

枯草芽孢杆菌粉剂作为鸡饲料添加剂的研究^{*}

郑永利 雷秋波 徐润林 林继球

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘要 利用具有卡那霉素抗性和能分泌 α -淀粉酶的生物工程菌枯草芽孢杆菌 Bs964作为微生物饲料添加粉剂, 饲喂不同发育时期的鸡, 分别测其平均日增质量. 根据实验结果, 证实枯草芽孢杆菌 Bs964对鸡的生长有促进作用, 分析了不同时期饲喂枯草芽孢杆菌 Bs964对鸡生长的影响.

关键词 枯草芽孢杆菌, Bs964, α -淀粉酶, 鸡

分类号 S 816. 79

利用微生物代替抗生素作为饲料添加剂, 在国内、外早有研究, 近年来已开始应用于生产, 并经实践证明无害、无残留、无污染、无耐药性^[1,2]. 根据美国食品及药品管理局(FDA) 1989年公布的报告, 可作为饲料添加剂的微生物有枯草杆菌(*Bacillus*), 酵母(*Candida*), 乳酸菌(*Lactobacillus*)等. 目前国内、外的研究主要是用筛选的天然菌作为饲料添加剂, 其主要作用都是用于改善动物消化道内的微生物环境, 抵御有害病菌的侵袭, 从而提高动物的健康水平, 间接地促进动物生长^[3,4]. 本研究利用克隆了 α -淀粉酶基因并具有分泌 α -淀粉酶的能力生物工程菌——Bs964菌作为微生物饲料添加剂, 首先将Bs964菌在固体培养基上扩大培养, 在不同的条件下保存, 测Bs964菌的存活能力, 再制成菌粉, 针对不同发育时期的鸡, 用一定量的菌粉与饲料混合饲喂, 分别测定鸡的平均日增重, 目的在于探讨Bs964工程菌粉剂作为鸡饲料添加剂的作用.

1 材料和方法

1.1 材料

实验菌种: Bs964菌为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)由中山大学生物工程中心罗进贤教授提供. 此菌是将 α -淀粉酶基因和抗卡那霉素基因克隆到Bs964菌中, 使其可分泌 α -淀粉酶, 并具有卡那霉素抗性.

实验动物: 一日龄鸡苗, 由华南农业大学养鸡场提供.

1.2 实验方法

1.2.1 培养基的选择和处理 ① 平板固体培养基(LB固体培养基): 将蛋白胨 10 g, 酵母

* 广东省自然科学基金(950102)资助项目

收稿日期: 1997-07-30 郑永利, 男, 27岁, 94级本科生

膏 5 g, 氯化钠 10 g, 水 1 000 mL 混和后, 调 pH 值至 7.4 左右, 分装在已放有 $d=1\%$ 的淀粉和 $d=1.5\%$ 的琼脂中, 高压锅 2.03×10^5 Pa 消毒 20 min. ② 二级液体培养基 (LB 液体培养基): 将蛋白胨 10 g, 酵母膏 5 g, 氯化钠 10 g, 水 1 000 mL 混合后调 pH 值至 7.4 左右, 高压锅 2.03×10^5 Pa 消毒 20 min. ③ 三级扩大发酵固体培养基: 将 $w=35\%$ 的米糠; $w=64\%$ 的麦麸; $w=1\%$ 的酵母粉混和后, 调 pH 值至 7.4 左右, 高压锅 2.03×10^5 Pa 消毒 45 min.

1.2.2 培养过程 ① 菌种的培养和保存: 将原菌种先接到平板培养基 (LB 固体培养基) 上, 37°C 培养 24 h, 保存备用. ② 二级液体菌种培养: 将前一步培养的菌种接到二级液体培养基上, 摇床培养 12 h (37°C , 190~200 r/min). ③ 三级菌种固体扩大发酵: 将二级液体菌种与三级固体培养基混和, 放在垫有已消毒纱布的框上, 37°C 开放式培养 24 h. 将已培养好的菌 60°C 下干燥 24 h, 使其形成芽孢. ④ 菌粉的制作: 将已干燥好的菌块粉碎, 塑料薄膜口袋分装, 封口.

