



北 京 科 技 大 学

本科生毕业设计(论文)选题报告

题目：牛源益生菌对奶牛产奶性状及其瘤胃菌群影响的探究

学院：化学与生物工程学院

专业：生物技术专业

姓名：黄凯辉

学号：41467024

指导教师签字：

2018 年 03 月 30 日

目 录

1 课题背景及研究意义.....	1
1.1 课题背景.....	1
1.2 研究意义.....	1
2 文献综述.....	3
2.1 益生菌研究现状.....	3
2.2 益生菌提高人类和动物健康水平的研究.....	4
2.3 益生菌在奶牛瘤胃的作用机制.....	4
3 研究内容，预期目标.....	6
3.1 研究内容.....	6
3.2 预期目标.....	6
4 研究进度安排.....	7
参考文献.....	9

1 课题背景及研究意义

1.1 课题背景

近年来,我国反刍动物养殖业,特别是奶牛养殖业发展迅速,人们对发挥反刍动物生产性能、保障动物健康养殖从而提高乳品等畜产品安全越来越关注。当今社会,由于抗生素饲料添加剂的广泛应用,导致动物胃肠道正常菌群失调、耐药性和药物残留,给动物和人类的健康带来了危害。随着人类对绿色奶制品重视程度的提高,寻求抗生素替代物,生产出高品质且健康的奶制品已成为畜牧业的头等大事。直接饲喂微生物的使用可提高奶牛对粗饲料的消化吸收,同时因其无毒副作用的特点正日益受到人们的青睐[1]。

1.2 研究意义

目前应用于反刍动物直接饲喂微生物中最常见的是真菌培养物和乳酸菌。其中真菌培养物包括米曲霉(*Aspergillus oryzae*)和啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),而乳酸菌包括乳杆菌(*Lactobacillus*)和链球菌(*Streptococcus lactis*)。其它菌类还有双歧杆菌(*Bifidobacterium*),芽孢杆菌属(*Bacillus*)和丙酸杆菌属(*Propionibacterium*)。乳酸菌已经被证实对奶牛胃肠道消化起到积极有利的作用,已有研究表明,产乳酸菌的存在可增强瘤胃微生物对乳酸的适应性,预防奶牛瘤胃酸中毒,同时,埃氏巨型球菌也被推荐作为预防围产期奶牛瘤胃酸中毒的直接饲喂微生物之一。饲喂丙酸杆菌可使乳酸发酵为丙酸。丙酸是奶牛泌乳早期糖异生的主要前体物质,丙酸在瘤胃中的浓度增加可增加肝糖量的生成,从而为乳糖合成提供更多的基质,增强能量效率和减少酮体生成。另外,增加的丙酸可以降低瘤胃中甲烷生成量。有报道称,用枯草芽孢杆菌作为奶牛直接饲喂微生物,发现奶牛产奶量呈增加趋势。而在奶牛日粮中添加纳豆芽孢杆菌,发现奶产奶量、牛乳脂率和乳蛋白率均显著提高。在奶牛饲养中应用的真菌益生菌添加剂主要为一些酵母产品。在日粮中添加酵母可以改善瘤胃内菌群的生长,稳定瘤胃的发酵。瘤胃中酵母菌在利用新摄取饲料表面氧气来维持自身代谢活动的同时除去瘤胃中的氧气,因此,瘤胃中补充酵母可以显著降低瘤胃内氧化还原电势,这种变化为严格厌氧的分解纤维素细菌的生长创造了更好的条件,刺激它们粘附于饲

料颗粒，并能提高养分的消化率。同时，研究表明饲喂酵母培养物可使显著提高奶牛日平均产奶量和脂肪校正乳产量。另外，啤酒酵母可以同其他淀粉利用菌竞争淀粉的发酵，预防乳酸在瘤胃中的蓄积。啤酒酵母具有提供生长因子的能力，例如有机酸或维生素等，从而增加瘤胃纤维素分解菌和乳酸生产菌的数量，降低瘤胃酸中毒的风险。

