

菊糖和枯草芽孢杆菌对肉鸡肠道菌群数量及排泄物氨气散发量的影响

孙瑞锋, 步长英, 李同树

(山东农业大学 动物科技学院, 山东 泰安 271018)

摘要:取1日龄AA肉鸡240只,随机分成4组,分别饲喂添加含0.0%菊糖(对照组)、0.3%菊糖、0.1%枯草芽孢杆菌、0.3%菊糖+0.1%枯草芽孢杆菌的玉米-豆粕型日粮42d。垫料平养,自由采食和饮水。于21、42日龄平板菌落计数法测定肉鸡盲肠菌群数量和纳氏试剂法测定排泄物氨气。结果表明:21日龄时,菊糖和枯草芽孢杆菌可降低大肠杆菌和沙门氏菌的数量,以菊糖+枯草芽孢杆菌组影响更为显著,但对总需氧菌和乳酸杆菌数量差异不显著;42日龄时,菊糖和枯草芽孢杆菌对大肠杆菌和沙门氏菌数量降低的作用更加明显,对总需氧菌影响仍然不大,但可增加乳酸杆菌数量,从而调节肉鸡肠道微生态环境;菊糖和枯草芽孢杆菌能有效减少肉鸡排泄物氨气散发量,以菊糖+枯草芽孢杆菌组作用更为显著,有利于改善肉鸡鸡舍环境。

关键词:菊糖;枯草芽孢杆菌;肠道菌群数量;氨气

中图分类号:S858.31 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2008)增刊-0252-05

Effects of Dahlin and *Bacillus subtilis* on Intestinal Microflora, Fecal Emission of Ammonia in Broiler

SUN Rui-feng, BU Chang-ying, LI Tong-shu

(Department of Animal Science, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

Abstract: Two hundred and forty 1-day-old Arbor Acres broiler chicks were randomly divided into four groups each including 60 broilers. The four groups were respectively fed with adding 0.0% inulin, 0.3% inulin, 0.1% *bacillus* and 0.3% inulin + 0.1% *bacillus* in broiler diets. On 21 and 42 day, the number of cecal bacteria was detection by Counting bacteria method and ammonia of broiler's fecal excreted was measured by Nessler's reagent method. The results showed that on 21 day, the addition of inulin and *bacillus* to broiler diets decreased the number of *E. coli* and *Salmonella*, especially in the adding 0.3% inulin + 0.1% *bacillus* group, but there was no significant variation in the amounts of aerobic and *Lactobacillus*; On 42 day, the action of making the number of *E. coli* and *Salmonella* decreased was more significant than 21 day, though the quantity of aerobic didn't vary, the amount of *Lactobacillus* was increased, which could make microflora system better; Furthermore the adding of inulin and *bacillus* to broiler diets could reduce dissemination of ammonia in excretion of broilers, especially in the adding 0.3% inulin + 0.1% *bacillus* group, which was benefit for improving hen house environment.

Key words: Dahlin; *Bacillus subtilis*; Intestinal flora quantity; Ammonia

菊糖(Dahlin)又称菊粉(Inulin),是由D-呋喃果糖通过 β -2,1糖苷键连接而成的一种生物多糖,终端含有一个葡萄糖分子(分子式缩写为GF_n),聚合度2-60,有关研究表明,菊糖与其类似的寡聚糖一样,能够调整动物肠道内的微生态系统,可与病原菌的外源凝集素特异性结合使其不能在肠道上粘附,

而随排泄物从消化道排出体外;菊糖在大肠中发酵还产生SCFA、有机酸和气体能促进大肠蠕动,有利于这些内容物向大肠后段运动,也起到了加快肠道排泄有害微生物的效果。枯草芽孢杆菌是益生菌制剂的一个重要菌种,像菊糖一样都被认为是维持良好肠道微生物生态系统的调整剂,也是解决在肉鸡生产