1.2.3 菌种的检测 将上述菌粉分为 3 部分, 一部分直接放在空气中, 一部分真空密封, 另一部分放入冰箱, 分别在第 1, 3, 10, 15, 30, 45, 60, 90 天取 0.2 g 样品稀释, 涂布于含卡那霉素 ($50 \mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 培养基抗性平板上, 在 37°C 下培养 24 h, 计算菌数.

1.2.4 芽孢枯草杆菌粉剂对鸡的增质量和饲料利用率的影响 ① 动物实验: 一日龄鸡 90 只, 随机分为 4 组, 每组各 15 只, 其中第 1 组为对照组. 采用“农大”牌鸡饲料饲养. 饲养过程中不饲喂任何抗生素. ② 饲料添加剂: 利用芽孢枯草杆菌粉剂与饲料混和后使用. ③ 实验步骤: 按照不同日龄饲喂饲料添加剂每实验组每只每次用菌若约 10^8 个, 其中第 1 组在第 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30 天添加饲料添加剂, 第 2 组在第 1, 5, 10, 15, 20 天添加饲料添加剂, 第 3 组在第 1, 5, 10 天添加饲料添加剂, 第 4 组在第 10, 15, 20, 25, 30 天添加饲料添加剂, 第 5 组在第 20, 25, 30 天添加饲料添加剂, 对照组不添加饲料添加剂. 然后, 在第 10, 21, 30, 45 天测定每只实验鸡的质量. ④ 实验鸡平均日增质量可按式进行
平均日增质量 (g/d) = [期末体质量 (g) - 期初体质量 (g)] / 饲养日龄 (d)

2 结 果

表 1 所列 *Bs964* 菌在固体培养基上每克生存的菌数, 可见在 90 d 后仍能较好地保存 *Bs964* 菌, 并且菌数能保持在一定的数量上. 而在菌种检测时, 在第 1 组的培养基长有其它菌 (主要是根霉菌), 在第 2, 3 组中偶尔也会有根霉菌的污染, 而从平板中可看出菌的活性不断减弱.

表 1 *Bs964* 菌的存活能力¹⁾

Tab. 1 The living ability of *Bs964*

个 · g⁻¹

培养时间 /d	开放放置	密封保存	低温保存	培养时间 /d	开放放置	密封保存	低温保存
1	1.47×10^9	1.47×10^9	1.47×10^9	30	7.50×10^7	1.60×10^8	1.60×10^8
3	2.45×10^8	2.30×10^8	2.30×10^8	45	5.50×10^7	1.35×10^8	1.40×10^8
10	1.15×10^8	1.75×10^8	1.85×10^8	60	2.50×10^7	1.20×10^8	1.30×10^8
15	1.25×10^8	1.55×10^8	1.55×10^8	90	$< 10^7$	1.25×10^8	1.30×10^8

1) 第 1 天的菌没有经过高温干燥

在实验过程中, 所有实验组均未发生肠道疾病, 但第 4 组有 2 只鸡, 第 5 组有 1 只鸡因天气寒冷而死亡. 表 2 所列鸡平均日增质量, 在统计处理显示第 1 组的第 21, 30, 40 天鸡的平均日增质量比对照组的有显著的差异, 而其它各组则无显著差异.

表 2 鸡平均日增质量

Tab. 2 The daily mass increase of the chickens g/d

日龄	第 1 组	第 2 组	第 3 组	第 4 组	第 5 组	对照组
10	1.42±0.331	1.28±0.574	1.16±0.740	1.28±0.641	1.32±0.419	1.19±0.649
21	1.77±0.261	1.52±0.499	1.48±0.493	1.54±0.379	1.49±0.477	1.45±0.473
30	1.98±0.311	1.86±0.546	1.86±0.513	1.66±0.434	1.65±0.499	1.66±0.472
40	2.50±0.404	2.38±0.615	2.39±0.560	2.24±0.605	2.19±0.638	2.12±0.545

