。

从文献资料中汇集数据

文献中的饲料信息往往更多地集中在所获数据值上，并不对饲料本身进行全面描述 (Leche, 1983)。当饲料信息描述不充分或者不正确时，容易产生混淆它们真实来源的风险。举个典型的例子：出版物通常涉及产品“暗酒糟”，它是威士忌蒸馏工业中的一种副产品，这类副产品会根据蒸馏工艺类型而定，它们可能来自大麦（麦芽蒸馏工艺），也可能来自小麦或者玉米（谷物蒸馏工艺）。在这种情况下，一个真实存在的遗传变异就会被忽略掉。两种产品成分明显不同，因此，提供饲料来源的附加信息非常关键；仅仅指出是“暗酒糟”是远远不够的。如果缺少这些附加信息，当试图获取大麦暗酒糟的具体蛋白质含量时，就会从数据库中检索大麦和小麦/玉米暗酒糟的平均蛋白质含量的数值，但是这个数值是没有意义的。因此，从文献中获取的数据往往是不合适的，特别是当使用数据的平均值时，因为这个平均值可能错误地将不同饲料合并在了一起。仅仅当没有其他数据来源时，才推荐使用文献中的数据。

从实验室里采集数据

当编译饲料信息数据库时，所用的数据往往来源于多家实验室。在汇集所采集的这些数据时，非常有必要了解用于数据收集的分析流程等相关特定信息，以保证这些用于数据库建立的数据是通过标准化的方法获取，并以标准化单元形式表达，因此所得数据也就能够用于比较分析。

对那些通过体内消化率或者原位降解率研究所获取的饲料营养价值数据进行标准化，这个问题是尤其重要的。在这种情况下，所涉及的实验室和研究单位，都应该有一些开展动物研究的标准化流程，同时还要加上严格的分析问题。所有这些都与动物的数量和种类（羊、牛、猪等）有关，也与所使用的饲喂与数据

采集协议有关。但是，当进行体内和原位研究时，不管操作的标准水平达到何种程度，实质上结果总会受到动物个体差异的影响。

用于收集实验室数据的标准化分析流程需要受到持续监控，所产生的数据也需要进行准确性和相关性检验。为此，需要在所参与的实验室间进行环实验，目的是用来评价标准技术或者新开发技术的精确度 (Barber, 1983; Fisher, 1983)。

合并新旧数据

将新旧数据库合并在一起是一种常用做法。在这些情况下，为了在共同基础上产生被表达的信息，了解获取数据的分析流程将是十分重要的，因此说这样的数据信息才具有可比性。分析方法的演化是一个重要的话题。旧数据可能是用现在已淘汰的方法获得的，或是由现在仍在使用的分析流程获得的，但是，这些现在仍在使用的分析流程，在过去所产生的数据精确度可能没有现在高。因此，把新数据和旧数据合并在一起可能是不妥当的，这样做可能会降低信息的整体质量。

针对数据库使用而产生的数据

针对数据库使用而产生的数据可能是最高质量的数据，因为所有的必要信息都包括在内，所用方法也经过了标准化和检验。饲料的化学组成可以用最新的标准方法来分析，并通过选择合适的动物品种和动物生理状态来进行动物研究的合理设计。饲喂方案和数据采集方案也可以被设定，其目的是为了满足不同数据库的特定需求。

理想状态下，应该是通过专门分析饲料的组成，并通过动物研究分析来研究它们的营养价值，从而构建出一个完整的数据库。通过这样一种方法，可以将那些由外部因素产生的偏差（如分析方法和动物指南）降到最低。另外，当利用单一来源的数据时，就需要保证所用技术和分析流程是精确的，并具有代表性的，这一点非常关键。然而，如果要包含有代表性的信息，数据

库必须用一定数量的样本来进行构建。由于饲料分析花费很多，特别是在进行动物测定时，因此，几乎没人专门为构建数据库而生产饲料信息。再者，获取数据也需要耗费大量的时间，特别是那些需要从动物研究中获得的数据。因此，数据往往从那些前面所列的不同来源中进行提取。最后，数据库管理者有责任去判断何种信息应该被包括在里面，以便构建一个有意义的数据库。

3. 数据偏差的来源

饲料信息与不同的偏差来源和不同的偏差类型有关。偏差可能是“内在的”，是由饲料间的真正差异造成，比如饲料的遗传性起源，也或者是应用到饲料上的加工工艺。偏差也可能是“外在的”，是由取样过程和分析流程的差异造成的。

数据的内在偏差

每种饲料都有其独特的化学特性和营养特性，以区别于其他饲料。但是，同类饲料也可能取自于不同的栽培品种，或者受到地理位置的影响。此外，同一原料也可经多种途径进行加工，进而产生不同的产品。多种多样的与小麦相关的原料，为将源于同一原料的饲料区别开来，提供了一个清楚的需求指示。小麦材料的术语包括小麦、硬粒小麦、冬小麦、春小麦、小麦粉和小麦暗酒糟。所有这些产品和副产品都以小麦为基础，但它们的化学成分和营养特点却很不一样，因此，估计它们会对所饲喂的动物产生不同效果。

在汇编数据库时，为了不影响数据质量，需要确保对那些由饲料内在特性所引起的真实偏差进行正确识别，这一点非常必要。饲料数据库的信息常常以平均值（或“合并数据”）的形式被检索，因此，为了获得有意义的信息，必须谨慎地将饲料合并在一起。为了实现数据的可靠性，饲料的精确描述和正确命名是非常关键的。为此，需要提供所有可用信息，比如，饲料类型、饲料来源、饲料加工工艺等。

一个很重要的属性容易被人忽略，那就是关于牧草成熟阶段的信息。正如图 1 所示，中性洗涤纤维（NDF）和淀粉的含量，与青贮玉米的成熟阶段具有很强的相关性，这点明确反映在作物干物质（DM）含量上，它随着成熟度的提高而升高。因此，在这种情况下，仅仅简单地把在不同阶段收获的玉米材料描述为青贮玉米是不正确的；不同的成熟阶段应该予以注明，在此基础上，对不同类型的产品进行分类。

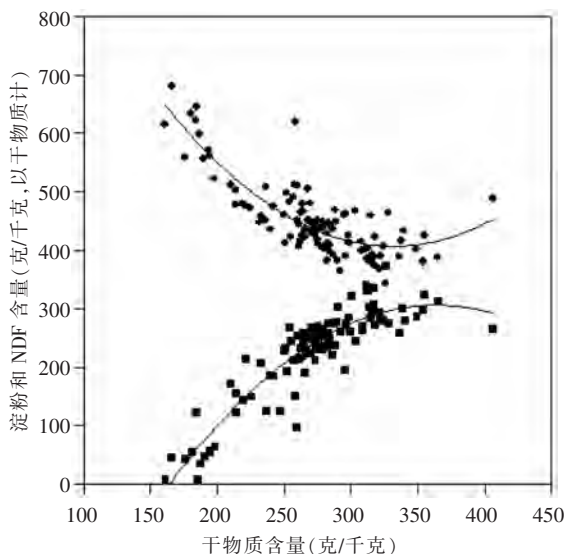


图 1 成熟阶段、中性洗涤纤维（NDF）
和玉米淀粉含量之间的关系

关于饲料加工工艺，当介绍比如米糠粕的数据时，就很有必要知道这种米糠粕是如何获得的，而且在它的生产过程中，都使用了哪些加工工艺。在表 1 的例子中，至少有两种不同类型的产品（压榨和提取的米糠粕）需要加以区分，因为它们的特点是化学组成不同，相应地它们的营养价值也就有所不同。

表 1 提取和压榨的米糠粕：分析和营养的差异

	提取粕	压榨粕
分析数据库参数		
干物质（烤箱烘干，以鲜重计）	896	902
粗蛋白（克/千克，以干物质计）	54	128
中性洗涤纤维（克/千克，以干物质计）	450	370
乙醚提取物（克/千克，以干物质计）	7.3	90
反刍动物的数据库参数		
代谢能（兆焦/千克，以干物质计）	7.1	10.9
干物质消化率系数	0.48	0.63
有机物消化率系数	0.55	0.70

资料来源：Van Vuuren 和 Meijs, 1987。

从表 1 中可以看出，提取的米糠粕，其生产工艺与压榨的米糠粕工艺相比，会导致很低的脂肪含量（提取的为 7.3 克/千克，压榨的为 90.0 克/千克，以干物质计），这样将会对代谢能值造成一个直接影响。非常明显，如果不特别指出所使用的工艺，两种类型米糠粕的值就会被平均，最终得到的结果值将是没有意义的。

另一个更为简单的例子是与用在牧草上的农场处理工艺有关。干草是通过将牧草干燥获得的，但是，干燥工艺可以是将物质“晾干”或者将物质“烤干”。不同的处理工艺会导致干草所含成分不同。比如，相关的粗蛋白含量可能会在晾制干草（122 克/千克，以干物质计）和烤制干草（99 克/千克，以干物质计）之间发生变化（MAFF, 1986）。这种情况下，了解应用到牧草上的处理工艺类型的相关信息将是非常必要的，目的是保持两种饲料的区别性特征，进而也就避免了错误平均值的产生。

数据的外在偏差

不同的实验室或是在同一个实验室内，分析程序都有可能存

在一些差异。如果没有被明确，这些差异就会对那些从这个数据库中检索的信息造成不好影响，因为这个数据库将对在不同基础上所提供的数值加以比较。在这一方面，数据库一个重要的缺陷就与它们可提供给使用者的数据类型和质量密切相关。

通常来讲，不同实验室采用的分析方法的多样性是造成绝大多数数据库外在偏差的主要因素 (Barber, 1983)。只有根据获取数据的所用分析方法进行聚类处理时，才能比较放心地去比较或者平均这些参数。举个例子，用高锰酸钾处理方法估算木质素含量 (根据 Goering 和 Van Soest 于 1970 年建立的方法) 和用溴化乙啶的处理方法估算木质素含量 (根据 Morrison 于 1972 年建立的分析方法)，并把所得结果进行平均处理，是错误的。因为两种处理方法在测定木质素含量时，不但给出了不同的结果，而且它们的表示单位也不一样。因此，将两者的数值进行合并和比较即使可行，也是不正确的。近年来，Beever 和 Mould (2000) 研究发现，提交给九个不同实验室处理所得玉米青贮料的粗蛋白和淀粉含量差异很大。其中，测定的玉米青贮料的粗蛋白含量为 57~119 克/千克 (以干物质计)，而淀粉含量则为 165~272 克/千克 (以干物质计)。调查结果显示，这些实验室所用的方法不同，其中推测某些实验室甚至可能使用了近红外光谱技术 (NIRS)。

数据偏差还往往发生在饲料营养价值的数据上，这些数据是通过体内和原位动物实验获得的。动物品种可能是导致这种内在数据偏差的原因之一。人们尤其通常的做法是把通过在羊和牛 (通常定义的“反刍动物”) 中进行测量所获得的数据作为基础，将饲料的营养价值进行分类。两种牲畜的食糜流通速率不同，因而它们的饲料利用率也就有实质性差异。其他一些偏差的产生通常由于缺乏同一物种不同生理状态间的差异性信息 (例如，干奶期和泌乳期奶牛，生长期和肥育期猪)。这些生理性差异对所获得的数据也有很大的影响。当这些生理状态信息没有记录时，将

会对这些数据的质量产生不良影响。另外，利用非标准化的饲养和粪便采集流程也会对所获得的结果产生实质性影响。

广泛用在测定瘤胃饲料降解率的原位方法，受多种偏差来源影响。1995 年 Huntington 和 Givens 对这些问题进行了综述，原位方法已经成为许多环实验的主题。比如，Madsen 和 Hvelplund (1994) 对如下内容进行了报道：即在欧洲 23 个研究所对 5 种精饲料的蛋白降解率用原位方法进行了评价。尽管所得平均数值与公开报道的数值相近，但不同研究机构给出的结果的可再现性却很差。环实验特别强调：需要对制袋材料和后期洗涤程序进行标准化。最后一个偏差来源（就平均数据而言），与选取的饲料样本数量有关，由于这些样本数量变化较大，因而也就造成了所合并的数据其代表性不稳定，或强或弱。

总之，为了获得关于饲料成分和营养价值的高质量数据库，通常需要将内在偏差记录下来，材料间的差异也需要明确标明。实际上，如果不同饲料没有被合并或者被平均，而是保持了其各自特征，那么这种做法将非常重要。另外，应当尽量将外在偏差降到最小，因为当几个标准程序应用到大量样本上时，与把大量方法应用到少数样本上的处理方法相比，前者所得的数据更有代表性和使用性。

4. 数据偏差的影响

使用从低质量饲料数据库中所获得的信息（高外在偏差和低内在偏差）可能会产生各种影响，这主要取决于数据库的终端用户（比如，动物营养学家，混合饲料生产商，农场主以及政策制定者）。总的来说，在这方面，外在偏差对数据质量的影响要比内在偏差大。

针对动物营养学家

分析饲料成分，费用昂贵且耗时。通过研究动物来获得的营养值也特别费力。因此，通常情况下，营养学家不可能支付所涉

及的每种饲料的分析费用，他们经常需要对一个营养值进行基本评估，而且这样的评估都是以那些容易获取且价格低廉的信息为基础的。

动物学家负责设计动物日粮。由于外在偏差太大，所以将会导致饲料数据信息不可信，进而引起的最重要的后果是：将会制订出一个营养不均衡的日粮。根据营养学、环境学和经济学方面的因素，这样的信息将会造成多种不同的影响结果；由于优化饲料利用率将会导致动物产出和经济回报的最大化，所以这些影响结果也高度相关。

营养影响。如今，通过估算供给动物的能量，就可以利用饲料营养信息来预测动物的生产性能（经常用复杂模型）。将低质量数据整合到分析模型中，将会造成对动物生产性能的估算不可信。此外，主张将那些通过体内测定获取的营养值数据与通过化学成分预测获取的营养值数据分开，也是非常重要的。

环境影响。由不均衡日粮所导致的最常见的环境影响就是氮损失。特别是对于反刍动物，氮的获取量取决于微生物蛋白的生产率，并且与在瘤胃中的碳水化合物和能量的可利用性有关。因此，当特征性描述一种饲料产品时，了解它的可降解氮（与碳水化合物和能量的可利用性一起）的准确量是非常重要的，因为这样可以为合成所需的氮量提供信息支持，避免氮流失到环境中。

表 2 给出了一个示例，该示例阐述了瘤胃中的氮转化效率是如何受饲料中氮素水平影响的。在这个示例中，氮素摄取量的差异仅仅是因为饲料中草料的粗蛋白含量的差异所引起的。肠道中的氮吸收量、氮素转化成牛奶蛋白量以及氮素在粪便和尿液的损失量，这三者之间的平衡都明显地由瘤胃对这种养分的获取能力而决定。在该示例中，当氮摄取量增加大约 25% 时，尿液中的氮损失量将增加 80%。因此，不同饲料中即便有很小的氮含量差别，也会造成氮素大量流失到环境中去。

表 2 奶牛在不同氮水平饲喂条件下的氮平衡

氮摄取量 (克/天)	氮排出 (分泌) 量 (克/天)		
	牛奶	粪便	尿液
626	107	158	361
494	118	178	198

资料来源: Van Vuuren 和 Meijs, 1987。

经济影响。举个例子, 假如一头奶牛一天饲喂 5 千克玉米谷蛋白, 所提供的代谢能为 1.8 兆焦/千克 (以干物质计) (AFRC, 1993 年推荐的标准), 一群奶牛共有 100 头, 那么, 每天就需要向这群奶牛提供 5 310 兆焦代谢能。当所提供的代谢能水平为 12.8 兆焦/千克 (以干物质计) 时 (MAFF, 1986), 那么, 每天就需要向这群奶牛提供 5 760 兆焦代谢能。在一个 200 天的饲喂期内, 代谢能供应量的差值将是 90 000 兆焦, 这相当于节约了大约 8 吨的配合饲料, 或者节约成本 2 500 美元。

就动物健康、饲料转化率以及最后的动物产品的产出量来说, 不平衡日粮还有可能会造成一定的经济损失。饲料中养分配比不合理, 将直接影响到牛奶生产 (在牛奶产量和质量方面), 并对生产效益产生直接影响。在快速生长的家禽上, 这种影响最为明显, 因为即便是养分平衡的微小变化, 也可能导致重大的经济后果。

对于配合饲料生产商

配合饲料是将各种原材料和/或副产品混合在一起制成的。在设计这些产品时, 饲料生产商需要找到不同原料的平衡组合, 以满足在特定生理状态下的特定动物的需要。为了达到此目的, 饲料生产商首先需要根据饲料的化学成分以及营养价值等方面的可利用信息作出一些基本的采购决定。因此, 在此阶段获得有代表性的、可靠的饲料数据信息非常重要, 不只是这样, 还可以对所用原料的经济价值进行评估, 并与它的市场价格进行比较。

再者，产品的不同成分构成需要被测定，其营养价值也需要被评估，但是却不能获取正确的初始值，这也将最终导致生产成本的提高以及销售给农民的配合饲料量降低。

对于农场主

为了满足动物需求，农场主需要布局作物生产。因此，农场主需要提前了解假定要用的各种组分的化学特性和营养特性等相关信息，然后根据这些信息对各种牧草进行合理组配，并选择相应用量。如果信息失准，所产作物将不能提供一个均衡的养分配比（比如，蛋白质太多，可利用的碳水化合物太少等）。最直接的后果将会得到一种不合适的动物日粮，进而影响到动物生产，同时，也必须从市场上再购买一些原饲料中所缺失的养分来弥补其不足。

对于政策制定者

为了能够指导国家或者地区制定一种有竞争力的、可持续性的农业相关政策，政策制定者需要一些可靠信息。很显然，如果评估是建立在不准确信息之上的，政策制定者不可能作出一些既可靠又可行的决定。

政策制定者利用这些低质量数据所产生的进一步影响与饲料的内在偏差有关，当然也与所用原料特征的真实差异有关（遗传差异或原料加工工艺所引起的差异）。这些差异可能由于不同国家所采用的饲料描述和命名方式不同而引起的。这样一来，就会在饲料贸易中产生一些疑虑，并对饲料出口政策的制定和执行造成一定困难。

由于饲料描述和定义缺乏协调一致性，这也是国家间许多问题经常发生的根源，特别是在欧盟（EU）成员国之间。历史上，语言和科学障碍已经造成了在饲料鉴定、命名以及描述上的很多显著差异，因此，经常造成一些错误性的偏差，因为同一名字可能用在不用饲料上，也或者不同名字用在了相同饲料上。国家间如果能提供统一而可靠的饲料数据和信息，那么这样做不但有利

于饲料的公平贸易，还将有利于开展在饲料效率、产品质量和环境方面的动物营养研究合作。至少这样做，对于正确应用关税和贸易总协定（GATT）以及执行欧盟农业政策是必须的。在欧盟内部，已经通过采取多项措施制定了一种常用方法，用以描述和命名饲料（ENFIC，1996）。

5. 结论

由于饲料的遗传构成以及加工工艺不同（饲料的内在偏差），所以就会导致饲料本身发生变化。与这些因素相关的信息、遗传差异明显的饲料以及在不同条件下加工的饲料，都应该分别进行鉴定和记录下来，这一点非常重要。否则，会导致数据被错误地平均和统一，因而，这样的数据所提供的信息也就没有任何意义。引起数据偏差的另一个根源是获取数据信息的方法上的差异（饲料的外在偏差）。由于所参与的实验室和研究机构不同，所以化学分析程序以及动物研究规程也就有可能不同。如果想要获取可靠信息，那么就应该将这种类型的偏差降到最低程度。

为了使饲料信息达到绝对的可靠，在将那些与饲料化学和营养特征相关的信息整合到数据库之前，需要先对它们进行仔细核查，一旦将这些信息整合到数据库中，就需要对它们进行认真管理。否则，将会在饲料间造成错误偏差，最终在预测动物生产性能 and 环境影响时产生误差，并对动物产品的经济效益造成不良影响。

参考文献

- AFRC. 1993. Energy and protein requirements of ruminants. An advisory manual. AFRC Technical Committee on Responses to Nutrients. Wallingford, UK, CAB International. p. 136.
- Barber, W. P. 1983. Data quality: how it is assessed and improved and what affects it. In G. E. Robards & R. G. Packham, eds. Feed information and

- animal production, pp. 57 - 78. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, UK.
- Beever, D. E. & Mould, F. L.** 2000. Forage evaluation for efficient ruminant livestock production. In D. I. Givens, E. R. Owen, R. F. E. Axford & H. M. Omed, eds. Forage evaluation in ruminant nutrition, pp. 15 - 42. Wallingford, UK. CABI Publishing.
- ENFIC.** 1996. EU concerted action animal feed and nutrition. European Network of Feed Information Centres (ENFIC) at Internet address: home.wxs.nl/~enfic/
- Fisher, C.** 1983. Acquisition and assessment of data on the amino acid composition of feedingstuffs. In G. E. Robards and R. G. Packham, eds. Feed information and animal production, pp. 285 - 289. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, UK.
- Givens, D. I. , Cottyn, B. G. , Dewey, P. J. S. & Steg, A.** 1995. A comparison of the neutral detergent-cellulase method with other laboratory methods for predicting the digestibility in vivo of maize silage from three European countries. Animal Feed Science and Technology, 54: 55 - 64.
- Goering, H. K. & Van Soest, P. J.** 1970. Forage fibre analysis. Agriculture Handbook No. 379. Washington, DC, United States Department of Agriculture (USDA) .
- Harris, L. E. , Asplund, J. M. & Crampton, E. W.** 1968. An international feed nomenclature and methods for summarising and using feed data to calculate diets. Utah State University Agricultural Experiment Station Bulletin No. 479, November 1968.
- Huntington, J. A. & Givens, D. I.** 1995. The in situ techniques for studying the rumen degradation of feeds: a review of the procedure. Nutrition Abstracts and Reviews, (series B) 2 (65): 64 - 93.
- Leche, T.** 1983. How data are acquired by feed information centres: problems and solutions. In G. E. Robards and R. G. Packham, eds. Feed information and animal production, pp. 34 - 36. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, UK.
- Madsen, J. & Hvelplund, T.** 1994. Prediction of in situ protein degradability

- in the rumen. Results of a European ring test. *Acta Agric. Scand.*, Suppl. 25: 103 - 124.
- MAFF.** 1986. Feed composition: UK tables of feed composition and nutritional value. Marlow Bottom, UK, Chalcombe Publications for the Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (MAFF) .
- Morrison, I. M.** 1972. A semi-micro method for the determination of lignin and its use in predicting the digestibility of forage crops. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 23: 455 - 463.
- Thaer, A.** 1809. Grundsätze der rationelle Landwirtschaft. Vol. 1 Section 275. Berlin, Germany, die Realschulbuchhandlung.
- Topps, J. H.** 1989. Databases of feed composition and nutritive value. In B. A. Stark, J. M. Wilkinson and D. I. Givens, eds. Ruminant feed evaluation and utilisation, pp. 41 - 50. Marlow Bottom, UK, Chalcombe Publications.
- Tran, G. & Lapière, O.** 1998. The French feed database: a national network. Paris, INAPG.
- Van Vuuren, A. M. & Meijs, J. A. C.** 1987. Effects of herbage composition and supplement feeding on the excretion of nitrogen in dung and urine by grazing dairy cows. In H. G. van der Meer, R. J. Unwin, T. A. van Dijk and G. C. Ennik, eds. Animal manure on grassland and fodder crops. Fertilizer or waste?