收稿日期:2007-11-18

基金项目:山东省财政支持重点农业科技成果推广项目(SDGP2004-54-0)资助

作者简介:孙瑞锋(1977-),男,山东聊城人,硕士,主要从事动物营养研究。

通讯作者:李同树(1949-),男,山东梁山人,教授,主要从事家禽营养研究。

中因多次用药导致肠道微生态系统失衡问题的有效途径^[1-9]。但目前对菊糖应用效果的研究报道很少。因此,本试验在肉鸡日粮中添加菊糖、枯草芽孢杆菌及其二者的合剂,通过分类比较分析菊糖对肉鸡盲肠菌群及排泄物氨气散发量的影响,重点研究菊糖调整肠道微生态平衡和减少氨气释放量的效果,为在肉鸡生产上的应用提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 试验动物与分组

选用 240 只 1 日龄 AA 肉鸡随机分成 4 个处理,每个处理设 6 个重复,每个重复 10 只鸡。4 个处理

的肉鸡日粮组成,分别为基础日粮(对照组)、基础日粮+ 0.3% 菊糖(菊糖组)、基础日粮+ 0.1% 枯草芽孢杆菌(芽孢杆菌组)、基础日粮+ 0.3% 菊糖+ 0.1% 枯草芽孢杆菌(菊糖+ 芽孢杆菌组)。

1.2 基础日粮与添加剂

参照 NRC(1994) 肉用仔鸡饲养标准配制玉米-豆粕型基础日粮,其原料组成及营养水平见表 1。菊糖由天门海力公司购入,该产品的菊糖含量 52.82% (实测值),推荐添加剂量为 0.3%; 枯草芽孢杆菌由宝来利来生物科技有限公司提供,产品有效含量(60±5)亿/g,推荐添加剂量为 0.1%。

表 1 基础日粮的组成及营养水平

Tab. 1 Composition and nutrient levels of diets

原料组成/% Composition of material	1~ 3 周		4~ 6 周		
	1~ 3 周	4~ 6 周	1~ 3 周	4~ 6 周	
玉米 Corn	54.00	57.72	代谢能/(MJ/kg) ME	3000	3100
豆粕 Soyben meal	33.76	30.62	粗蛋白/% CP	22.00	20.00
鱼粉 Fishmeal	4.50	3.00	钙/% Ca	1.00	0.90
油脂 Oil	3.78	4.83	总磷/% Total P	0.45	0.40
石粉 Lime-stone	1.27	1.20	赖氨酸/% Lys	1.28	1.15
磷酸氢钙 Ca ₂ HPO ₄	1.20	1.15	蛋氨酸/% Met	0.58	0.45
食盐 Salt	0.30	0.35			
赖氨酸 Lys	0.00	0.03			
蛋氨酸 Met	0.19	0.10			
预混料 Premix	1.00	1.00			
合计 Total	100	100			

注:粗蛋白、钙、总磷为实测值,其他指标为计算值。每千克基础日粮含 VA 1000 IU, 维生素 B₁₂ 125 μg; 核黄素 6.0 mg; 泛酸 12 mg; 尼克酸 45.0 mg; 生物素 0.25 mg; 维生素 D₃ 2 750 IU; 维生素 E 38 mg; 维生素 K 33.0 mg; 锰 125 mg; 铁 170 mg; 锌 75 mg; 铜 20 mg; 碘 0.36 mg; 硒 0.5 mg。

Note: The values of crude protein, calcium and total phosphorus were analyzed and other else were calculated. Supplied the following per kilogram of diet; VA 10 000 IU; V B₁₂ 125 μg; riboflavin 6.0 mg; D-panthothenic acid 12 mg; niacin 45.0 mg; biotin 0.25 mg; VD₃ 2 750 IU; VE 38 mg; VK₃ 3.0 mg; Mn 125 mg; Fe 170 mg; Zn 75 mg; Cu 20 mg; I 0.36 mg and Se 0.5 mg.