3 讨 论

3.1 菌种的保存效果

在开放培养 *Bs96* 菌时, 由于固体培养基与外界广泛接触因而其它菌 (主要为根霉菌) 的污染机会较大, 在密封和低温的条件下, 一方面由于 *Bs96* 菌已经形成芽孢, 能适应外界条件, 另一方面在缺少水份和氧气或低温的条件下, 其它菌不易生长, 故 90 d 后 *Bs96* 菌仍能较好地保存, 并且菌数能保持在一定的数量上 (10^8 个 /g); 但在开放保存时, 根霉菌能大量的繁殖, 不利于 *Bs96* 菌的生存.

3.2 芽孢枯草杆菌粉剂对鸡增质量的作用

枯草芽孢杆菌工程菌由于能分泌 α -淀粉酶, 而 α -淀粉酶有助于鸡对消化道内的淀粉类物质的降解和吸收, 有利于实验鸡的生长, 因此是种较理想的饲料添加剂^[3-5]. 从实验结果来看, 在鸡的平均日增质量中, 第 1 组的第 21, 30, 40 天的数据与对照组的有显著差异 ($P < 0.05$), 而其它数据与对照组比较无显著差异 ($P > 0.05$). 在第 4, 5 组的结果中, 实验数据与对照组的非常接近, 而第 1 和 3 组的结果与对照组的有一定的差异, 可能由于饲喂添加剂的时间不同所致, 在第 1, 2 和 3 组鸡的饲喂时间较早, 并多次饲喂, 第 4, 5 组的饲喂的时间过迟, 前期工作表明, *Bs96* 菌在早期饲喂时易于定居, 而饲喂较迟不利定居 (待发表), 故第 1, 2 和 3 组与第 4, 5 组比较有一定的差异. 此外, 统计学外理显示, 只有第 1 组的数据与对照组的有显著差异, 这也表明了只有不断地饲喂 *Bs96* 菌粉剂才能使鸡更有效地增加质量, 这与 *Bs96* 菌的生物学特性有关. 与其它克隆生物一样, *Bs96* 菌虽已克隆了 α -淀粉酶基因, 但外来基因在自然条件下易丢失^[6], 若干代后, *Bs96* 菌即使在鸡消化道内定居也有可能将其 α -淀粉酶基因丢失, 其作用就会减弱, 仍致消失. 故本文建议饲喂添加剂应连续进行, 这样, 将有利于 *Bs96* 菌分泌 α -淀粉酶, 有助于鸡的生长.

参 考 文 献

- 1 郭芳彬. 可直接饲用的微生物在畜牧业的应用 (I). 饲料研究, 1996, (1): 13~ 14
- 2 郭芳彬. 可直接饲用的微生物在畜牧业的应用 (II). 饲料研究, 1996, (2): 12~ 13
- 3 蔡辉益, 霍启光. 饲用微生物添加剂研究与应用进展. 饲料工业, 1993, 14 (4): 7~ 12
- 4 蔡辉益, 霍启光. 饲用微生物添加剂研究与应用进展 (续). 饲料工业, 1993, 14 (5): 7~ 11
- 5 雷秋波. 利用生物工程菌作为鸡饲料添加剂的研究. 中山大学学报论丛, 1997 (1): 30~ 33
- 6 周德庆. 微生物学教程. 北京: 高等教育出版社, 1993. 271

Study of A Biotechnical Microorganism (*Bacillus subtilis*) as A Forage Additive of Chicken

Zheng Yongli* Lei Qiubo Xu Runlin Lin Jiqiu

Abstract For the investigation of the roles of biotechnical microorganism forage additives, Bs964, a biotechnical microorganism cloned with α -amylase gene and so capable of α -amylase secretion, and being K^r , was used as a forage additive for chicken in this study. The experiment chickens at different age were fed with the forage additive, and the means of daily mass gain have been measured. The results showed that Bs964 promote for chicken growth. The effects of different forage additive feeding time on the chicken growth have been analyzed in the paper.

Keywords *Bacillus subtilis*, Bs964, α -amylase, chicken

* School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China