



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102409015 A
(43) 申请公布日 2012. 04. 11

(21) 申请号 201110400531. 6
(22) 申请日 2011. 12. 06
(83) 生物保藏信息
CGMCC No. 4756 2011. 04. 08
CGMCC No. 5092 2011. 07. 26
CGMCC No. 5093 2011. 07. 26
CGMCC No. 5094 2011. 07. 26
CGMCC No. 4628 2011. 03. 02
(71) 申请人 北京大北农业科技集团股份有限公司
地址 100080 北京市海淀区中关村大街 27
号中关村大厦 14 层大北农集团
申请人 北京科高大北农饲料有限责任公司
湖南大北农农业科技有限公司
(72) 发明人 杜建涛 付维来 刘鹏 彭子欣
王安如
(51) Int. Cl.
C12N 1/20 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 13 页

(54) 发明名称
一种复合微生态制剂及其在饲料添加剂中的应用和预混料

(57) 摘要
本发明属于饲用微生态技术领域, 涉及一种复合微生态制剂及其在饲料添加剂中的应用和预混料。该制剂含有嗜酸乳杆菌菌粉及地衣芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、粪肠球菌、枯草芽孢杆菌四种菌中的任二种、三种或四种的菌粉, 制剂中的活菌含量高、水分含量低, 具有耐胃酸、耐胆盐、耐高温及耐受常用抗生素等抗逆性能和产酸、产酶及抑制病原菌等益生功能。本发明的复合微生态制剂能够提高饲料利用率, 增加肉蛋奶等产量, 促进动物生长, 提高动物机体免疫力和抗病能力, 部分替代抗生素, 从而改变动物产品的品质。

1. 一种复合微生态制剂,其特征在於该制剂含有嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*)CGMCC No.5093 菌粉及地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)CGMCC No.5094、短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*)CGMCC No.4756、粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*)CGMCC No.5092、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)CGMCC No.4628 四种菌中的任二种、三种或四种的菌粉。

2. 如权 1 所述的复合微生态制剂,其特征在於制剂中含有嗜酸乳杆菌 CGMCC No. 5093 菌粉、地衣芽孢杆菌 CGMCC No. 5094 菌粉、短小芽孢杆菌 CGMCC No. 4756 菌粉和粪肠球菌 CGMCC No. 5092 菌粉,上述四种菌粉的重量配比为 0.8-2.5 : 1 : 0.8-1.2 : 1.5-2.5。

3. 如权 1 所述的复合微生态制剂,其特征在於制剂中含有嗜酸乳杆菌 CGMCC No. 5093 菌粉、地衣芽孢杆菌 CGMCC No. 5094 菌粉和枯草芽孢杆菌 CGMCC No. 4628 菌粉,上述三种菌粉的重量配比为 0.8-3.5 : 1-3.5 : 0.8-2.5。

4. 如权 1 所述的复合微生态制剂,其特征在於制剂中含有嗜酸乳杆菌 CGMCC No. 5093 菌粉、地衣芽孢杆菌 CGMCC No. 5094 菌粉和粪肠球菌 CGMCC No. 5092 菌粉,上述三种菌粉的重量配比为 1.5-2.5 : 0.8-1.2 : 1。

5. 如权 1 所述的复合微生态制剂,其特征在於制剂中含有嗜酸乳杆菌 CGMCC No. 5093 菌粉、短小芽孢杆菌 CGMCC No. 4756 菌粉和粪肠球菌 CGMCC No. 5092 菌粉,上述三种菌粉的重量配比为 2-2.5 : 2-2.5 : 1-1.5。