2 文献综述

2.1 益生菌研究现状

直接饲喂微生物亦称“益生菌”，益生菌(Probiotics)一词最早来源于拉丁文的 *pro* (for)和希腊文的 *bios* (life)，是除具有分解矿化有机污染物和完成元素生物地化循环外，更具有提高人类和动物健康水平功能的一类微生物。在 *Science* 发表的论文“益生菌—由微生物产生的生长促进因素”中，最先给出益生菌的定义是“一种微生物对其他微生物促进生长的作用” [2]。英国学者认为益生菌是“额外补充的活性微生物，能改善肠道菌群的平衡而对宿主的健康有益” [3]。目前应用于反刍动物直接饲喂微生物中最常见的是真菌培养物和乳酸菌。其中真菌培养物包括米曲霉(*Aspergillus oryzae*)和啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)，而乳酸菌包括乳杆菌(*Lactobacillus*)和链球菌(*Streptococcus lactis*)。其它菌类还有双歧杆菌(*Bifidobacterium*)，芽孢杆菌属(*Bacillus*)和丙酸杆菌属(*Propionibacterium*)。乳酸菌已经被证实对奶牛胃肠道消化起到积极有利的作用，已有研究表明，产乳酸菌的存在可增强瘤胃微生物对乳酸的适应性，预防奶牛瘤胃酸中毒，同时，埃氏巨型球菌也被推荐作为预防围产期奶牛瘤胃酸中毒的直接饲喂微生物之一[4-5]。饲喂丙酸杆菌可使乳酸发酵为丙酸。丙酸是奶牛泌乳早期糖异生的主要前体物质，丙酸在瘤胃中的浓度增加可增加肝糖量的生成，从而为乳糖合成提供更多的基质，增强能量效率和减少酮体和甲烷的生成量[6,7]。李杰梅等用枯草芽孢杆菌作为奶牛直接饲喂微生物，发现奶牛产奶量呈增加趋势[8]。栾广春等在奶牛日粮里添加纳豆芽孢杆菌，发现奶产奶量、牛乳脂率和乳蛋白率均显著提高[9]。在奶牛饲养中应用的真菌益生菌添加剂主要为一些酵母产品，饲喂酵母培养物可显著降低瘤胃内氧化还原电势,这种变化为严格厌氧的分解纤维素细菌的生长创造了更好的条件，刺激它们粘附于饲料颗粒，并能提高养分的消化率，增加日平均产奶量和脂肪校正乳产量[10-13]。另外，啤酒酵母可以同其他淀粉利用菌竞争淀粉的发酵，预防乳酸在瘤胃中的蓄积。啤酒酵母具有提供生长因子的能力，例如有机酸或维生素等，从而增加瘤胃纤维素分解菌和乳酸生产菌的数量，降低瘤胃酸中毒的风险[14,15]。

2.2 益生菌提高人类和动物健康水平的研究

目前, 益生菌提高人类和动物健康水平的作用机理尚未完善, 已有的研究结果主要包括如下几个方面: 1)微生物优势种群理论; 2)生物拮抗理论; 3)生物夺氧; 4)提高免疫力; 5)改善环境; 6)酶催化饲料吸收转化[16-21]。直接饲喂微生物进入奶牛机体内主要通过对瘤胃微生物区系的改变而发挥作用[22]。反刍动物瘤胃内栖息着复杂的非致病微生物菌群, 其相互作用维持着瘤胃的生态平衡和促进饲料中蛋白、碳水化合物以及粗纤维的消化[23]。瘤胃微生物消化是一个连续有机的过程, 通过微生物与粗纤维的附着、粘连、穿透等一系列作用, 并进而分泌各种酶类将草料的各组分加以水解, 同时, 瘤胃微生物还能把饲料中低质量的植物纤维蛋白合成高质量的、更符合机体自身生理需要的菌体蛋白。瘤胃细菌、真菌和原虫都参与植物细胞壁的降解, 细菌由于数量上的绝对优势及具有多种代谢途径在养分消化中占主导地位[24]。已有研究表明, 活菌制剂到达奶牛瘤胃后, 能迅速刺激瘤胃内特定微生物菌群的大量增殖, 被激活的瘤胃微生物能大大促进氨和乳酸的利用。对氨的利用可促进菌体蛋白的合成, 对乳酸的利用表现在可直接吸收利用乳酸和刺激其他微生物利用乳酸, 改善瘤胃 pH 值环境以刺激瘤胃微生物的生长和活性[25]。增殖的微生物在其生长过程中又产生多种维生素和活性酶类, 从而提高微生物对精料和纤维素的酶解和利用率, 增强动物的消化机能, 提高饲料转化率和消化吸收能力[26]。同时, 增殖的微生物的发酵过程会产生大量的挥发性脂肪酸, 其中乙酸占 50%以上, 通过奶牛生理代谢试验表明, 乙酸能提高奶牛的泌乳量和乳脂率[22,27]。调整宿主的免疫功能是益生菌的另一功能, 其在达到瘤胃后能迅速形成有益菌的优势菌群, 通过生物夺氧、附着位点和营养系等因素竞争性地抑制有害菌繁殖生长, 所产生的有机酸可降低肠胃内的 pH 杀灭不耐酸的有害细菌, 从而达到调节肠内菌群趋于正常的目的[28]。

