

产气法评价纳豆芽孢杆菌对瘤胃液体 体外发酵的影响

邓露芳¹,王加启¹,姜艳美^{1,2},卜登攀¹,
魏宏阳¹,周凌云¹,王金枝¹

(1 中国农业科学院 北京畜牧兽医研究所 动物营养学国家重点实验室,北京 100094;

2 新疆农业大学 动科学院,新疆 乌鲁木齐 830052)

【摘要】 【目的】评价纳豆芽孢杆菌对瘤胃液体体外发酵的影响。【方法】采用瘤胃液体体外发酵产气法,以不添加纳豆芽孢杆菌为对照,动态观测基础日粮中纳豆芽孢杆菌添加量分别为 1.5×10^8 /g(处理 I)和 7.5×10^8 /g(处理 II)对瘤胃液体体外发酵产气量、pH 值、 NH_3 -N 质量浓度和各挥发性脂肪酸浓度的影响。【结果】与对照相比,处理 II 产气量提高了 11.89% ($P < 0.05$),瘤胃 pH 值显著降低 ($P < 0.05$), NH_3 -N 质量浓度提高了 16.07% ($P < 0.05$),乙酸、丙酸和总挥发性脂肪酸浓度分别提高了 10.43%,50.35% 和 20.70% ($P < 0.05$);处理 I 除丙酸浓度显著高于对照 ($P < 0.05$) 外,其他各指标均与对照无明显差异 ($P > 0.05$)。【结论】纳豆芽孢杆菌培养物在基础日粮中的添加量为 7.5×10^8 /g 时,能促进瘤胃液对饲料底物的降解代谢。

【关键词】 纳豆芽孢杆菌;产气法;瘤胃液体体外发酵

【中图分类号】 S816.73

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2008)09-0033-07

Assessment of effect on supplementation of *Bacillus subtilis* natto on ruminal fermentation *in vitro* by gas production technique

DENG Lu-fang¹, WANG Jia-qi¹, JIANG Yan-mei^{1,2}, BU Deng-pan¹,
WEI Hong-yang¹, ZHOU Ling-yun¹, WANG Jin-zhi¹

(1 State Key Laboratory of Animal Nutrition, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China; 2 College of Animal Sciences, Xinjiang Agricultural University, Urumchi, Xinjiang 830052, China)

Abstract: 【Objective】 The study is to evaluate the role of *Bacillus subtilis* natto culture (BNC) effect on ruminal fermentation *in vitro*. 【Method】 Gas production technique was used to examine the effect of supplementation of 0.15% concentration BNC in dry material (DM) of substrate, containing 1.5×10^8 /g (group I) and 0.75% concentration BNC in DM of substrate, containing 7.5×10^8 /g (group II) on ruminal gas production, pH value, NH_3 -N concentration and VFA concentrations *in vitro*. 【Result】 Compared with control group (CK), the gas production in treat group II increased by 11.89% ($P < 0.05$), the pH value decreased ($P < 0.05$), the NH_3 -N concentration increased by 16.07% ($P < 0.05$), and the concentrations of acetic acid, propionic acid and total VFA increased by 10.43%, 50.35% and 20.70% ($P < 0.05$) respectively. In group I, propionic acid concentration was higher than that of CK, and the other indicators were

* [收稿日期] 2007-09-30

[基金项目] 科技部国际科技合作重点项目(2004DFA06700)

[作者简介] 邓露芳(1981—),女,福建三明人,在读博士,主要从事饲用微生物研究。E-mail: nuhuo1807@sohu.com

[通讯作者] 王加启(1967—),男,安徽宿州人,研究员,博士生导师,主要从事奶牛营养与牛奶质量改良研究。
E-mail: wang-jia-qi@263.net

not significantly different with CK.【Conclusion】The BNC containing 7.5×10^8 /g in DM of substrate promoted the degradation and metabolism of the substrate in ruminal fermentation *in vitro*.

Key words: *Bacillus subtilis* natto;gas production technique;ruminal fermentation *in vitro*

纳豆芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* natto,BN)在细菌鉴定学上被归属为枯草杆菌,最早由 Sumi 等^[1]从日本传统食品纳豆中分离出来,并发现了纳豆激酶。此后,随着人们对纳豆芽孢杆菌的深入研究,其生理生化特性及其益生功效逐渐为人们所认识。纳豆芽孢杆菌能在肠道内生长几周,分泌各种酶和维生素,促进小肠黏膜细胞的增殖^[2-3],还可增强胃肠道内各种酶的活性^[4-5],并具有抑制肠道内有害菌的作用^[6-8]。近年来,纳豆芽孢杆菌对人类^[9]和单胃动物^[10-12]胃肠道的益生效果,已得到很好证实,但其应用于反刍动物的饲用效果及其对瘤胃发酵环境的影响鲜有报道。本研究通过瘤胃液体外发酵产气技术,初步探讨了纳豆芽孢杆菌对瘤胃发酵环境的影响,以期纳豆芽孢杆菌应用于反刍动物提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌种 纳豆芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* natto,BN)来源于中国农业科学院北京畜牧兽医研究所反刍动物营养研究室,经中国科学院微生物研究所鉴定。