体外产气法评价饲料资源 营养品质的最新研究进展

Harinder P. S. Makkar

动物生产及卫生司

粮农组织/国际原子能机构核技术联合署

国际原子能机构

奥地利，维也纳

本文重点介绍了一种新方法的发展潜力，该方法利用体外瘤胃发酵技术来评价饲料资源的营养价值。这项技术可以用于饲料或者饲料组分的筛选，以便获得在瘤胃中的高的微生物蛋白合成效率和高的干物质降解率，并为饲喂策略的发展提供基础，以便把底物最大化地固定在微生物细胞内。这样会增加肠道内的蛋白供给量，减少反刍动物甲烷生产量。此外，这项技术为研究各种植物活性成分或者合成化合物的作用提供了一种简便工具，而且它们的作用指的是将养分分配给发酵气体、短链脂肪酸和微生物量时的不利或有利作用。

1. 引言

在发展中国家中，畜牧生产中一个主要限制因素就是全年饲料供应量不足，波动大，饲料质量不稳定。为牲畜提供充足的优质饲料，以提升并保持它们的生产能力，是世界范围内所有农业科学家和政策制定者所面临的主要挑战。世界人口的增长以及世界经济的快速发展都将导致动物产品需要量的增长；在未来 20 年内，肉和奶产量预计将会增长 30% 左右。同时，对于粮食作

物的需求量也将增长。饲喂数百万牲畜并保证它们食品安全的未来梦想，这将需要依靠提高非常规资源的利用效率来实现，而这些非常规资源通常不被用做人类的食物，但可以用做动物的食物。另外，世界上大面积的土地是已退化的、荒芜的或边远的土地，而且此类土地面积每年都在增加。这就要求人们去鉴定和引入一批新的、几乎不为人们所了解的植物，它们既可以在贫瘠的土壤里生长，又对控制土壤流失起着非常重要的作用，而且还可以提供食品和饲料。在发展中国家，饲喂牲畜的主要原料是农业的副产品，它们含有高比例的木质纤维素，比如，谷物秸秆、干草、甘蔗副产品以及类似的其他饲料。这些饲料的蛋白质、能量、矿物质以及维生素含量都很低。往这些饲料中添加树叶、籽粕或者尿素，为瘤胃微生物提供氮源，进而改善这类低质量粗饲料的利用率。利用一些简单而稳定的技术手段来评价这些饲料资源的营养品质，将有利于提高它们的利用效率。

反刍动物的生长量和产奶量，很大程度上受饲料质量限制，饲料质量问题主要反映在自愿采食量低以及消化率低等问题上。动物营养中这些参数的重要性已经为人们所长期关注。测定体内的饲料采食量和消化率，耗时、耗力，价格也高，另外还要消耗大量饲料，不适合进行大规模的饲料评估。因此，人们尝试着用实验室技术来预测饲料采食量和消化率。多种尝试都集中在了开发回归方程上，通过使用这些回归方程来预测饲料化学组分的消化率。但至今为止，还没有开发出一个令人满意的回归方程对多种多样的牧草作出预测。

本文重点介绍了这样一种新方法的利用前景，即该方法主要利用了体外瘤胃发酵技术对传统和非传统饲料资源进行营养品质的评估。

2. 饲料资源的评价

日粮平衡的最新研究进展包括：饲料处理，其目的是为了提

高转运到小肠中的蛋白质及能量的数量和质量。多纤维饲料的选择是基于瘤胃中的高的微生物蛋白合成效率和高的干物质降解率之上的，而饲喂策略的发展是基于瘤胃中的高的微生物蛋白合成效率和高的微生物蛋白合成量之上的，这样将会提供更多的过瘤胃蛋白。除了最通常意义上的干物质消化率外，饲料评价的概念还有另外一个要素，那就是微生物蛋白合成效率。在发展中国家的大多数饲喂制度下，过瘤胃蛋白的有限供应量是限制动物生产能力提高的一个重要限制因素。

以微生物标记物的使用量为基础，目前有许多方法可用来测定瘤胃中的微生物蛋白净合成量。这些方法都要求使用安装了瘤胃瘻管的动物来测定食糜流量。瘻管技术比较复杂，在发展中国家的多数研究条件下，其使用会受到多种限制（Chen 等，1990）。IAEA 等于 1997 年开发了一项简单技术，用来测定肠道内的微生物蛋白供给量，此技术是建立在测定尿嘌呤衍生物总量基础之上的。另外，此技术在联合 FAO/IAEA 协调研究计划下正在进行全面研究（IAEA，1998）。尽管此方法是基于尿液采集基础之上来测定嘌呤衍生物的（针对牛的尿囊素和尿酸，针对羊的尿囊素、尿酸、黄嘌呤和次黄嘌呤），但是这项技术可以通过使用现场采集尿液样本这种方式，来得到进一步简化。这项技术不需要瘻管动物，但需要在研究状态下将日粮饲喂给动物，因此，这项技术不太适合大规模样本的筛查，或者说也不适合利用各种饲料组分发展饲料添加剂策略。

体外法

降解饲料的体外实验室评估法对于反刍营养学家非常重要。一个有效的实验室方法，应该具有可重复性，并且应该与体内实际测量参数值有较好的相关性。体外法具有很多优点，比如，它非常廉价、省时，而且还能把实验条件控制得更精确（与体内法相比较）。目前有 3 个重要的生物降解技术可用来测定反刍动物饲料的营养值：1) Tilley 和 Terry (1963) 建立的瘤胃微生物消

化法，或者是 Menke 等人 1979 年建立的产气法；2) 瘤胃尼龙袋的样品原位培养法 (Mehrez 和 Orskov, 1977)；3) 无细胞真菌纤维酶法 (De Boever 等, 1986)。这些生物方法都非常有意义，因为微生物法和酶法，与化学法相比，对于影响消化率和消化程度的影响因素更敏感 (Van Soest, 1994)。多年来，尼龙袋技术一直都被用来提供饲料组成的消失率和消失程度的估算值。这项技术提供了一个非常有用的、可用来估算饲料和饲料组分消失率和潜在瘤胃降解率的方法，同时也将瘤胃颗粒物质的通过率的效果考虑在内。这种方法的缺点在于：一次只能估算少数几个饲料样品，并且它要求至少有 3 个瘘管动物来解释由动物本身所导致的偏差。因此，在实验内进行大批量样本筛查时，这种技术的作用就显得非常有限。此项技术要求投入很多的人力和大量的样本。由于在消化早期阶段，重量损耗较低，在这种情况下得出的数值可能出现重要误差；针对劣质粗粮，如果在滞后期不把动力学模型考虑在内，那么早期阶段微生物的吸附就会导致更高的重量，因此，将会对结果造成曲解 (McDonald, 1981; Dhanoa, 1988)。

Tilley 和 Terry 于 1963 年建立的技术现已被广泛应用，因此此技术非常便利，尤其在需要对大范围饲料进行测定时更是如此。这种方法被许多饲料评价实验室应用，此方法包括两个步骤：首先，把饲料放在含有瘤胃液的缓冲液（含有瘤胃液）中发酵 48 小时；随后，在酸性溶液中用胃蛋白酶消化 48 小时。后来，Goering 和 Van Soest (1970) 对该方法进行了修改，即在培养 48 小时后将残留物用中性洗涤液进行处理，以便估算真正的干物质降解率。尽管 Tilley 和 Terry 用体内法所测定的数值进行了广泛地验证 (Van Soest, 1994)，但此方法还存在一些缺点。这种方法是一个终点测定法（仅仅给出一个观察值），所以，除非进行漫长的、劳动密集型的过程研究，否则，这项技术并不能提供关于饲料消化动力学方面的信息；残留物测定对样本造成

了破坏，因此，需要进行大量的重复实验。另外，这种方法很难应用到像组织培养样品或者细胞壁组分的类似材料上。

Tilley 和 Terry 技术与尼龙袋技术都是基于残留物测定的基础之上的，因此，在测定富含单宁的饲料时，可能会造成对干物质消化率进行过高的估算，因为单宁在两个体系中都能溶解，但却不能被消化，所以，对于动物的养分供给并没有太多作用 (Makkar 等, 1993)。

体外产气法

气体测量技术已广泛用于评估饲料的营养价值。由于该项技术在研究发酵动力学时有一定的优势，所以最近对粗饲料的有效利用关注度也在不断增加，这也就促使了此项技术的广泛应用。气体测定方法可以提供一些关于饲料可溶和不可溶成分的消化动力学方面的有用数据。目前多个研究小组都使用了多种气体测定技术和体外产气法。关于这些方法的优点和缺点，Getachew 等人 (1998a) 已对此进行了探讨。基于注射器的体外产气法 (Menke 等, 1979; Blümmel 等, 1997) 似乎最适合在发展中国家使用。其他体外方法，比如 Tilley 和 Terry 技术与尼龙袋技术都是基于重量测定基础之上的，它们是跟随底物的消失而进行的 (这些物质对于发酵可能有帮助，也可能无帮助)，而气体测定法主要是集中在发酵产物的出现上 (具有可溶解性，但却不是可发酵的产品，对气体产生无作用)。在产气法中，可研究单个样品的发酵动力学，因而只需少量样本就可以了，或是一次性对大量样本进行评估。体外产气法与萨克法相比，在评价单宁效果或者其他抗营养因子时更有效。在萨克法中，当这些因子从尼龙袋内释放出来后，它们在瘤胃中得到稀释，因此，很明显对瘤胃发酵没有什么影响。此外，体外气体法还能更好地监控营养-抗营养间以及抗营养-抗营养间的相互作用 (Makkar 等, 1995a)。

下面介绍一种简单的体外法，它具有方便、快捷的特点，能一次处理大量样本。这种方法是基于这样一个基础之上的，即用

体内标记法或者体外标记法对降解底物或者所产生的微生物蛋白进行定量分析,对基于注射器的体外瘤胃发酵系统所产生的气体或者短链脂肪酸(SCFA)进行定量分析(Menke等,1979)。另外,这种方法不需要高端的设备或者使用大量动物(仅需要一只或者最好是两只瘘管动物),并且以干物质降解率和微生物蛋白合成为基础,来筛选饲料或者饲料组分。

在Menke等(1979)开发的方法中,发酵实验是在一个100毫升标定玻璃注射器中进行的,里面装有饲料和瘤胃缓冲液。根据200毫克饲料干物质进行24小时培养后所产生的气体以及其他化学成分的水平情况,来预测有机物消化率(可通过体外法测定)和可代谢能。

对于粗饲料,它们关系式为:

$$ME(\text{兆焦/千克,以干物质计}) = 2.20 + 0.136Gp + 0.057CP, R^2 = 0.94$$

$$OMD(\%) = 14.88 + 0.889Gp + 0.45CP + 0.0651XA, R^2 = 0.92$$

式中,ME代表可代谢能;DM指干物质,OMD代表有机物消化率;CP指粗蛋白含量;XA指灰分含量;Gp是指200毫克干物质进行24小时培养后所产生的净气体体积(用毫升表示),并且这项数值是利用霍恩海姆标准对瘤胃溶液活性的日变化进行校正处理后得出的。

Aiple等(1996)比较了3种用于预测饲料净能含量(以基于体内消化率的方程来估算)的方法(酶法、粗养分法以及气体测定法)。比较结果发现,在预测单一饲料的净能含量时,气体测定法优于另外两种方法。

Menke等人于1979年开发的分析方法,被Blümmel和Ørskov(1993)进行了修正,他们把饲料放在一个温控水浴锅里进行培养,而不是放在培养箱内转子上。Makkar等(1995b)和Blümmel等(1997)对此法进行了进一步的改动。他们把样

本量由 200 毫克提高到 500 毫克，增加了两倍体积的缓冲液，因此，培养体积也从原来的 30 毫升（Menke 等，1979）提高到改动后的 40 毫升。在 30 毫升的体系中，当气体的总体积超过 90 毫升时，由于培养基缓冲液会被耗尽，培养底物量与产气体量之间的线性关系将会消失；在 40 毫升的体系中，只有当气体的体积超过 130 毫升时（Getachew 等，1998b），这种线性关系才会消失。缓冲液的耗尽将导致培养基 pH 降低；最终，发酵将受到抑制。如果在 30 毫升体系中产气量超过 90 毫升，或者在 40 毫升体系中产气量超过 130 毫升，应该减少所培养的饲料量。

改进后的方法（40 毫升体系，在水浴锅里培养），其主要优点包括：1）在记录水浴锅中的培养注射器上的气体读数过程中，培养基的温度下降的非常小。这在研究发酵动力学时非常有用，因为在发酵过程中，气体体积需要每隔一段时间就要进行记录；2）由于水浴锅中含有大量的水，它具有很高的保温能力，即使在短时间内发生电力中断，这样也能避免培养温度剧烈降低情况的发生；3）增加样本量（从 200 毫克增加到 500 毫克）可以降低固有误差的产生，而且这些固有误差与重量测定方法有关，并且这些重量测定法可用来测定相伴的体外表观消化率和真实消化率（详见以下介绍）。

当饲料与缓冲瘤胃液体外培养时，碳水化合物就会被发酵，产生短链脂肪酸、气体和微生物细胞。气体的产生主要是碳水化合物发酵成醋酸盐、丙酸盐和丁酸盐的结果。蛋白发酵时所产生的气体量与碳水化合物发酵时多产的气体量相比，相对较少。脂肪对产气量的贡献可以忽略不计。当培养 200 毫克椰子油、棕榈仁油和/或者大豆油时，仅仅产生 2.0~2.8 毫升的气体，而相同量的酪蛋白和纤维素培养时则可产生 23.4~80 毫升的气体。

产气技术中所产生的气体是由发酵产生的直接气体，而通过缓冲液缓冲短链脂肪酸（SCFA）所产生的气体则是间接气体。对于粗饲料来说，当利用碳酸氢盐缓冲液时，将会有 50% 左右

的气体是通过缓冲液缓冲 SCFA 得到的, 其余气体则是由发酵直接产生的。当丙酸盐浓度较高时, 通过缓冲液缓冲 SCFA 所产生的 CO_2 气体量约占总产气量的 60%。通过发酵而产生的每摩尔短链脂肪酸, 能使缓冲瘤胃液释放出 0.8~1 毫摩尔的 CO_2 , 这主要取决于磷酸盐缓冲液当前使用量。短链脂肪酸与产气量之间具有显著相关性 (参见下文)。

气体主要是在底物发酵成醋酸盐和丁酸盐时产生的。底物发酵而产生丙酸盐时, 可以通过用缓冲液缓冲酸而产生一些气体, 因此, 较低的产气量与丙酸盐的产量有关。伴随丙酸盐产生而释放的气体只是通过用缓冲液缓冲丙酸盐而生成的一种间接气体。所产生的不同摩尔百分比的短链脂肪酸与底物类型有关。因此, 醋酸盐与丙酸盐的摩尔比率常被用来评价与底物相关的一些差异。与醋酸盐相比, 可以快速发酵的碳水化合物可以产生较高摩尔百分比的丙酸盐。当发酵缓慢的碳水化合物被培养时, 则会产生较低摩尔百分比的丙酸盐。许多工作人员发现, 在饲喂高谷物含量日粮的奶牛中, 它们的瘤胃液中含有更多的丙酸盐和较低的醋酸盐/丙酸盐比率。如果饲料发酵时产生高比率的醋酸盐, 将会伴随着更多的气体产生 (相对于高丙酸盐含量的饲料来说)。也就是说, 短链脂肪酸比率的变化将会反映到产气量的变化上面。

在瘤胃缓冲液中, 不管聚乙二醇 (一种单宁络合剂) 是否存在与否, 通过培养谷物秸秆 (Blümmel 和 Ørskov, 1993), 多种饲料 (包括许多乳制品复合饲料以及它们单独的饲料组分, 这些组分的蛋白和脂肪含量具有很大的波动性) 以及含单宁的草料所产生的气体 (Getachew 等, 2000a), 都与按 Wolin (1960) 化学计量法推算的短链脂肪酸产量有密切关系。化学计量式如下:

发酵产生的 $\text{CO}_2 = A/2 + P/4 + 1.5B$, 其中 A 、 P 和 B 分别代表醋酸盐、丙酸盐和丁酸盐的摩尔数。

发酵产生的 $\text{CH}_4 = (A + 2B) - \text{CO}_2$, 其中 A 和 B 分别代

表醋酸盐和丙酸盐的摩尔数。 CO_2 指的是在上一个公式计算得出的 CO_2 值。

假设：1 摩尔 SCFA 从以碳酸氢盐为基础的缓冲液（缓冲 CO_2 ）中释放 1 摩尔 CO_2 ，可以说成是缓冲的 CO_2 ，那么缓冲的 CO_2 毫摩尔数就等于在培养过程中所产生 SCFA 的总毫摩尔数。

气体体积 = 气体的毫摩尔数 $\times$ 气体常数 (R) $\times T$,

其中, R = 空气摩尔体积数/温度 (0 开尔文, K), 也就是说, $22.41 \text{ 升}/273 = 0.082$;

T = 培养温度 (开尔文); $273 + 39^\circ\text{C} = 312 \text{ 开}$

SCFA 生产的气体总量 = $(BG + FG) \times CF$, 其中, BG = 来自缓冲液缓冲 SCFA 而得到的气体体积 (毫升), FG = 发酵的气体体积 (毫升) ($\text{CO}_2 + \text{CH}_4$), CF = 海拔和气压的校正因子。霍恩海姆大学的海拔高度为 400 米, 校正因子为 0.953 (Blümmel 等, 1999)。(在霍恩海姆大学, 39°C 条件下 1 毫摩尔的气体体积是: $1 \times 0.082 \times 312 \times 0.953 = 24.4$ 毫升)。

关于气体生成的来源以及化学计量法的详细描述, 可以参考 Blümmel 等 (1997) 和 Getachew 等 (1998a) 撰写的文章。

在添加聚乙二醇或者未添加聚乙二醇条件下, 将含单宁草料培养 24 小时后, 所测量的体外产气量, 与用化学计量法推算的、产自短链脂肪酸的气体体积密切相关。将含有粗蛋白 (5.4% ~ 27%) 和苯酚化合物 (1.8% ~ 25.3% 的总酚和 0.2% ~ 21.4% 的相当于鞣酸的总单宁) 的草料培养 24 小时后, SCFA 产量 (毫摩尔) 与气体体积 (毫升) 之间的关系可以用下列公式来表示 (Getachew 等, 2000a):

在未添加聚乙二醇的条件下: $\text{SCFA} = 0.0239 \cdot \text{Gas} - 0.0601$;
 $R^2 = 0.953$; $N = 39$; $P < 0.001$ (I)

在添加 PEG 的条件下: $\text{SCFA} = 0.0207 \cdot \text{Gas} + 0.0207$; $R^2 = 0.925$; $N = 37$; $P < 0.001$ (II)

上述关系与用小麦秸秆获得关系式非常相似 (Blümmel 等,

1993)。

利用以上关系式,可以通过产气值预测 SCFA 产量。SCFA 产量水平可作为动物能量可用率的一个指标。为把饲料成分与生产参数以及与日粮的净能值联系起来,测定 SCFA 就显得非常重要。在发展中国家,对来自体外气体测定的 SCFA 产量水平的预测将会变得越来越重要,因为这些发展中国家的实验室,几乎没有现代化的设备来进行 SCFA 的测定。

如果已知 SCFA 的摩尔比和产量,就可以利用化学当量平衡法来推算出预期从瘤胃发酵中产生的 CH_4 和 CO_2 量。

发酵饲料的动力学,可以通过发酵产气量和缓冲液缓冲短链脂肪酸所释放的气体计算得到。产气动力学与饲料中可溶、不可溶但能降解和不能降解的部分所占的比例有关。通过对产气特性的数学描述可以分析数据、评价与底物和培养基相关的差异和饲料溶解成分及慢速发酵成分的降解率。研究者们已经建立了很多模型来描述产气特征。France 等 (1993; 2000) 把气体特征的模拟、底物损失量的估算以及瘤胃通过速率三者整合起来,得到瘤胃降解程度的估算值,因此,就把产气与在瘤胃中所发生的事件联系起来。

与微生物量测定相伴的体外产气法

微生物量测定。体外气体测定对于反刍动物的营养学家非常具有吸引力,因为用这种方法测定随时间而变的产气体积非常容易。但是,这种气体测量仅仅测定那些对营养没有价值和对环境有害的产物。在绝大多数研究中,产气速率和范围往往被错误理解成与底物(饲料)的降解速率和范围是相当的。当前营养学概念主要指高的微生物效率,仅仅测定气体是不够的。体外气体测定仅仅反映了 SCFA 的产量。SCFA 和微生物生产量的关系不稳定,这种不稳定体现在所产生的每单位 ATP 的生物量生产的变化上。这就使得气体体积(或者 SCFA 产量)和微生物生产量之间呈负相关,特别是当两者在真正被降解的每单位底物都有表

达时尤为明显。这就预示着，仅仅利用体外气体法测量气体来进行粗粮选择时，将会导致背离最大化微生物生产量的初衷。Blümmel 等 (1997) 研究显示，真正降解底物的伴随定量测定法与体外产气测定法的结合，是如何提供关于发酵产品分配的重要信息的。体外微生物生产量可以用以下公式计算：

微生物量 (毫克) = 真正降解的底物 (毫克) - [气体体积 (毫升) × 化学计量因子]

对于粗饲料，相应的化学计量因子为 2.20。

分配系数。上述公式里的参数也可以计算分配系数 (PF)。PF 的定义是：真正降解的底物与产生的气体体积 (毫升) 之间的比率 (这与 France 等 1993 年描述的回归参数 Y 是一样的)。

上述公式就变成了：微生物量 (单位) = 气体体积 (PF - 化学计量因子)。

含有高分配系数 (PF) 的饲料意味着有更多比例的降解物质被整合到微生物量当中，比如，微生物蛋白合成的效率是比较高的。高分配系数的粗饲料证明含有较高的干物质摄入量。不同体外分配系数值也反映了体内微生物蛋白合成状况，而且体内微生物蛋白合成的状况可以通过嘌呤衍生物 (PF 值越高，尿嘌呤衍生物排出也越高) (Blümmel 等, 1999b) 来估算，也可以通过反刍动物产生的甲烷量来推算 (PF 值越高，甲烷产出量越低) (Blümmel 等, 1999b)。以上结果表明，体外估算的 PF 值可以在预测干物质摄入量、瘤胃微生物生产量以及整个反刍动物的甲烷释放量方面提供有价值的信息。

真正降解底物的测定流程、化学计算因子的计算、SCFAs 和气体体积的关系，以及 SCFA 产量、ATP 产量以及微生物产量三者的关系，都可以在 Blümmel 等 (1997) 和 Getachew 等 (1998a) 所撰写的文章中找到。应该注意到，对于主要由结构性碳水化合物组成的底物来说，这些流程和关系是有效的。但这样的结果却不能扩展到其他底物，比如那些含有较高可溶碳水化合

物、蛋白或者脂肪的底物。Rymer 和 Givens (1999) 研究发现, 与 Blümmel 等 (1997) 前人的研究结果类似, 那些可以产出大量气体和 SCFA 的高质量饲料 (青贮饲料、小麦、玉米、糖蜜甜菜饲料和鱼粉), 每单位真正降解饲料所生产的微生物质量很低。

因此, 似乎有理由建议, 在饲料或饲料成分选择时, 应该选那些具有高的体外真消化率, 但是每单位真正被消化底物的产气量却比较低。Dijkstra 等 (2000) 通过利用体外气体参数, 描述了体外微生物蛋白合成的建模过程。

培养时间和 *PF*。除了又一次阐述了测定微生物量的重要性外, Blümmel 等 (1998a) 人还进行了另外一项研究, 他们强调, 测定微生物量时的发酵时间也是非常重要的。在这项研究中, 酶底物的降解和 3 种干草 (具有相似的体内消化率) 分配给 SCFA 的体外动力学, 微生物产量以及氨、二氧化碳和甲烷产量, 会在低氮和高氮水平条件下, 分别在培养 8、12、18 和 24 小时时进行调查。通过氮平衡 (Getachew 等, 2000b) 和嘌呤分析 (Makkar 和 Becker, 1999), 可以对微生物合成以重量法进行定量测定 (Blümmel 等, 1997)。SCFA 和气体产量之间是呈正相关关系 ($P < 0.0001$), 并且, 它们在低氮或者高氮水平条件下的所有培养时间里, 都是累积的。另外, 微生物量, 微生物氮产量和微生物嘌呤产量, 会在培养 12 小时后下降, 而氨产量则会增加。不管培养时间和培养基 (低氮或者高氮水平下) 如何, 单位降解底物、气体产量和 SCFA 产量总是与微生物量成负相关 ($P < 0.05$)。在后期的培养时间里, SCFA 产量或者气体产量的持续性地增加, 或者微生物量的持续性地减少, 这都反映了微生物的裂解, 很可能增加了微生物能量的消散。怎样把降解的底物分配给 SCFA 和气体, 以及如何在低氮和高氮培养基中把它们转化成微生物量, 这些在 3 种干草中的表现始终是不同的 ($P < 0.05$)。嘌呤分析结果显示, 不同处理之间在微生物组成上有着

根本性差异。这些差异也在一定程度上解释了不同微生物效率存在的原因 (Blümmel 等, 1998a)。

当富含单宁的饲料与单宁抑制因子 PEG 共培养或者单独培养时, 培养 16 小时的微生物生长效率比培养 24 小时的微生物生长效率要高。往培养基中加入氮, 也会影响培养 16 和 24 小时从含单宁的饲料中进行微生物蛋白合成的效率 (Getachew 等, 2000c)。为了正确描述饲料或者饲料成分的特征, 需要开发相应的技术手段来测量在一定培养时间内 PF 水平, 而在这样的培养时间内, 微生物的裂解应当保持在一个很低的水平。几种可能比较简易并值得探讨的、用于鉴定培养时间的方法如下: 1) 在最大产气量产生一半时的时间; 2) 在产气速率达到最大时的拐点 (在一定的培养时间内产气速率一直上升, 此后随培养进程呈现下降趋势)。以上两种参数都可以根据气体曲线图用数学方法来推算。关于培养基中的氮水平对 PF 的影响以及这些 PF 在体内的重要性, 都需要进一步的研究。

中性洗涤可溶物成分的消化动力学。气体测量法已经被用在了对饲料、富含淀粉饲料以及其他高消化率碳水化合物组分中的中性洗涤可溶物部分进行消化动力学研究。也就是, 从未分级的全价饲料的平均产气曲线中, 扣除可消化中性洗涤纤维的平均产气曲线, 就可以得到相关的中性洗涤可溶物部分的消化动力学结果 (Chen 等, 1999)。这种扣除流程将为低中性洗涤纤维含量的纤维饲料提供有用信息, 比如, 玉米粒 (Chen 等, 1999), 但它不适合用于富含中性洗涤纤维的草料分析 (Blümmel 等, 1998b)。Blümmel 等人 (1998b) 检验了全价粗饲料和所提取的中性洗涤纤维的发酵速率和发酵程度, 也检验了提取的中性洗涤纤维的干物质降解率, 还对全价粗饲料的 PF 以及 54 种粗饲料提取的中性洗涤纤维 (NDF) 的 PF 进行了分析。提取的 NDF 的 24 小时降解率比全价粗饲料的 NDF 降解率要高, 它们对应的 PF 值则是降低的 (2.5 对 3.1; 比如, 提取的 NDF 的微生物蛋

白合成效率较低)。与全价粗饲料相比,高降解率和低 PF 水平都促进了提取的 NDF 的更高气体体积的产生。添加氨基酸和糖(可溶物的最基本成分)可以增加发酵时(条件类似于未分化的饲料)来自于细胞壁的微生物合成效率,去除可溶部分会造成更低的微生物效率。对于通过扣除流程计算的动力学参数在体内的重要性来说,细胞可溶部分对于 NDF 的养分分配所产生的较大影响不禁让人心生疑虑。(Blümmel 等,1998b)。

随意采食量的预测。反刍动物利用粗饲料的一个主要限制因素就是随意采食量,因此,预测饲料采食量,特别是纤维粗饲料的采食量,是反刍动物营养学研究的重要方面之一。可以用体外产气量预测干物质采食量。众多学者均报道体外产气量与干物质采食量有显著的相关性。牧草细胞壁对通过瘤胃装料机制而进行的随意采食量有相当大的影响(Van Soest, 1994)。与全饲料的产气量相比,从饲料中提取的中性洗涤纤维的产气量与随意采食量的相关性更高。通过对比调查多个采食量预测模型后发现,把气体体积测量(4~8 小时)和随后的降解底物量的测定(>24 小时)结合起来计算,比单独基于产气动力学模型所得的结果要好。来自于 NDF 的体外产气量,比来自于全粗饲料的产气量,对干物质采食量的影响更大(82% 对 75%)(Getachew 等,1998a)。

饲料间的组合效应。通过单独培养基础日粮和补充饲料,或者将两者一起培养,利用气体测定法来研究基础日粮与补充饲料之间的组合效应,并且通过压力传感系统来检测不同培养时间段的产气量(Sampath 等,1995)。表明可以把很容易获得的易发酵材料来作为一种便捷能源,这将会提高瘤胃微生物的活性,从而促进粗饲料的降解。工作人员发现,当把基础日粮与补充饲料一起培养时,在培养的早期阶段,产气量可以直接反映两者的正组合效应。因此,根据作者的描述,这种手段可以用于研究补充饲料的协同作用。但是,需要明确指出的是,单纯的气体测定,将

会导致有歧义的结果（请参见以上内容）。因此，除了气体测定，还需要对这样的研究进行微生物生产量的测定。

含有单宁副产品和牧草的评价

用体内标记法或者体外标记法测定微生物量的必要性。很不幸，基于气体分析的方法和用于推算由纤维饲料所产生的微生物量的纤维素分析的去污剂系统，并不适用于富含单宁的饲料产品。富含单宁的饲料（按生产 1 毫升气体需 1 毫克真正消化的酶底物来推算），其 PF 值的范围为 3.1~16.1（Getachew 等，2000c），正好高于理论上的 PF 值范围（2.75~4.41）（Blümmel 等，1997）。高 PF 值产生的原因在于：a）饲料中单宁的增溶作用。这些单宁对系统中的气体或者能量没有贡献，但却能导致干物质的流失；b）细胞溶质会促进干物质的损失，但对气体的产生无效，因为单宁可以阻止气体的产生；c）将 a）和 b）两者结合在一起。另外，在真实残留物中的单宁-蛋白复合物（作为一种人造品），它的出现也让进行微生物量定量的比重测定法（Blümmel 等，1997）变得多余（Makkar 等，1997a）。从饲喂富含单宁饲料的动物获取的粪便样本（蛋白质的来源可能是微生物、饲料或者胃肠道的内生性分泌液）含有单宁与蛋白复合物，以及不能被纤维分析的去污剂系统（Van Soest 等，1991）进行去除的部分，都会导致对纤维值的误解，在对富含单宁的饲料进行体内评价时也会出现问题（Degen 等，1995；Makkar 等，1995c）。因此，在用纤维分析的去污剂系统对富含单宁的饲料进行体外或者体内试验评价时，需要非常小心地去解读这些结果。

对富含单宁的饲料进行体外评价，需要以二氨基庚二酸（DAPA）或者嘌呤为标志物，或者在微生物中掺入 ^{15}N 同位素，对微生物量进行定量分析（Makkar 等，1998a）。富含单宁饲料的 PF 可以用微生物量来表示，其微生物量是由产生每毫升气体量所使用的这些标记物来决定的（或者是产生每毫摩尔 SCFA）。开发用于评价含单宁饲料的系统主要取决于在含有或者不含有