。

2.3 益生菌在奶牛瘤胃的作用机制

国内外有关益生菌在奶牛瘤胃的作用机制研究已取得了初步成绩, 但是目前尚存在诸多问题有待解决。由于益生菌进入奶牛机体内主要通过对瘤胃微生物区系的改变而发挥作用, 不难推测, 奶牛的泌乳量的大小极可能与瘤胃菌群构成改变直接相关, 但是目前瘤胃微生物的种群构成、比例以及种群

之间的相互关系还不明确。由于瘤胃微生物纯培养困难和体系复杂，依靠传统的方法通过微生物的选择性培养，或者靠直接形态观察来获得部分信息进行鉴定和分类，只能定量检测可培养的细菌，不能鉴定未培养的细菌，故低估了正常菌群的数量和多样性，成为正确认识瘤胃菌群构成的严重障碍[29]。同时，人为培养方法易给微生物的鉴定、分类和特征研究带来偏差，不能反映瘤胃微生物多样性的丰度和范围[30]。宏基因组学（Metagenome）为微生物多样性、种群结构进化关系功能活性相互协作关系研究提供了有效的方法，可以用来鉴定微生物的种类、完善微生物的分类系统[31]。目前已较为成熟的技术有基因序列分析、遗传指纹技术、全细胞原位杂交和实时定量技术等，美国已经推出了基于新一代测序平台的“人类微生物组计划(Human Microbiome Project)”项目，欧盟也推出了相应的“人类肠道宏基因组学

3 研究内容，预期目标

3.1 研究内容

本项目采用纯培养技术对高低泌乳量奶牛瘤胃液微生物菌群进行数量及分布统计，发现其优势菌群存在差异。此外，通过分别对不同泌乳量奶牛瘤胃微生物进行分离，筛选出可能为芽孢杆菌类、乳酸菌类、酵母菌类和解纤维素类的牛源益生菌。从奶牛瘤胃内容物中提取基因组 DNA,运用高通量测序技术同时研究不同泌乳量奶牛瘤胃微生物区系的结构组成差异和添加益生菌后同一奶牛瘤胃微生物的种群构成改变。

3.2 预期目标

本项目通过探索添加不同益生菌对奶牛瘤胃液微生物群落结构变化的效应与机理，分析奶牛瘤胃液微生物群落结构变化对奶牛泌乳量的影响，希望从分子水平上揭示奶牛瘤胃微生物区系的结构组成和泌乳量的关系。

4 研究进度安排

3月29日~4月30日：高通量测序分析技术获取瘤胃液样品和粪便样品的细菌和真菌群落结构

4月30日~5月3日:中期检查

5月3日~6月1日：使用多种方法探究基因多样性。

6月1日~6月20日：总结实验，开始论文撰写，评审及答辩

学生本人签字：

年 月 日

参考文献

- [1]王小林. 直接饲喂微生物在奶牛生产中的研究进展[J]. 中国奶牛. 2011, (9): 43-45.
- [2]Lilly, Daniel M and Rosalie H Stillwell. Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms[J]. Science. 1965, 147(3659): 747-748.
- [3]Fuller, R. A Review[J]. Journal of applied bacteriology. 1989, 66: 365-378.
- [4]Oetzel, GR, et al. Direct-Fed Microbial Supplementation and Health and Performance of Pre-and Postpartum Dairy Cattle: A Field Trial[J]. Journal of dairy science. 2007, 90(4): 2058-2068.
- [5]Kung, L and AO Hession. Preventing in Vitro Lactate Accumulation in Ruminal Fermentations by Inoculation with *Megasphaera Elsdenii*[J]. Journal of animal science. 1995, 73(1): 250-256.
- [6]Hino, Tsuneo, et al. Substrate Preference in a Strain of *Megasphaera Elsdenii*, a Ruminal Bacterium, and Its Implications in Propionate Production and Growth Competition[J]. Applied and environmental microbiology. 1994, 60(6): 1827-1831.
- [7]Nagaraja, TG, et al. "Manipulation of Ruminal Fermentation." In The Rumen Microbial Ecosystem, 523-632: Springer, 1997.
- [8]李杰梅, et al. 枯草芽孢杆菌对奶牛生产及乳脂脂肪酸组成的影响[J]. 中国乳品工业. 2009, 36(12): 38-40.
- [9]栾广春, et al. N1 型纳豆芽孢杆菌对泌乳期奶牛产奶量及乳品质的影响[J]. 中国畜牧兽医. 2009, (10): 12-15.
- [10]Dann, HM, et al. Effects of Yeast Culture *Saccharomyces Cerevisiae* on Prepartum Intake and Postpartum Intake and Milk Production of Jersey Cows[J]. Journal of dairy science. 2000, 83(1): 123-127.
- [11]Marden, JP, et al. How Does Live Yeast Differ from Sodium Bicarbonate to Stabilize Ruminal Ph in High-Yielding Dairy Cows?[J]. Journal of dairy science. 2008, 91(9): 3528-3535.
- [12]Lascano, GJ and AJ Heinrichs. Rumen Fermentation Pattern of Dairy Heifers Fed Restricted Amounts of Low, Medium, and High Concentrate Diets without and with Yeast Culture[J]. Livestock science. 2009, 124(1): 48-57.
- [13]Moallem, U, et al. The Effects of Live Yeast Supplementation to Dairy Cows During the Hot Season on Production, Feed Efficiency, and Digestibility[J].