6. 如权 1 所述的复合微生态制剂,其特征在於所述的嗜酸乳杆菌 CGMCC No. 5093 菌粉的制备方法如下:按 1-2% 的接种量向发酵培养基中接入 8h-12h 菌龄的嗜酸乳杆菌种子液,发酵条件为:30-40℃,转速为 60-100rpm,培养 12-16h,得发酵液,发酵液离心,得到菌泥,加入与菌泥的重量体积百分比为 15-20% 的冻干保护剂,混匀,于 -25℃ --45℃ 冷冻干燥,即得,所述的发酵培养基的成分及其质量体积比如下:葡萄糖 1-2%,大豆蛋白胨 1-2%,酵母膏 1-2%,硫酸铵 0.5-1.0%,磷酸氢二钾 0.2-0.5%、氯化钠 0.2-0.8%,硫酸镁 0.01-0.05%;所述的地衣芽孢杆菌 CGMCC No. 5094 菌粉的制备方法如下:按质量体积比 0.5-2% 的接种量向发酵培养基中接入 10-14h 菌龄的地衣芽孢杆菌种子液,发酵条件为:30-40℃,转速为 200-300rpm,培养 15-22h,得发酵液,发酵液中加入质量体积比为 20% -25% 的填充物麦芽糊精,混匀,进行喷雾干燥,进风温度 140-160℃,排风温度 40-50℃,雾化器转速 15000-18000rpm,即得,所述发酵培养基的成分及其质量体积比如下:麸皮 1-2%,玉米粉 0.5-1.5%,豆粕 1-2%,硫酸铵 0.5-2%,硫酸镁 0.01-0.05%,柠檬酸铵 0.3-1.2%、消泡剂 0.05-0.1%,pH 为 6.2-7.4;所述的短小芽孢杆菌 CGMCC No. 4756 菌粉的制备方法如下:按质量体积比 1-2% 的接种量向发酵培养基中接入 12h-16h 菌龄的短小芽孢杆菌种子液,发酵条件为:30-40℃,转速为 100-300rpm,培养 16-24h,得发酵液,发酵液中加入质量体积比为 20-25% 的填充物玉米淀粉,混匀,进行喷雾干燥,进风温度 150-170℃,排风温度 40-70℃,雾化器转速 15000-20000rpm,即得,所述发酵培养基的成分及其质量体积比如下:葡萄糖 1-2%,大豆蛋白胨 1-2%,豆粕 1-2%,硫酸铵 0.5-1.0%,氯化钠 0.2-0.8%,硫酸镁 0.01-0.05%。

7. 如权 1-6 任一项所述的复合微生态制剂,其特征在於进一步包含载体,载体为麦芽糊精、硫酸钾铝、玉米芯粉、葡萄糖、油糠粉中的任一种或者两种。

8. 权 1-7 任一项所述的复合微生态制剂在制备禽畜饲料添加剂中的应用。

9. 一种包含权 1-7 任一项所述的复合微生态制剂的预混料,其特征在于预混料中复合微生态制剂添加的质量体积比为 0.5-10%。

一种复合微生态制剂及其在饲料添加剂中的应用和预混料

技术领域

[0001] 本发明属于饲用微生态技术领域,涉及一种复合微生态制剂及其在饲料添加剂中的应用和预混料。

背景技术

[0002] 目前,对动物疾病的预防和治疗药物基本仍采用抗生素,但由于长期、大量使用抗生素,致病菌耐药性增强、菌群失调、免疫力下降、疾病复发率高、药物残留等种种弊端日益严重,同时也严重危害动物机体及人类健康。在此形势下,改变养殖观念、预防重于治疗,并开发应用无毒、无药残的新型绿色饲料添加剂是必然趋势。

[0003] 微生态制剂是目前常用和研究较多的一种绿色、安全的饲料添加剂,此类制剂是用动物有益菌经工业化高密度发酵生产得到的,包含有很多的有益微生物及其代谢产物构成的活菌制剂,可以直接饲喂动物。微生态制剂通过维持肠道内微生态平衡而发挥作用,具有防病、增强机体免疫力、促进生长、增加体重等多种功能,且无污染,无残留,不产生抗药性,是一种绿色、安全的饲料添加剂。

[0004] 市场上的微生态产品种类繁多,质量参差不齐,主要存在以下几个问题:(1) 活菌含量低,而研究表明,如果一种菌在盲肠内容物中的浓度少于 10^7 cfu/g,则该菌产生的酶及其代谢产物不足以影响宿主,难以满足治疗需要;(2) 水分含量偏高,这样使得微生态制剂的保质期大大缩短,也是影响微生态制剂质量不好的重要原因之一;(3) 不耐抗生素;(4) 对胃酸和胆盐不稳定,致使只有少数菌株进入肠道后仍具有活性,达不到发挥作用所需的活菌数量。由于微生态制剂存在的这些质量问题,从而影响了其在动物饲喂中的应用效果,限制了微生态制剂的广泛应用。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种包含多种全新益生菌的复合微生态制剂,此制剂包含具有耐胃酸、耐胆盐、耐高温及耐受常用抗生素等抗逆性能和产酸、产酶及抑制病原菌等益生功能的多种益生菌,制剂中各益生菌活菌含量高、水分含量低。