1.1.2 纳豆芽孢杆菌培养物(*Bacillus subtilis* nat-

to culture,BNC)的制备 从 PDA 斜面培养基^[13]上取两环活化菌种,接入装有 30 mL 种子培养基(蔗糖 1 g/dL,大豆蛋白胨 1 g/dL,NaCl 0.5 g/dL,Na₂HPO₄ 0.6 g/dL,NaH₂PO₄ 0.1 g/dL,CaCl₂ 0.02 g/dL,MgSO₄ 0.05 g/dL,pH 值调至 6~7)的 100 mL 锥形瓶中,37 ℃、180 r/min 培养 24 h。取体积分数 21%的种子液,加入装有 30 mL 发酵培养基(葡萄糖 1 g/dL,蔗糖 1 g/dL,大豆蛋白胨 6 g/dL,胰蛋白胨 4 g/dL,Na₂HPO₄ 0.6 g/dL,NaH₂PO₄ 0.1 g/dL,CaCl₂ 0.02 g/dL,MgSO₄ 0.05 g/dL,pH 值调至 6~7)的 100 mL 锥形瓶中,37 ℃、180 r/min 培养 24 h。稀释一定倍数后进行显微镜血球计数板计数。用稀释液调整菌液浓度达到 1×10^9 /mL,于 4 ℃保存备用。

1.1.3 产气法针筒注射器的准备 准备 32 支 100 mL 针筒注射器,清洗晾干后,检查注射器的气密性和活塞抽拉的灵活性,然后将活塞和针筒标上对应的记号。

1.1.4 试验动物及其饲养管理 3 头体重 550 kg 左右,处于第一个泌乳期的泌乳中期、安装有永久性 3 个位点瘰管的健康荷斯坦奶牛。供体奶牛采食日粮与试验日粮组成相同,见表 1。

表 1 基础日粮的组成及其营养水平

Table 1 Composition and nutrient level of basal diet

原料 Ingredients	含量/% Content	营养成分 Nutrient	营养水平 Level
苜蓿草粉 Alfalfa hay	13.516	干物质/(kg·d ⁻¹) Dry matter	20.01
羊草 Chinese wild rye	35.845	总可消化养分/(w/w) TDN	68.09
玉米 Corn	27.844	粗料比例/(w/w) The proportion of forage	50.00
小麦麸 Wheat bran	11.202	精料比例/(w/w) The proportion of concentrate	50.00
大豆粕 Soybean meal	9.69	产奶净能/(MJ·kg ⁻¹) NEL	6.19
石粉 Calcium carbonate	0.732	日粮粗蛋白质/(g·kg ⁻¹) CP	1.415
磷酸氢钙 Calcium phosphate dibasic	0.229	Ca/(g·kg ⁻¹)	0.063
食盐 Sodium chloride	0.229	P/(g·kg ⁻¹)	0.038
小苏打 Saleratus	0.457	NDF/(g·kg ⁻¹)	4.225
维生素预混料 ¹ Premix of vitamine	0.009	Na/(g·kg ⁻¹)	0.033
微量元素预混料 ² Premix of microelement	0.046	Cl/(g·kg ⁻¹)	0.047

注:1.每千克维生素预混料所提供成分:维生素 A 200 KIU,维生素 D₃ 5 000 IU,维生素 B₃ 10 000 mg。
2.每千克微量元素预混料所提供成分:铜(Cu)1 600 mg,铁(Fe)2 500 mg,锌(Zn)8 000 mg,锰(Mn)2 500 mg,碘(I)100 mg,硒(Se)20 mg。
Note:1. A kilo premix of vitamine contents;V_A,200 KIU;V_{D₃},5 000 IU;V_{B₃},10 000 mg.
2. A kilo premix of microelement contents;Cu,1 600 mg;Fe,2 500 mg;Zn,8 000 mg;Mn,2 500 mg;I,100 mg;Se,20 mg.