PEG 条件下的饲料的培养 [PEG 相对分子质量 4 000 或者 6 000, 最好是 6 000 (Makkar 等, 1995b)], 以及用以上标记物测定的气体量 (或者 SCFA) 和微生物量。PEG 对单宁具有高亲和性。添加 PEG 将会形成 PEG-单宁复合物, 导致单宁失活。由于添加 PEG 而导致的气体 (或者 SCFA) 和微生物量的改变, 代表了总体的单宁效应 (生物效应), 可以作为瘤胃发酵参数的一种功能。基于体外瘤胃发酵系统的生物分析, 连同单宁络合剂的使用, PEG 在评价含单宁饲料的营养价值时可以与其他的单宁分析法互补。

结合单宁和微生物蛋白合成效率的重要性。以上介绍的方法 (把含有单宁的饲料培养在含 PEG 或者不含 PEG 的溶液中) 还可以用来研究可提取单宁和不可提取单宁 (结合单宁) 的营养重要性。在培养富含单宁的 NDF 过程中加入 PEG, 可以导致产气量的增加。这表明, 经瘤胃微生物降解的 NDF 释放出的单宁具有生物活性, 很可能会影响瘤胃发酵 (Makkar 等, 1997b)。重复用 70% 丙酮溶液提取富含单宁的枝叶进行培养后, 也得出了与上述类似的结果。

这种方法的另外一个应用, 就是研究单宁在微生物蛋白与 SCFAs (或者气体) 之间的营养分配, 或者研究瘤胃微生物蛋白合成的效率问题。利用 DAPA、嘌呤和 ^{15}N 的方法来测定微生物量时, 发现在 PEG 存在的情况下, 底物的降解率和微生物量的生产相对较高, 而微生物蛋白合成的效率则相对较低 (Makkar 等, 1995a, 1998a; Getachew 等, 2000b)。相似的结果也可以通过其他一些基于气体分析的方法和氮平衡法来获取, 而且在气体分析中, 常把氨的摄入率作为微生物蛋白合成效率 (Makkar 等, 1998a)。相反, 在单宁存在时, 微生物蛋白合成效率可能会更高。净微生物量的生产取决于可降解干物质的减少与微生物量生产的提高之间的平衡 (单宁存在条件下消化的单位干物质)。

对于富含单宁的饲料，此方法还被用来开发一种研究策略，以便通过提高微生物蛋白合成效率来提高微生物量的生产。掺入少量 PEG，然后在培养期间把它们分散开，可以提高微生物量生产的效率（Getachew 等，2000d），这被解读为将 PEG 包埋到饲喂舔砖中。动物舔这些舔砖时，会导致 PEG 在瘤胃中缓慢释放。这与用相同量的 PEG 直接饲喂动物相比，会使动物的生产能力得到提高（Ben Salem 等，1999）。

蛋白质的降解率。尽管从富含单宁的枝叶饲料和草本豆类饲料中得到的 24 小时体外可降解氮值与那些报道过的低质量粗饲料相比还比较低（Getachew 等，1998b；2000b），但是它们相对较高的粗蛋白含量对于瘤胃可降解氮的供给却起着非常重要的作用。在单宁抑制剂 PEG 的存在的条件下，它们的体外可降解氮值是升高的。在 PEG 存在和不存在条件下的体外可降解氮值之间的差异表明单宁在瘤胃中可以阻止一些蛋白被降解（Getachew 等，2000b）。受单宁保护而免于被微生物降解的蛋白质，是否完全通过动物的过瘤胃方式而被全部利用，这点还需要进一步的研究。Raab 等（1983）报道，当 17 小时后把培养终止后，体内和体外值之间存在一种紧密关系。普通蛋白饲料在被测试时发现，大约 80% 的 24 小时值会在开始培养的 8 小时内被降解，而在受保护的蛋白饲料中，则仅仅有 60% 左右的 24 小时值在此时间内被降解（Raab 等，1983）。针对含 PEG 和不含 PEG 的富含单宁饲料，其体外降解率的合适培养时间研究，取决于蛋白和单宁的性质，因此，对此需要进行鉴定。还有，对于受单宁保护而免于在瘤胃中被降解的饲料蛋白进行定量的这种方法，也需要进行体内验证。将聚丙烯酰胺凝胶与图像分析系统结合在一起分析测定发酵期间的饲料蛋白，将是另一个非常具有吸引力的测定氮的瘤胃降解率的方法，还可以研究不同自然植物产品（比如，单宁、皂苷、生物碱）的影响（Makkar 等，1997a，1998a，b）。

3. 气体法评价饲料时需要实际考虑的几个问题

浓缩饲料培养 16 小时和粗饲料培养 24 小时后，培养的终止点应该是在微生物产量最大的时候，针对大量的饲料样本，常规条件下很难对大量饲料评价实验进行确证。在进行动力学实验时，所用方法一次能分析 200 毫克的样本，并计算当气体产生一半时的时间 ($t/2$)。时间“ $t/2$ ”接近于微生物生产最大化的时间。这意味着，在真正测定被降解的有机物和微生物蛋白前（利用嘌呤或者 ^{15}N 法），还需要进行一项动力学实验。对于常规的饲料评价，浓缩饲料培养 16 小时粗饲料培养 24 小时是一个很好的折中方案。浓缩饲料培养 16 小时粗饲料培养 24 小时后，可以测定：

a) 实际有机物降解率和产气量（将称取的风干样品 375±5 毫克放在 30 毫升培养基中，此培养基中含有比 Menke 等人 (1979) 所用的用来估算可代谢能量和有机物降解率的常规培养高两倍浓度的碳酸氢盐离子。记录净产气量（含饲料注射器中的产气量体积减去空白对照中的产气量，就是净产气量，单位为毫升）。培养终止后，把注射器的内容物定量转移到一个大烧杯中，然后用中性消化溶液消化 1 小时（这样做的目的是为了使微生物溶解，仅获取那些未被降解饲料）。用二号坩埚过滤内容物，并用热水冲洗坩埚，直到把残渣中的去污剂全部洗净。在 130℃ 的温度条件下干燥坩埚 2 小时，或者在 100℃ 的温度条件下干燥坩埚 10 小时（过夜）。把坩埚转移到干燥器中后记录坩埚的重量数据。坩埚重量减去空坩埚的重量，就等于注射器中的那些未被降解饲料的重量。（注明：这种对处于被分级阶段残渣的测定方法并不适用于富含单宁的饲料或含有单宁-蛋白复合物或者人工添加单宁的样品，也不适用于淀粉含量高的饲料。有些淀粉在开始培养的 16 小时内不能被微生物降解，但却能在中性去污剂溶液中溶解。这样会导致低估真正处于被分级阶段的残渣数据）。需

要注意，这种测量处于被分级的残渣的所用方法不能用于培养的开始阶段（培养的 16 小时以内），因为在这段时间内，一部分处于被微生物分级阶段的饲料，可以在中性去污剂溶液中溶解。把这些残渣（处于被分级阶段的饲料）的重量用字母“a”来表示。现在把装有这些残渣的坩埚转移到马弗炉中，炭化样品。里面的有机物会消失，留下灰烬。把坩埚转移到烘箱后，称重所得数据减去空坩埚的重量，所得重量即为灰烬的重量，此处用字母“b”表示。也就是说， $a-b$ 就可以得到处于被分级的有机物。有机物的降解率用单位百分比表示。请注意，在计算有机物降解率时，需要有饲料样本的干物质和灰烬含量。这样，就可以计算在注射器中用于培养的 375+5 毫克的风干物质中的有机物。注射器中的有机物重量 = $(375 \times \text{DM 百分数}/100) - [375 \times (\text{DM 百分数}/100) \times (\text{灰烬百分数}/100)]$ ，或是注射器中的有机物重量 = $(375 \times \text{DM 百分数}/100) (1 - \text{灰烬百分数}/100)$ ，最后所得数值用字母“c”来表示。有机物质降解率的百分数 = $(a-b) 100/c$ 。

b) 对于绝大多数传统饲料资源（不是含有单宁的饲料或者富含淀粉的饲料成分），微生物量的生产可以在培养终止时进行计算。需要注意的是，这个计算方法不能用于培养的起始阶段（不能早于 16 小时）。

微生物量的产量（毫克） = $(a-b) - 2.2 \times \text{气体净体积}$ ；
 $(a-b)$ 的单位是毫克，2.2 是化学计量系数。

微生物量的产量效率 = $[(a-b) - 2.2 \times \text{气体净体积}] / (a-b)$ 。

c) PF 值的计算。PF 是用于测量微生物量的生产效率或者微生物蛋白的生产效率的一个标准。系数越高，效率也就越高。

$PF = \text{真正被降解的有机物量（毫克）} / \text{气体体积（毫升）}$

或者 $PF = c - (a-b)$ ，即，实际被降解的有机物/在特定注射器内产生的气体体积。在这个公式中， $c - (a-b)$ 的值已经

被推算出来，这个值就是 PF 值

PF 值的理论范围是 2.74~4.41。任何低于或者高于这个范围的数据都应该进行严格地评价。对于富含单宁的样本，通常 PF 的值高于 4.41。越高的 PF 值（比如 7.2）意味着 7.2 毫克真正被降解的有机物可以产生 1 毫升的气体。富含单宁的饲料样本的高 PF 值，可能与培养阶段的饲料中单宁的增溶有关。单宁的增溶造成了干物质损失，但不会影响气体生产。此外，单宁还可以通过抑制瘤胃发酵来抑制细胞溶质中的气体生产（细胞溶质也会造成干物质损失）。在真正被降解的有机物中存有单宁-蛋白复合物，也会造成真正被降解的有机物被低估，导致 PF 值出现错误。但是，在实际处于被分级阶段的材料中，单宁-蛋白复合物的存在可能会降低 PF 值。从含有单宁的样本中获得的 PF 值，是发酵过程中饲料成分增溶的净效应，但对于气体生产和实际未被降解残渣中单宁-蛋白复合体的存在没有影响。

d) 对于含有单宁的饲料，为了测定实际未被降解的有机物质，注射器中的内容物在培育后不用中性洗涤液消化。相反，注射器内容物也用来测定嘌呤和/或进行 ^{15}N 掺入研究。

微生物量的生产效率可以表示为：注射器中嘌呤的净重（毫克）/净产气量（毫升）（这两个值都需要用空白对照来进行校正）。

微生物量的生产效率还可以表示为：

明显处于被分级残渣中的 ^{15}N 重量（毫克或微克）/净产气量（这两个值都需要用空白对照来进行校正）。

如果有必要，可以把嘌呤的量转化成微生物氮值。转化的方法是，采集瘤胃液样本，在大约 17 000g 离心力条件下离心收集微生物沉淀，用去离子水洗一次，然后重新离心，最后进行冻干保存。对于已称重的冻干样品，可以先用硝酸盐沉淀嘌呤后，再通过高压液相色谱 HPLC 技术或者光谱光度法来进行测定。利用测定的嘌呤值比上微生物量所得比率，可以把嘌呤转化成微生

物量。如果需要把嘌呤转化成微生物氮，可以用凯氏定氮法来测定相同量的冻干样品中的 N 值；也可以把沉淀中的 N 值转化成氨，并通过硝普钠和次氯酸反应来测定氨（Makkar 和 Becker, 1999）。

注意：嘌呤只存在于微生物中，不在上清液中。但是， ^{15}N 却在两种状态下都存在，包括在明显未降解的残渣中和培育后的上清液中。因此，需要对明显未被降解的残渣中进行 ^{15}N 的掺入研究。通过把注射器内容物放到高速离心机上进行离心（17 000 g，20 分钟，4℃）后获得明显未降解的残渣，丢弃上清液，用去离子水洗涤，然后再次高速离心，丢弃上清液。所得沉淀进行冻干处理或者在真空干燥器里，50℃ 条件下干燥处理。残渣的重量应当是离心管和残渣的总重量，扣除空离心管重量后所得到的重量值。这个重量在稍后阶段的计算中需要考虑。残渣应当定量收集，并用球磨机进行充分研磨，最后研磨成非常细的粉末。除了测定 ^{15}N 外，还可以在此残渣中测定嘌呤。这部分重点介绍了此方法在含有单宁的饲料中的应用，但它却可以应用到其他任何一种饲料分析上。

e) 产气量可以用公式 (I) 和 (II)，把它转化成 SCFA 产量，单位毫摩尔。

f) 用 375 毫克样本产生的净气量值，转化从 375 毫克到 200 毫克干样本的气体值，或者直接把 200 毫克样本培养 24 小时，都可以估算体内可代谢能量以及有机物的消化率 (DOM)。

g) 在含有双倍碳酸氢盐离子浓度的 30 毫升培养基中，分别加入和不加入 PEG 6000 的情况下，培养 375 毫克样本，来测定单宁的活性（参照以上的“a”）；在 16 小时和 24 小时终止培养；在 16 小时和 24 小时培养时间里的测定结果为：

- 加入 PEG 与不加 PEG 相比，注射器内的产气量间的差异会加大（用百分数表示）；

- 加入 PEG 与不加 PEG 相比，注射器内的嘌呤量间的差

异会增加或者减少（用百分数表示）；

- 加入 PEG 和不加 PEG 相比，ME 和 DOM 值（200 毫克样本转化成气体值以后）以及加入 PEG 以后的 ME 值和 DOM 值得百分比变化（不加 PEG 的 ME 和 DOM 值当成是 100%）；

- 在加入 PEG 后，微生物蛋白的生产效率的变化，用嘌呤（毫克）（或 ^{15}N 结合量）/气体（毫升）来表示。

h) 分别培养 200 毫克的粗饲料样品 96 小时，和 200 毫克精饲料样品 72 小时后，测定气体产生的动力学数据。

i) 微生物氮（MN）可以用两种氮平衡法在培养后来进行测量（Getachew 等，2000b）。

第一种方法：

$\text{MN} = \text{TN} - (\text{NDF} - \text{N} + \text{氨} - \text{N})$ ，这里的 TN 表示总氮，换言之，就是培养前，注射器里的缓冲瘤胃液中的氮加上饲料氮。NDF - N 指的是在培养过程中附着在 NDF 组分上的氮，氨 - N 指的是培养过程中存在上清液中的氨 - N。在一个密闭的系统中，在开始培养时的总氮可能存在于任何培养时间内的微生物量、NDF - N、氨 - N 以及氨基酸中。在发酵过程中，上清液中还存在痕量的氨基酸和肽，因此，在计算微生物氮值时，它们可以忽略不计。

为了测定培养后附着在 NDF 组分上氮，要把注射器内容物转移到一个 600 毫升的烧杯中，并用 50 毫升体积的中性洗涤液（NDS）洗涤两次，倒入烧杯中。内容物回流 1 小时后，用预先柏油处理的二号过滤坩埚进行过滤。在 100°C 条件下，将坩埚过夜干燥，并称重。在 NDS 处理后，所培养的底物重量减去残留物重量后，所得数据就是真正的降解率。为计算 NDF - N 值，被 NDS 处理后（中性洗涤残留物，NDF）的残留物需要用微量凯氏定氮消化处理。

第二个方法是：

$\text{MN} = \text{APUR} - \text{N} - \text{NDF} - \text{N}$ ，在这里，APUR - N 指的是

培养后结合在明显处于分级阶段残留物上的氮。对于这些明显处于分级阶段残留物的制备，可以参照上文中的“d)”部分。结合在这个组分的氮值，可以利用类似于 NDF - N 的测定方法来计算。

根据明显处于分级阶段残留物的重量，也可以推算出其表观降解率。

产气法中应该做的和不应该做的事情

- 在从公司里购买到注射器后，应该立刻用钻石刀给柱塞做标记，同时也要给相应有刻度标记的外壳（套筒）部分做上标记（在打开装有注射器的箱子后，其中注射器是由柱塞和带刻度外筒组成的）。用钻石刀把注射器的这两个部件做上相同的数字标记。

- 注射器的柱塞应该用白凡士林进行充分润滑（培育 24 小时时应该涂少量的凡士林，96 小时以上时应该多涂些凡士林）。

- 从固态相和液态相中收集瘤胃液，并对其进行正确处理（使用暖热容器，用二氧化碳吹洗容器，并始终保持瘤胃液处在二氧化碳之中）。

- 还原性溶液应该在实验的当天进行配制。

- 在加入还原性溶液之前（大约 10 分钟），需要用二氧化碳对底物进行充分吹洗。在加入瘤胃液之后，以及在开始灌注注射器前，应该用二氧化碳至少吹洗底物 10 分钟。在灌注注射器时，也要一直用二氧化碳吹洗底物（在此阶段，气流量可以降低些）。

- 当把底物灌注到注射器中的时候，要密切注视底物（二氧化碳气体应该要冲洗到底物中，而底物也应该会出现搅动状态）。

- 把配制的 30 毫升培养基加入注射器后，通过拉动柱塞，使注射器内部呈现轻度真空状态，然后打开夹子。这个过程可以

使管嘴中的培养基回流到注射器内。否则，将会损失培养基或者待分析的样品。

- 当灌充完注射器后（需要 30~40 分钟），摇晃注射器。每隔 30 分钟摇晃一次，直到完成 2 小时的培养。此后，每 2 小时一次，直到完成培养的头 10 小时或者 12 小时。因此，在读取完气体体积后（24 小时、30 小时、36 小时、48 小时、60 小时、72 小时、96 小时），要摇晃注射器。要确保在搅拌时，所有饲料颗粒都被混入底物中（旋转振荡的做法可能会有些帮助）。

- 在灌装完注射器后，需要立刻用去离子水洗涤分液器，否则，分液器可能会翘起，而不能再次使用。

- 检查水浴锅中水的温度和水位，一天至少检查两次。

- 在回家之前的夜晚时间，如果注射器柱塞超过 80 毫升的位置，需要把它推回，并记录推前和推后的相应刻度。

- 当晚上推回柱塞时，应当在 30 分钟后进行摇动，以避免注射器柱塞的底部沾染样品，以及把样品弄到培养底物的外面。

- 使用二氧化碳气瓶时需要特别注意。当你不会操作时，要请教相关技术人员。错误操作会造成事故发生。

- 当记录气体体积读数时，要用使用标记在柱塞上的棕色环，而不是柱塞的底部。当读取气体刻度时，应保持注射器倒立状态，并使眼睛与其保持平行。读取完刻度后，应立刻把注射器放回到水浴锅中。

- 为了清洗注射器，注射器应该被清空（最好把柱塞拉回，从后面而不是喷嘴处，移除内容物）。应该移除夹子，把注射器的柱塞和外壳分开。柱塞上多余的凡士林，应当用棉纸或者软布擦掉，然后把两者转移到含有去污剂溶液的高温水浴锅中。用手拭擦柱塞，用一个软刷清外管的内部。用高温水彻底清洗柱塞和外管，最后用去离子水冲洗它们。再把称重的样品加入注射器前，彻底对注射器进行干燥。

- 固定夹子的方法（在需要固定的部分，施加压力，使其打开或者关闭，要正对着注射器）。当从水浴锅中取出注射器读取刻度时，挤压水浴锅盖子的边缘时不会使夹子打开。

- 对坩埚进行清晰标记（最好用钻石刀）。将它们按照升序或降序排列；这样可有助于识别那些没有很好被标记的坩埚，特别是这些坩埚被放在马弗炉以后。

- 单宁生物分析法只使用 PEG 4000 或者 PEG 6000（最好是后者）。

- 产气法的相关幻灯片播放材料，请参阅网址：<http://www.iaea.org/programmes/nafa/d3/mtc/invitrosideshowapr01.pdf>

4. 结论与研究展望

体外瘤胃发酵法，可以同时测定微生物生产量和产气量，该方法具有以下几方面的优点：

1) 它具有筛选大量饲料资源的潜力，比如，培育具有优良营养价值的品种（栽培种）的育种计划；2) 在利用当地常规和非常规饲料成分获取瘤胃中最大微生物效率的补充饲料策略，也具有非常重要的意义；3) 在研究瘤胃调控剂提高微生物蛋白合成效率、降低甲烷（一种环境污染气体）排放量方面起着重要作用；4) 它为研究营养物-反营养物、反营养物与反营养物间的相互关系，以及与发酵气体、CCFA 和微生物量生产相关的各种养分的作用给予了更好的洞察力。这种方法也被越来越多的人用于筛查植物来源的瘤胃调节因子。这些产品对动物和人类所造成的毒害比较低，而且非常环保。因而，它们越来越被广大消费者所接受。

进一步的研究应该集中在以下几个方面：1) 在体外产气系统中，开发简易方法来鉴定培养时间，此时的 PF 值为最大（一种测定发酵底物比率的方法，这种底物可以导致微生物量的生产）；2) 在培养基中的氮对于 PF 的影响；3) 体内所获 PF 的重

要意义。截至目前,在进行了有限几个实验中发现,利用气体动力学参数和 PF 值构建的简单模型,能够预测粗饲料中干物质的摄入量以及反刍动物的甲烷释放水平。还需要再进行进一步实验,以验证对于任何假定饲料,从体外消化动力学参数得到的微生物蛋白合成物,能否可以充分解释被观察到的微生物蛋白对体内小肠的供应状况。目前,测定后者参数的最简单的方法,就是根据尿液嘌呤衍生物中的水平来推算。应当对大范围的饲料成分和日粮进行有效性测试,以便使得以上提及的简单测定气体和微生物量的技术变成一种强功能的常规工具,用于饲料评价,进而避免对耗时、耗力、昂贵饲喂研究的需求。

最后,应当加强相关统计或数学模型的开发,这些统计或模型要非常符合产气特征,并能很精确地描述产气过程。同时,还应该设计相关实验,以便更好地理解各种统计和功能参数的生物学意义,还可以把微生物量测定整合到这些数学模型中。

应该开展相关的研发,构建非常规饲料的饲料数据库,内容除了常规的组成分析外,还要有营养价值方面的信息。在含有单宁的饲料案例中,需要把测定单宁生物活性方法与分析单宁水平的化学方法结合在一起。

参考文献

- Aiple, K. -P. , Steingass, H. & Drochner, W. 1996. Prediction of net energy content of raw materials and compound feeds for ruminants by different laboratory methods. Arch. Anim. Nutr. , 49: 213 - 220.
- Ben Salem, H. , Nefzaoui, A. , Ben Salem, L. & Tisserand, J. L. 1999. Different means of administering polyethylene glycol to sheep: effect on the nutritive value of Acacia cyanophylla Lindl. Foliage. Anim. Sci. , 68: 809 - 818.
- Blümmel, M. , Steingass, H. , Becker, K. & Soller, H. 1993. Production of SCFA, CO₂ , CH₄ and microbial cells in vitro. Proc. Soc. Nutr. Physiol. 1: 9.

- Blümmel, M. , Makkar, H. P. S. & Becker K. 1997. In vitro gas production: a technique revisited. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. , 77: 24 - 34.
- Blümmel, M. , Makkar, H. P. S. & Becker, K. 1998a. The partitioning kinetics of in vitro rumen fermentation products in a gas production test, J. Dairy Sci. . (Suppl. 1), 309.
- Blümmel M. , Makkar H. P. S. & Becker K. 1998b. The in vitro gas production characteristics of whole roughage versus extracted neutral-detergent fibre and their implications for analysing the fermentation of cell solubles by a differential approach. In E. R. Deaville, E. Owen, A. T. Adesogan, C. Rymer, J. A. Huntington & T. L. J. Lawrence, eds. In vitro techniques for measuring nutrient supply to ruminants BSAS No. 22, pp 85 - 88, Edinburgh.
- Blümmel, M. , Aiple, K. -P. , Steingass, H. & Becker, K. 1999a. A note on the stoichiometrical relationship of short chain fatty acid production and gas evolution in vitro in feedstuffs of widely differing quality. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. , 81: 157 - 167.
- Blümmel, M. , Mgonezulu, R. , Chen, X. B. , Makkar H. P. S. , Becker K. & Ørskov E. R. 1999b. The modification of in in vitro gas production test to detect roughage related differences in in vivo microbial protein synthesis as estimated by the excretion of purine derivatives. J. Agric. Sci. (Camb.), 133: 335 - 340.
- Blümmel, M. & Ørskov, E. R. 1993. Comparison of gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. Anim. Feed Sci. Technol. , 40: 109 - 119.
- Chen, X. B. , Hovell, F. D. D. & Ørskov, E. R. 1990. Excretion of purine derivatives by ruminants: endogenous excretion differences between cattle and sheep. Br. J. Nutr. , 63: 121 - 129.
- Chen, Y-K. , Pell, A. N. , Chase, L. E. & Schofield, P. 1999. Rate and extent of the ethanol-soluble and neutral detergent-insoluble fractions of corn grain. J. Anim. Sci. , 77: 3077 - 3083.
- De Boever, J. L. , Cottyn, B. G. , Buysse, F. X. , Wainman, F. W. & Vanacker, J. M. 1986. The use of an enzymatic technique to predict di-

gestibility, metabolisable and net energy of compound feedstuffs for ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* , 14: 203 - 214.

Degen, A. A. , Becker, K. , Makkar, H. P. S. & Borowy, N. 1995. *Acacia saligna* as a fodder tree for desert livestock and the interaction of its tannins with fibre fractions. *J. Sci. Food Agric.* , 68: 65 - 71.

Dhanoa, M. S. 1988. On the analysis of dacron bag data for low degradability feeds. *Grass and Forage Science*, 43: 441 - 444.

Dijkstra, J. , France, J. , Dhanoa, M. S. & Lopez, S. 2000. Simulation of substrate degradation, microbial synthesis and gas production in the gas production technique and in vivo. EAAP Satellite Symposium, Gas production: fermentation kinetics for feed evaluation and to assess microbial activity, 18 - 19 August, Wageningen, The Netherlands.

France, J. , Dhanoa, M. S. , Theodorou, M. K. , Lister, S. J. , Davies, D. R. & Isac, D. 1993. A model to interpret gas accumulation profiles associated with in vitro degradation of ruminal feeds. *J. Theor. Biol.* , 163: 99 - 111.

France, J. , Dijkstra, J. , Dhanoa, M. S. , Lopez, S. & Bannink, A. 2000. Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed in vitro: derivation of models and other mathematical considerations. *Brit. J. Nutr.* , 83: 43 - 150

Getachew, G. , Blümmel, M. , Makkar H. P. S. & Becker K. 1998a. In vitro gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* , 72: 261 - 281.

Getachew, G. , Makkar, H. P. S. & Becker, K. 1998b. The in vitro gas coupled with ammonia nitrogen measurement for evaluation of nitrogen degradability in low quality roughages using incubation medium of different buffering capacity. *J. Sci. Food Agric.* , 77: 87 - 95.

Getachew, G. , Makkar, H. P. S. & Becker, K. 2000a. Stoichiometric relationship between short chain fatty acid and in vitro gas production in presence and absence of polyethylene glycol for tannin containing browses, EAAP Satellite Symposium, Gas production: fermentation kinetics for feed evaluation and to assess microbial activity, 18 - 19 August, Wageningen,

The Netherlands.