[0006] 本发明的另一目的在于提供该复合微生态制剂在制备禽畜饲料添加剂中的应用。

[0007] 本发明还提供了包含该复合微生态制剂的预混料。

[0008] 本发明的目的是通过以下技术方案实现的:

[0009] 本发明提供一种复合微生态制剂,该制剂含有嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) CGMCC No. 5093 菌粉及地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) CGMCC No. 5094、短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) CGMCC No. 4756、粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) CGMCC No. 5092、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) CGMCC No. 4628 四种菌中的任二种、三种或四种的菌粉。

[0010] 其中,本发明的复合微生态制剂中含有嗜酸乳杆菌 CGMCC No. 5093 菌粉、地衣芽孢杆菌 CGMCC No. 5094 菌粉、短小芽孢杆菌 CGMCC No. 4756 菌粉和粪肠球菌 CGMCC No. 5092

菌粉,上述四种菌粉的重量配比为 0.8-2.5 : 1 : 0.8-1.2 : 1.5-2.5,即可制成仔猪专用型复合微生态制剂,总有益菌含量为 $6-10 \times 10^9$ cfu/g。

[0011] 其中,本发明的复合微生态制剂中含有嗜酸乳杆菌 CGMCC No. 5093 菌粉、地衣芽孢杆菌 CGMCC No. 5094 菌粉和枯草芽孢杆菌 CGMCC No. 4628 菌粉,上述三种菌粉的重量配比为 0.8-3.5 : 1-3.5 : 0.8-2.5,即可制成饲料厂母猪产品专用复合型微生态制剂,益生菌数量在 $3-6 \times 10^{10}$ cfu/g。

[0012] 其中,本发明的复合微生态制剂中含有嗜酸乳杆菌 CGMCC No. 5093 菌粉、地衣芽孢杆菌 CGMCC No. 5094 菌粉和粪肠球菌 CGMCC No. 5092 菌粉,上述三种菌粉的重量配比为 1.5-2.5 : 0.8-1.2 : 1,即可制成蛋鸡专用复合型微生态制剂,益生菌数量在 $2-5 \times 10^9$ cfu/g。

[0013] 其中,本发明的复合微生态制剂中含有嗜酸乳杆菌 CGMCC No. 5093 菌粉、短小芽孢杆菌 CGMCC No. 4756 菌粉和粪肠球菌 CGMCC No. 5092 菌粉,上述三种菌粉的重量配比为 2-2.5 : 2-2.5 : 1-1.5。

[0014] 为更好的达到本发明的发明效果,本发明复合微生态制剂中所述的嗜酸乳杆菌 CGMCC No. 5093 菌粉的制备方法如下:按 1-2% 的接种量向发酵培养基中接入 8h-12h 菌龄的嗜酸乳杆菌种子液,发酵条件为:30-40℃,转速为 60-100rpm,培养 12-16h,得发酵液,发酵液离心,得到菌泥,加入与菌泥的重量体积百分比为 15-20% 的冻干保护剂,混匀,于 -25℃ --45℃ 冷冻干燥,即得,所述的发酵培养基的成分及其质量体积比如下:葡萄糖 1-2%,大豆蛋白胨 1-2%,酵母膏 1-2%,硫酸铵 0.5-1.0%,磷酸氢二钾 0.2-0.5%、氯化钠 0.2-0.8%,硫酸镁 0.01-0.05%;所述的地衣芽孢杆菌 CGMCC No. 5094 菌粉的制备方法如下:按质量体积比 0.5-2% 的接种量向发酵培养基中接入 10-14h 菌龄的地衣芽孢杆菌种子液,发酵条件为:30-40℃,转速为 200-300rpm,培养 15-22h,得发酵液,发酵液中加入质量体积比为 20% -25% 的填充物麦芽糊精,混匀,进行喷雾干燥,进风温度 140-160℃,排风温度 40-50℃,雾化器转速 15000-18000rpm,即得,所述发酵培养基的成分及其质量体积比如下:麸皮 1-2%,玉米粉 0.5-1.5%,豆粕 1-2%,硫酸铵 0.5-2%,硫酸镁 0.01-0.05%,柠檬酸铵 0.3-1.2%、消泡剂 0.05-0.1%,pH 为 6.2-7.4;所述的短小芽孢杆菌 CGMCC No. 4756 菌粉的制备方法如下:按质量体积比 1-2% 的接种量向发酵培养基中接入 12h-16h 菌龄的短小芽孢杆菌种子液,发酵条件为:30-40℃,转速为 100-300rpm,培养 16-24h,得发酵液,发酵液中加入质量体积比为 20-25% 的填充物玉米淀粉,混匀,进行喷雾干燥,进风温度 150-170℃,排风温度 40-70℃,雾化器转速 15000-20000rpm,即得,所述发酵培养基的成分及其质量体积比如下:葡萄糖 1-2%,大豆蛋白胨 1-2%,豆粕 1-2%,硫酸铵 0.5-1.0%,氯化钠 0.2-0.8%,硫酸镁 0.01-0.05%。