1.3 鸡群的饲养管理

试验鸡采用垫料平养,饲养管理和免疫程序参照 AA 肉鸡饲养管理手册。饲养期分为两个阶段,共 42 d。

1.4 测定指标及方法

1.4.1 盲肠菌群的测定 盲肠菌群的检测采用平板计数法。于 21, 42 日龄各处理组取 6 只肉鸡宰杀,取盲肠末端 2 cm 肠段液氮保存。肠道菌测定在无菌操作台上进行,取盲肠食糜 0.5 g 于灭菌瓶中,加入生理盐水 4.5 mL 稀释成 10⁻¹,振荡 1~ 2 min,静置 10 min 后,吸取 0.5 mL 上清液转入盛有 4.5 mL 稀释液小瓶中稀释至 10⁻²,按此法再逐级进行 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹ 的倍比稀释,每个稀释度设 3 个重复。大肠杆菌、沙门氏菌、总需氧菌分别接种于麦康凯选择性培养基(杭州天和微生物试剂公司)、SS 琼脂、营养琼脂培养基平皿上,37℃ 生化培养箱中有氧培养 24 h 后菌落计数;乳酸杆菌接种于乳酸杆菌选择性培养(LBS)平皿上,37℃ 生化

培养箱中厌氧培养 48 h 后进行菌落计数。菌群数量以每克肠道内容物所含细菌数(1 g CFU/g)表示。

1.4.2 鸡粪氨气散发量的测定 饲养试验结束前 1 d,收集每个重复组鲜鸡粪,剔除毛屑杂物后充分混匀,准确称取 50 g 鸡粪样品装入 500 mL 磨口玻璃瓶中,用胶塞密封,室温下放置 3 d,让其分解发酵产气。再用注射器抽取 100 mL 玻璃瓶中的气体,经大气采样器以 0.1 L/min 的速度用 0.005 mol/L 硫酸溶液吸收其中的氨气。参照 GB/T 14668-1993 空气质量,氨的测定按纳氏试剂比色法的步骤进行检测分析,将采样体积换算成标准状态下的体积,按下面公式计算出各个处理组鸡粪样品所释放出的氨气浓度:

$$C(NH_3) = (A - A_0) \times B_5 \times 5 / V_0$$

式中: C: 空气中氨浓度(mg/L); A: 样品溶液的吸光度; A₀: 空白溶液的吸光度; B₅: 计算因子(纳氏比色法中回归曲线斜率的倒数 单位: μg/吸光度); V₀: 标准状态下的采样体积(L)。

1.5 数据处理

采用 SPSS11.5 软件对试验数据进行单因素方差分析, 差异显著性 Duncan 氏多重比较, 试验结果用平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm S$)表示。

2 结果与分析

2.1 菊糖和枯草芽孢杆菌对肉鸡盲肠菌群数量的影响

各处理组肉鸡盲肠中各种菌群的数量, 见表 2。

由表 2 可知, 肉鸡日粮添加菊糖和芽孢杆菌后, 盲肠微生物菌群发生了一定的变化。21 日龄各组间比较, 总需氧菌数和乳酸杆菌数差异不显著, 大肠杆菌数量菊糖+ 芽孢杆菌组、菊糖组比对照组分别降低 19.2% 和 16.4%, 差异显著, 沙门氏菌数量菊糖+ 芽孢杆菌组、菊糖组比对照组分别降低 23.6% 和 21.8%, 差异显著。可见菊糖和菊糖+ 芽孢杆菌组都有使大肠杆菌和沙门氏菌数量下降的趋势。但

芽孢杆菌组对各菌群的影响不明显。

42 日龄肉鸡的盲肠菌群数量比较, 总需氧菌各组间差异不明显, 但与对照组相比, 添加菊糖和芽孢杆菌组都呈下降的趋势; 大肠杆菌数量以菊糖+ 芽孢杆菌组最少, 且与菊糖组、芽孢杆菌组的数量分别比对照组降低 29.8%, 14.5%, 12.4%, 3 个添加组均与对照组差异显著; 沙门氏菌检测数量以对照组最多, 菊糖+ 芽孢杆菌组、菊糖组、芽孢杆菌组分别比对照组降低 48.32%, 36.42% 和 32.70%, 且差异显著。乳酸杆菌的数量以菊糖+ 芽孢杆菌组最高, 且与菊糖组、芽孢杆菌组分别比对照组增加 28.5%, 21.38% 和 15.30%, 均与对照组显著差异。