日粮精粗比为 50 : 50。每天饲喂 2 次(8:30 和 20:30),自由饮水。每天挤奶 2 次(8:00 和 20:00)。

1.1.5 模拟瘤胃缓冲液的配制 分别预配制溶液 A($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 13.2 g/dL, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 10 g/dL, $\text{CoCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g/dL, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 8.0 g/dL), 溶液 B(0.4 g/dL NH_4HCO_3 , 3.5 g/dL NaHCO_3) 和溶液 C(0.57 g/dL Na_2HPO_4 , 0.62 g/dL K_2HPO_4 , 0.06 g/dL $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$); 试验前按以下比例配制瘤胃缓冲液:400 mL 蒸馏水+0.1 mL 溶液 A+200 mL 溶液 B+200 mL 溶液 C+1 mL 刃天青溶液(1 g/L)+40 mL 还原剂溶液(使用时临时配制, 0.160 mg/dL NaOH +0.625 g/dL $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)。上述溶液混匀后, 通入 CO_2 至饱和, 加热至 39 ℃。

1.2 试验方法

1.2.1 试验处理 试验设 3 个处理, 以添加 200 mg 基础日粮(表 1)为对照(CK), 以在对照日粮基础上添加 BNC 1.5×10^8 /g 为处理 I, 添加 BNC 7.5×10^8 /g 为处理 II。试验期为 24 h, 每个处理在 0, 2, 6, 10, 16 和 24 h 分别设置 2 个重复, 重复 2 期试验。每个处理准备 10 个针筒注射器, 每个时间点(除去 0 h)对应 2 个针筒(即 2 个重复)。另外 2 个注射器作为每期试验的空白产气注射器。试验前 1 h, 分别称取(200±5) mg 基础日粮, 使用长纸槽直接送入 100 mL 注射器底部。处理 I 添加含 1×10^9 /mL 菌液 30 μL, 处理 II 添加含 1×10^9 /mL 菌液 150 μL。在注射器活塞表面涂抹薄薄一层凡士林, 增加滑动性和密封性, 小心插入对应的注射器内。然后分别抽取 20 mL 瘤胃缓冲溶液, 排出气体以保证缓冲液处于厌氧状态, 放入水浴恒温箱 39 ℃预热。每个处理的 0 h 不使用注射器, 分别使用 2 个带胶塞 100 mL 玻璃瓶, 同样添加基础日粮、不同水平的 BNC 和缓冲液, 通入 CO_2 排除 O_2 后盖上胶塞, 等待接种瘤胃液后立刻取样。

1.2.2 瘤胃液的接种 取晨饲前 3 头瘰管牛瘤胃 3 个位点的固体内容物与瘤胃液, 固液混合拍打 3 min, 4 层纱布过滤后, 分别用注射器抽取瘤胃液 10 mL, 使瘤胃缓冲液与瘤胃液以体积比 2 : 1 混合, 放入水浴恒温箱(39±0.5) ℃培养。

1.2.3 产气读数 分别于 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 和 24 h 读取各处理 2 支注射器的产气数。各处理产气量为注射器产气数扣除空白注射器(不添加基础日粮的瘤胃混合液体 30 mL)产气数的均值。当注射器刻度达到 60 mL 时, 记录刻度读数并排出气体, 使刻度返回到 30 mL 的位置继续产气。

1.2.4 样品采集 分别于 0, 2, 6, 10, 16 和 24 h 取出处理 I、处理 II 和对照组的 2 个重复样注射器, 读取产气量, 并采集发酵液测定 pH 值、 $\text{NH}_3\text{-N}$ 质量浓度和挥发性脂肪酸浓度。

1.3 样品分析与检测方法

1.3.1 瘤胃发酵液 pH 值的测定 取出发酵液, 用孔径为 0.04 mm 尼龙袋过滤后, 立即用 pH 计直接测定 pH 值。测定前, 使用 pH=4.01 和 pH=7.01 的标准缓冲液对 pH 计进行校正。

1.3.2 瘤胃发酵液 $\text{NH}_3\text{-N}$ 质量浓度的测定 发酵液经 4 层纱布过滤后, 取 3 mL 发酵液, 并加入 1 mL 新配制的 25 g/dL 偏磷酸, 盖上盖, 摇匀, -20 ℃冷冻保存, 采用靛酚比色法^[14]测定发酵液中 $\text{NH}_3\text{-N}$ 质量浓度。

1.3.3 瘤胃发酵液挥发性脂肪酸(VFA)浓度的测定 过滤发酵液经 10 000 ×g 离心 10 min; 移取上清液 1 mL 至离心管中, 加入冰浴的 25 g/dL 偏磷酸 0.25 mL, 静置 30 min; 然后 10 000 ×g 再次离心 15 min, 取上清液, 采用外标分析法测定乙酸、丙酸、丁酸和总挥发性脂肪酸(TVFA)浓度。测定使用 GC-4800A 气象色谱仪, FID 检测器; 处理软件为 A4800 色谱数据工作站; 采用外标分析法。使用条件为: 色谱柱为 Φ 4 mm(外) × 2.6 m 的不锈钢填充柱(150 mg/g PEG, Chromsorb W 0.178~0.165 mm), 柱温 130 ℃, 气化室温度 220 ℃, 检测器温度 220 ℃; 柱前压力为氮气 0.36 MPa, 氢气 0.03 MPa, 空气 0.20 MPa; 氮气(载气)流速为 30 mL/min。进样量为 0.6 μL/次。