- Getachew, G. , Makkar, H. P. S. & Becker, K.** 2000b. Effect of polyethylene glycol on in vitro degradability of nitrogen and microbial protein synthesis from tannin-rich browse and herbaceous legumes. *Brit. J. Nutr.* , 84: 73 – 83.
- Getachew, G. , Makkar, H. P. S. & Becker, K.** 2000c. Tannins in tropical browses: effects of tannins on in vitro microbial fermentation and microbial protein synthesis in medium containing different amounts of nitrogen. *J. Agric. Food Chem.* , 48: 3581 – 3588.
- Getachew, G. , Makkar, H. P. S. & Becker, K.** 2000d. Effect of different amounts and method of application of polyethylene glycol on efficiency of microbial protein synthesis in an in vitro system containing tannin rich browses, EAAP Satellite Symposium, Gas production: fermentation kinetics for feed evaluation and to assess microbial activity, 18 – 19 August, Wageningen, The Netherlands.
- Goering, H. K. & Van Soest, P. J.** 1970. Forage fibre analyses (Apparatus, Reagents, Procedures, and Some Applications) . *Agric. Handbook No. 379*, ARS – USDA, Washington, DC.
- IAEA.** 1997. Estimation of rumen microbial protein production from purine derivatives in urine. IAEA – TECDOC – 945.
- IAEA.** 1998. Development, standardization and validation of nuclear-related technologies for measuring microbial protein supply in ruminant livestock for improving productivity. Final Research Coordination Meeting, 24 – 28 August, Vienna, Austria. *Animal Production and Health Newsletter*, 29: 12 – 15.
- Makkar, H. P. S.** 1989. Protein precipitation methods for quantitation of tannins: a review. *J. Agric. Food Chem.* , 37: 1197 – 1202.
- Makkar, H. P. S.** 2000. Quantification of tannins in tree foliage-a laboratory manual; a joint FAO/IAEA working document, Vienna, Austria.
- Makkar, H. P. S. & Becker, K.** 1999. Purine quantification in digesta from ruminants by spectrophotometric and HPLC methods. *Brit. J. Nutr.* , 81: 107 – 112.

- Makkar, H. P. S. , Blümmel, M. , Borowy, N. K. & Becker, K.** 1993. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *J. Sci. Food Agric.* , 61: 161 - 165.
- Makkar, H. P. S. , Blümmel, M. & Becker, K.** 1995a. In vitro effects of and interactions between tannins and saponins and fate of tannins in the rumen. *J. Sci. Food Agric.* , 69: 481 - 493.
- Makkar, H. P. S. , Blümmel, M. & Becker, K.** 1995b. Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidone and polyethylene glycol with tannins and their implications in gas production and true digestibility in in vitro techniques. *Brit. J. Nutr.* , 73: 897 - 913.
- Makkar, H. P. S. , Borowy, N. K. , Becker, K. & Degen, A.** 1995c. Some problems in fiber determination of a tannin-rich forage (*Acacia saligna* leaves) and their implications in in vivo studies. *Anim. Feed Sci. Technol.* , 55: 67 - 76.
- Makkar, H. P. S. , Blümmel, M. & Becker, K.** 1997a. In vitro rumen apparent and true digestibility of tannin-rich forages. *Anim. Feed Sci. Technol.* , 67: 245 - 251.
- Makkar, H. P. S. , Becker, K. & Younan, M.** 1997b. Nutritional implications of bound proanthocyanidins. *Proc. XVIII International Grassland Congress*, June 8 - 12, Winnipeg, Canada.
- Makkar H. P. S. , Blümmel M. & Becker K.** 1998a. Application of an in vitro gas method to understand the effects of natural plant products on availability and partitioning of nutrients. In E. R. Deaville, E. Owen, A. T. Adesogan, C. Rymer, J. A. Huntington & T. L. J. Lawrence, eds. *In vitro techniques for measuring nutrient supply to ruminants*, pp147 - 150, Edingburgh: BSAS No 22.
- Makkar, H. P. S. , Sen, S. , Blümmel, M. & Becker, K.** 1998b. Effects of fractions containing saponins from *Yucca schidigera*, *Quillaja saponaria* and *Acacia auriculoformis* on rumen fermentation. *J. Agric. Food Chem.* , 46: 4324 - 4328.
- McDonald, I.** 1981. A revised model for the estimation of protein degrad-

- ability in the rumen. J. Agric. Sci. (Camb.), 96: 251 - 252.
- Mehrez, A. Z. & Ørskov, E. R.** 1977. A study of artificial fibre bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. J. Agric. Sci. (Camb.), 88: 645 - 650.
- Menke, K. H. , Raab, L. , Salewski, A. , Steingass, H. , Fritz, D. & Schneider, W.** 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. J. Agric. Sci. (Camb.), 92: 217 - 222.
- Raab, L. , Cafantaris, B. , Jilg, T. & Menke, K. H.** 1983. Rumen protein degradation and biosynthesis. 1. A new method for determination of protein degradation in rumen fluid in vitro. Brit. J. Nutr. , 50: 569 - 582.
- Rymer, C. & Givens, D. I.** 1999. The use of the in vitro gas production technique to investigate the effect of substrate on the partitioning between microbial biomass production and the yield of fermentation products. Proc. Br. Soc. Anim. Sci. , pp 36.
- Sampath, K. T. , Wood, C. D. & Prasad, C. S.** 1995. Effect of urea and by-products on the in vitro fermentation of untreated and urea treated finger millet (*Eleusine coracana*) straw. J. Sci. Food Agric. , 67: 323 - 328.
- Tilley, J. M. & Terry, R. A.** 1963. A two stage technique for the in vitro digestion of forage crops. J. Brit. Grassl. Soc. , 18: 104 - 111.
- Van Soest, P. J.** 1994. Nutritional ecology of ruminants. 2nd edition. Cornell University Press.
- Van Soest, P. J. , Robertson, J. B. & Lewis, B.** 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci. , 74: 3583 - 3597.
- Wolin, M. J.** 1960. A theoretical rumen fermentation balance. J. Dairy Sci. , 43: 1452 - 1459.

动物饲料的微生物学

J. P. F. D'Mello

前苏格兰农学院 (SAC)

英国 爱丁堡

多种不同微生物天然存在于或是以污染物的形式存在于牧草、谷物、油料种子副产品以及复合饲料中。在青贮饲料阶段，饲料发酵中产生的乳酸菌具有很多益处。这种细菌善于产生乳酸，它可以使饲料的 pH 降低至 4.0 左右，因此，非常利于反刍动物冬季饲喂饲料的保存。乳酸菌和酵母菌都具有一些有益特性，比如可作为饲料益生菌，降低农场动物的腹泻率，提高农场动物的生长性能。动物饲料可能会被一些有害细菌污染，比如，沙门氏菌、李斯特菌和大肠杆菌。就大肠杆菌来说，粪便源和粪水被认为是这些有害细菌污染牧场和复合饲料的主要污染途径。谷物和油料种子副产品往往以植物病原体真菌或者储存阶段产生的真菌污染。由于这些真菌中的一些菌种可产生多种霉菌毒素，对农场动物会有很大的不利影响。利用杀霉菌剂和防腐剂，是减少这些有毒真菌污染的可能方法。对于多种饲料的污染物控制，特别是对于真菌毒素的控制，目前存有广泛立法。针对这些污染物（连同当前的疯牛病）的相关立法，目前已有详尽综述。

1. 前言

自从欧盟和其他地方出现沙门氏菌、O157 型大肠杆菌、弯曲杆菌以及疯牛病 (BSE) 后，动物饲料微生物学已成为了一个重要议题。2001 和 2002 年，在英国发生的口蹄疫疫情，使得动

物饲料微生物学变得更加重要。动物饲料的真菌污染在世界范围内是一种常见问题。由于一些霉菌种株可以产生真菌毒素，会对各种农场动物造成有害影响。关于动物饲料安全问题，目前不能掉以轻心，现在还必须对所有畜牧产业中的饲料保持警惕。然而，我们应该认识到，青贮饲料的成功生产，取决于由有益微生物所促进的发酵。本综述将着重介绍饲料微生物学的几个方面，包括青贮饲料发酵、真菌和细菌污染、益生菌和相关立法。在综述中，有关 BSE 立法的相关论断也包括在内，进而展示了一个更加全面的、有关饲料微生物当今发展状况及未来发展战略的局面。

2. 青贮饲料微生物学

有效保存高水分含量的饲料和其他作物，必须依赖于微生物活性的控制，特别对细菌的控制。有利于饲料优化保存的条件包括：快速收获；在青贮饲料处理的各个阶段保持在一个厌氧的环境条件。在这样的环境条件下，乳酸菌可以利用内源性植物糖类物质顺利繁殖，并产生大量乳酸，使青贮饲料的 pH 降到 4 左右。这种酸值，最利于饲料的成功保藏。湿饲料很难用这种方法进行保存，而且还常常为一些有害细菌的生长提供一些有利条件，比如梭菌类。表 1 对两类细菌的特性描述作了一些总结。

表 1 青贮饲料的微生物¹

生物体	所需条件	主要产品/效果
乳酸菌 (LAB)	厌氧；作物萎蔫较适合；应该将作物切碎以利于 LAB 的快速建立	同型发酵路线：乳酸和一些冰醋酸。 异型发酵路线：乳酸、乙醇、甘露醇、乙酸和二氧化碳
梭状芽孢杆菌	厌氧，湿牧草	糖分解的种类：丁酸，CO ₂ 和 H ₂ ； 蛋白水解的种类：丁酸，乙酸，胺， 二氧化碳和氨气

(续)

生物体	所需条件	主要产品/效果
肠杆菌	厌氧，最适 pH 是 7，在发酵早期很活跃	醋酸，乙醇，CO ₂ ，H ₂ 和 NH ₃
李斯特菌	需氧，pH 在 5.5 以上，在低温和非常干燥的青贮饲料也可生长	李斯特菌病，特别是针对羊
真菌	需氧，在青贮饲料表面活性强	孢子和真菌毒素

注：1 摘自 McDonald 等 (1991)。

种类

乳酸菌 (LAB) 分两类，同型发酵菌和异型发酵菌。同型发酵菌种类包括植物乳杆菌、戊糖片球菌和粪肠球菌。异型发酵菌种类包括短乳杆菌和肠膜明串珠菌。同型发酵菌种类能更高效地把饲料糖转化成乳酸 (表 1)。其中，植物乳杆菌被认为其转化效率最高，它可以快速地在鲜青贮料中产生大量乳酸。LAB 实质上是非蛋白水解生物，利于饲料中活性蛋白和游离氨基酸的保存，因此，被认为是一种有益微生物。

有两个组群的梭菌属已得到认可，糖化菌组和蛋白水解组。糖化菌组包括酪酸梭状芽孢杆菌和酪丁酸梭菌。它们可以把残余糖分和乳酸发酵成丁酸，使 pH 升高。蛋白水解组包括双酶梭菌和生孢梭菌。它们可以把氨基酸发酵成多个不同的产物 (表 1)。梭菌属在高湿环境下生长旺盛，因此，湿牧草储存问题多多，比如，长时间保存和饲喂这种饲料后牲畜的良好自愿采食性以及生长性能都将会出现问题。

肠细菌包括大肠杆菌和草生欧文菌。也由于它们可在乳酸菌把植物糖分发酵成乳酸、乙醇、CO₂ 和 H₂ 时与其产生竞争，因此，也被看做是一种有害菌。它们还能够把氨基酸分解成 NH₃

(表 1)。

单核细胞增多性李斯特菌是一种在自然界广泛分布的菌，在青贮饲料，特别在大捆青贮饲料中，都能发现此菌的存在。在羊和牛身上李斯特菌病发病率的上升，部分原因与大捆青贮饲料的使用有关。大捆青贮饲料具有相对较低的密度、局部发酵以及包装易损等特征，这些特征都利于李斯特菌的生长。这种生物非常重要，原因在于它很可能污染为人类所消费的动物产品。

青贮饲料中的真菌主要分两大类，酵母菌和霉菌。酵母菌包括念珠菌属、酵母属和球拟酵母菌。与青贮饲料相关的霉菌则包括曲菌、青霉菌和镰刀菌。由于它们可产生有毒的霉菌毒素，因此，也备受关注。

微生物活性的调节

通过控制细菌活性，可使其利于青贮饲料的保存。在青贮前，对作物进行萎蔫处理，是一种限制发酵的常见手段，可以允许 LAB 生长，但却能限制那些有害微生物（比如，梭菌属和肠道细菌）的生长。萎蔫处理的另外一个优点是，它可以减少污水产生，进而将环境污染降到最低。

添加剂可以用于控制或者激发青贮饲料中的由细菌引起的发酵。甲酸是一种被广泛使用的添加剂，通过添加这种甲酸，可以人工把饲料 pH 降至 4.0 以下。例如，生产上所使用的一些商品（例如含有 85% 的甲酸）都需要在牧草的收获阶段进行添加。但是，即便是在推荐的剂量下，细菌仍然可以把糖分发酵成乳酸。有两种方法可以激发青贮饲料中的细菌活性。在青贮前，加入一些糖蜜，可以确保为 LAB 提供足够底物，进而将 pH 降到一个理想值。最近，有人建议，收获阶段青贮作物中相对较低的 LAB 浓度是一个限制因素。因此，许多商业接种剂，它们含有冻干的同型发酵菌 LAB 菌种，可以在收获的牧草中使用。接种效率的高低主要取决于接种率和高糖浓度的存在这两种因素。

3. 牧草和浓缩饲料的真菌污染

谷物、油料种子副产品以及牧草的真菌污染，仍然是世界范围的一个动物健康风险，特别是在潮湿的热带地区。这类风险主要起因于真菌种株能够产生有害化合物（如大家所熟知的真菌毒素）。在受到多种遗传与环境因素的影响时，真菌则会通过次级代谢途径产生这些有害物质。

牧草和谷物的真菌毒素污染常常发生在田间，在那里，植株受到了特别是致病真菌或者一些内生共生菌的感染。另外，这些污染也发生在收获产品和饲料的处理和储藏阶段。在这段时间里，只要环境条件合适，就会造成腐败真菌的污染。水分含量和环境温度都是一些关键因素，它们都会对浓缩饲料和复合饲料中真菌的繁殖和真菌毒素的产生造成影响。

吸入真菌孢子，或者食用了菌丝体，都可能引起总称为“霉菌病”这类情况的发生。例如，霉菌性流产，就是由于真菌材料的系统性传播并转运到胎盘中所造成的后果。

分类

通常情况下，可以把有毒真菌细分成两类：“田间类”（或者植物病原性的）和“储存类”（腐生或者腐败的）生物。其中，麦角菌（*Claviceps*）、内生镰刀菌（*Neotyphodium fusarium*）和链格孢属（*Alternaria*）属于“田间类”菌的代表；曲菌（*Aspergillus*）、青霉菌（*Penicillium*）属于“储存类”菌的代表。产毒菌的种类，还可以根据它们的地域流行状况来进行进一步区分。这些分布的差异也反映了它们对生长和次级代谢环境的需求。因此，黄曲霉菌（*Aspergillus flavus*）、寄生曲菌（*Aspergillus parasiticus*）和赭曲霉 *Aspergillus ochraceus*），它们在温暖潮湿的环境下都很容易繁殖，但是，青霉（*P. expansum*）和疣状青霉（*P. verrucosum*）却是温和的真菌。因此，热带和温带地区来源的植物产品，黄曲霉菌是主要污染菌。而青

霉菌污染主要发生在温带食物上，特别是谷物类。镰刀菌是一种普遍存在的菌，但是甚至在这类镰刀菌属中也含有产毒种类，而且被它们污染的谷物几乎全部来自于热带和亚热带地区。在浓缩饲料和牧草中一些重要真菌的分布状况，请参看表 2。表 2 中也列出了主要的真菌毒素。

在谷物和油料种子中，曲菌产生的霉菌毒素比其他所有真菌都多。例如，1998 年 Dhand 等发现，曲菌是热带地区奶制品和其他饲料中最主要的菌属。在此菌属中，有 3 种真菌实际参与了真菌毒素的生产，分别是黄曲霉素、寄生曲霉和赭曲霉。黄曲霉素和寄生曲霉合成了黄曲霉毒素，而赭曲霉则产生了赭曲毒素。

曲菌种类

黄曲霉毒素包括了黄曲霉毒素 B1、B2、G1 和 G2（分别是 AFB1、AFB2、AFG1 和 AFG2）。另外，黄曲霉毒素 M1（AFM1）大多产生于饲喂含有 AFB1 污染的饲料的奶牛后所生产的牛奶中。能产生黄曲霉素的曲霉一般都被认为是储藏真菌，在相对高湿和高温的环境下容易生长繁殖。因此，黄曲霉毒素的污染几乎全部发生在热带饲料中，比如花生、棉籽以及棕榈仁等油料种子的副产品。在温湿地区，黄曲霉毒素对玉米的污染也是一个重要问题，在那里，黄曲霉可能在作物收获前就感染了作物，并在作物储存阶段保持活性。

表 2 浓缩饲料和牧草中的有毒真菌

真菌种类	发生地点	真菌毒素类型
黄曲霉，寄生曲霉	花生粕，棉籽饼，棕榈仁饼，玉米，复合饲料	黄曲霉毒素
黄曲霉	油籽粕，复合饲料	环匹阿尼酸
赭曲霉，鲜绿青霉，圆弧青霉	大麦和小麦	赭曲毒素 A
橘青霉，扩展青霉	谷物	橘霉素

(续)

真菌种类	发生地点	真菌毒素类型
黄绿青霉	谷物	黄绿青霉素
大刀镰刀菌, 禾谷镰孢菌	谷物	脱氧菱镰菌醇
拟分枝孢镰刀菌, 早熟禾镰刀菌	谷物	T-2 毒素
拟分枝孢镰刀菌, 禾谷镰孢菌, 早熟禾镰刀菌	谷物	蛇形菌素
大刀镰刀菌, 禾谷镰孢菌, 拟分枝孢镰刀菌	谷物	玉米烯酮
串珠镰刀菌	玉米籽粒	伏马菌素, 串珠镰刀菌毒, 5-丁基-2-吡啶甲酸
芎状羊茅内生真菌	牧草	麦角碱
多年生黑麦草内生真菌	牧草	黑麦草神经毒素生物碱
麦角菌	谷物	麦角生物碱
半壳孢样拟茎点霉	羽扇豆短须	拟茎点霉素
纸皮思霉	牧场	蕈孢菌素 A

注: 1 采编自 D'Mello (2000)。

如上所示, 赭曲霉可产生赭曲毒素。但是, 其他至少有两个青霉菌也具有这样的能力。赭曲毒素 A (OTA) 和赭曲毒素 B 是自然界产生的两种类型的污染物, 其中, OTA 分布最广, 主要分布在谷物和饲喂了污染饲料的动物的组织中。另外一个真菌毒素——橘霉素, 也经常与 OTA 一起作为污染物存在, 特别是在小麦上。

镰刀菌种类

谷物的主要镰刀真菌类别有: 禾谷镰刀菌、大刀镰刀菌、拟分枝孢镰刀菌、梨孢镰刀菌和串珠镰刀菌 (表 2)。这些真菌能

产生多种不同的真菌毒素。在动物卫生中特别重要的真菌毒素包括单端孢霉烯族毒素类、玉米赤霉烯酮和伏马菌素。单端孢霉烯族毒素类可以被细分为 4 个基本组，其中 A 组和 B 组占有主体地位。A 组单端孢霉烯族毒素类包括 T-2 毒素、HT-2 毒素、新茄镰孢菌醇和蛇形菌素四类。B 组单端孢霉烯族毒素类包括脱氧雪腐镰刀菌烯醇（也被称为呕吐毒素）、雪腐镰刀菌烯醇和镰刀菌酮 X。特定镰刀菌物种的一个特点之一，就是能表达这两类单端孢霉烯族毒素。但是，在这些真菌次级代谢机制中还具有一个共同特征，那就是它们都能合成玉米赤霉烯酮，因此，往往会与特定类型的单端孢霉烯族毒素类构成共同污染物。一些特定的镰刀菌可以产生伏马菌素（表 2）。在镰刀菌群中，伏马菌素 B1、B2 和 B3 三者往往同时污染玉米。实际上，以上所有有害的镰刀菌类别，也是粮食作物的主要病原菌，能造成小麦和大麦赤霉病以及玉米穗腐病等病害的发生。因此，收获被病菌感染作物的谷粒，很可能也被真菌毒素污染，这一点已经被大量证据所证实。

芨状羊茅内生真菌

内生植物真菌——芨状羊茅内生真菌往往与多年生高羊茅草紧密相关。另外一个相关的真菌——多年生黑麦草内生真菌，主要存在于多年生黑麦草中（D'Mello, 2000）。麦角生物碱，主要是麦角瓦灵，主要存在于芨状羊茅内生真菌感染的高羊茅草中。咪唑类异戊二烯黑麦神经毒素生物碱，特别是黑麦神经毒素 B，主要存在于被多年生黑麦草内生真菌感染的多年生黑麦草中。麦角生物碱能降低牛的生长速度、繁殖性能和奶产量，而黑麦神经毒素化合物则会诱导反刍动物的神经效应。

半壳孢样拟茎点霉

在澳大利亚，羽扇豆残茬可以作为羊饲料，具有一定的价值。但是，真菌半壳孢样拟茎点霉的感染却成为此种饲料的一个主要限制因素，因为这些真菌可产生具有毒性的拟茎点霉属毒

素。植物的成熟部分或者开始衰老部分，包括茎、豆荚和种子，特别容易受此感染。拟茎点霉属毒素 A 被认为是主要的感染毒素，能造成多种不利影响，比如，能引起断乳病、肝损伤、光敏性疾病以及繁殖性能降低等（D'Mello 和 Macdonald, 1998）。

纸皮思霉

纸皮思霉是一种广泛存在的牧草腐生物，它可以合成蕈孢菌素 A，是一种可以导致羊面部湿疹和肝脏损伤的化合物。

有机酸的利用

针对饲料的真菌污染，特别是高水分含量谷粒的真菌感染，在储藏前用有机酸进行处理，可以防止此类真菌污染的发生。丙酸是一种可以有效防止谷粒真菌污染的药剂。现在商业上已经有了多种有机酸的混合物。最近，在苏格兰农学院（SAC）开展了两项实验，来研究 BASF 混合物的有效性。其研究结果被作者 Blanchard 等人出版发表（2001）。测试的防腐剂包括 Lupro-Mix[®] NC（露保美饲料酸化剂）和 Lupro-Grain[®]（露保康防腐剂）。其中，Lupro-Mix[®] NC（露保美）是由 38% 的丙酸、34% 的甲酸、8% 的氨水和 20% 的水混合而成；Lupro-Grain[®]（露保康）则是由 92% 的丙酸、4% 的氨水和 4% 的丙二醇混合而成。两种防腐剂的防治效果与丙酸分别在不同添加水平条件下（0.10%、0.25% 和 0.50%）进行了对比分析。在第一个调查研究中，使用纯化培养基培养（马铃薯葡萄糖琼脂，PDA）培养霉菌，以测定三种防腐剂对于 6 种储藏真菌的防治效果。如表 3 中所示，在控制青霉菌时，丙酸保护效果最好，也非常稳定；其次是 Lupro-Mix[®]（露保美）；最后是 Lupro-Grain[®]（露保康）。相反，在抑制黄曲霉和寄生曲霉方面，Lupro-Grain[®]（露保康）比 Lupro-Mix[®]（露保美）更有效，但在控制赭曲霉、疣状青霉和娄地青霉时的效率相同。与其他的储藏真菌相比，疣状青霉都可以在这次调查研究的条件下，被 4 种供试药剂有效控制。

**表 3 3 种供试产品对接种于纯化基质（马铃薯葡萄糖琼脂）
中六种储存真菌的最低抑菌浓度¹**

产品	黄曲霉	寄生曲霉	赭曲霉	娄地青霉	扩展青霉	疣状青霉
丙酸	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.10
Lupro-Mix® NC	0.50	0.50	0.25	0.50	0.25	0.25
Lupro-Grain®	0.25	0.25	0.25	0.50	0.50	0.25

注：1 信息来自于 Blanchard 等（2001）。

在第二项测试中，潮湿无菌的大麦谷粒接种寄生曲霉后，分别用 3 种供试产品的不同浓度（0.1%、0.25%、0.5%）进行处理。与第一次测试的结果相反，Lupro-Grain®（露保康）产品最有效，且其最低抑菌浓度（MIC）值最低（表 4）。酶底物的类型影响供试产品对于寄生霉菌的控制效率。水活性的不同（比如，水分含量）或者两种酶底物的缓冲能力不同，都可能造成测试结果出现偏差。显然，要全面地评价这些防腐剂产品在其他谷物或者复合饲料中的功效，还需要继续进行大量工作。

4. 沙门氏菌种类

在农场动物疾病中，有许多种沙门氏菌是罪魁祸首。其中，鼠伤寒沙门氏菌分布最广泛；肠炎沙门氏菌是一种常见的家禽病原体，感染蛋类和鸡肉。动物饲料是这些细菌的主要来源。肉类、骨粉和鱼粉经常被沙门氏菌污染。频繁的牧场利用也提供了另外一个污染途径，即通过染病动物的粪便来污染。此外，在传统农场和有机农场中，将牛粪水泼洒到牧场上的做法，也是一个重要的潜在传染源。

在世界大部分地区，家禽粪便常被用作反刍动物的饲料。比如，在美国，两种家禽的废物产品可用于此目的：干禽粪和干垫料禽粪（Jeffrey 等，1998）。干禽粪是一种未稀释的排泄物，通常来自圈养禽群，而干垫料禽粪则是粪便和垫料的混合物。加热

这些产品，可以减少细菌污染，但却不能使其无菌。令人欣慰的是，在 1998 年 Jeffrey 等人进行的一项实验中发现：在 13 个奶牛场收集的所有加工过的垫料禽粪的样本，都没有被沙门氏菌所污染，尽管所有的样本实际上都含有大肠杆菌、非葡萄糖发酵革兰氏阴性细菌和革兰氏阳性细菌。

表 4 3 个供试产品对接种于大麦基质^{1,2}中
寄生曲霉的最低抑菌浓度

产品	最低抑菌浓度
丙酸	0.25
Lupro-Mix® NC	0.25
Lupro-Grain®	0.10

注：1 摘自 Blanchard 等（2001）。2 所使用的 100 克无菌大麦粒，其水分含量被调整为 28%。

5. 大肠杆菌，包括 O157 型大肠杆菌

大家普遍认识到，含有大肠杆菌的牛饲料是通过粪便污染的。对于 O157 型大肠杆菌，应当给予特别关注，因为 O157 型大肠杆菌与人类疾病的暴发有显著关联性。

牧场使用一些粪水，很可能会把粪便中的大肠杆菌转移给食草动物，这种行为会在那些关注食品安全的人中引发不安。1998 年 Hancock 等人认为，应当把“储存宿主”的概念与被认为是 O157 型大肠杆菌来源的偶见宿主概念区分开来。他们认为，牛不是这种细菌的储存宿主。潘宁顿集团（1997 年）也认为，把粪便泼洒在牧场上所产生的影响还需要进一步评估，但还是应该建议对这种行为采取一些预防措施。因此，来自粪水的 O157 型大肠杆菌会对牧草造成污染这一说法目前仍没有定论。

其他类型的大肠杆菌也广泛存在于多种牛饲料中。因此，Lynn 等（1998）报道，在美国的 13 家奶牛场和 4 个饲料厂中收

集的牛饲料样本中，尽管 O157 型大肠杆菌在这些样本中没有被检测到，但是仅有超过 30% 的牛饲料样本被大肠杆菌污染。在 5 个奶牛场中，每克饲料中大肠杆菌的浓度超过了 1 000 个菌落形成单位。他们建议，对于那些潮湿的饲料以及储存在饲料仓中的饲料，一定要多加注意，防止大肠杆菌繁衍。在美国进行了另一项研究的结果也表明，在牛饲料中也有大肠杆菌（非 O157）污染事件的发生。Jeffrey 等人（1998）报道，在 52 份干垫料禽粪（用于奶牛饲料）中分离出了 13 种非 O157 型大肠杆菌。