[0015] 进一步,本发明的微生态制剂还包含载体,载体为麦芽糊精、硫酸钾铝、玉米芯粉、葡萄糖、油糠粉中的任一种或者两种。

[0016] 本发明的复合微生态制剂可用于制备禽畜饲料添加剂。

[0017] 本发明还提供了包含该复合微生态制剂的预混料,其中,预混料中复合微生态制剂添加的质量体积比为 0.5-10%。

[0018] 本发明的地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 为申请人从牛肠道中分离、经定向初筛和复筛得到。其营养细胞杆状,其芽孢为椭圆或长筒形,为中生或次端生,孢囊稍

膨大。孤立或呈短链,杆端半圆形。在 12 ~ 16h 内能形成菌落,菌落为圆形,或不规则,边缘毛发状,菌落白色,不透明,无褶皱。革兰氏阳性。申请人对此株地衣芽孢杆菌进行了耐酸性、耐胆盐、耐高温性、发酵特性和抑菌活性等实验,此株地衣芽孢杆菌具有对逆环境耐受性强、粘附性强、生长快、生物量大、抑菌活性好等特点。本发明的地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 申请人已于 2011 年 7 月 26 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,简称 CGMCC,地址:北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所,保藏编号为 CGMCC No. 5094。本发明的粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) 为申请人从猪大肠中分离得到,其生物学特征如下:菌落圆整,表面光滑,不透明,乳白色,边缘光滑,革兰氏阳性菌;单个菌体为球状或椭圆状。本发明的粪肠球菌经过人工胃液、胆汁液及耐热性的筛选;又经过产酶能力筛选和抑菌能力筛选,可以耐受 pH2.0,1% 胃蛋白酶的人工胃液,可以耐受 0.3% 的人工胆汁液,可以耐受 85℃ 的制粒温度,也可以抑制致病性大肠杆菌 K88, K99 和金黄色葡萄球菌,具有较强的产酸和抑制豆粕、棉粕、玉米秸秆中霉菌的能力。本发明的粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) 申请人已于 2011 年 7 月 26 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,简称 CGMCC,地址同上,保藏编号为 CGMCC No. 5092。本发明的嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) 为申请人从猪粪便中分离得到,其生物学特征如下:菌落圆整,表面光滑,不透明,乳白色,边缘光滑,革兰氏阳性菌;单个菌体为杆状。本发明的嗜酸乳杆菌经过人工胃液、胆汁液及抗逆性的筛选;可以耐受 pH2.0,1% 胃蛋白酶的人工胃液,可以耐受 0.3% 的人工胆汁液,也可以抑制致病性大肠杆菌 K88,痢疾杆菌和金黄色葡萄球菌,具有较强的产酸和抑菌能力。本发明的嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) 申请人已于 2011 年 7 月 26 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,简称 CGMCC,地址同上,保藏编号为 CGMCC No. 5093。本发明的短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) 为申请人首次在国内分离到的一株来源于动物消化道的新的短小芽孢杆菌,为申请人从牛的瘤胃中分离得到的一株芽孢杆菌优势菌株,经过生理生化及 16s RNA 分析鉴定,表明该菌属于短小芽孢杆菌,其分类命名为短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*),已于 2011 年 4 月 8 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,地址同上,简称 CGMCC,保藏编号为 CGMCC No. 4756。本发明所用的枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 为申请人从传统发酵豆豉中分离得到,其生物学特征如下:菌落表面粗糙,不透明,污白色,菌落圆形,边缘呈锯齿状,革兰氏阳性菌;芽孢形态为椭圆到柱状,位于菌体中央或稍偏,芽孢形成后菌体不膨大。本发明的枯草芽孢杆菌显著区别于现有的枯草芽孢杆菌,可以耐受 pH2.0,1% 胃蛋白酶的人工胃液,可以耐受 0.3% 的人工胆盐,可以耐受 80℃ 的制粒温度,可以抑制致病性大肠杆菌 K88, K99 和金黄色葡萄球菌,具有较强的产纤维素酶的能力,可以降解纤维素。本发明的枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 已于 2011 年 3 月 2 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,简称 CGMCC,地址同上,保藏编号为 CGMCC No. 4628。