1.4 统计分析方法

试验数据采用 SAS 9.0 软件进行方差分析, 并以 Tucky 法进行多重比较。处理与采样时间互作效应显著时($P < 0.05$), 对数据进行动态趋势图分析。

2 结果与分析

2.1 BNC 对奶牛瘤胃液体外发酵环境 pH 值、 $\text{NH}_3\text{-N}$ 质量浓度和 VFA 浓度的影响

从表 2 可以看出, BNC 在日粮中添加量为 7.5×10^8 /g(处理 II)时, 对奶牛瘤胃液体外发酵环境的 pH 值、 $\text{NH}_3\text{-N}$ 质量浓度和 VFA 浓度均有显著影响($P < 0.05$)。与对照组相比, 处理 II 奶牛瘤胃液体外发酵环境的 pH 值由 6.96 下降到 6.88 ($P < 0.05$), 产气量、 $\text{NH}_3\text{-N}$ 质量浓度、乙酸、丙酸和 TVFA 浓度分别提高 11.89%, 16.07%,

10.43%,50.35%和 20.70% ($P<0.05$),丁酸和乙酸/丙酸分别下降 2.23%和 18.81% ($P<0.05$)。处理 I 奶牛瘤胃液体外发酵环境中,除丙酸浓度显著高于对照 ($P<0.05$)外,其他指标与对照没有明显差别 ($P>0.05$)。

表 2 BNC 对奶牛瘤胃液体外发酵环境 pH 值、NH₃-N 质量浓度和 VFA 浓度的影响
Table 2 Effect of BNC on ruminal pH value,concentration of NH₃-N and VFA *in vitro*

项目	处理 Treatment			SEM	P	
	CK	I	II		处理 Treatment	处理×采样时间 Treatment×sample time
pH	6.96 a	6.98 a	6.88 b	0.008	<0.000	<0.000
产气量/mL Gas	18.76 a	19.01 a	20.99 b	0.292	<0.000	<0.061
NH ₃ -N/(mg·dL ⁻¹)	24.58 a	23.97 a	28.53 b	0.191	<0.000	<0.000
乙酸/(mol·L ⁻¹) Acetate	43.81 a	42.63 a	48.38 b	0.471	<0.000	0.016
丙酸/(mol·L ⁻¹) Propionate	11.38 a	11.26 b	17.11 c	0.159	<0.000	<0.000
丁酸/(mol·L ⁻¹) Butyrate	6.72 a	7.07 a	6.57 b	0.107	0.006	0.316
乙酸/丙酸 Ace/Pro	3.88 a	3.82 a	3.15 b	0.044	<0.000	<0.000
总挥发性脂肪酸/(mol·L ⁻¹) Totle VFA	60.43 a	61.55 a	72.94 b	0.562	<0.000	<0.000

注:同行数据后标不同字母者表示差异显著 ($P<0.05$),标相同字母者表示差异不显著 ($P>0.05$)。
Note: Different letters in the same row mean significant difference between the treatments ($P<0.05$), same letter in the same row means no significant difference between treatments ($P>0.05$).

2.2 不同 BNC 添加量对奶牛瘤胃液体外发酵环境 pH 值日变化的影响

图 1 表明,处理 II 奶牛瘤胃液体外发酵环境 pH 值相对于 CK 和处理 I 有明显降低 ($P<0.05$),尤其在产气培养初期的 0~2 h 内,下降幅度明显,而 CK 和处理 I 出现缓慢上升趋势。处理 I 与 CK pH 值日动态变化规律相似,两者差异不显著 ($P>0.05$)。

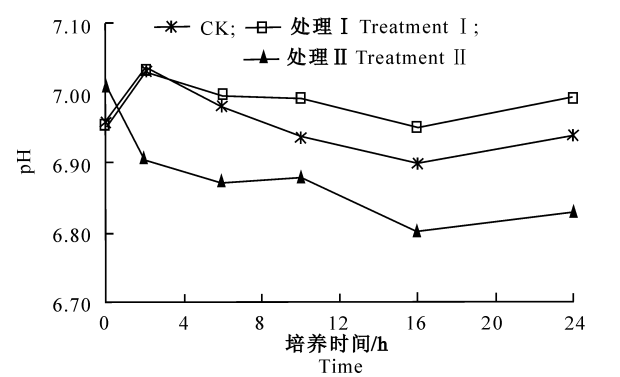


图 1 不同 BNC 添加量对奶牛瘤胃液体外发酵环境 pH 值日变化的影响

Fig.1 Effect of different supplying BNC on ruminal pH value of dairy cow *in vitro* during 24 hours