6. 口蹄疫病毒

在 2001—2001 年，口蹄疫病已成为英国的一个主要问题，对畜牧产业造成了致命影响。这种疾病是通过吸入和摄取被污染的材料而进行传播的。英国的这次口蹄疫疫情的爆发，临时归因于给猪饲喂了餐饮垃圾所造成的。但这种相关性可能永远无法得到证实。很显然，在集约型动物饲养条件下，对正确加工动物饲料的需求应该得到应有的认同。但是，在欧盟最近的制导方针中，饲喂含有肉制品的餐饮垃圾是被严令禁止的。因此，至少在理论上，口蹄疫病毒的来源应当被排除在牲畜农场之外。

7. 疯牛病

最近被证实，加工动物蛋白中的朊病毒蛋白质，是导致疯牛病发生的饲料污染物。朊病毒蛋白质是一种正常动物组织的组成部分，可以转变成致病因子，造成很多物种发生致命的神经综合征。在英国暴发的疯牛病（BSE）也是由此种蛋白导致的，因此备受关注。这种疾病的起因是由于将患有痒病羊的尸体的肉骨粉饲喂给牛所造成的。朊病毒蛋白质可以导致痒病感染，这与人类新变异型克罗伊茨费尔特-雅各布病（vCJD）相似。人类发生的人类新变异型克罗伊茨费尔特-雅各布病，与人类食用了被 BSE 污染的牛肉有关。为此，关于饲喂牲畜的特定动物产品，在欧盟

已制定了广泛而严格的立法。

8. 益生菌

许多微生物产品加入饲料后，可以在提高动物健康水平，改善产品质量方面发挥有益作用。这些产品并不具有特定的营养功能，被命名为“益生菌”。比如，嗜酸乳杆菌可以降低家畜腹泻率，增加犊牛体重。但在不同实验中，这种效果也不是很一致。酵母菌种也可以作为益生菌（Wallace 和 Newbold, 1992）。需要指出的是，关于益生菌的作用机理还不明确，还需要对不同的产品进行严格的成本效益分析，以便使益生菌具有商业化用途。

9. 立法

可以预想到，饲料和牧草的细菌污染应该有相应的法令措施进行综合管理。但是，在英国，相关的规定仅限于沙门氏菌的污染。比如，按照英国的相关规定，饲料中只要鉴定出沙门氏菌是阳性，就必须上报部长的兽医官（HMSO, 1989）。目前关于大肠杆菌储藏源的证据，还不能令人信服到必须要限制动物粪水和粪便泼洒到牧场的这种行为。通过使用一些管理措施来减少反刍动物饲料和牧草中的这种细菌的粪便源是十分困难的。在评估大肠杆菌在农场初始污染和后续传播的关键控制点之前，需要引入这类管理规程。

由于真菌次级化合物的急性毒性，特别是某些霉菌毒素的致癌性，所以对于一些主要饲料成分和全价日粮，应该建立相关的监管性和咨询性指导原则。表 5 给出了英国、欧盟和北美的一些监管性和咨询性指导原则的类型。从中可以看出，对于黄曲霉毒素有多种规定，但对于赭曲毒素 A 和瓜萎镰菌醇仅有咨询性指导原则，并没有立法措施来支持。特别需要注意的是，还缺少对致癌性物质伏马菌素的法规。

表 5 真菌次生化合物的一般准则和法规的实例（霉菌毒素）¹

国家	次生化合物	商品	最高水平	情况
欧盟	黄曲霉毒素 B (克/千克) ¹	直接饲喂的饲料除了： 花生，椰肉干，棕榈仁，棉籽， 巴巴苏棕榈果，玉米和加工所 得产品	50 20	法定的
		牛，绵羊和山羊的全饲料（除 了犊牛、羔羊和幼小山羊的全 饲料外）	50	
		猪和家禽的全饲料（幼小动物 除外）	20	
		其他全饲料	10	
	黄曲霉毒素 M1 (毫克/千克)	奶类/奶类产品	0.5	法定的
	赭曲毒素 A (克/千克)	谷物及谷物制品	4	咨询性的
	麦角	所有含有非碾磨谷物的饲料	1 000	法定的
世界范围	烟曲霉毒素	未规定	—	—
美国/加拿大	脱氧瓜萎镰菌醇 (毫克/千克)	动物饲料	5~10	咨询性的

注：1 摘自 D'Mello (2000)。

自从英国和欧洲的其他地区发生疯牛病危机以来，动物饲料就受到了特别的严格控制。在英国，自从 1994 年 11 月以来，禁止用任何形式的哺乳动物蛋白来饲喂反刍动物，否则违法。自从 1996 年 4 月以来，禁止用哺乳动物的肉骨粉（mMBM）饲喂任何农场牲畜。这样做是为了避免不慎把 mMBM 饲喂给反刍动物。动物饲料的监控结果表明：绝大多数饲料都符合这些规定，99.7% 的饲料都不含有禁用蛋白。欧盟范围内的饲料规定也适用于有关疯牛病的饲料控制。因此，2002 年 10 月 3 日，欧洲议会

和欧盟理事会制定的第 1774 和 2002 号法规 (EC) 要求成员国, 仅仅那些符合人类消费需求, 并通过动物检疫的材料才能用于饲料的生产。规定要求, 要把死亡动物以及其他有问题材料排除在饲料链之外; 把那些不能被动物饲料或者人类食品所用的动物废料从收集、转运、储存、处理以及加工过程中进行完全分离; 把饲料加工工厂与其他动物废物加工厂完全分离开来。法规中也禁止种内循环, 并对必须和可以与禁用动物材料一起处理的材料进行了明确规定。对于某些产品, 比如, 用于销毁的肉骨粉和脂肪, 需进行严格的鉴定和相应的追溯体系。对这些产品进行永久性标记, 可以避免可能出现的欺诈行为, 也避免了非认证产品流入食品和饲料中来。新规定要求, 类别 1 中的材料 (例如, 可以导致高危的疯牛病或者绵羊疯痒病的动物副产品) 在进行适当的热处理后, 可以进行焚烧或者掩埋。类别 2 中的材料 (包括一些可导致动物疾病污染的动物副产品) 在适当的处理后, 可以作为非饲料材料进行循环利用 (沼气、堆肥、油脂化工产品等)。最后, 类别 3 中的材料 (例如, 为了人类消费而捕杀的健康动物副产品) 可以在认证的加工工厂中进行适当处理后, 用于饲料的生产。

参考文献

- Blanchard, P. J. , D'Mello, J. P. F. , Macdonald, A. M. C. , Cattan, S. & Roser, U.** 2001. Minimum inhibition concentrations for propionic acid and organic acid mixtures against storage fungi. *World Mycotoxin Forum* pp. 62 - 62. Proceedings of a conference held on 14 - 15 May 2001 in the Netherlands.
- Dhand, N. K. , Joshi, D. V. & Jand, S. K.** 1998. Fungal contaminants of dairy feed and their toxigenicity. *Indian Journal of Animal Sciences*, 68: 1095 - 1096.
- D'Mello, J. P. F.** 2000. Anti-nutritional factors and mycotoxins. In J. P. F. D'Mello, ed. *Farm animal metabolism and nutrition*, pp. 383 - 403. CABI

Publishing, Wallingford.

- D'Mello, J. P. F.** 2002. Mycotoxins in plant products. In J. P. F. D'Mello, ed. Food Safety. CABI Publishing, Wallingford, (in press) .
- D'Mello, J. P. F. & Macdonald, A. M. C.** 1998. Fungal toxins as disease elicitors. In J. Rose, ed. Environmental toxicology: current developments, pp. 253 - 289. Gordon and Breach Science Publishers, Amsterdam,
- Hancock, D. D. , Besser, T. E. , Rice, D. H. , Ebel, E. D. , Herriott, D. E. & Carpenter, L. V.** 1998. Multiple sources of *Escherichia coli* O157 in feedlots and dairy farms in the Northwestern USA. Preventive Veterinary Medicine, 35: 11 - 19.
- HMSO.** 1989. Statutory instruments. The zoonoses order 1989. Her Majesty's Stationery Office, London.
- Jeffrey, J. S. , Kirk, J. H. , Atwill, E. R. & Cullor, J. S.** 1998. Prevalence of selected microbial pathogens in processed poultry waste used as dairy cattle feed. Poultry Science, 77: 808 - 811.
- Lynn, T. V. , Hancock, D. D. , Besser, T. E. , Harrison, J. H. , Rice, D. H. , Stewart, N. T. & Rowan, L. L.** 1998. The occurrence and replication of *Escherichia coli* in cattle feeds. Journal of Dairy Science, 81: 1102 - 1108.
- McDonald, P. , Henderson, A. R. & Heron, S. J. E.** 1991. The biochemistry of silage. Chalcombe Publications, Marlow. 340 pp.
- McGee, P. , Bolton, D. J. , Sheridan, J. J. , Earley, B. & Leonard, N.** 2001. The survival of *Escherichia coli* O157: H7 in slurry from cattle fed different diets. Letters in Applied Microbiology, 32: 152 - 155.
- Pennington Group.** 1997. Report on the circumstances leading to the 1996 outbreak with *E. coli* O157 in central Scotland, the implications for food safety and the lessons to be learned, pp. 38 - 39. The Stationery Office, Edinburgh.
- Wallace, R. J & Newbold, C. J.** 1992. Probiotics for ruminants. In R. Fuller, ed. Probiotics. The scientific basis, pp. 317 - 353. Chapman & Hall, London.

动物饲料中的污染物和毒素

J. P. F. D'Mello

苏格兰农学院，爱丁堡，英国

这项工作得到了苏格兰行政院农村事务部的部分资助（项目编号 627012），特别致谢。

从全球来看，动物饲料和牧草中含有多种不同的污染物和毒素，它们来自于人为源和自然源。在本篇文章中，涵盖了谷物、全价配合饲料以及牧草中的重金属、放射性核物质、真菌毒素、植物毒素、抗生素以及微生物病原体等不同分布情况。同时也就它们对农场家畜生产力的影响以及相应地可食用产品的安全性进行了分析。证据显示，饲料中含有多种共污染物，并且，这些复合污染物在性质上也存在地区性差异。因此，可采取的补救措施也十分有限。此外，尽管在发展中国家还缺少适当的立法，但由于进口到欧洲和美国的饲料加强了管控，因此，发展中国家在这方面也必将作出相应调整。

1. 前言

动物饲料通常受多种来源的污染物污染，包括环境污染、害虫和微生物感染等。动物饲料中还含有内源性毒素，这些毒素主要来源于饲料作物产生的初级和次级产物。因此，饲料毒素包括植物源和微生物源这类化合物。尽管这些毒素常被人们分开来考虑（因为它们来源不同），但是，两者却有几个共同的基本特征。因此，植物和微生物毒素中的化合物会产生抗营养效应，或是能降低农场动物的繁殖性能。再者，两组化合物间的相互作用，可

能产生累加或者协同作用。在实际家畜饲喂中，这些相互作用的范围和影响还需要进一步的定量研究。饲料污染物和毒素在全球范围内都有，但每个污染物或者毒素的相对影响却具有显著的地域性差异。广义上讲，“饲料”一词一般是指直接成分和牧草的掺和物。基于这样一个广阔视角，介绍一些重点关注的问题显得非常必要和有意义。因此，本文仅对那些对农场家畜有重大威胁的污染物和毒素进行阐述。由于昆虫碎片和排泄物导致的饲料污染，本文不作阐述。但是，这些载体在传播真菌孢子和菌丝时的作用不应被忽视。合法控制某些饲料污染物和毒素在一个不断发展的框架内是合适的，并具有操作性的；突出的相关事项也将在此进行简要概述。

2. 环境污染物

在饲料中可能存在大量的有机物和无机物，包括杀虫剂、工业污染物、放射性核物质以及重金属。能污染饲料的杀虫剂，其主要来源包括有机氯、有机磷酸酯和拟除虫菊酯化合物（van Barneveld, 1999）。最近的一项调查结果显示，在英国，有 21% 的饲料存在杀虫剂残留。在谷物储存中使用的甲基嘧啶磷杀虫剂，被检测出的频率最高。尽管杀虫剂对农场牲畜具有潜在的危害性，但还是要对那些用于人类消费的动物产品中杀虫剂残留量给予重点关注。二噁英和多氯联苯（PCB）是工业污染物的两个代表，它们也会污染饲料，特别是牧草。那些靠近工业区的食草奶牛所产的牛奶，比那些来自农村牧场的奶牛所产牛奶，含有更高量的二噁英污染。1999 年，被二噁英污染的动物脂肪被无意地添加到了运往比利时、法国和荷兰农场动物饲料中，后来发现，来自这些农场的肉制品和蛋类产品，其二噁英污染含量都超过了可接受水平。

在检测放射性核物质污染中，将人类健康考虑在内是至关重要的。继在 1986 年切尔诺贝利事故后，铯-134 和铯-137 被释

放出来，造成了大范围内的牧场和保藏草料污染。结果，牛奶和绵羊尸体被污染，羊的迁移和屠宰受到了限制（MAFF, 1994）。

由于给作物和牧草施用了某类肥料，所以饲料和牧草的镉污染也可能会发生。另外，铅污染可能由于城市和郊区污染导致。饲料中的汞污染是由于使用了鱼粉造成的。

3. 微生物污染

在将 O157 型大肠杆菌与人类疾病联系在一起后，大肠杆菌对于饲料的污染，目前受到了人们的普遍关注。在一份最近的美国研究报告中（Lynn 等，1998）显示，有 30% 的商业来源和农场来源的牛饲料样本被大肠杆菌污染，尽管这些饲料中的 O157 型大肠杆菌检测都呈阴性。在夏季，大粪中的大肠杆菌，其中包括 O157 型大肠杆菌，在可能发生的条件下，被证明可以在养牛场上的多种饲料中进行复制存活。

由于饲料的粪便污染广泛存在于农场中，因此，这也是牛接触大肠杆菌和其他生物体的重要途径。当把家禽粪便饲喂给牛时，牛接触大肠杆菌的可能性也是存在的（比如，在加利福尼亚，有两种商业化的作为牛饲料的家禽粪便产品）。但是，假如在饲料分配之前，对这些饲料产品进行充分的加热处理，那么，感染大肠杆菌、沙门氏菌以及弯曲杆菌的可能性就会大大降低，甚至完全消失（Jeffrey 等，1998）。然而，值得注意的是，在美国、欧洲以及南非，牛饲料中，通常肠道沙门菌的污染率在 5%~19%（Krytenburg 等，1998）。

单核细胞增多性李斯特菌往往发生在劣质青贮饲料和大捆青贮饲料中。当把草青贮在厌氧条件下时，低 pH 区域条件下，将会把李斯特菌排除在最后处理后的青贮饲料之外。但是，在大捆的青贮饲料中会发生需氧发酵，导致 pH 增高，进而诱发李斯特菌的生长繁殖。李斯特菌可以在低温下存活，还能在高水平干物质的青贮饲料中存活。青贮饲料被李斯特菌污染，是一个非常重

要的议题，因为这种污染会导致人类或者动物发生流产、脑膜炎、脑炎和败血病。近年来，各种由李斯特菌所导致的发病事件一直在增加。

4. 真菌污染

多种报道一致认为，真菌以及孢子对饲料的污染是非常普遍的。在热带地区，曲霉是奶场和其他饲料的主要菌属（Dhand, Joshi 和 Jand, 1998）。其他的种属，包括青霉、镰刀菌和链格孢菌，是谷物的主要污染物（D’Mello, Macdonald 和 Cochrane, 1993）。由于真菌能产生真菌毒素，所以，真菌污染是非常不利的（参见下一部分）。但是，来自于发霉的干草、青贮饲料、啤酒糟和甜菜浆的孢子会被动物吸入或食用，造成有害的结果，被称为“真菌病”。这样的条件下发生疾病的常见例子包括癣菌病和真菌性流产。真菌性流产会在牛身上以系统传播和随后在胎盘和胎儿组织中以增生的形式出现。

5. 真菌毒素

真菌毒素是真菌的次级代谢产物，具有破坏动物健康和生产力的能力（D’Mello 和 Macdonald, 1998）。这些化合物导致的不同影响，通常以传统的通用术语“霉菌毒素中毒症”来表示，包括不同的综合病症以及非特异性条件。饲料和牧草中出现的主要真菌毒素请参见表 1。表 1 中也列出了不同毒素类别对应的真菌类型。伴随着牧草和谷物的真菌毒素污染经常发生在被特定真菌或共生内生寄生菌感染的作物农场中。当环境条件适合腐败真菌生长时，在收获的产品和饲料的加工和储藏过程中也会发生真菌污染。水分含量和环境温度是真菌定植和霉菌毒素生产的关键影响因素。一般来说，可以把毒性真菌细分为“田间”（或植物-致病性真菌）和“储藏”（或腐生/腐败）生物。麦角菌、内生真菌、镰刀菌和链格孢菌是“田间”真菌的经典代表，而黑曲霉和

青霉是“储藏”真菌的代表生物。分枝杆菌产毒物种，可以在地域流行的基础上进一步加以区分。这些区别也反映这些菌种生长以及次级代谢机制对于环境的特殊要求。因此，黄曲霉、寄生曲霉和赭曲霉素容易在温暖潮湿的条件下生长；而扩展青霉菌和疣状青霉菌基本上是温带真菌。因此，曲霉真菌主要存在于热带和其他温带地区的植物产品中，而青霉素菌则广泛存在于温带的食品中，特别是在谷物中。镰刀真菌几乎无处不在，但是，尽管这种病菌是一种有毒性的物种，但它几乎都与来自于温暖国家的谷物有关。

一个新近发现的特征是，两种或两种以上真菌毒素可通过同一真菌种属（表 1）而进行联合生产。这一发现促使我们对记录在案的真菌毒性发生史上的有名事件所产生的原因，进行了新的解读。

表 1 常见饲料和牧草中发生的主要真菌毒素的来源

真菌毒素	真菌种类
黄曲霉毒素	黄曲霉，寄生曲霉
环匹阿尼酸	黄曲霉
赭曲毒素 A	赭曲霉，鲜绿青霉，圆弧青霉
橘霉素	橘青霉，扩展青霉
棒曲霉素	扩展青霉
黄绿青霉素	黄绿青霉
脱氧雪腐镰刀菌烯醇	大刀镰刀菌，禾谷镰刀菌 T-2
T-2 毒素	拟分枝孢镰刀菌，早熟禾镰刀菌
蛇形菌素	拟分枝孢镰刀菌，禾谷镰刀菌，早熟禾镰刀菌
玉米赤霉烯酮	大刀镰刀菌，禾谷镰刀菌，拟分枝孢镰刀菌
烟曲霉毒素，串珠镰刀菌毒，镰刀菌酸	串珠镰刀菌
细格孢氮杂酸，格链孢醇，甲基醚，细格菌素	链格孢

(续)

真菌毒素	真菌种类
麦角生物碱	苇状羊茅内生真菌
震颤毒素生物碱	内生真菌
麦角生物碱类，紫花	麦角菌属
拟茎点霉毒素	半壳孢样拟茎点霉
孢子素 A	纸皮思霉

黄曲霉毒素

黄曲霉毒素的类别包括黄曲霉毒素 B1、B2、G1 和 G2（分别对应为 AFB1、AFB2、AFG1 和 AFG2）。另外，在食用被 AFB1 污染饲料的奶牛所产的牛奶中，检测到黄曲霉毒素 M1（AFM1）的存在。产黄曲霉素菌株一般被归类于储存真菌，它在相对高水分/高湿度和高温度的条件下增殖繁衍。因此，黄曲霉毒素的污染几乎完全集中于热带饲料中，比如，来自花生、棉籽和棕榈仁的油籽副产品。在温暖潮湿的地区，玉米黄曲霉毒素污染也是一个重要的问题。在那里，黄曲霉可能在作物收获前就感染了作物，并在后期作物的储藏中仍然保持活性。

由于黄曲霉毒素的毒性形式多样，也因为发达国家的相关立法，监测动物饲料中黄曲霉毒素将是一个持续的议题（D'Mello 和 Macdonald, 1998）。在英国，1987—1990 年进行的分析结果显示，所有进口饲料的黄曲霉素 AFB1 水平都符合现行法律规定。但是，在别处，在某些饲料中的黄曲霉素水平仍然对动物的健康造成了威胁。因此，在印度，在花生粕样本中检测到的黄曲霉毒素含量高达 3 700 克/千克。更为严重的是，在中国和越南北部，在玉米样品中发现了黄曲霉素 B1 和镰刀霉菌毒素的合并污染问题。在中国，有 85% 的玉米样品被黄曲霉素 B1 和烟曲霉毒素 B1 双重污染，它们在样本中的污染水平分别为 8~68 克/千克和 160~25 970 克/千克。在越南北部，饲料级玉米中的

AFB1 污染水平为 9~96 克/千克, 烟曲霉毒素 B1 的污染水平为 271~3 447 克/千克 (Placinta, D'Mello 和 Macdonald, 1999)。在 1988 年到 1989 年期间, 对英国农场交货的牛奶进行分析后发现, 牛奶中含有很低的 AFM1 污染, 但在坦桑尼亚农场交货的牛奶中, 却发现了 50% 以上的牛奶制品含有真菌毒素 (D'Mello 和 Macdonald, 1998)。关于黄曲霉毒素对动物健康影响问题的关注, 最早是开始于 1960 年。那时, 在英国, 有 100 000 只火鸡, 因为食用了被黄曲霉污染的花生而死于急性肝坏死和胆管增生 (“土耳其 X 疾病”)。此事件在真菌毒素中毒症历史上是一个标志性事件, 推动了黄曲霉毒素的发现进程。后续的研究表明, 黄曲霉毒素对幼鸭是剧毒的, 而反刍动物却对此毒素具有耐受性。然而, 通过流行病学研究, 会为慢性黄曲霉毒素感染与人类癌症发生的相关关系, 提供重要证据。

赭曲毒素

曲霉菌属中的赭曲霉, 能产生赭曲霉毒素, 这种特性至少与两种青霉菌相同。赭曲毒素 A (OA) 和赭曲毒素 B 是自然存在的两种污染物类型。其中, OA 更为普遍, 主要存在于谷物和食用被污染饲料后的动物组织中。另外一个真菌毒素——橘青霉素, 经常与赭曲毒素以共同污染的形式存在。在最近的保加利亚小麦样品中, OA 和橘青霉素的含量分别从小于 0.5~39 克/千克和 5~420 克/千克到 420 克/千克。在燕麦中, 所检测的 OA 含量更高 (最高能达到 140 克/千克), 而橘青霉素含量却低于检出限 (D'Mello, 2001)。

赭曲毒素和橘青霉素对许多动物种类都对肾脏有毒害性。OA 经常导致猪肾病及巴尔干地区性人发生肾病。在这些疾病症状中, 橘青霉素是怎样发挥其毒性的作用机制还有待进一步阐释。

镰孢菌类真菌毒素

目前, 大量的数据显示, 在全球范围内都存在镰孢菌毒素污

染谷类作物和动物饲料的情况 (D'Mello 和 Macdonald, 1998)。其中, 单端孢霉烯族毒素、玉米赤霉烯酮 (ZEN) 和伏马菌素三者都特别重要。单端孢霉烯族毒素可以细分为 4 个基本类群, 其中类群 A 和类群 B 最为重要。单端孢霉烯族毒素类群 A 包括 T-2 毒素、HT-2 毒素、新茄病镰刀菌烯醇和蛇形菌素 (DAS)。单端孢霉烯族毒素类群 B 包括脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (DON, 也被称为呕吐毒素)、雪腐镰刀菌烯醇和镰刀菌酮 X。能产生这两类单端孢霉烯族毒素是一个特定镰孢菌种的特点。但是, 这些真菌的次级代谢机制中的一个共同特性就是, 它们能合成 ZEN, 且常常与某些单端孢霉烯族毒素一起成为共污染物。伏马菌素是由另外镰孢菌属种类合成的另一类群 (表 1)。在这一类群中的 3 个成员 (伏马菌素 B1、B2 和 B3) 在玉米中经常一起出现。

实际上, 所有在表 1 中列出的镰刀菌的产毒种类, 也是谷类作物的主要病原体, 能导致作物发生多种病害, 比如, 可导致小麦和大麦发生赤霉病, 还能使玉米发生穗腐病等。从发病的作物中收获的籽粒, 很可能已经被真菌毒素污染, 这点已经被大量的证据所证实。近年来, 监控谷物和动物饲料中是否有镰刀霉菌毒素的污染, 多年来已经成为许多调查研究的主题 (表 2 和表 3)。这些真菌毒素一个突出的特点就是, 它们在全球范围内广泛分布。但是, 不同区域间的显著差异也应该注意到。另一个值得关注的议题是, 不同镰刀霉菌毒素在同一个样本中共同污染的证据一致性。针对这些议题, D'Mello 和 Macdonald 于 1999 年进行了更为深入的研究, 其中参照了一项德国的研究数据: 小麦分析样本中有 94% 的样本被 2~6 种镰刀霉菌毒素同时污染, 有 20% 的样本被 DON 和 ZEN 共同污染 (表 2)。最常见的合并污染包括 DON、3-ADON 和 ZEN。检测结果显示, T-2 和 HT-2 毒素水平分别为 0.003~0.250 毫克/千克和 0.003~0.020 毫克/千克, 但是, 这些毒素只与 DON、NIV 和 ZEN 共污染条件下才会

出现。

在波兰东南部的卢布林地区，A 型单端孢霉烯毒素污染大麦籽粒，往往伴随赤霉病的自然发生。其中，占主要地位的微生物是拟枝孢镰孢（Placinta, D'Mello 和 Macdonald, 1999）。在 24 个大麦籽粒样本中，有 50% 的样本呈 T-2 毒素阳性，毒素水平在 0.02~2.4 毫克/千克。其中，有 5 个样本被 T-2 和 HT-2 共同污染，毒素水平在 0.01~0.37 毫克/千克。玉米穗也经常被镰刀菌病原体自然污染。在波兰的一项研究结果显示，禾谷镰刀菌感染往往会造成 DON 毒素（表 2）和 15-ADON 毒素同时污染玉米棒子（Placinta, D'Mello 和 Macdonald, 1999）。在被镰刀菌破坏的玉米粒中的 DON 和 15-ADON 浓度分别为 4~320 毫克/千克和 3~86 毫克/千克。但是，在玉米棒子的棒芯里面，污染得更为严重，其中 DON 的浓度为 9~927 毫克/千克，15-ADON 的浓度为 6~606 毫克/千克。在挪威，商业种植者生产的燕麦粒被 DON 污染程度，比大麦粒或小麦粒都要高（表 2）。除了 NIV 污染物外（表 2），其他的污染物包括 3-ADON 和镰刀菌酮 X。例如，56% 的燕麦样本中含有 3-ADON，检测水平在 0.03 毫克/千克或者更高。其他一些被 DON 污染的特例，包括来自于日本和美国的小麦和大麦样品（表 2）。但是，需要指出的是，即便样本中污染的水平较低，仍然有高发病率的事件出现。在荷兰，有 90% 和 79% 的谷物样本分别被 DON 和 NIV 污染（Placinta, D'Mello 和 Macdonald, 1999）。

表 2 谷物和动物饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇（DON）、雪腐镰刀菌烯醇（NIV）和玉米赤霉烯酮（ZEN）含量的全球分布概况（毫克/千克）

国家	谷物/饲料类型	DON	NIV	ZEN
德国	小麦	0.004~20.5	0.003~0.032	0.001~8.04
波兰	小麦	2.0~40.0	0.01	0.01~2.0

动物饲料质量与安全性评估

(续)