[0019] 本发明中所选育的地衣芽孢杆菌、粪肠球菌、枯草芽孢杆菌、嗜酸乳杆菌和短小芽孢杆菌在制备中采用液体深层高密度发酵技术和喷干或冷冻干燥等一系列的后处理加工工艺技术制成菌粉,制剂中的活菌含量高、水分含量低,具有耐胃酸、耐胆盐、耐高温及耐受常用抗生素等抗逆性能和产酸、产酶及抑制病原菌等益生功能。本发明的复合微生态制剂能够提高饲料利用率,增加肉蛋奶等产量,促进动物生长,提高动物机体免疫力和抗病能

力,部分替代抗生素,从而改变动物产品的品质。

[0020] 通过下列实施例将更具体的说明本发明,但是应理解所述实施例仅是为了说明本发明,而不是以任何形式限制本发明的范围。

具体实施方式

[0021] 实施例 1、优良菌种的分离、筛选、选育及鉴定

[0022] 1) 增菌培养:将健康动物(猪或家禽)的新鲜粪便、肠道内容物样品接种于 BPY 液体培养集中,在 37℃ 恒温培养增殖 48h;

[0023] 2) 地衣芽孢杆菌和短小芽孢杆菌的分离纯化:对步骤 1) 增菌培养物 100℃ 水浴 5min,然后在 BPY 培养基平板上进行划线培养,从中挑取各个具有特征形态的菌落再划线培养和分离,直至为纯菌落为止,革兰氏染色镜检,将分离的疑似纯菌落接种试管斜面中增殖,然后保存于 4℃ 冰箱中,待用;

[0024] 菌落形态:菌落表面粗糙,无光泽,乳白色不透明,边缘不整齐,直径 2-3mm,随着培养时间的延长,变为红褐色;镜检:细胞为杆菌 $1.6-3.8\mu\text{m}\times 0.6-1.2\mu\text{m}$,革兰氏阳性,芽孢中生,椭圆形,不膨大,初步确定为芽孢杆菌;

[0025] 通过对这几株疑似芽孢杆菌的菌进行 16SrRNA 鉴定,确定地衣芽孢杆菌和短小芽孢杆菌两种。

[0026] 3) 嗜酸乳杆菌的分离纯化:对步骤 1) 增菌培养基在 MRS 培养基平板上进行划线培养,将分离的疑似纯菌落接种斜面中增殖,然后保存于 4℃ 冰箱中,待用;

[0027] 菌落形态:菌落圆整,表面光滑,有光泽,乳白色不透明,直径 0.5-1.2mm,随着时间延长,颜色变暗发黄,细菌革兰氏阳性,单个菌体细长杆状。经鉴定,为嗜酸乳杆菌。

[0028] 4) 粪肠球菌 CGMCC No. 5092 的筛选:

[0029] A、初筛

[0030] 取样品猪粪、牛粪和鸡粪等样品各 5g,浸泡于 20ml 无菌 0.85% 生理盐水中,震荡打散样品,使样品充分与生理盐水接触,70℃ 恒温水浴锅静置 3 分钟,取上清,5000rpm 离心 10 分钟,弃去上清。将离心后的菌体沉淀加入 10ml 人工胃液中,37℃ 静置 2h,然后离心,收集菌体后,将菌体沉淀加入 10ml 人工胆盐中,37℃ 静置 4h,收集菌体,稀释涂布于 LB 培养基。37℃ 培养箱培养 12-24h 后,对菌落进行纯化分离。对得到的菌进行保存,并进一步复筛。

[0031] 生理盐水的配制方法是:0.85% 氯化钠溶液,高压灭菌后备用。

[0032] 人工胃液的配制方法是:1% 胃蛋白酶,0.85% 氯化钠,用浓盐酸调 pH 值到 2.0,经细菌过滤器过滤除菌后备用。

[0033] 人工胆盐的配制方法是:在液体肉汤中添加 0.3% 的猪胆盐(分析纯),高压灭菌后备用。

[0034] LB 固体培养基的制作方法是:蛋白胨 10g,酵母膏 5g,氯化钠 10g,琼脂 1.5%, pH7.0,高压灭菌后备用。

[0035] B、复筛

[0036] (1) 将配置好、灭完菌的 LB 培养基温度冷却至 45℃,加入过夜培养的大肠杆菌 K88、K99 和金黄色葡萄球菌(每毫升培养基加入 1 微升菌液),震荡混匀,倒入无菌平板,水

平凝固后,每个平板利用四个牛津杯进行打孔,每只牛津杯中加入 200 μ l 待测菌液,盖好皿盖,小心移至 37℃培养箱,平皿正放静置培养。培养 20h 后,打开皿盖,移去牛津杯,用卡尺测量抑菌圈直径。

[0037] 5) 枯草芽孢杆菌 CGMCC No. 4628 的筛选

[0038] A、初筛

[0039] 纳豆、豆豉、腐乳、猪粪、鸡粪、牛粪等样品各 5 克,浸泡于 20ml 灭菌 0.85%生理盐水,震荡打散样品,使样品充分和生理盐水接触,90℃恒温水浴锅静置 10 分钟,取上清 5ml,5000rpm 离心 10 分钟,弃去上清。菌体沉淀加入 10ml 人工胃液中,37℃静置 2 小时。5000rpm 离心 10 分钟,弃去上清,将菌体沉淀加入 10ml 人工胆盐中,37℃静置 4 小时。震荡混匀后,梯度稀释涂 LB 培养基。30℃培养箱培养 12-24 个小时后,纯化菌落。得到纳豆样品中分离出的 N-1、N-2 菌,豆豉样品中分离出的 C-1 (CGMCC No. 4628)、C-2 菌,腐乳样品中没有分离到菌落,猪粪中分离出 Z-1、Z-2 菌,鸡粪中分离出 J-1、J-2 菌,牛粪中分离出 F-1、F-2 菌。初筛得到的菌株再进行进一步复筛。

[0040] 生理盐水的配置方法是 :0.85%的氯化钠,高压灭菌后备用。

[0041] 人工胃液的配制方法是 :1%胃蛋白酶,0.85%的氯化钠,用浓盐酸调 pH 值到 2.0,细菌过滤器过滤备用。

[0042] 人工胆盐的配置方法是 :在液体肉汤中添加 0.3%的猪胆盐 (分析纯),高压灭菌后备用。

[0043] LB 固体培养基的制作方法是 :蛋白胨 10g,酵母膏 5g,氯化钠 10g,琼脂 1.5%,pH7.0,高压灭菌后备用。

[0044] B、复筛

[0045] (1) 产纤维素酶能力的筛选

[0046] 用无菌牙签将分离纯化出的菌株在 0.5%羧甲基纤维素的 LB-CMC 培养基上进行点菌,30℃培养 24h,用 0.1%刚果红染色 1 小时,弃去染料,再用 1M NaCl 溶液洗涤 1 小时,根据菌落周围有无出现水解透明圈,测定透明圈与菌落直径,计算透明圈直径与菌落直径比值 (H/C),发现 N-1、C-1 (CGMCC No. 4628)、C-2 的水解透明圈较大,其中 C-1 的水解透明圈最大 (表 1)。