2.4 不同 BNC 添加量对奶牛瘤胃液体外发酵环境 VFA 浓度日变化的影响

由图 3 可以看出,处理 I 奶牛瘤胃液体外发酵环境中乙酸、丙酸和 TVFA 浓度的日动态变化趋势

2.3 不同 BNC 添加量对奶牛瘤胃液体外发酵环境 NH₃-N 质量浓度日变化的影响

从奶牛瘤胃液体外发酵环境中 NH₃-N 质量浓度日变化趋势(图 2)来看,处理 I 和处理 II 的 NH₃-N 质量浓度均在 0~16 h 时出现上升趋势,16~24 h 趋于稳定。其中,处理 I 的 NH₃-N 质量浓度与 CK 差异不明显,而处理 II 明显高于 CK ($P<0.05$)。

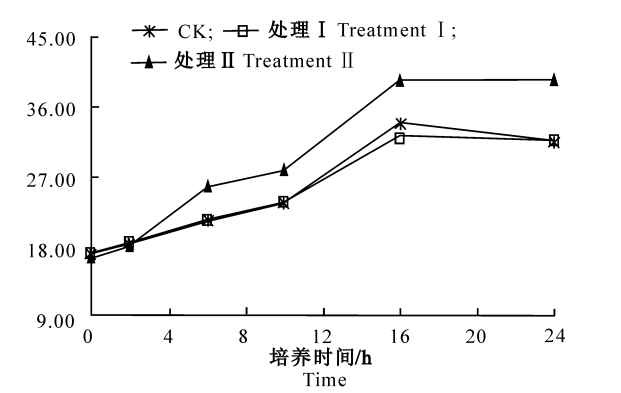


图 2 不同 BNC 添加量对奶牛瘤胃液体外发酵环境 NH₃-N 质量浓度日变化的影响

Fig.2 Effect of different supplying BNC on ruminal NH₃-N concentration of dairy cow *in vitro* during 24 hours

与 CK 基本一致,而处理 II 均高于 CK,其中丙酸浓度升高趋势最为明显。处理 II 乙酸/丙酸则明显小于处理 I 和 CK。

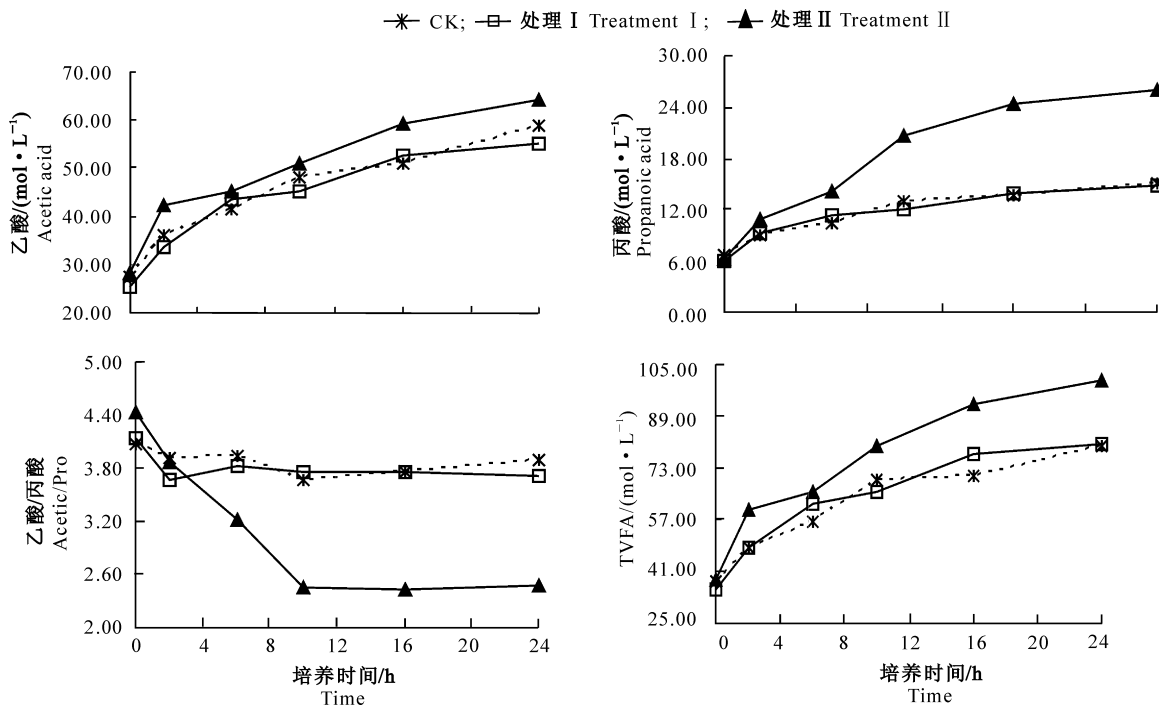


图 3 不同 BNC 添加量对奶牛瘤胃液体体外发酵环境 VFA 浓度日变化的影响

Fig. 3 Effect of different supplying BNC on ruminal VFA concentration of dairy cow *in vitro* during 24 hours