国家	谷物/饲料类型	DON	NIV	ZEN
	玉米粒	4.0~320.0		
	玉米棒子：轴向茎	9.0~927.0		
芬兰	饲料和谷物	0.007~0.3		0.022~0.095
	燕麦	1.3~2.6		
挪威	小麦	0.45~4.3	最大值 0.054	
	大麦	2.2~13.33	最大值 0.77	
	燕麦	7.2~62.05	最大值 0.67	
荷兰	小麦	0.020~0.231	0.007~0.203	0.002~0.174
	大麦	0.004~0.152	0.030~0.145	0.004~0.009
	燕麦	0.056~0.147	0.017~0.039	0.016~0.029
	黑麦	0.008~0.384	0.010~0.034	0.011
南非	谷物/动物饲料		0.05~8.0	
菲律宾	玉米		0.018~0.102	0.059~0.505
泰国	玉米			0.923
韩国	大麦	0.005~0.361	0.005~0.361	
	玉米	平均 0.145	平均 0.168	
越南	玉米粉	1.53~6.51	0.78~1.95	
中国	玉米	0.49~3.10	0.6	
日本	小麦	0.03~1.28	0.04~1.22	0.002~0.025
	大麦			0.010~0.658
	小麦	0.029~11.7	0.01~4.4	0.053~0.51
	大麦	61.0~71.0	14.0~26.0	11.0~15.0
新西兰	玉米	最大值 3.4~8.5	最大值 4.4~7.0	最大值 2.7~10.5
美国	小麦	接近 9.3		
	冬小麦, 1991	<0.1~4.9		
	春小麦, 1991	<0.1~0.9		
	小麦, 1993	<0.5~18.0		
	大麦, 1993	<0.5~26.0		
加拿大	小麦(硬)	0.01~10.5		

(续)

国家	谷物/饲料类型	DON	NIV	ZEN
	小麦 (软, 冬季)	0.01~5.67		
	小麦 (软, 春季)	0.01~1.51		
	玉米	0.02~4.09		
	动物饲料	0.013~0.2	0.065~0.311	
阿根廷	小麦	0.10~9.25		

被伏马菌素广泛污染的玉米和动物饲料，最近被整理报道（表 3）。在大多数情况下，FB1 在伏马菌素污染中占有主导地位。FB1 的最高值是出现在中国的玉米样本中，其中有 85% 的样本为 AFB1 共污染，在泰国也有这样的情况出现。在越南北部，也发现了玉米被多种菌素污染的情况，包括伏马菌素、DON、NIV 和 AFB1。对于 FB2，其污染浓度的最高值出现在阿根廷的玉米样本中。在菲律宾、泰国和印度尼西亚，有 50% 以上的玉米样本被 FB1 和 FB2 所污染，在 48% 的此类样本中发现了这些真菌毒素与黄曲霉毒素一起共同污染的现象（Placinta, D'Mello 和 Macdonald, 1999）。

**表 3 世界范围内玉米和动物饲料被
伏马菌素的污染情况（克/千克）**

国家	FB1	FB2	FB3	Total
玉米				
贝宁	nd ¹ ~2 630	nd~680		nd~3 310
博茨瓦纳	35~255	nd~75	nd~30	35~305
莫桑比克	240~295	75~110	25~50	340~395
南非	60~70	nd	nd	60~70
南非	最大值 2 000			
马拉维	nd~115	nd~30	nd	nd~135

(续)

国家	FB1	FB2	FB3	Total
赞比亚	20~1 420	nd~290		20~1 710
津巴布韦	55~1 910	nd~620	nd~205	55~2 735
坦桑尼亚共和国	nd~160	nd~60	nd	nd~225
洪都拉斯	68~6 555			
阿根廷	85~8 791	nd~11 300	nd~3 537	85~16 760
乌拉圭	nd~3 688			
哥斯达黎加	1 700~4 780			
意大利	10~2 330	nd~520		10~2 850
葡萄牙	90~3 370	nd~1 080		90~4 450
越南	268~1 516	155~401	101~268	524~2 185
中国	160~25 970	160~6 770	110~4 130	430~36 870
菲律宾	57~1 820	58~1 210		
泰国	63~18 800	50~1 400		
印度尼西亚	226~1 780	231~556		
动物饲料				
南非	4 000~11 000			
乌拉圭	256~6 342			
印度	20~260			

注：1nd=检测不到。

来源：Placinta, D'Mello 和 Macdonald, 1999。

镰刀菌毒素会对农场家畜造成多种影响 (D'Mello, 2000)。在猪身上, DON 是一种强力的饲料摄入抑制剂; ZEN 可以导致猪和反刍动物产生生殖异常。伏马菌素与许多具体症状有关, 包括猪的肺水肿和马的脑脊髓白质病。在南非, 玉米的伏马毒素污染已与人的食管癌发生密切相关。

内生真菌生物碱

内生真菌——芨状羊茅内生真菌常常与多年生高羊茅密切相关；而另一相关真菌——多年生黑麦草内生真菌，则存在于多年生黑麦草中（D'Mello, 2000）。麦角生物碱（主要是麦角瓦灵），则发生在芨状羊茅内生真菌感染的高羊茅草上；而吲哚异戊二烯黑麦草神经毒素生物碱（特别是黑麦草神经毒素 B）则发生在被多年生黑麦草内生真菌感染的多年生黑麦草中。麦角肽生物碱可以降低牛的生长速度、繁殖性能以及牛奶产量；而黑麦草神经毒素化合物则能对反刍动物的神经系统造成影响。

拟茎点霉毒素

在澳大利亚，羽扇豆荳作为羊饲料具有一定的价值。但是真菌羽扇豆茎腐病的感染是一个主要的限制因素，因为由这种真菌所生产的拟茎点霉毒素具有毒性。植物成熟或者衰老的部分，包括茎、豆荚和种子，都特别容易受感染。拟茎点霉毒素 A 是一种主要的毒素，能导致羊产生多种疾病，比如，生长不良、肝脏损伤、光敏感以及繁殖率降低等（D'Mello 和 Macdonald, 1998）。

蕈孢菌素

纸皮思霉是一种广泛存在的牧场腐生物，它能合成蕈孢菌素 A。蕈孢菌素 A 是一种可以造成羊面部湿疹和肝脏损伤的化合物。

6. 植物毒素

许多植物成分都能对农场畜牧业的生产力造成不良影响（D'Mello, 2000）。这些成分都存在于在现实饲喂中所用的植物叶子和（或）种子里。表 4 列出了几个特定毒素的典型浓度。植物毒素可以分为不耐热组和耐热组。不耐热组包括凝集素、蛋白酶抑制剂和氰，它们对标准加工温度都非常敏感。耐热组包括抗原蛋白质、缩合单宁、喹啉烷类生物碱、硫代葡萄糖苷、棉酚、皂苷、非蛋白氨基酸 S-甲基半胱氨酸亚砷、含羞草碱和植物雌

激素。这些物质作为抗营养因子的作用已被 D'Mello (2000) 进行过详细阐述, 但对其突出要点仍需在此重申一下。

表 4 植物毒素: 来源和浓度

毒 素	主要来源	典型浓度
凝集素	刀豆	73 单位/毫克蛋白
	四棱豆	40320 单位/毫克
	赖马豆	59 单位/毫克蛋白
胰蛋白酶抑制剂	大豆	88 单位/毫克
抗原蛋白	大豆	—
氰	木薯块根	186 毫克/千克 (以 HCN 计)
缩合单宁	相思树	65 克/千克
	莲花菌	30~40 克/千克
喹啉烷生物碱	羽扇豆	10~20 克/千克
硫化葡萄糖苷	油菜籽	100 毫摩尔/千克
棉籽酚	棉籽	0.6~12 克/千克 (游离)
皂苷 (甾体)	俯仰臂形草, 黍属	—
S-甲基半胱氨酸亚砷	羽衣甘蓝	40~60 克/千克
含羞草碱	银合欢	145 克/千克 (种子)
		25 克/千克 (叶子)
植物雌激素	三叶草, 紫花苜蓿, 大豆	—

资料来源: 采编于 D'Mello, 1995。

凝集素

凝集素是一种蛋白质, 它可对小肠黏膜造成损伤。与大多数其他日粮蛋白不同, 凝集素对肠道内的消化裂解有一定的耐性。大量被摄入的外源凝集素可以从饲喂含有其中一种豆科植物种子日粮的动物粪便中完全回收 (D'Mello, 2000)。具有强效抗营养和有毒特性的一个最好实例, 就是伴刀豆球蛋白 A, 它是刀豆的

组成部分。凝集素还存在于其他豆科粮食中，包括四棱豆和大豆。伴刀豆球蛋白 A 能够促进刷状缘膜脱落，降低绒毛长度，从而降低小肠的吸收表面积。与其他凝集素，肠道固有膜有可能会对嗜酸性粒细胞和淋巴细胞具有渗透性。整体影响是降低了营养物质吸收量，但是免疫功能也可能会受损。

蛋白酶抑制剂

蛋白酶抑制剂是一种不耐热因子的典型例子，它具有抗营养的功效。它们构成了一类独特的蛋白质，能够以一个非常具体的方式，与在动物消化性分泌液中的多种蛋白水解酶发生反应。大豆胰蛋白酶抑制剂的特性比较明显（表 4），是营养价值的主要决定因素（D'Mello, 1995）。蛋白酶抑制剂也存在于其他豆科植物的种子中，比如，蚕豆、四棱豆、木豆和豇豆等。对动物造成的影响主要有：降低蛋白的消化率，导致氨基酸的内源性损失，导致动物的整体性能遭受损伤。

抗原蛋白

某些豆科植物种子的贮藏蛋白能够穿过肠黏膜的上皮屏障，对农场动物的免疫功能造成不利影响。在大豆中，所鉴定的抗原蛋白为大豆球蛋白和伴大豆球蛋白。这些抗原蛋白的特征是能在常规加热加工过程中不变性，在动物的消化道中也能抵抗酶类的分解。抗原蛋白最显著的效果体现在“免疫过敏综合征”方面。在把热处理后的大豆饲喂给敏感牛犊和小猪后，会出现这种症状（D'Mello, 1991）。这些组分的抗原可以引起广泛的局部性的和系统性的免疫反应，并造成严重的肠道损伤。由此而造成的影响，包括食糜运动异常，养分吸收遭到破坏以及容易发生腹泻等。

氰

氰广泛存在于植物中，并以多种类型存在于高粱和木薯（表 4）中，占主要地位的氰分别是蜀黍苷和亚麻苦苷。亚麻苦苷化合物也存在于亚麻籽中。氰是一种糖苷类物质，容易产生氢氰

酸；氢氰酸分子会导致中枢神经系统功能紊乱、呼吸衰竭和心脏骤停 (D'Mello, 2000)。家禽代谢能值在未经处理的木薯块根饲料中表现得比较低，可能是因为未经处理的木薯块根饲料具有生氰能力。

缩合单宁

单宁属于酚类化合物，相对分子质量超过 500。缩合单宁 (CTs) 是酚类化合物的一个子类，广泛分布在豆科牧草 (表 4)、种子和高粱中。牛和羊对 CTs 敏感，山羊则对其有较强的耐受性。当饲料中含有 CTs [包括荷花或者枝叶类豆科植物 (比如金合欢属植物)] 中都含有的 CTs 时，此时对食用此类饲料的绵羊就会造成不利影响。主要影响包括：破坏瘤胃功能、降低摄食量降低、毛生长缓慢以及体重增长缓慢等影响。然而，在中等水平 (30~40 克/千克豆科植物干物质)，CTs 会使过瘤胃蛋白利用率增加和抑制瘤胃鼓胀，此时它们具有营养优势。在较高的水平 (每/千克豆科植物干物质含有 100~120 克 CTs)，CTs 能减少羔羊胃肠道寄生虫病 (D'Mello, 2000)。

喹啉生物碱

喹啉生物碱产生于羽扇豆中，它们包括羽扇豆碱、鹰爪豆碱和白金雀儿碱。苦味品种中总生物碱含量水平相对较高 (表 4)，不适合用于动物饲料，因为摄入这些物质后会造成负面影响。此外，牛在怀孕期间食用羽扇豆类植物，可能会产生多种先天性畸形小牛。

硫代葡萄糖苷

硫代葡萄糖苷是一种芸薹属饲料作物中重要的苷类物质，如羽衣甘蓝 (表 4; D'Mello, 2000)。通过植物或微生物酶 (黑芥子硫苷酸酶) 的作用，会把硫代葡萄糖苷中的葡萄糖移除，然后释放不同的化合物，然后这些化合物进一步分解后将产生大量的有毒代谢产物。最常见的分解产物是异硫氰酸酯和腈，但是，根据 pH、温度和金属离子浓度的不同，也可能产生大量的其他代

谢产物。这些产物可能造成器官损伤，致甲状腺肿大或降低采食量，特别在非反刍动物中。

棉酚

棉酚色素在棉籽中（表 4）以游离和结合两种形式存在。在整个种子中，棉酚基本上是以游离的形式存在，但在加工产生不活跃形式的过程中，与蛋白质结合的棉酚量可能是变动的。游离棉酚是有毒性的物质，能造成器官损伤、心脏衰竭甚至死亡。棉籽粕饲喂给公牛后会导致精子畸形数量增加，降低精子产量。

皂苷

皂苷分为两类：一类甾体皂苷，它以葡萄糖苷的形式存在于某些牧场植物中，如俯仰臂形草和黍属植物中（表 4）；另一类则是三萜皂苷，存在于大豆和苜蓿中。许多羊的肝源性光敏反应条件都归因于摄入了含有甾体皂苷的牧草植物。相反，苜蓿中的三萜皂苷能降低饲料在瘤胃中的降解率。

氨基酸

有许多非蛋白氨基酸存在于植物的叶子和种子中。牧草和块根类芸薹属作物含有 S-甲基半胱氨酸亚砷（SMCO），而芳香族氨基酸则存在于热带豆科植物银合欢的树叶和种子中（D'Mello, 2000）。滥用芸薹属牧草喂养反刍牲畜，会导致反刍牲畜的器官损害和溶血性贫血，这些都是由于摄入了 SMCO 造成的。贸然给羊饲喂银合欢属植物，会导致羊毛脱落、摄食减少、器官损伤，甚至死亡。假如饲喂给牛，会导致牛毛脱落、过度流涎、嗜睡、体重减轻和甲状腺肿大。这些病症都是银合欢毒性的常见特征。

植物雌激素

植物雌激素是异黄酮化合物的不同类别，主要发现于牧草和豆科粮食中（表 4）。在苜蓿中，芒柄花黄素是植物雌激素的主要形式。植物雌激素在瘤胃中能得到很快代谢，形成具有不同生物活性的产物。芒柄花黄素可以转化为一种更具有强雌激素作用

的化合物。植物雌激素与绵羊的“三叶草病”有密切关系，这种病的特点是排卵和受孕率都比较低（D'Mello, 2000）。

7. 杂草种子

世界范围内都存在杂草种子污染动物饲料的问题。杂草种子的作用，一是起因于它们所含有的毒素，二是起因于它们对饲料营养密度的稀释效应。杂草种子所含的毒素，许多都已在前一章中提到，特别是生物碱、皂苷、氨基酸和蛋白酶抑制剂。在不同国家被立法控制的杂草种子的实例包括：曼陀罗属植物，苕子、蓖麻和猪屎豆属植物。

8. 未申报的添加剂

动物产品中经常被一些药物残留所污染，而这些药物残留一般是通过饲料方式给予的。这样的饲料添加剂可以被用于疾病防治，提高家畜性能。药物残留物也有可能来自于含有未申报药物的动物饲料的污染。这些药物所发生的污染，主要是由于饲料厂内交叉污染产生的（Lynas 等，1998）。例如，加药饲料残留可能会保留在设备，然后污染后续批次的饲料。在这样的条件下，污染程度可能会较低，但足以造成动物产品中农药残留物的检出。Lynas 等（1998）检验了在北爱尔兰地区未申报的抗菌添加剂对饲料污染的程度，结果发现，在 247 份加药饲料中，发现有 35% 的饲料含有未申报的抗菌药物；在 161 份未加药饲料中，44% 饲料含有抗生素。这些经常被鉴定的污染物包括金霉素、磺胺类、青霉素和离子载体。如果在肥育期，动物食用了受磺胺二甲嘧啶污染的饲料后，足以导致过量的组织残留。未申报抗生素对饲料污染可能是一个全球问题，需要进一步调查。动物产品中的药物残留是有害的，因为这种残留会影响人类的健康，比如，过敏反应，此外，还能在发病生物体内产生对抗生素的耐药性。

9. 相关的规章制度

对有害物质控制管理的前景作一个简要回顾，具有启发性和重要性。目前，相关的规章制度在欧洲和北美是最综合的，而在发展中国家，相关的法定指令甚至还未曾建立。因此，50 个国家，大部分在非洲，还没有相关法规来控制霉菌毒素（D'Mello 和 Macdonald, 1998）。最近实施的新法规将改变这种状况，该法规对进口到欧盟（EU）的饲料进行了规范，于 1999 年 8 月生效。非欧盟资料生产商，现在需要有一个欧盟的代理商，来证明进口到欧盟的动物饲料的质量和标准必须符合欧盟的相关规定。

对于重金属和黄曲霉素，一般来讲，直接的、完全的和互补的饲料都在规定界限方面都有所区别。也可按特定类型动物饲料为目的，进行区别对待。为了控制农药，对饲料和脂肪类产品分别指定了不同的法律法规，但实际上对于动物的类型却没有分别。在大量植物毒素中，只有棉酚、氰化物和特定的硫代葡萄糖受到了欧盟的监管。对于特定的细菌对饲料的污染，需要有特别的规定。例如，按照英国的规定，在饲料检测中，假如出现了沙门氏菌阳性结果，就必须向“部长的兽医官”进行汇报（HM-SO, 1989）。

10. 加工的影响

在饲料生产中，热处理是一个常用的过程，可以改进动物饲料的特征，比如安全性和营养价值。例如，对于垫料禽粪进行热处理，是控制甚至是消灭沙门氏菌、大肠杆菌和弯曲杆菌污染的有效方法（Jeffrey 等, 1998）。热加工也能对蛋白酶抑制剂、凝集素和氰进行有效变性。然而，对于抗原蛋白，需要更复杂的程序，涉及使用热乙醇萃取法（D'Mello, 1991）。

对用于动物饲料的遭受黄曲霉毒素污染的油籽，氨化似乎是

首选的处理方法。这种饲料在商业化饲料厂中，在高温高压条件下，用氢氧化铵或者气态氨进行处理；或者在发展中国家，在小规模饲料经营中，这种饲料在常温和低压条件下进行进行处理。如果需要完成氨化反应，解毒过程是不可逆转的，黄曲霉毒素污染将会被完全清除。假如残余的氨被消除，含有污染物清除的油籽粕的日粮将很容易地被动物消化吸收，而不会出现不良反应。根据污染物清除的效率，AFM1 在奶牛生产的牛奶中的残留将会非常少或者消失。富含单宁牧草的负面效应将会通过聚乙二醇处理或者叶面喷施来克服，但这种处理过程的实际应用还有待进行经济学方面的评估。

11. 结论

动物饲料，包括牧草，可能会被有机化合物、无机化合物以及多种颗粒物所污染。有机化合物是最大的一类污染物，包括植物毒素、霉菌毒素、抗生素、朊蛋白和农药。无机化合物，包括重金属和放射性核物质。如杂草种子和某些细菌病原体等一些颗粒物也是饲料中常见的污染物。饲料污染物和毒素影响面很广，包括导致摄入量减少、繁殖功能障碍和细菌性疾病发生率增加等。转移到食用动物产品中的残留物，也是备受关注的因素。目前，已经制定了比较适合的综合法规，用于控制饲料中的多种化合物和病原体。然而，在许多发展中国家，特别是在非洲，法令性的污染物控制还没有得到充分发展。饲料中污染物的排除范围也是有限的，且通常也不符合经济原则。预防污染才是最有效可行的策略。

参考文献

- Dhand, N. K. , Joshi, D. V. & Jand, S. K. 1998. Fungal contaminants of dairy feed and their toxigenicity. Indian Journal of Animal Sciences, 68: 1095 - 1096.

- D'Mello, J. P. F.** 1991. Antigenic proteins. In J. P. F. D'Mello, C. M. Duffus & J. H. Duffus, eds. Toxic substances in crop plants, pp. 107 - 125. Cambridge, UK, Royal Society of Chemistry.
- D'Mello, J. P. F.** 1995. Antinutritional substances in legume seeds. In J. P. F. D'Mello and C. Devendra, eds. Tropical legumes in animal nutrition, pp. 135 - 172. Wallingford, UK, CAB International.
- D'Mello, J. P. F.** 2000. Antinutritional factors and mycotoxins. In J. P. F. D'Mello, ed. Farm animal metabolism and nutrition, pp. 383 - 403. Wallingford, UK, CAB International.
- D'Mello, J. P. F.** 2001. Mycotoxins in plant products. In J. P. F. D'Mello, ed. Food safety. Wallingford, UK, CABI Publishing. (出版中。)
- D'Mello, J. P. F. , Macdonald, A. M. C. & Cochrane, M. P.** 1993. A preliminary study of the potential for mycotoxin production in barley grain. Aspects of Applied Biology, 36: 375 - 382.
- D'Mello, J. P. F. & Macdonald, A. M. C.** 1998. Fungal toxins as disease elicitors. In J. Rose, ed. Environmental toxicology: current developments, pp. 253 - 289. Amsterdam, the Netherlands, Gordon and Breach Science Publishers.
- HMSO.** 1989. Statutory instruments. The Zoonoses Order 1989. London, Her Majesty's Stationery Office (HMSO) .
- Jeffrey, J. S. , Kirk, J. H. , Atwill, E. R. & Cullor, J. S.** 1998. Prevalence of selected microbial pathogens in processed poultry waste used as dairy cattle feed. Poultry Science, 77: 808 - 811.
- Krytenburg, D. S. , Hancock, D. D. , Rice, D. H. , Besser, T. E. , Gay, C. C. & Gay, J. M.** 1998. A pilot survey of Salmonella enterica contamination of cattle feeds in the Pacific northwestern USA. Animal Feed Science and Technology, 75: 75 - 79.
- Lynas, L. , Currie, D. , McCaughey, W. J. , McEvoy, J. D. G. & Kennedy, D. G.** 1998. Contamination of animal feedingstuffs with undeclared antimicrobial additives. Food Additives and Contaminants, 15: 162 - 170.
- Lynn, T. V. , Hancock, D. D. , Besser, T. E. , Harrison, J. H. , Rice, D. H. , Stewart, N. T. & Rowan, L. L.** 1998. The occurrence and replication of

- Escherichia coli in cattle feeds. *Journal of Dairy Science*, 81: 1102 - 1108.
- MAFF.** 1994. Radionuclides in foods. Food Surveillance Paper No. 43. London, United Kingdom Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (MAFF), Her Majesty's Stationery Office.
- Placinta, C. M. , D'Mello, J. P. F. & Macdonald, A. M. C.** 1999. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with Fusarium mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*, 78: 21 - 37.
- van Barneveld, R. J.** 1999. Physical and chemical contaminants in grains used in livestock feed. *Australian Journal of Agricultural Research*, 50: 807 - 823.

食用动物中的抗生素生长促进剂

Peter Hughes

英国，利兹大学，生物化学与分子生物学学院，
微生物研究室

John Heritage

英国，利兹大学，生物化学与分子生物学学院，
微生物研究室

就将抗生素用做食用动物的生长促进剂这一问题，一直存在争议。这些抗生素在动物饲料中的所用剂量很小，被认为能改善产品质量，使肉中的脂肪含量较低，而蛋白质含量则较高。使用抗生素生长促进剂的另外一个好处是：它可以控制人畜共患病原体，如沙门氏菌、弯曲杆菌、大肠杆菌和肠球菌。任何抗生素的使用都与致病细菌的耐药选择有关。人们一直存在争议，认为使用抗生素生长促进剂将对细菌施加一个选择压力。在临床或者兽医实践中使用那些对抗生素有耐药性细菌，会影响抗菌化疗的继续使用。本文阐述了使用抗生素作为生长促进剂的应用状况，然后也考察了其他一些用于获得优质肉的备选方法。

1. 引言

“抗生素生长促进剂”这一术语，是用来描述任何可以破坏或者抑制细菌的药物，可以以很低的、亚治疗剂量来给药。为促进生长而使用抗生素，已经导致了畜牧业的集约化发展。传染病病原体能减少养殖的食用动物的产量。为了控制它们，亚治疗剂量抗生素和抗菌药物的给药处理，已被证明是有效的。生长促进

剂的使用，在很大程度上是集约化养殖方法的一个问题。这些由于抗生素使用所产生的问题，在很大程度上都出现在那些发达国家，而非发展中国家。

根据国家动物卫生办公室（NOAH，2001）的定义，抗生素生长促进剂，是用于“帮助动物更有效地消化食物，获得最大的受益，并让动物发展成为强壮和健康的个体”。虽然目前支撑它们发生作用的相关机制还不清楚，但人们认为，抗生素抑制了肠道内细菌的敏感群体。据估计，在猪饲料中高达 6% 净能量可能会因肠道中微生物发酵而丢失（Jensen，1998）。如果微生物种群可以被更好地控制，丢失的能量可能会被转移到生长方面。

Thomke 和 Elwinger（1998）推测，在免疫反应过程中释放出的细胞因子，还可能会刺激分解激素的释放，这将会降低肌肉群生长量。因此，胃肠道感染的减少将导致随后肌肉重量的增加。不管生长促进剂的作用机制到底如何，它们的使用将使日增重保持在 1%~10%，进而获得脂肪含量低、蛋白质含量高的优质肉产品。毋庸置疑，生长促进剂是有效的。然而，Prescott 及 Baggot（1993）发现，生长促进剂对那些患病动物和那些居住在拥挤脏乱条件下的动物，作用更为明显。

目前，围绕用于肉类生产的动物生长促进剂的使用，还存在争议。因为一段时期内对于抗生素的过度使用，可能会导致当地菌群对抗生素产生抗性。但这也有特例：临床使用 60 年后，化脓性链球菌仍然对青霉素敏感，但像这样的例子还是非常罕见的。毫无疑问，抗菌化疗的医疗应用，特别是为了治疗人类的感染，给以前敏感细菌施加了巨大的选择压力，以使它们获取编码能对抗生素产生抗性的遗传元件。

抵抗力不佳的病人和抗生素的过度使用，都会为细菌敏感菌株的抗性增强提供一个最佳环境，这种现象在我们医院已有发生。此类现象的最好案例之一就是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（MRSA）。大多数金黄色葡萄球菌的菌株都会产生青霉素酶，它

是一类内酰胺酶，能分解青霉素；稳定型青霉素酶——内酰胺类，如甲氧西林、氯唑西林和氟氯西林，已被用于治疗金黄色葡萄球菌感染。这些分子的侧链构型，可以避免内酰胺酶与抗生素的结合，从而使药物更具有稳定性。这些药物在抗生素的竞争对抗中的广泛使用，导致了耐内酰胺酶的金黄色葡萄球菌菌株的出现，它们通过另外一种机制对内酰胺酶产生抗性。MRSA 还获得了能对多种抗生素都有抗性的决定因素（医院感染学会，2001）。MRSA 菌株往往对大量的抗菌药物都有抗性，比如，红霉素、克林霉素、四环素和许多氨基糖苷类。目前，对于严重的全身性 MRSA 感染的唯一治疗方法，就是用糖肽类抗生素，包括万古霉素。自 1996 年以来，已经出现了 MRSA 菌株对万古霉素敏感性下降（2001，疾病控制和预防中心）的报告。更令人担忧的是，当在实验室中把 *vanA* 基因盒从耐万古霉素肠球菌中转移后，MRSA 可以对糖肽有高水平耐药表达（Noble, 1997）。这种发生在实验室之外的情况，也使我们与后抗生素时代更近了一步。在这个时代，某些细菌感染已不能够用抗菌化疗来治疗了。