表 2 中 21 和 42 日龄肠道菌群的测定结果显示, 日粮中添加菊糖和菊糖+ 芽孢杆菌对盲肠微生物的影响较为相似, 呈现出总需氧菌、大肠杆菌、沙门氏菌数量下降, 而乳酸杆菌数量有所增加的趋势, 且这种效果 42 日龄比 21 日龄更为明显。

表 2 不同处理组肉鸡盲肠中各类菌群的数量

处理组 Treatment	对照组 Control	菊糖组 GFn	芽孢杆菌组 Bacillus	菊糖+ 芽孢杆菌组 GFn+ Bacillus
21 d 总需氧菌 Total aerobe	8.81 ± 0.27	8.69 ± 0.38	8.57 ± 0.34	8.39 ± 0.21
大肠杆菌 E. Coli	6.13 ± 0.50b	5.53 ± 0.30a	5.81 ± 0.11b	5.45 ± 0.07a
沙门氏菌 Almonella	6.42 ± 0.75b	5.70 ± 0.40a	5.97 ± 0.16b	5.64 ± 0.16a
乳酸杆菌 Lactobacillus	7.60 ± 1.27	8.21 ± 0.68	8.24 ± 0.56	8.35 ± 0.38
42 d 总需氧菌 Total aerobe	8.69 ± 0.23	8.01 ± 0.16	8.15 ± 0.26b	7.66 ± 0.31
大肠杆菌 E. Coli	6.62 ± 0.15b	5.78 ± 0.15	5.89 ± 0.12	5.10 ± 0.21
沙门氏菌 Salmonella	7.98 ± 0.29b	5.85 ± 0.12	5.31 ± 0.51	5.38 ± 0.25
乳酸杆菌 Lactobacillus	6.08 ± 0.26	7.38 ± 0.43b	7.01 ± 0.13b	7.81 ± 0.16b

注: 同行肩标字母不同表示差异显著, 下表同。

Note: Values with different letter superscripts in the same column mean significant difference ($p < 0.05$), the same as below.

表 3 不同处理组鸡粪的氨气散发量

对照组 Control	菊糖组 GFn	芽孢杆菌组 Bacillus	菊糖+ 芽孢杆菌组 GFn+ Bacillus
21 d	57.26 ± 5.34b	35.28 ± 6.79a	38.67 ± 14.93a
42 d	78.36 ± 21.59c	48.41 ± 11.82a	55.64 ± 23.55b

2.2 菊糖和枯草芽孢杆菌对鸡粪中氨气散发量的影响

由表 3 分析, 21 日龄各组鸡粪中 NH₃ 的散发量比较, 3 个添加组均比对照组有显著的降低, 其中, 菊糖组鸡粪中 NH₃ 的散发量降低 38.38%, 芽孢杆菌组降低 20.35%, 菊糖+ 枯草芽孢杆菌组降低 62.14%, NH₃ 散发量降低的幅度最大。42 日龄各组鸡粪中 NH₃ 的散发量比较, 菊糖组和菊糖+ 芽孢杆菌组降低幅度较大, 与对照组相比差异极显著, 分别下降 38.51% 和 46.72%; 芽孢杆菌组比对照组降低

16.75%, 且差异显著, 但芽孢杆菌组与菊糖组和菊糖+ 芽孢杆菌组相比也存在着显著的差异, 表明芽孢杆菌组降低 NH₃ 散发量的效果不如菊糖+ 芽孢杆菌组。

3 讨论与结论

3.1 菊糖和芽孢杆菌对肉鸡肠道菌群的影响

试验结果表明, 肉鸡日粮添加菊糖和芽孢杆菌可以减少 21 日龄肉鸡盲肠中的大肠杆菌和沙门氏菌的数量, 增加乳酸杆菌的数量; 随着肉鸡的生长,

到 42 日龄肉鸡时这种作用更加明显。这是因为菊糖进入消化道后, 产生有利于肠道有益微生物生长的物质或者本身增加肠道有益微生物的数量, 使肠道有益菌群占优势。这些有益微生物抢先利用小肠上皮细胞内的营养物质进行生存和繁殖, 并优先占据肠道黏膜表面黏附位点, 阻止致病菌与肠道黏膜表面受体结合。同时, 肠道有益微生物大量繁殖, 消耗氧气, 产生过氧化氢、有机酸等具有抗菌活性的代谢产物, 能抑制致病类型的有害菌和外源病原菌的生存。Kieessen 等^[1], Roberfrid 等^[2] 都发现菊糖可显著促进人大肠中双歧杆菌、乳酸杆菌等生长, 使梭菌、拟杆菌、大肠杆菌等数量减少; 和本试验结果一致, 但与袁纓对于菊糖的研究结果不同。这可能与糖的纯度、分子量、单糖组成及分子结构等有关。