Journal of dairy science. 2009, 92(1): 343-351.

[14]Kung Jr, L, et al. Effects of a Live Yeast Culture and Enzymes on in Vitro Ruminant Fermentation and Milk Production of Dairy Cows[J]. Journal of dairy science. 1997, 80(9): 2045-2051.

[15]Erasmus, LJ, et al. Effect of Yeast Culture Supplement on Production, Rumen Fermentation, and Duodenal Nitrogen Flow in Dairy Cows[J]. Journal of Dairy Science. 1992, 75(11): 3056-3065.

[16]赵明军, 谌南辉. 动物微生态制剂研究进展[J]. 山东家禽. 2002, 6: 42-44.

[17]张帆, et al. 饲用嗜酸乳杆菌拮抗特性研究[J]. 中国饲料. 2005, (22): 9-11.

[18]Maruta, K, et al. Effects of Bacillus Subtilis C-3102 Intake on Fecal Flora of Sows and on Diarrhea and Mortality Rate of Their Piglets[J]. Animal Science and Technology. 1996, 67.

[19]Lessard, M, et al. Administration of Pediococcus Acidilactici or Saccharomyces Cerevisiae Boulardii Modulates Development of Porcine Mucosal Immunity and Reduces Intestinal Bacterial Translocation after Escherichia Coli Challenge[J]. Journal of animal science. 2009, 87(3): 922-934.

[20]王建辉, et al. 益生菌的不同作用机理探讨及其在动物生产中的应用[J]. 饲料工业. 2004, 25(3): 26-30.

[21]牛丽亚, et al. 纳豆芽孢杆菌和嗜酸乳杆菌混合发酵过程中营养物质变化的研究[J]. 粮食与饲料工业. 2009, (4): 36-37.

[22]王世荣, 岳寿松. 试论微生态制剂对反刍动物的作用机制[J]. 中国微生物学杂志. 2003, 15(1): 60-61.

[23]McBee, Richard H. Significance of Intestinal Microflora in Herbivory[J]. Annual review of ecology and systematics. 1971: 165-176.

[24]姚文, 朱伟云, 韩正康, et al. 应用变性梯度凝胶电泳和 16S rDNA 序列分析对山羊瘤胃细菌多样性的研究[J]. 中国农业科学. 2004, 37(9): 1374-1378.

[25]乔国华 and 单安山. 直接饲喂微生物对奶牛瘤胃发酵和肠道的影响[J]. 中国饲料. 2007, (3): 10-12.

[26] Harrison, GA, Hemken, RW, Dawson, KA, Harmon, RJ, Barker, KB. Influence of addition of yeast culture supplement to diets of lactating cows on ruminal fermentation and microbial populations[J]. J Dairy Sci. 1988, 71: 2967-2975.

[27] D.Lbath, 等著. 金国粹, 等译. 乳牛学[M]. 北京:农业出版社, 1988:

96-97.

[28]Gilliland, SE, et al. Comparisons of Two Strains of Lactobacillus Acidophilus as Dietary Adjuncts for Young Calves[J]. Journal of Dairy Science. 1980, 63(6): 964-972.

[29]Aman, RI, Ludwig, W, Schleifer, KH. Phylogenetic indentification and insitu detection of individual microbial cells without cultivation[J]. Appl Environ Microbiol. 1995, 59:143-169.

[30]Bakken, LR, Olsen, RA. The relationship between cell size and viability of soil bacteria[J]. Microbiol Ecol. 1987, 13: 103-114.

[31]Handelsman, J, Rondon, MR, Brady, SF, et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: A new frontier for natural products[J]. Chem Biol. 1998, 5(10): 245-249.

[32]Lupp, et al. Gut Microbes and Health[J]. Nature. 2012, 489: 219.

指导教师意见 样式: b 标题 不入目录

指导教师签字:

年 月 日