为了避免进入后抗生素时代，世界各地机构正在研究关于抗生素的使用和滥用问题（众议院上议院，1998；欧洲共同体委员会，2001）。尽管为防止感染而作为预防措施的抗生素给药在增加，但有多数抗生素，60%左右的抗生素是用于人类疾病的治疗。养殖业是继医疗工作者使用后的第二大主要消费领域。大约 40%的抗生素被用做生长促进剂，尽管抗生素也可用于动物疾病治疗。为了减少选择性抗药性细菌出现的风险，必须对抗生素的使用加以限制。减少抗生素在最具有吸引力领域的使用量，就是要禁止在食用动物中把抗生素作为生长促进剂使用。本文概述了以抗生素为生长促进剂的使用所产生的后果，研究了一些替代方案，其目的是为了降低那些可造成人类和动物发生疾病的细菌的抗性选择的压力。

2. 抗生素生长促进剂目前的使用状况

世界范围内，抗生素作为动物生长促进剂的使用，有着明显的不同。瑞典现在不使用抗生素以促进动物生长；美国则使用种类繁多的抗生素，包括一些被认为是“医学上重要的”抗生素。以下信息是来自抗生素耐药性联合专家咨询委员会（JETA-CAR, 1999）关于食品生产动物抗生素的使用报告。猪接触到生长促进剂的范围是最大的。例如，在美国，内酰胺类抗生素，包括青霉素类、林可酰胺类抗生素和大环内酯类抗生素（包括红霉素，四环素）经常被使用在猪身上。所有这些抗生素也都用于人类感染的治疗。在美国，有一些其他的化合物也用于促进猪的生长方面。这些化合物包括杆菌肽、默诺霉素、短截北风菌素、喹喔啉、维吉尼亚霉素和砷化合物。在美国，用于促进牛生长的化合物有默诺霉素和维吉尼亚霉素，两者也都在家禽上作为生长促进剂来使用。使用一些诸如莫能菌素的离子载体也用来促进牛的生长。砷化合物也被用于家禽。美国的动物卫生研究所（AHI, 1995）估算，假如不使用抗生素生长促进剂，美国将需要额外的 452 万只鸡、2 300 万头牛和 1 200 万头以上的猪，才能达到目前的生产水平。

在澳大利亚，有一系列的生长促进剂被使用。养猪户使用了砷化合物、默诺霉素、大环内酯类吉他霉素和泰乐菌素、喹喔啉喹乙醇、维吉尼亚和链阳菌素。家禽生产商使用砷化合物、默诺霉素、杆菌肽和维吉尼亚霉素。他们还使用默诺霉素和大环内酯类竹桃霉素。在 1999 年 12 月，糖肽类阿伏霉素被撤出澳大利亚市场，现有库存也在 2000 年 7 月 1 日登记失效后，不允许使用。关于这种化合物的使用情况，将在下文中进行详细阐述。

在欧盟使用生长促进剂受到了许多的限制。寡糖阿维霉素被用于猪和家禽养殖中；离子载体，即莫能菌素和盐霉素，被用于牛和猪身上；默诺霉素则用于多种家畜上，包括牛、猪、家禽和

兔。在养猪过程中，饲料转化效率及日增重率约提高了 2.5%。与家畜腹泻和增生性肠炎有关的死亡率，比那些没有使用抗菌生长促进剂的国家（比如瑞典）低 10%~15%。在家禽身上使用诸如杆菌肽、维吉尼亚霉素和阿伏霉素之类的生长促进剂，可以控制产气荚膜杆菌的感染。这些生长促进剂的使用，除了能改善饲料的转化效率之外，还具有潜在的致命性。据估计，减少产气荚膜梭状芽孢杆菌的感染，能增加 1.5% 的经济效益（JETA-CAR, 1999）。

美国在养牛产业方面可能是最依赖生长促进剂的国家，因为牛对能量的需求很高，假如不使用生长促进剂，就很难满足它们的生长需要。高能量日粮可以增加肉牛的肌肉生长量和脂肪沉积，还能提高奶牛的牛奶品质。但不幸的是，这类日粮的使用也具有副作用，比如家畜气胀病和乳酸性酸中毒，这些都可导致身体衰弱或者甚至致命。在欧洲，这些情况都不是问题，因为在欧洲的牛日粮中含有大量的草料。为另外解决上述问题，人们使用了莫能菌素，不但可以防止上述问题的发生，还能显著减低氨气和甲烷气体的排放（Mbanzamihigo 等，1995）。莫能菌素在医学上不属于一类很重要的抗生素，也不容易产生抗生素抗性的问题。因此，1997 年 Roger 等研究人员，通过调查长期的莫能菌素治疗带来的影响后发现，经过了 96~146 天的莫能菌素治疗后，瘤胃微生物并没有出现适应性现象，撤掉莫能菌素后的几个小时内，绝大部分影响都将消失。

从这个意义上讲，莫能菌素可能是对人类和动物健康以及细菌抗性问题上，是最为安全有效的抗生素生长促进剂之一。维吉尼亚霉素具有类似的用途，如防治牛和家禽产生乳酸，但是使用这种化合物会导致细菌抗药性的产生。它与普那霉素和奎奴普丁有关，两者都用在人类医学中。但为此也人担心，它们的持续使用可能破坏人类的治疗。欧盟已经禁止它被作为生长促进剂来使用（Butaye 等，2000）。

3. 人类健康与抗生素生长促进剂的使用后果

肉类中的抗生素残留可以直接影响人类健康，产生一些副作用，或者通过抗生素抗性决定因素的间接选择，扩散到人类病原菌上。氯霉素就是导致出现上述问题的抗生素。Gassner 和 Wuethrich (1994) 在肉中发现了氯霉素代谢产物，因此，他们推断，肉中的抗生素残留，很可能是导致人类出现再生障碍性贫血的原因之一。在十几年前的美国，和 1994 年后的欧盟，都禁止了生长促进剂的使用。那时的氯霉素仍然作为药物来治疗伤寒。生长促进剂在畜牧业上的过度使用，导致了抗药性沙门氏菌属的增加，其中也包括伤寒杆菌，它是一种能导致伤寒的致病细菌。应该指出，抗生素生长促进剂的使用和越来越强的细菌抗药性之间的关系，仍然未能明确。自从 1994 年颁布禁令以来，伤寒感染率和治愈率都没有发生明显的变化。1999 年，在英格兰和威尔士有 153 例伤寒，1994 年有 227 例，1991 年有 132 例（公共卫生实验室管理署，在线）。对于氯霉素抗性增加的另一种解释是：在发展中国家，这种抗生素可能一种不需处方就可出售的药物，而且它还非常便宜，也容易生产。

一般来说，肉类中抗生素残留的影响与抗生素抗性菌株选择和扩增问题相比，显得微不足道。通过这种方式选择的抗生素抗性决定因子可能有多种途径，通过这些途径，它们可能会破坏抗生素的治疗应用。对人类有致病性的微生物也可能发生抗性选择。另外，抗性选择也可在能引起人类疾病的动物源性细菌上发生。在另一个层面，抗性决定因子也可以在被饲喂给动物的共生菌成员中选择。如果抗性决定因子是可动的，那它可能随后转移到人的或者动物的病原体上。抗性选择的后果，由于替代物或者可能更有毒的药物的使用，从慢性病和一些副作用出现，甚至导致死亡，伴随整个治疗的失败。现代医药将丰富的抗生素提供给我们，但像在 MRSA 例子中所阐述的那样，替代物正在开始耗

尽。因抗生素的使用所出现的、4种最常见的、与抗药性相关的微生物包括沙门氏菌、弯曲杆菌、大肠埃希氏菌和肠球菌，这些细菌很可能被频繁地在人与动物之间传播。

沙门氏菌

沙门氏菌可致人类发生多种疾病。伤寒沙门氏菌是潜在的致命伤寒病的病原体。这种感染完全来源于人类，它通过人粪便污染食物和水，如果不及时治疗，死亡率非常高。由于它主要是在卫生条件不佳条件下进行传播的，并来源于人类病原菌携带者，因此它不属于本次综述讨论的范畴。沙门氏菌的其他种类是动物源性细菌，通常来自于被污染的食物，比如家禽。他们通常会导致肠胃炎。症状包括从轻度腹泻、恶心到严重呕吐、发烧和剧烈腹泻。多数感染局限于肠道，但对于处于极端年龄段的人，沙门氏菌可能会引起扩散性疾病。这种情况需要住院治疗，由于极度脱水，加上内毒素性休克，甚至可能导致死亡。沙门氏菌病的最常见的病原体是肠道炎沙门氏菌和鼠伤寒沙门氏菌，这些细菌经常作为污染物在家禽和鸡蛋中发现。最近用于控制沙门氏菌感染的措施，可以非常有效地控制感染事件的发生，特别是肠道炎沙门氏菌感染（2001，食品微生物安全顾问委员会）。

鼠伤寒沙门氏菌通常可用氟喹诺酮类、氯霉素和氨苄西林来治疗。然而，Molbak 等人（1999）报道，鼠伤寒沙门氏菌株 DT104 除了对氨苄青霉素和四环素等多种药物产生耐药性外，对喹诺酮类药物也具有抗药性。因此，由鼠伤寒沙门氏菌株 DT104 所引起的感染可能很难治疗。

1998 年 Bonner 报道，1983 年由沙门氏菌抗药菌株引起的食物中毒事件的暴发，与牛食用了含金霉素饲料后，其肉被制成的汉堡包有关。Spika 等人于 1987 年，对氯霉素有抗性的沙门氏菌株——新港沙门氏菌变种进行了追踪研究，研究的范围从牛肉汉堡到饲喂氯霉素的牛群。Tacket 等人（1985）报道，由于食用了鲜奶导致了多重耐药肠沙门氏菌变种的爆发。所有这些报道

尽管都来自于北美洲，但类似的问题却不仅限于北美洲；细菌不会对国家的边界区别对待。1988 年在英国分离出了鼠伤寒沙门氏菌 DT104，随后这种细菌传播到了世界各地。

利用医学上重要的药物，比如氯霉素和四环素作为生长促进剂，看起来可能是促进抗性菌株产生的最明显途径，这将对人类健康造成威胁，但是，抗性菌株的选择过程也并非如此简单。JETACAR (1999) 报道，氨基葡萄糖阿布拉霉素作为生长促进剂使用，与具有耐药性的沙门氏菌的分离有非常明显的相关性，特别是针对牛身上的鼠伤寒沙门氏菌 DT104。这些细菌具有氨基葡萄糖抗性是因为它们获取了 *N*-乙酰酶。这种酶也对人类医药中另一重要药物——庆大霉素具有耐药性。

一些科学家认为，抗生素生长促进剂可能间接地促进了沙门氏菌在不卫生条件下在动物间的传播。生长促进剂，通过减少病原体含量的方式，为合适的卫生处理充当了一种掩蔽剂的角色。集约型肉鸡生产，其卫生条件基本上是比较差的，也因此遭到了批评。肉鸡一般都是舍养，这就使得任何病原体可以在群体内进行快速传播。

弯曲杆菌

弯曲杆菌，特别是空肠弯曲杆菌和大肠杆菌，是发达国家细菌性食物中毒的最常见原因，比如英国和美国。英国公共健康实验室服务局报道，在 2000 年有 53 858 个弯曲杆菌的粪便报告，而沙门氏菌的粪便报告只有 14 844 件（公共健康实验室服务局，在线）。由弯曲杆菌引起的胃肠道疾病，与沙门氏菌引起的临床疾病症状，具有很多的相似性，包括腹泻、呕吐和发烧。由该菌导致疾病从而造成的住院情况是罕见的，影响的主要是那些处于极端年龄段的人，因弯曲杆菌感染而死亡事件更是少见。

空肠弯曲杆菌是造成人类弯曲杆菌属感染的最常见的细菌，它对很多药物制剂都很敏感，包括红霉素、氯霉素、四环素和庆大霉素。针对少见的革兰氏阴性菌，感染治疗首选的药物是大环

内酯类红霉素，它在美国也被用来作为猪的生长促进剂来使用。没有人认为该方法一种有害的治疗方法。但是，由于弯曲杆菌在动物健康方面是一种不太重要的细菌，几乎没有相关研究专门从动物中分离具有抗性的弯曲杆菌。因为大环内酯类抗生素家族在临床上的重要地位，所以这些抗生素在食品工业中广泛使用也受到了关注。这样一来，就非常有必要开展相关研究，从动物分离物中发现那些抗生素抗性决定因子。

如果促进增长的大环内酯类抗生素有很少或根本没有效果，那么氟喹诺酮类药物的治疗作用与耐药性增加有关。氟喹诺酮类耐药菌株在世界各地不断涌现。Engberg 等人（2001）概述了从人体中分离出的弯曲杆菌的体外大环内酯类和喹诺酮类耐药性的流行性和发展趋势。分析结果表明，在食品动物身上喹诺酮类的应用，与人类耐药菌株之间存在时间关系。Endtz 等人（1991）报道，使用氟喹诺酮类药物治疗家禽的呼吸系统疾病，似乎导致了所治疗禽类的内脏中有耐氟喹诺酮弯曲杆菌的发生。值得注意的是，作为治疗药物的使用剂量往往大于以促进生长为目的使用剂量。

这种高剂量施加了巨大的选择压力，就弯曲杆菌来说，会有耐药菌株的出现，甚至占到主导地位。

大肠杆菌

当大肠杆菌菌株定植于肠道时，它们被视为非致病性的、革兰阴性的、人与动物共生菌群中的成员之一。但是，它们却是引起人类发生多种感染的主要原因。致病菌株常常导致尿路感染，但它们也是导致旅游者发生腹泻的主要原因。这种细菌也经常导致腹腔感染，如肠或阑尾炎穿孔，这也是败血病最常见的原因之一。在极少数情况下，它是导致新生儿脑膜炎的病原体。综上所述，大肠杆菌几乎能对身体的任何部位造成伤害。

一些菌株，比如最臭名昭著的大肠杆菌 O157，能产生 Vero 细胞毒素，因此被称为产 Vero 毒素大肠杆菌（VTEC）菌株。

这些细菌可能会导致出血性大肠炎，约 5% 病例会恶化为 白内溶血尿毒综合征，病死率达 10% 左右。这是英国儿童急性肾衰竭的主要原因。在成年人中，溶血尿毒综合征的症状经常伴随有神经系统的并发症。牛和其他家养动物的胃肠道是 VTEC 菌株的天然储藏所，因此，这些菌群可能会受到抗生素生长促进剂带来的选择压力。

大肠杆菌的抗生素耐药性是全球普遍存在的问题，比如，青霉素药剂对于大肠杆菌的治疗效果越来越低（Heritage 等，2001）。LeClerc（1996）曾警告，O157 型大肠杆菌的高突变率非常危险，并且已经观察到这些菌株可以通过水平基因转移轻易地获得抗性决定因子。有人指出，可能存在这样一条途径，通过这条途径，可以从一个环境病原体库中获得抗生素抗性。即使抗生素生长促进剂没有作用于细菌，但仍有可能这种细菌的菌株从食用动物的肠道菌群中获得抗性。基于以上原因及疾病的规模和严重性，在考虑到使用抗生素生长促进剂的相关风险时，应该懂得不能忽视大肠杆菌的存在。

肠球菌

肠球菌，如粪肠球菌和屎肠球菌，越来越受到人们的关注，因为它们会导致人类产生疾病甚至死亡，尤其是对那些病情严重的住院病人。与上述讨论的细菌不同，肠球菌是革兰氏阳性细菌，对多数用做生长促进剂的抗生素都很敏感。在临床环境下，过度使用抗生素将导致多抗药性肠球菌的选择，包括抗万古霉素的肠球菌。这种菌株对所有常规系统性的抗菌疗法都有抗性。在 20 世纪 80 年代中期，在欧洲首次分离出耐万古霉素肠球菌，但是很快就蔓延到美国。Edmond 等人（1996）发现，由耐万古霉素肠球菌引起的血源性感染患者，相比于那些对阿莫西林和万古霉素都敏感的患者，其死亡率要高出两倍以上。

曾有人建议，使用抗生素生长促进剂，特别是药物阿伏霉素，会导致耐万古霉素肠球菌的产生。这两种药物都是糖肽，在

肠球菌内被发现是 *van* 基因赋予了它们对这两种药物产生了抗性。作为生长促进剂来使用阿伏霉素，会增加动物内的抗性选择压力。随后，这种危险的抗性细菌会移植给人类。这些抗性细菌能在宿主间移植，或者传播给另外一个敏感宿主（比如免疫缺陷病人），从而引起疾病发生。另外，穿过肠道的、附着在肉类上的生物体，通过移动的遗传元件（包括转座子和质粒），可能会把抗性基因转移到长驻菌群中。

尽管阿伏霉素没有被用于人类药物，但它的类似物，万古霉素和替考拉宁却应用于人类疾病的治疗。Khachatourians (1998) 指出，来自于丹麦和德国的耐万古霉素的菌株，对阿伏霉素具有交叉耐药性，这说明动物中的阿伏霉素耐药菌株会对人类构成潜在威胁。Das 等工作成果发现 (1997)，这个潜在的威胁可能会变为现实。一名卡车司机在鸡包装厂工作时，遭遇了股骨骨折。后来他的伤口部位出现了局部感染。伤口拭子处出现了变形杆菌和粪肠球菌的混合物。变形杆菌对用于患者治疗的头孢呋辛敏感。随后拭子检验发现了耐万古霉素肠球菌的一份纯菌种。这种细菌的抗性是由于 *vanA* 基因盒表达引起的。对工厂进行调查后发现，从工厂地表和鸡身上获取的 20 份样品中，有 8 份含有阿伏霉素抗性的肠球菌，这些菌中都含有 *vanA* 基因表达盒。由于这位患者的粪便中没有携带 VRE，在那段时间也没有住院或者服用抗生素，因此，他最有可能是工厂中被感染的。如果这是事实，那将证明，阿伏霉素作为动物生长剂使用，具有危害人类健康的可能。

McDonald 等人 (1997) 对家禽、猪和人的粪便中的耐万古霉素的肠球菌进行分子遗传学分析后发现，确实存在 Tn546 转座子的转移现象，这种转座子基因编码对人类和农场动物糖肽的抗性。Van den Bogaard 等人 (1997) 用类似的分析手段，对火鸡和饲养火鸡的农民粪便中的耐万古霉素肠球菌进行了分析。他们发现，在 47 个被测试的火鸡农场中，来自于火鸡中的分离物

与农民的分离物相同。利用 PCR 扩增技术和脉冲电泳技术，对 *vanA* 基因和其他基因盒进行了研究。结果表明，动物和人类的分离物是相同的。然而，有人也对这项研究提出质疑：没有证据显示，农民体内定植了这些细菌，并且，也缺少此类情况重现性的相关证据。阿伏霉素对抗药性的影响很难进行评估，但是，从不同研究中收集的数据显示，以阿伏霉素作为动物生长促进剂，理论上存在对糖肽抗性的选择性风险。通过这种方式选择的抗性细菌最后可能会危害人类健康。

由于阿伏霉素存在着未知风险，所以欧盟委员会禁止把阿伏霉素作为生长促进剂来使用。Del Grosso 等人（2000）发现，禁令颁布后，被耐万古霉素的肠球菌污染的肉制品减少了。这种减少，在家禽上具有统计学意义的显著性（从 18.8% 降到 9.6%），但在猪肉产品方面却不显著（从 9.7% 降到 6.9%）。这种现象表明，阿伏霉素的撤出可以成功地减少 VER 对肉产品的污染。

还有人认为，那些导致抗性的抗生素生长促进剂可能会被转移到人类身上，或者这些抗生素生长剂会对人类产生威胁。也有人质疑这一论点。他们认为，能证明这种威胁的证据是不存在的，因为使用的分析方法不得当，缺乏重复性和有限数据的可比性。质疑者也指出，继续把抗生素作为人类药物来使用的最大威胁，是来自于用这些药物治疗那些被感染的人类患者。然而，不争的事实是，抗生素促进了抗性产生，而抗生素生长促进剂作为一种可能的选择剂，被强烈牵扯其中。欧盟委员会不再允许“医学上重要的”的抗生素被作为抗生素生长促进剂来使用，因为可能存在着影响治疗的风险。然而，这需要全球共同努力。正如菲德勒（1996）所指出的，国际边界对细菌无效。

在 20 世纪 70 年代初，英国禁止将四环素和青霉素作为生长促进剂来使用，随后，这种措施也刺激带动了欧洲其他国家采取相同的防备措施。在 20 世纪 70 年代中期，美国食品和药物管理局（FDA）提出了类似禁令，但遭到国会的干预，要求 FDA 在

实行禁令之前应该进行大量研究。当今，欧洲委员会、世界卫生组织、疾病控制中心和美国公共卫生协会都支持立即禁止那些抗生素生长促进剂的使用，它们与人类使用的抗生素是相同的，或密切相关。1999年3月，美国公共利益科学中心、美国环保协会以及其他科学中心向FDA提出正式请求，禁止6种抗生素在人类医药或者相关领域使用，这些抗生素包括青霉素、四环素、红霉素、林可霉素、泰乐菌素和维吉尼亚霉素。美国食品和药物管理局最近组建了一个工作小组（FDA，2001），以处理在农业中抗菌剂的使用问题，但许多政治家对此非常消极。值得注意的是，这些框架文件只是简单列出一个方案，用来评价抗生素对人类健康的风险。就其本身而言，它没有代表任何形式的立法，但仍然迎合了许多负面的威胁其成功的评论。最常见的批评是这方案缺乏证据。

4. 抗生素生长促进剂的替代物

在考虑逐步停止使用或禁止使用抗生素生长促进剂时，任何可以开发或非法提供的替代产品质量，无论是否在市场上流通，都必须对其进行评估。基本上，有两种方法来降低我们对抗生素在动物上使用的依赖。最直接的选择就是开发抗生素替代品。这些替代品具有类似的功能机制，在提高饲料转化率的同时，也能促进动物生长。另一个较为困难的方法就是去改善动物的健康状况。生长促进剂在环境恶劣的情况下表现甚佳（Prescott 和 Baggot, 1993）：即当动物健康状况不佳和生活环境条件不卫生时发挥的作用最好。如果当地环境改善，过度拥挤的程度降低以及使用了感染控制技术后，那么对生长促进剂的实际需求也就没有了。

饲料用酶

定期往猪和家禽饲料中添加饲料用酶，可以帮助分解饲料中某些难以被动物消化的成分，如葡聚糖、蛋白质和肌醇六磷酸。

他们作为发酵产品而被真菌和细菌生产，似乎对动物只有积极的作用。然而，一些伦理学家认为，给动物添加酶产品，这只不过表明，我们视这些牲畜为“工厂牲畜”。除了从伦理方面反对外，饲料酶在最大限度地提高饲料转化效率方面非常有效，几乎没有缺点。因此，目前的研究重点放在提高现有酶的质量上来，扩大可被消化饲料原料的范围。2001年，动物营养科学委员会认为，目前为止，对于消费者、使用者和动物来讲，评价应用的条件是可以令人接受的。

竞争排斥益生菌

竞争排斥益生菌是指饲料中的微生物，由不同种类的细菌组成，以“友好”的形式出售。人们认为，这种产品的作用机制是：通过促进这些细菌在胃肠道中进行定植，防止潜在病原物在胃肠道中定植并造成感染。这是一种竞争排斥原理。这些益生菌经常用于幼畜身上，特别是家禽。这些细菌通过在胃肠道中定植，而防止沙门氏菌和弯曲杆菌的感染。目前还不知道这种处理方式的有效性到底如何，但至少人们认为，这样处理方式可以减少腹泻，降低死亡率。这些益生菌也可以用于那些已经用抗生素治疗过的动物身上，而使其在肠道里进行重新定植，原因在于一些药物的杀菌作用而导致了肠道的菌群缩减。

益生菌

益生菌与竞争排斥益生菌有相似之处。人们认为，益生菌可以通过改善肠道内的微生物平衡来提高动物的整体健康状况。益生菌的具体作用方式还未明确，但人们推测，益生菌大体是通过3种方式来发挥作用的。所推测的第一种方式是重申竞争排斥原理：通过在肠道内大量定植益生菌来排除病原体，从而防止病原体造成感染；所推测的第二种可能方式是，益生菌可以作为免疫系统的一种刺激物。由于免疫系统暴露在益生菌面前，任何敌对的细菌也会被注意到，随着白细胞监控强度的增加，这些潜在病原体也会被清除；所推测的第三种方式认为，益生菌对肠道的代

谢活动有很强的正面促进作用，比如，可以增加维生素 B₁₂、细菌素和丙酸的产量。除了这 3 种方式外，还有其他一些作用机制，但都有待进一步验证。

益生菌所面临的问题，就是缺少它们的作用机制和对宿主动物影响的相关证据。Shahani 等人（1983）证明，实验室条件下小鼠经诱导所产生的肿瘤，在饲喂了发酵初乳后，可以阻止肿瘤生长，但仅仅对那些肿瘤生长前的小鼠才有效。1985 年，Kato 等人也证明，腹腔注射干酪乳杆菌，也能阻止肿瘤生长。根据这些实验结果，人们相信，干酪乳杆菌具有免疫促进剂的功效，此特性类似于一些 BCG，在功效上像是肿瘤的一种疫苗和免疫系统的一种激活剂。不幸的是，这些结果在农场中还不能得到很好的重复。在生产性农场里，绝大多数益生菌都不是通过腹腔注射的方式来使用的。令人不安的是，有人还发现，某些菌株可能是有害的：Sharpe 等人（1973）发现，干酪乳杆菌鼠李糖亚种可在宿主动物上产生心内膜炎或脓肿。

正如许多研究认为的那样，益生菌作为免疫增强剂，还存在一系列问题必须予以回答。什么是活性最好的菌株？它们是否也存在潜在的致病性？最大剂量是多少？何时以及如何给予这些益生菌？最简单的选择就是饲料给予系统。

在某些情况下，益生菌是有效的，特别是用在幼畜身上，或者是用在那些用抗生素治疗的动物身上，益生菌可以作为竞争排斥益生菌来使用。益生菌还在增加体重和提高饲料转化率方面，也有一定的辅助作用。有许多很好的野外实验结果可以证明抗生素生长促进剂的有效性。然而，益生菌的有效性还未被证明：在科学界，支持和质疑益生菌的声音都存在，彼此不相上下。在比较明确的实验条件下，已经证明了益生菌的有益性。目前仅有少数几个有良好设计的、有双盲对照的实验来支持益生菌治疗可促进健康的断言。

利用活细菌产品存在的另外一个问题是，关于抗生素耐药性

和未知致病因素的潜在危险。澳大利亚政府正在考虑引入有关益生菌的立法，要求在制备期内对相关的抗菌药物的各个菌种耐药质粒的存在以及耐药模式进行检测，这类检测已作为注册程序的一部分。最近一份来自动物营养科学委员会的报告（2001），是有关益生菌产品安全性的报告，报告发现，产品中的两个主要菌株，乳酸片球菌和植物乳杆菌，对四环素都有抗性。这种抗性是由 *tet* (S) 基因编码，这种基因经常存在于流动性很强的遗传因子中。因此，人们认为，由于在动物细菌菌群中、食物链内以及外界环境中，四环素抗性基因有被传播的可能性，所以在动物营养中使用这种产品，也会存在这一定风险。