但从试验结果来看, 菊糖对肉鸡盲肠乳酸杆菌和总需氧菌的抑制作用在 21 日龄以前并不显著, 可能是由于菊糖和芽孢杆菌对宿主消化道菌群数量的调控需要时间不同所致。42 日龄试验结果表明, 菊糖和枯草芽孢杆菌表现出一定的协同作用, 二者的共同添加可以降低大肠杆菌 29.8%, 降低沙门氏菌 48.32%, 增加乳酸杆菌 28.5%。且都与对照组差异显著。这是由于枯草芽孢杆菌与肠道固有菌产生竞争性的酵解作用, 使枯草芽孢杆菌在通过肠道上段时存活率得到改善, 选择性抑制肠道有害菌数量, 对肉鸡的应激或病理状态下维持消化道内正常的微生态系, 维持健康生长有明显效果。肠道有益菌群的定植率提高, 也增强了菊糖对内源和外源菌生长及活性的刺激作用。

3.1.1 菊糖对肉鸡盲肠沙门氏菌和大肠杆菌的影响 鸡沙门氏菌病(Avian salmonellosis)和鸡大肠杆菌病(Avian Colibacillosis)同属于细菌性呼吸道病。沙门氏菌病是由沙门氏菌属中一种或多种细菌引起的禽类传染病, 大肠杆菌是动物肠道内正常栖息的一种革兰氏阴性杆菌, 是一种条件性致病菌, 当细菌与机体的对比失衡时致使肉鸡发病。为了调节肉鸡肠道菌群平衡, Oyofu 等对已含沙门氏菌的鸡群饮水中添加 0.25% 的菊糖, 鸡群中沙门氏菌的阳性检出率从 53% 降低到 27%。Bailey 等的试验证明, 大肠杆菌和沙门氏菌不能利用菊糖, 与本试验在 42 日龄测得结果相近, 本试验证实添加 0.3% 的菊糖可以降低肉鸡盲肠大肠杆菌和沙门氏菌 14.5% 和 36.42%。原因是益生菌在肠道上皮定植, 竞争性阻止大肠杆菌和沙门氏菌定植, 使得沙门氏菌和大肠杆菌作为过路菌被排出, 特别是对肉鸡这种肠道较短的家禽作用更加明显。与岳文斌等、王丹等研究

结果一致。证实菊糖, 菊糖和芽孢杆菌的混合使用可以减少肉鸡盲肠的大肠杆菌和沙门氏菌数量。

3.1.2 菊糖对肉鸡盲肠总需氧菌和乳酸杆菌的影响 Gebbink 等发现菊糖能显著提高结肠后段的乳酸杆菌并降低总需氧菌数量, 能够刺激乳酸杆菌增殖, 提高乳酸杆菌活力, 维持肠道菌群平衡。Howard 等发现菊糖能显著提高($p < 0.05$) 小鼠盲肠和结肠的双歧杆菌和乳酸杆菌数量, 并能他们在厌氧总菌中所占比例。本试验测得 42 日龄肉鸡日粮添加 0.3% 菊糖组总需氧菌下降了 14.5% ($p < 0.05$), 乳酸杆菌含量比对照组高 21.38% ($p < 0.05$), 与上述结果一致, 也与 Howard 等、张艳的报道一致, 但在 21 日龄时这个结果并不明显。原因可能是低聚糖可促进乳酸杆菌的生长, 但与糖的纯度、结构等有关, 高纯度 β 型糖苷键的菊糖最易被乳酸杆菌利用。