3 讨论

目前,纳豆芽孢杆菌在单胃动物上的应用较多,相应的机理研究报道也较多,主要包括以下几方面:(1)纳豆芽孢杆菌代谢产生的各种酶类能增加肠道各种酶的活性^[4-5],提高肠道对营养物质的消化吸收;(2)纳豆芽孢杆菌所分泌的细菌素能抑制肠道有害菌的生长,尤其是抑制大肠杆菌 O157 的生长^[7,15],并且促进益生菌的生长,例如乳酸杆菌和双歧杆菌生长^[3,16],从而发挥益生作用;(3)纳豆芽孢杆菌具有刺激肠道粘膜免疫反应的作用^[17]。然而与单胃动物相比较,反刍动物瘤胃是一个极其复杂的微生物共生生态系统,直接饲喂微生物的作用机理也要复杂得多。

3.1 BNC 对反刍动物瘤胃内环境的影响作用

瘤胃内 pH 值是反应瘤胃内环境的重要指标,本试验 pH 值为 6.80~7.04,属于反刍动物体内瘤胃 pH 值的正常范围(6~7)^[18]。处理 II pH 值显著低于 CK($P<0.05$),其原因可能有两方面:一是纳豆芽孢杆菌与体外瘤胃液混合培养过程中代谢产酸^[19],造成瘤胃液 pH 值降低;另一原因是,BNC 促进了 VFA 的生成,挥发性脂肪酸能降低瘤胃液 pH 值^[18]。黄俊文等^[10]的研究也发现,断奶仔猪饲料中添加纳豆芽孢杆菌,具有降低肠道 pH 值的趋势

($P>0.05$)。

产气法的产气量能有效预测体内干物质(DM)的降解率和代谢能($r=0.98$)^[20],本试验中处理 II 的产气量较对照高 11.89%($P<0.05$),说明纳豆芽孢杆菌具有促进饲料消化的作用。孟庆翔等^[21]提出,组成微生物蛋白的 $\text{NH}_3\text{-N}$ 与体外产气量存在着高度正相关($r>0.99$)。随着体外发酵时间的延长,本试验处理 II $\text{NH}_3\text{-N}$ 质量浓度和产气量上升趋势一致,表明 BNC 能促进瘤胃氮代谢,并提高瘤胃微生物蛋白的合成。挥发性脂肪酸各指标主要反应了瘤胃内碳水化合物的代谢,处理 II 乙酸、丙酸和 TVFA 浓度分别较 CK 提高 10.43%,50.35%和 20.70%($P<0.05$),表明 BNC 具有促进瘤胃碳水化合物降解的能力。其中,丙酸浓度的显著提高导致乙酸/丙酸显著降低($P<0.05$),但在精粗饲料质量比为 1:1 的日粮模式下,乙酸/丙酸(3.12)与体内法的正常比值(3.55)^[18]相近,不影响瘤胃微生物的正常生长环境,同时高丙酸产量有助于提高反刍动物机体的能量来源。

BNC 对瘤胃内环境的影响作用表明,纳豆芽孢杆菌能促进瘤胃微生物的生长。因为纳豆芽孢杆菌虽然具有较强的抗菌活性^[7],但主要是对好氧性致病菌产生抑制和杀灭作用^[7-8,15],对瘤胃的厌氧菌群不但不会产生抑制作用,还有助于维持瘤胃较好的

厌氧环境,促进厌氧菌群的生长。陈兵等^[3]试验表明,SD 大白鼠口服纳豆芽孢杆菌后,肠道厌氧菌群中的双歧杆菌、乳酸杆菌、梭菌和拟杆菌数量均有不同程度地增多;Hosoi 等^[16]对纳豆芽孢杆菌与 3 株乳酸菌进行体外厌氧培养研究表明,纳豆芽孢杆菌通过产生过氧化氢酶和枯草蛋白酶促进了乳酸杆菌的生长,并提高了其活性。

3.2 BNC 添加量对动物饲喂效果的影响作用

微生物作为饲料添加剂运用于动物生产中,其有效活菌数关系到饲喂效果,不同动物饲喂不同量的有效活菌数,会产生不同的饲喂效果。在单胃动物中,缪东等^[11]在猪日粮中添加 0.4%的纳豆菌制剂(10^9 /g)效果最好,与日粮中添加 0.4%常用添加剂比较,日增重提高 21%,每头每日多长 150.8 g;随着日粮中添加纳豆菌制剂比例减少,提高效果逐渐降低。黄俊文等^[10]给断奶仔猪饲喂添加量为 0.2%的纳豆芽孢杆菌(10^{10} /g),表明其具有降低仔猪肠道 pH 的趋势($P>0.05$),可提高仔猪结肠内容物中乳酸杆菌和双歧杆菌的数量($P<0.05$),提高结肠黏膜中乳酸杆菌的数量($P<0.05$),并显著提高小肠黏膜的绒毛高度($P<0.05$)。在禽类中,王丽娟等^[12]给肉仔鸡使用添加量为 0.2%的芽孢杆菌(2×10^8 /g),Xu 等^[22]在蛋鸡饲料中添加 0.05%枯草芽孢杆菌(6.0×10^9 /g),Fritil's 等^[23]给肉鸡饲喂添加量为 0.003%的枯草芽孢杆菌,均能显著性提高禽类的生产性能。然而,枯草芽孢杆菌在反刍动物上的应用鲜有报道。