控制感染的措施

把抗生素作为促生长剂来使用，主要是依靠它们在动物生长中起到控制感染的作用。同样，许多替代产品也经常间接地起到控制感染的作用。但是，什么样的直接措施可以控制农场动物感染呢？澳大利亚养猪产业首创了“全进全出”的生猪生产方法。这是一个新系统，被用于替代那些具有稳定生猪出栏率的过时技术。所有断奶的猪在一周内被归为同一批，并在一个猪棚中集中饲养，从而替代了各个年龄段的猪。不准许把不同批的猪进行混合饲养，这样就避免了猪群间的相互感染。“早期隔离断奶”技术是由于观察到了这样一个现象：母猪是病原体的一种重要来源。如果仔猪断奶早，它们就不太可能接触到来自他们母亲的病原体。但是，也必须多加考虑，尽量避免由于过早给动物断奶引发的动物福利问题。

“无特定病原体”系统是用来防止生猪感染多种疾病，而这些疾病需要用抗生素介入治疗，尤其是呼吸系统疾病。为此，它们是通过子宫切除术而出生，通过人工饲养方式来饲喂的。这种处理和饲养方式只对那些珍贵种畜来说是比较划算的。

最后，疫苗可以用预防某些病原体感染，比如，肠毒素大肠杆菌和多种支原体感染。相比于其他策略，疫苗接种最大缺点就

是所花费的成本太高。在澳大利亚，由于很多农场规模都非常大，如果依照欧洲标准，他们是能够支付得起疫苗接种的费用的。一些英国农场主开始采用感染控制的方法，特别是“全进全出”方式的畜牧业。

瑞典模式

1985年，当议会通过“饲料法”和禁止使用促进生长的抗生素时，瑞典提出了适合的抗生素替代问题。犊牛、火鸡和肥育猪都没有因禁令而受到明显影响：增长率可能略有下降，但死亡率又没有大的升高。自从开始坏死性肠炎暴发“不稳期”以后，努力为肉鸡构建了新的饲料和鸡舍的这种做法，被认为是成功的。动物福利委员会也很高兴地发现，鸟类拥有了更好的新环境。然而，断奶的猪却没有享受到相同的待遇。JETACAR (1999) 报道，大约在5万头猪中，腹泻增加了，死亡率也提高了1.5%。另外，体重增加到25千克所需的时间也增加了5~6天。改善了住宿和卫生条件，牲畜建筑被分区管理，降低了疾病的传播速度，引进了“全进全出”措施，同时改变饲料。这导致了抗生素的使用量减少了50% (1993)，而且每年都在递减。在1995—1996年，只有11%的断奶仔猪的食物进行了抗生素处理。

这项禁令激发了新思想和新技术，并成功地实现了农业产业不再依赖具有生长促进作用的抗生素的目标。另外，动物福利也得到了全面提高。瑞典经验表明，抗生素并不是健康动物生产所必需的，前提是，需要改善动物生长条件、饲养和食品。这也付出了代价，因为尽管动物福利得到了整体改善，但是成千上万的猪和鸡就是因为禁令的直接作用而有可能导致死亡。瑞典产品非常昂贵，在市场上也不具有竞争力，企业开支也很高。然而，有人可能会认为，采用瑞典模式后遇到的问题可以被最终结果所证明。瑞典模式表明，世界上的其他国家，都有可能在不使用抗生素作为生长促进剂的情况下，来发展现代化农业。

5. 结论

抗生素生长促进剂最好的替代方法，就是总体上改善能生产我们食物的那些动物的状况，比如，瑞典模式。医学上所使用的重要抗生素，必须禁止其作为生长促进剂而发挥作用，而且要把这作为一件迫切事情来对待。然而不幸的是，从瑞典经验可以看出，改革进度非常缓慢，且费用异常昂贵。为了开始一个新的全局性产业变革，改变抗生素生长促进剂使用的态度是非常有必要的。继续使用抗生素的最大威胁来自于人类医药，抗性选择这个问题将影响到每一个人。如果抗性菌株的选择是由于抗生素在临床上的过度使用或者其他来源造成的，对那些抗生素治疗失败的人来讲，影响微乎其微。

致谢

感谢利兹大学的迈克·福布斯教授，对文章进行了批判性阅读和有价值的讨论。

参考文献

- Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food.** 2001. Second report on Salmonella in eggs. Food Standards Agency, London.
- Animal Health Institute (USA)** . 1998. Antibiotic resistance back in the news. AHI Quarterly, 19: 1 - 4.
- Bonner, J.** 1998. Hooked on Drugs. New Scientist <http://archive.newscientist.com/> Last accessed 28 October 2001.
- Butaye P. , van Damme, K. , Devriese, L. A. , van Damme, L. , Bael, M. , Lauwers, S. , & Haesebrouck, F.** 2000. In vitro susceptibility of Enterococcus faecium isolated from food to growth-promoting and therapeutic antibiotics. International Journal of Food Microbiology, 54: 181 - 187.
- Centers for Disease Control.** 2000. Issues in healthcare settings: laboratory detection of oxacillin/methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). <http://www.cdc.gov/ncidod/hip/Lab/FactSheet/mrsa.htm> Last accessed 28 October 2001.

cessed 28 October 2001.

- Commission of the European Communities DGXXIV Scientific Steering Committee.** 1999. Opinion of the Scientific Steering Committee on Antimicrobial Resistance. http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/out50_en.pdf Last accessed 28 October 2001.
- Das, I. , Fraise, A. & Wise, R.** 1997. Are glycopeptide-resistant enterococci in animals a threat to human beings? *The Lancet*, 9057: 997.
- Del Grosso, M. , Caprioli, A. , Chinzari, P. , Fontana, M. C. , Pezzotti, G. , Manfrin, A. , di Giannatale, E. , Goffredo, E. & Pantosti, A.** 2000. Detection and characterization of vancomycin-resistant enterococci in farm animal and raw meat products in Italy. *Microbial Drug Resistance-Mechanisms Epidemiology and Disease*, 6: 313 - 318.
- Edmond, M. B. , Ober, J. F. , Dawson, J. D. , Weinbaum, D. L. & Wenzel, R. P.** 1996. Vancomycin-resistant enterococcal bacteraemia: natural history and attributable mortality. *Clinical Infectious Diseases*, 23: 1234 - 1239.
- Endtz, H. G. & Ruijs, G.** 1991. Quinolone resistance in *Campylobacter* isolated from Man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 27: 199 - 208.
- Engberg, J. , Aarestrup, F. M. , Taylor, D. E. , Gerner-Smidt, P. , & Nachamkin, I.** 2001. Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* : resistance mechanisms and trends in human isolates. *Emerging Infectious Diseases*, 7: 24.
- Fidler, D. P.** 1996. Globalization, international law and emerging infectious diseases. *Emerging Infectious Diseases*, 2: 77 - 84.
- Food and Drug Administration, USA.** <http://www.fda.gov/oc/antimicrobial/taskforce2000.html> Last accessed 28 October 2001.
- Gassner, B. & Wuethrich, A.** 1994. Pharmacokinetic and toxicological aspects of the medication of beef-type calves with an oral formulation of chloramphenicol palmitate. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 17: 279 - 283.

- Heritage, J, Ransome, N. , Chambers, P.A. & Wilcox, M.H.** 2001. A comparison of culture and PCR to determine the prevalence of ampicillin-resistant bacteria in the faecal flora of general practice patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48: 287 – 289.
- Hospital Infection Society.** Revised guidelines on the control of MRSA in hospitals. [http: //www. his. org. uk/work/MRSA. html](http://www.his.org.uk/work/MRSA.html) Last accessed 28 October 2001.
- House of Lords Select Committee Report.** 1998. Resistance to antibiotics and other antimicrobial agents. HMSO, London.
- Jensen, B. B.** 1998. The impact of feed additives on the microbial ecology of the gut in young pigs. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 7: 45 – 64, Suppl. 1.
- Joint Expert Advisory Committee on Antibiotic Resistance.** 1999. Report of the Joint Expert Advisory Committee on Antibiotic Resistance (JETACAR) on the use of antibiotics in food producing animals: antibiotic resistant bacteria in animals and humans [http: // www. health. gov. au/pubs/jetacar. pdf](http://www.health.gov.au/pubs/jetacar.pdf) Last accessed 28 October 2001.
- Kato, I. , Yokokura, T. & Mutai, M.** 1985. Induction of tumoricidal peritoneal exudate cells by administration of *Lactobacillus casei*. *International Journal of Immuno-Pharmacology*, 7: 103109.
- Khachatourians, G.** 1998. Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic resistant bacteria. *Canadian Medical Association Journal*, 159: 1129 – 1136.
- LeClerc, J. E.** 1996. High mutation frequencies among *Escherichia coli* and *Salmonella* pathogens. *Science*, 274: 1208 – 1211.
- Mbanzamihigo, L. , Vannevel, C. J. & Demeyer, D. I.** 1995. Adaptation of rumen fermentation to monensin administration. *Reproduction Nutrition Development*, 35: 353 – 365.
- McDonald, L. C. , Kuehnert, M. J. , Tenover, F. C. & Jarvis, W. R.** 1997. Vancomycin resistant enterococci outside the health care setting: prevalence, sources, and public health implications *Emerging Infectious Diseases*, 3: 311 – 317.

- Molbak K. Baggesen D. L. Aarestrup F. M. Ebbesen J. M. Engberg J. Fryden-**
dahl K. Gerner-Smidt P. Petersen A. M. & Wegener HC. 1999. An out-
break of multidrug-resistant, quinolone-resistant *Salmonella enterica* sero-
type Typhimurium DT104. *New England Journal of Medicine*, 341: 1420 –
1455.
- National Office of Ani al Health (NOAH) .** Antibiotics for animals. [http: //](http://www.noah.co.uk/issues/antibiotics.htm)
www.noah.co.uk/issues/antibiotics.htm Last accessed 28 October 2001.
- Noble W. C.** 1997. Antibiotic resistance in the staphylococci. *Science Pro-*
gress, 80: 5 – 20.
- Prescott J. F. & Baggot J. D.** 1993. Antimicrobial Therapy in Veterinary
Medicine, 2nd edition, pp 564 – 565; Iowa State University Press.
- Public Health Laboratory Service.** [http: //www.phls.co.uk/facts/ Gastro/](http://www.phls.co.uk/facts/Gastro/Salmonella/salmtypHAnn.htm)
[Salmonella/salmtypHAnn.htm](http://www.phls.co.uk/facts/Gastro/Salmonella/salmtypHAnn.htm). Last accessed 28 October 2001.
- Rogers, M. , Jouany, J. P. , Thivend, P. & Fontenot, J. P.** 1997. The
effects of short-term and long-term monensin supplementation, and its sub-
sequent withdrawal on digestion in sheep. *Animal Feed Science and Tech-*
nology, 65: 113 – 127.
- Scientific Committee for Animal Nutrition.** 2001. Report of the Scientific
Committee for Animal Nutrition (SCAN) on the Safety Assessment of Pro-
biotic Product Pronifer MSB [http: //europa.eu.int/ comm/food/fs/sc/s](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/san/out58_en.pdf)
[an/out58 _en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/san/out58_en.pdf) Last accessed 28 October 2001.
- Scientific Committee for Animal Nutrition.** 2001. Report of the Scientific
Committee for Animal Nutrition (SCAN) on the use of certain enzymes in
animal feeding stuffs. [http: //europa.eu.int/comm/ food/fs/sc/scan/](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scan/out52_en.pdf)
[out52 _en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scan/out52_en.pdf) Last accessed 28 October 2001.
- Shahani, K. , Friend, B. & Bailey, P.** 1983. Antitumor activity of fermen-
ted colostrum and milk. *Journal of Food Protection*, 46: 385 – 6. Sharpe,
M. , Hill, R. & Lapage, S. 1973. Pathogenic lactobacilli. *Journal of*
Medical Microbiology, 6: 281 – 286.
- Spika, J. S. , Waterman, S. H. & Soo Hoo, G. W.** 1987. Chloramphenicol re-
sistant *Salmonella newport* traced through hamburger to dairy farms *New*
England Journal of Medicine, 316: 565 – 570.

- Tacket, C. O. , Dominguez, L. B. , Fisher, H. J. & Cohen, M. L.** 1985. An outbreak of multipleVdrug-resistant Salmonella enteritidis from raw milk. Journal of the American Medical Association, 253: 2058 – 2060.
- Thomke, S. & Elwinger, K.** 1998. Growth promotants in feeding pigs and poultry ii; mode of action of antibiotic growth promotants. Annales de Zootechnie, 47: 153 – 167.
- Van den Bogaard, A. E. J. M. , Jensen, L. B. & Stobberingh, E. E.** 1997. Vancomycin-resistant enterococci in turkeys and farmers. New England Journal of Medicine, 337: 1558 – 1559.

FAO 学术论文

FAO 动物生产及卫生文件

- 1 Animal breeding: selected articles from the World Animal Review, 1977 (C E F S)
- 2 Eradication of hog cholera and African swine fever, 1976 (E F S)
- 3 Insecticides and application equipment for tsetse control, 1977 (E F)
- 4 New feed resources, 1977 (E/F/S)
- 5 Bibliography of the criollo cattle of the Americas, 1977 (E/S)
- 6 Mediterranean cattle and sheep in crossbreeding, 1977 (E F)
- 7 The environmental impact of tsetse control operations, 1977 (E F)
- 7 Rev. 1 The environmental impact of tsetse control operations, 1980 (E F)
- 8 Declining breeds of Mediterranean sheep, 1978 (E F)
- 9 Slaughterhouse and slaughterslab design and construction, 1978 (E F S)
- 10 Treating straw for animal feeding, 1978 (C E F S)
- 11 Packaging, storage and distribution of processed milk, 1978 (E)
- 12 Ruminant nutrition: selected articles from the World Animal Review, 1978 (C E F S)
- 13 Buffalo reproduction and artificial insemination, 1979 (E *)

- 14 The African trypanosomiases, 1979 (E F)
- 15 Establishment of dairy training centres, 1979 (E)
- 16 Open yard housing for young cattle, 1981 (Ar E F S)
- 17 Prolific tropical sheep, 1980 (E F S)
- 18 Feed from animal wastes: state of knowledge, 1980 (C E)
- 19 East Coast fever and related tick - borne diseases, 1980 (E)
- 20/1 Trypanotolerant livestock in West and Central Africa - Vol. 1. General study, 1980 (E F)
- 20/2 Trypanotolerant livestock in West and Central Africa - Vol. 2. Country studies, 1980 (E F)
- 20/3 Le bétail trypanotolérant en Afrique occidentale et centrale - Vol. 3. Bilan d'une décennie, 1988 (F)
- 21 Guideline for dairy accounting, 1980 (E)
- 22 Recursos genéticos animales en América Latina, 1981 (S)
- 23 Disease control in semen and embryos, 1981 (C E F S)
- 24 Animal genetic resources - conservation and management, 1981 (C E)
- 25 Reproductive efficiency in cattle, 1982 (C E F S)
- 26 Camels and camel milk, 1982 (E)
- 27 Deer farming, 1982 (E)
- 28 Feed from animal wastes: feeding manual, 1982 (C E)
- 29 Echinococcosis/hydatidosis surveillance, prevention and control: FAO/UNEP/WHO guidelines, 1982 (E)
- 30 Sheep and goat breeds of India, 1982 (E)
- 31 Hormones in animal production, 1982 (E)
- 32 Crop residues and agro - industrial by - products in ani-

- mal feeding, 1982 (E/F)
- 33 Haemorrhagic septicaemia, 1982 (E F)
- 34 Breeding plans for ruminant livestock in the tropics, 1982 (E F S)
- 35 Off – tastes in raw and reconstituted milk, 1983 (Ar E F S)
- 36 Ticks and tick – borne diseases: selected articles from the World Animal Review, 1983 (E F S)
- 37 African animal trypanosomiasis: selected articles from the World Animal Review, 1983 (E F)
- 38 Diagnosis and vaccination for the control of brucellosis in the Near East, 1982 (Ar E)
- 39 Solar energy in small – scale milk collection and processing, 1983 (E F)
- 40 Intensive sheep production in the Near East, 1983 (Ar E)
- 41 Integrating crops and livestock in West Africa, 1983 (E F)
- 42 Animal energy in agriculture in Africa and Asia, 1984 (E/F S)
- 43 Olive by – products for animal feed, 1985 (Ar E F S)
- 44/1 Animal genetic resources conservation by management, data banks and training, 1984 (E)
- 44/2 Animal genetic resources: cryogenic storage of germ-plasm and molecular engineering, 1984 (E)
- 45 Maintenance systems for the dairy plant, 1984 (E)
- 46 Livestock breeds of China, 1984 (E F S)
- 47 Réfrigération du lait à la ferme et organisation des transports, 1985 (F)

- 48 La fromagerie et les variétés de fromages du bassin méditerranéen, 1985 (F)
- 49 Manual for the slaughter of small ruminants in developing countries, 1985 (E)
- 50/1 Better utilization of crop residues and by - products in animal feeding: research guidelines - 1. State of knowledge, 1985 (E)
- 50/2 Better utilization of crop residues and by - products in animal feeding: research guidelines - 2. A practical manual for research workers, 1986 (E)
- 51 Dried salted meats: charque and carne - de - sol, 1985 (E)
- 52 Small - scale sausage production, 1985 (E)
- 53 Slaughterhouse cleaning and sanitation, 1985 (E)
- 54 Small ruminants in the Near East - Vol. I. Selected papers presented for the Expert Consultation on Small Ruminant Research and Development in the Near East (Tunis, 1985), 1987 (E)
- 55 Small ruminants in the Near East - Vol. II. Selected articles from World Animal Review 1972 - 1986, 1987 (Ar E)
- 56 Sheep and goats in Pakistan, 1985 (E)
- 57 The Awassi sheep with special reference to the improved dairy type, 1985 (E)
- 58 Small ruminant production in the developing countries, 1986 (E)
- 59/1 Animal genetic resources data banks - 1. Computer systems study for regional data banks, 1986 (E)
- 59/2 Animal genetic resources data banks - 2. Descriptor

- lists for cattle, buffalo, pigs, sheep and goats, 1986 (E F S)
- 59/3 Animal genetic resources data banks – 3. Descriptor lists for poultry, 1986 (E F S)
- 60 Sheep and goats in Turkey, 1986 (E)
- 61 The Przewalski horse and restoration to its natural habitat in Mongolia, 1986 (E)
- 62 Milk and dairy products: production and processing costs, 1988 (E F S)
- 63 Proceedings of the FAO expert consultation on the substitution of imported concentrate feeds in animal production systems in developing countries, 1987 (C E)
- 64 Poultry management and diseases in the Near East, 1987 (Ar)
- 65 Animal genetic resources of the USSR, 1989 (E)
- 66 Animal genetic resources – strategies for improved use and conservation, 1987 (E)
- 67/1 Trypanotolerant cattle and livestock development in West and Central Africa – Vol. I, 1987 (E)
- 67/2 Trypanotolerant cattle and livestock development in West and Central Africa – Vol. II, 1987 (E)
- 68 Crossbreeding *Bos indicus* and *Bos taurus* for milk production in the tropics, 1987 (E)
- 69 Village milk processing, 1988 (E F S)
- 70 Sheep and goat meat production in the humid tropics of West Africa, 1989 (E/F)
- 71 The development of village – based sheep production in West Africa, 1988 (Ar E F S) (Published as Training manual for extension workers, M/S5840E)

- 72 Sugarcane as feed, 1988 (E/S)
- 73 Standard design for small – scale modular slaughter-houses, 1988 (E)
- 74 Small ruminants in the Near East – Vol. III. North Africa, 1989 (E)
- 75 The eradication of ticks, 1989 (E/S)
- 76 Ex situ cryoconservation of genomes and genes of endangered cattle breeds by means of modern biotechnological methods, 1989 (E)
- 77 Training manual for embryo transfer in cattle, 1991 (E)
- 78 Milking, milk production hygiene and udder health, 1989 (E)
- 79 Manual of simple methods of meat preservation, 1990 (E)
- 80 Animal genetic resources – a global programme for sustainable development, 1990 (E)
- 81 Veterinary diagnostic bacteriology – a manual of laboratory procedures of selected diseases of livestock, 1990 (E F)
- 82 Reproduction in camels – a review, 1990 (E)
- 83 Training manual on artificial insemination in sheep and goats, 1991 (E F)
- 84 Training manual for embryo transfer in water buffaloes, 1991 (E)
- 85 The technology of traditional milk products in developing countries, 1990 (E)
- 86 Feeding dairy cows in the tropics, 1991 (E)
- 87 Manual for the production of anthrax and blackleg vac-

- cines, 1991 (E F)
- 88 Small ruminant production and the small ruminant genetic resource in tropical Africa, 1991 (E)
- 89 Manual for the production of Marek's disease, Gumboro disease and inactivated Newcastle disease vaccines, 1991 (E F)
- 90 Application of biotechnology to nutrition of animals in developing countries, 1991 (E F)
- 91 Guidelines for slaughtering, meat cutting and further processing, 1991 (E F)
- 92 Manual on meat cold store operation and management, 1991 (E S)
- 93 Utilization of renewable energy sources and energy - saving technologies by small - scale milk plants and collection centres, 1992 (E)
- 94 Proceedings of the FAO expert consultation on the genetic aspects of trypanotolerance, 1992 (E)
- 95 Roots, tubers, plantains and bananas in animal feeding, 1992 (E)
- 96 Distribution and impact of helminth diseases of livestock in developing countries, 1992 (E)
- 97 Construction and operation of medium - sized abattoirs in developing countries, 1992 (E)
- 98 Small - scale poultry processing, 1992 (Ar E)
- 99 In situ conservation of livestock and poultry, 1992 (E)
- 100 Programme for the control of African animal trypanosomiasis and related development, 1992 (E)
- 101 Genetic improvement of hair sheep in the tropics, 1992 (E)

- 102 Legume trees and other fodder trees as protein sources for livestock, 1992 (E)
- 103 Improving sheep reproduction in the Near East, 1992 (Ar)
- 104 The management of global animal genetic resources, 1992 (E)
- 105 Sustainable livestock production in the mountain agro - ecosystem of Nepal, 1992 (E)
- 106 Sustainable animal production from small farm systems in South - East Asia, 1993 (E)
- 107 Strategies for sustainable animal agriculture in developing countries, 1993 (E F)
- 108 Evaluation of breeds and crosses of domestic animals, 1993 (E)
- 109 Bovine spongiform encephalopathy, 1993 (Ar E)
- 110 L'amélioration génétique des bovins en Afrique de l'Ouest, 1993 (F)
- 111 L'utilización sostenible de hembras F1 en la producción del ganado lechero tropical, 1993 (S)
- 112 Physiologie de la reproduction des bovins trypanotolérants, 1993 (F)
- 113 The technology of making cheese from camel milk (*Camelus dromedarius*), 2001 (E F)
- 114 Food losses due to non - infectious and production diseases in developing countries, 1993 (E)
- 115 Manuel de formation pratique pour la transplantation embryonnaire chez la brebis et la chèvre, 1993 (F S)
- 116 Quality control of veterinary vaccines in developing countries, 1993 (E)

- 117 L'hygiène dans l'industrie alimentaire, 1993 – Les produits et l'application de l'hygiène, 1993 (F)
- 118 Quality control testing of rinderpest cell culture vaccine, 1994 (E)
- 119 Manual on meat inspection for developing countries, 1994 (E)
- 120 Manual para la instalación del pequeño o matadero modular de la FAO, 1994 (S)
- 121 A systematic approach to tsetse and trypanosomiasis control, 1994 (E/F)
- 122 El capibara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) – Estado actual de su producción, 1994 (S)
- 123 Edible by-products of slaughter animals, 1995 (E S)
- 124 L'approvisionnement des villes africaines en lait et produits laitiers, 1995 (F)
- 125 Veterinary education, 1995 (E)
- 126 Tropical animal feeding – A manual for research workers, 1995 (E)
- 127 World livestock production systems – Current status, issues and trends, 1996 (E)
- 128 Quality control testing of contagious bovine pleuropneumonia live attenuated vaccine – Standard operating procedures, 1996 (E F)
- 129 The world without rinderpest, 1996 (E)
- 130 Manual de prácticas de manejo de alpacas y llamas, 1996 (S)
- 131 Les perspectives de développement de la filière lait de chèvre dans le bassin méditerranéen, 1996 (F)
- 132 Feeding pigs in the tropics, 1997 (E)

- 133 Prevention and control of transboundary animal diseases, 1997 (E)
- 134 Tratamiento y utilización de residuos de origen animal, pesquero y alimenticio en la alimentación animal, 1997 (S)
- 135 Roughage utilization in warm climates, 1997 (E F)
- 136 Proceedings of the first Internet Conference on Salivarian Trypanosomes, 1997 (E)
- 137 Developing national emergency prevention systems for transboundary animal diseases, 1997 (E)
- 138 Producción de cuyes (*Cavia porcellus*), 1997 (S)
- 139 Tree foliage in ruminant nutrition, 1997 (E)
- 140/1 Analisis de sistemas de producción animal – Tomo 1: Las bases conceptuales, 1997 (S)
- 140/2 Analisis de sistemas de producción animal – Tomo 2: Las herramientas basicas, 1997 (S)
- 141 Biological control of gastro – intestinal nematodes of ruminants using predacious fungi, 1998 (E)
- 142/1 Village chicken production systems in rural Africa – Household food security and gender issues, 1998 (E)
- 142/2 Village chicken production systems in rural Africa – Household food security and gender issues, 1998 (E)
- 143 Agroforestería para la producción animal en América Latina, 1999 (S)
- 144 Ostrich production systems, 1999 (E)
- 145 New technologies in the fight against transboundary animal diseases, 1999 (E)

- 146 El burro como animal de trabajo – Manual de capacitación, 2000 (S)
- 147 Mulberry for animal production, 2001 (E)
- 148 Los cerdos locales en los sistemas tradicionales de producción, 2001 (S)
- 149 Animal production based on crop residues – Chinese experiences, 2001 (C E)
- 150 Pastoralism in the new millennium, 2001 (E)
- 151 Livestock keeping in urban areas – A review of traditional technologies based on literature and field experiences, 2001 (E)
- 152 Mixed crop – livestock farming – A review of traditional technologies based on literature and field experiences, 2001 (E)
- 153 Improved animal health for poverty reduction and sustainable livelihoods, 2002 (E)
- 154 Goose production, 2002 (E F)
- 155 Agroforestería para la producción animal en América Latina – II, 2003 (S)
- 156 Guidelines for coordinated human and animal brucellosis surveillance, 2003 (E)
- 157 Resistencia a los antiparasitarios – Estado actual con énfasis en América Latina, 2003 (S)
- 158 Employment generation through small – scale dairy marketing and processing, 2003 (E)
- 159 Good practices in planning and management of integrated commercial poultry production in South Asia, 2003 (E)
- 160 Assessing quality and safety of animal feeds, 2004 (E)

获得日期：2004 年 1 月

Ar——阿拉伯文

Multil——多种语言文字

C——中文

* 绝版

E——英文

* * 准备中

F——法文

e 电子出版物

P——葡萄牙文

S——西班牙文

联合国粮农组织技术论文可通过联合国粮农组织授权的销售代理或直接从粮农组织市场营销组获得，地址：Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Rome, Italy。

欢迎登录：中国农业出版社网站
www.ccap.com.cn

本书就动物饲料对食品质量、食物安全 and 环境影响等问题提供一些最新信息，进而改善对那些日益被公众和个体消费者所密切关注的风险进行管理的基础。

ISBN 978-7-109-17430-6



9 787109 174306 >

定价：40.00元