3.2 菊糖和枯草芽孢杆菌对肉鸡排泄物中氨气散发量的影响

试验结果表明, 肉鸡日粮添加菊糖和枯草芽孢杆菌可使肉鸡排泄物中氨气散发量大大降低, 这是因为菊糖在大肠中的发酵过程实质上是微生物分泌菊糖酶消化菊糖的过程, 菊糖发酵的终产物主要为 SOFA(乙酸、丙酸、丁酸)、气体($\text{CO}_2, \text{H}_2, \text{CH}_4, \text{H}_2\text{S}$) 和有机酸(乳酸、琥珀酸、丙酮酸等)(Nilsson 等^[3]; Levrat 等^[4]) 等短链脂肪酸, 尽管这些有机酸并不能分解含氮化合物, 但可降低肠道和粪尿 pH, 从而减少肠道和粪尿中 $\text{NH}_3, \text{H}_2\text{S}$ 、吲哚和胺类等恶臭气体的产量。另外, 菊糖和枯草芽孢杆菌的复合添加, 使发酵粪中 NH_3 进一步降低, 这也预示着菊糖和益生菌组成的合生元对降低鸡舍中有害气体含量可能起着更重要的作用。

添加数量 0.3% 菊糖和 0.1% 枯草芽孢杆菌及其共同使用可以减少肉鸡盲肠有害菌数量, 增加有益菌数量, 有利于提高肉鸡抗病能力, 并促进肉鸡生长; 0.3% 菊糖和 0.1% 芽孢杆菌的添加能有效减少肉鸡排泄物中氨气散发量, 有利于鸡舍环境的改善。

参考文献:

- [1] Buddington R K. Dietary supplement of neosugar alters and fecal flora and decreases activities of some reductive enzymes in human subjects[J]. Am J Clin Nutr, 1996, 63: 709–716.
- [2] Scott T A, Hall J W. Using acid in soluble ash marker ratios to predict digestibility of wheat and barley metabolizable energy and nitrogen retention in broiler chicks[J]. Poult Sci, 1998, 77: 674–679.
- [3] 金辰彦[日]. 甜叶菊发酵提取物的抗组胺作用[J]. 应用药理, 2002, 62(5/6): 105–109.

- [4] 蔡幼清. 低卡天然增甜剂甜叶菊甙对大鼠的肾毒性程度及与脲酶排泄的关系[J]. 国外医学中医中药分册, 1995, 17(5): 40-41.
- [5] 佟树敏, 蒋谷人, 刘东. 甜菊糖的结构修饰 α -葡萄糖基-甜菊糖苷的酶促合成研究[J]. 中草药, 1998, (29) 9: 582-584.
- [6] Kleessen Ii, Sykura Ii, Zunft Ii, *et al.* Effects of inulin and lactose on fecal microflora, microbial activity and bowel habit in elderly constipated persons[J]. American Journal of Clinical Nutrition, 1997, 65: 1397-1402.
- [7] Roberfrid M B, Van Loo J A, Gibson G R. A review of the bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products[J]. J Nutr, 1997, 128: 11-19.
- [8] Kruse H P, Kleessen B, Blaut M. Effects of inulin on faecal bifidobacteria in human subjects[J]. Br J Nutr, 1999, 82: 375-382.
- [9] 张名涛, 顾宪红, 杨琳, 等. 菊粉的原生素作用研究进展[J]. 动物营养学报, 2003, 12(4): 12-18.
- [10] Kleessen B. Effects of inulin and lactose on fecal microflora, microbial activity and bowel habit in elderly constipated persons[J]. Am J Clin Nutr, 1997, 65: 1397-1402.
- [11] Roberfrid M B, Van Loo J, Gibson G R. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products[J]. J. Nutr, 1998, 128: 11-19.
- [12] Nilsson BJOROCK I. Availability of cereal fructans and inulin in the rat intestinal tract[J]. J Nutr, 1988, 118: 1482-1486.
- [13] Levrat M A, Remesy C, Deminme C. Hinh propionic acids fermentations and mineral accumulation in the cecum of rats adapted to different levels of inulin[J]. J Nutr, 1991, 121: 1730-1737.