本试验中,处理 II (7.5×10^8 /g)对瘤胃液体外发酵环境各指标影响显著,而处理 I (1.5×10^8 /g)除显著提高丙酸浓度($P<0.05$)外,对其他指标的影响效果均不明显。因此,本试验处理 II 的枯草芽孢杆菌添加量具有促进瘤胃饲料底物消化代谢的作用,但这种作用有待于体内法进一步验证。

4 结 论

在基础日粮中添加纳豆芽孢杆菌 7.5×10^8 /g,能促进瘤胃液体外发酵环境下饲料底物的降解代谢,降低瘤胃 pH 值和乙酸/丙酸,提高产气量以及瘤胃液中 $\text{NH}_3\text{-N}$ 质量浓度,乙酸、丙酸和总挥发性脂肪酸浓度。

[参考文献]

[1] Sumi H, Hamada H, Tsushima H, et al. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto: a typical and

popular soybean food in the Japanese diet [J]. *Experientia*, 1987, 43(10): 1110.

[2] 钟青萍, 王 斌, 石木标. 多功能保健食品——纳豆 [J]. *食品研究与开发*, 2003, 24(4): 81-83.

Zhong Q P, Wang B, Shi M B. Natto——A healthy food with many functions [J]. *Food Research and Development*, 2003, 24(4): 81-83. (in Chinese)

[3] 陈 兵, 朱凤香, 陈巧云, 等. 纳豆芽孢菌分离纯化及对大白鼠肠道微生态系统的影响 [J]. *浙江农业学报*, 2003, 15(4): 223-227.

Chen B, Zhu F X, Chen Q Y, et al. Isolation and purification of *Bacillus natto* sawamura and its effect on the intestinal microecology systems of rats [J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2003, 15(4): 223-227. (in Chinese)

[4] 陈 兵, 何世山, 朱凤香, 等. 纳豆芽孢杆菌剂对 AA 鸡生产性能和十二指肠消化酶的影响 [J]. *浙江农业学报*, 2003, 15(5): 289-292.

Chen B, He S S, Zhu F X, et al. Effects of *Bacillus natto* sawamura preparation on growth capability and duodenum digestive enzyme of AA broilers [J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2003, 15(5): 289-292. (in Chinese)

[5] 邝哲师, 田兴山, 张玲华, 等. 芽孢杆菌制剂对断奶仔猪体内消化酶活性的影响 [J]. *中国畜牧兽医*, 2005, 32(6): 17-18.

Kuang Z S, Tian X S, Zhang L H, et al. Effect of *Bacillus* additive on digestive enzyme activity of weaned piglets [J]. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2005, 32(6): 17-18. (in Chinese)

[6] Sumi H. Antibacterial activity of bacillus natto-growth inhibition against *Escherichia coli*-O157 [J]. *Bioindustry*, 1997(14): 17.

[7] 纪 宁, 孔繁东, 祖国仁, 等. 纳豆菌抗菌作用的研究现状与展望 [J]. *食品研究与开发*, 2006, 27(1): 138-141.

Ji N, Kong F D, Zu G R, et al. The present situation and developmental tendency of antimicrobial function of *Bacillus natto* [J]. *Food Research and Development*, 2006, 27(1): 138-141. (in Chinese)

[8] 贾力敏, 陈晓蔚, 江 晓, 等. 纳豆菌对致病菌生长抑制作用的初步研究 [J]. *中国公共卫生*, 2002, 18(5): 577-578.

Jia L M, Chen X W, Jiang X, et al. Study of *Bacillus natto* antimicrobial effect on growth of pathogen [J]. *Chinese Journal of Public Health*, 2002, 18(5): 577-578. (in Chinese)

[9] Sato T, Yamada Y, Ohtani Y, et al. Production of menaquinone (vitamin K2)-7 by *Bacillus subtilis* [J]. *J Biosci Bioeng*, 2001, 91(1): 16-20.

[10] 黄俊文, 林映才, 冯定远. 纳豆菌、甘露寡糖对仔猪肠道 pH、微生物区系及肠黏膜形态的影响 [J]. *畜牧兽医学报*, 2005, 36(10): 1021-1027.

Huang J W, Lin Y C, Feng D Y. Effect of natto and MOS on intestinal pH, colonic microflora population and intestinal membrane shape of early weaning piglet [J]. *Acta Veterinaria Et Zootechnica Sinica*, 2005, 36(10): 1021-1027. (in Chinese)

[11] 缪 东, 郭照辉, 丁祥力, 等. 纳豆菌制剂作饲料添加剂喂生长

肥育猪的试验[J]. 饲料研究, 2005(11):51-52.

Liao D, Guo Z H, Ding X L, et al. Examination of supplemental *Bacillus subtilis* natto in growing-finishing piglets[J]. Feed Research, 2005, 11:51-52. (in Chinese)

[12] 王丽娟, 张广民, 孙文志. 芽孢杆菌在大肠杆菌应激下对肉仔鸡免疫和抗氧化功能的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2006(8):44-46.

Wang L J, Zhang G M, Sun W Z. Effect of *Bacilli* on immune and antioxidant function in broilers chicks challenged by *E. coli* [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2006(8):44-46. (in Chinese)

[13] 沈 萍. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 215.

Shen P. Microbial experiment[M]. Beijing: High Education Press, 2000:215. (in Chinese)

[14] Broderick G A, Kang J H. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and *in vitro* media [J]. J Dairy Sci, 1980, 63(1):64-71.

[15] Osawa R, Matsumoto K. Digestion of staphylococcal enterotoxin by *Bacillus natto* [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1997, 71(4):307-311.

[16] Hosoi T, Ametani A, Kiuchi K, et al. Improved growth and viability of lactobacilli in the presence of *Bacillus subtilis* (natto), catalase, or subtilisin [J]. Can J Microbiol, 2000, 46(10):892-897.

[17] Duc L H, Huynh A H, Barbosa T M, et al. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(4):2161-2171.

[18] 冯仰廉. 反刍动物营养学 [M]. 北京: 科学出版社, 2004:136-137.

Feng Y L. Ruminant nutrition [M]. Beijing: Science Press, 2004:136-137. (in Chinese)

[19] 刘学剑. 饲用芽孢杆菌的研究和应用 [J]. 广东饲料, 2005, 14(2):30-32.

Liu X J. Research and application of feed *Bacillus* [J]. Guangdong Feed, 2005, 14(2):30-32. (in Chinese)

[20] Menke K H, Raab L, Salewski A. The estimation of the digestibility and metabolisable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor [J]. J Agric Sci, 1979, 93:217-222.

[21] 孟庆翔, 张宏军. 估测饲料蛋白质瘤胃降解率的新方法的研究 [J]. 北京农业大学学报, 1991, 174:95-100.

Meng Q X, Zhang H J. Study of a new way to evaluate the protein degradation of feed in rumen [J]. Journal of Beijing Agriculture University, 1991, 174:95-100. (in Chinese)

[22] Xu C L, Ji C, Ma Q, et al. Effects of a dried bacillus subtilis culture on egg quality [J]. Poultry Science, 2006, 85:364-368.

[23] Fritil's C A, Kersey J H, Motl M A, et al. *Bacillus subtilis* C-3102(Calsporin) improves live performance and microbiological status of broiler chickens [J]. J Appl Poultry Res, 2000, 9:149-155.

(上接第 32 页)

[8] Michael E S, Tang Y Q, Wendy L M, et al. Purification, primary structures, and antimicrobial activities of β -Defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1993, 268(9):6641-6648.

[9] Charlotte T, Chen L Y, Rachel C, et al. Isolation and characterization of antimicrobial peptides from deer neutrophils [J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2005, 26:165-169.

[10] Lehrer R I, Rosenman M, Harwig S S L, et al. Ultrasensitive assay for endogenous antimicrobial peptides [J]. J Immunol Meth, 1991, 137:167.

[11] 汪家政, 范 明. 蛋白质技术手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2000:189-197.

Wang J Z, Fan M. Protein technique handbook [M]. Beijing: Science Press, 2000:189-197. (in Chinese)

[12] Steinberg D A, Lehrer R I. Designer assays for antimicrobial peptides. Disputing the "one-size-fits-all" theory[J]. Methods Mol Biol, 1997, 78:169-186.

[13] 盛长忠, 安春菊, 耿 华, 等. 一种家蝇幼虫热稳定抗菌肽的分离纯化 [J]. 南开大学学报: 自然科学版, 2002, 35(4):6-10.

Sheng C Z, An C J, Di H, et al. Separation and purification of a heat-stable antibacterial peptide of the larvae of housefly [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis: Natural Science Edition, 2002, 35(4):6-10. (in Chinese)

[14] 张希春, 孙振钧, 黄 锦, 等. 蚯蚓抗菌肽 EABP-1 的分离纯化及部分性质 [J]. 应用环境生物学报, 2002, 9(1):36-38.

Zhang X C, Sun Z J, Hang J, et al. Purification and characterization of antibacterial peptide EABP-1 from annelid eisenia fetida [J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2002, 9(1):36-38. (in Chinese)

[15] Harwig S S, Swiderek K M, Kokryakov V N, et al. Gallinacins: cysteine-rich antimicrobial peptides of chicken leukocytes [J]. FEBS Lett, 1994, 342:281-285.