[0047] LB-CMC 培养基的配置方法是 :羧甲基纤维素 0.5%,胰化蛋白胨 10g,酵母提取物 5g,氯化钠 10g,高压灭菌 20min。

[0048] 表 1 水解透明圈与菌落直径比值 (M/C)

[0049]

分离源	纳豆		豆豉		腐乳	猪粪		鸡粪		牛粪	
菌株	N-1	N-2	C-1	C-2	无	Z-1	Z-2	J-1	J-2	F-1	F-2
H/C	2.5	2.2	3.2	2.9		1.3	2.1	1.4	1.2	1.9	2.2

[0050]

[0051] 实施例 2、优良菌种的抗逆性和生物学性能的测定

[0052] 1、地衣芽孢杆菌、短小芽孢杆菌和嗜酸乳杆菌的生物学性能和抗逆性测定 :

[0053] 1) 地衣芽孢杆菌的培养物的制备 :将冰箱保藏的斜面菌种接种到 BPY 种子培养基

中活化,37℃、200rpm 培养 18h,得到芽孢率在 95%以上的培养物。

[0054] 2) 短小芽孢杆菌的培养物的制备 :将冰箱中保藏的斜面菌种接种到 BPY 种子培养基中活化,35℃、100rpm 培养 16h,即得 ;

[0055] 3) 嗜酸乳杆菌培养物的制备 :将冰箱中保藏的斜面菌种接种到 MRS 种子培养基中活化,37℃、静置培养 16h,即得 ;

[0056] 4) 耐酸性测定 :将上述制备的培养物按 5%接种量分别接种于 pH 值 2.0、3.0、4.0 的人工模拟胃液中,0h 计数作对照,2h、6h 取样用磷酸缓冲液按 10 倍系列稀释,进行平板活菌技术,计算存活率。

[0057] 本发明选育的 3 株菌种 :地衣芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、嗜酸乳杆菌在胃酸中存活率结果见表 1.

[0058] 人工模拟胃液的制备 :量取 9.5% -10.5%浓盐酸 16.4mL,加蒸馏水至 1000 毫升,做基础人工胃液,用盐酸或氢氧化钠调 pH 值 2.0、3.0、4.0,各取 10ml (9ml),分装于试管中,100℃下蒸汽灭菌 15 分钟,在无菌条件下,每 10ml 液体中加入 0.100g 胃蛋白酶,其试验结果如表 2 所示。

[0059] 表 2 三株菌种在人工模拟胃液中的存活率

[0060]

	存活率 (%)					
胃酸 pH 值	pH2.0		pH3.0		pH4.0	
处理时间	2h	6h	2h	6h	2h	6h
地衣芽孢杆菌	49.5	49.1	56.1	51.3	51.6	72.9
短小芽孢杆菌	32.0	12.0	67.9	22.5	72.3	35.1
嗜酸乳杆菌	49.2	35.3	65.1	42.8	89.6	85.3

[0061] 5) 耐胆盐测定 :将上述制备的 3 株菌种的培养物,按 5%接种量分别接种于 0.03%、0.1%、0.2%、0.3%不同浓度的猪胆盐溶液中,0h 计数作对照,2h、6h 取样用生理盐水按 10 倍系列稀释计数,进行平板活菌计数,计算存活率。

[0062] 本发明所选育的 3 株菌种在胆盐中存活率结果见表 3。

[0063] 胆盐的制备 :0.85 生理盐水中各 9 毫升,分装于试管中,121℃下蒸汽灭菌 30 分钟,在无菌条件下,制成 0.03%、0.1%、0.2%、0.3 不同浓度的猪胆盐溶液,3 种菌种在不同浓度猪胆盐中处理 6h 后的存活率结果见表 3。

[0064] 表 3 3 株菌种在不同浓度猪胆盐中处理 6h 的存活率

[0065]		存活率 (%)			
	不同菌液浓度	0.03%	0.1%	0.2%	0.3%
	地衣芽孢杆菌	100	100	98	95
	短小芽孢杆菌	100	99.1	93.6	88.5
	嗜酸乳杆菌	62.9	48.6	21.6	11.9

[0066] 6) 耐高温测定 :将上述制备的 3 株菌种的培养物,分别于 50℃、60℃、70℃、80℃ 水浴处理 15min、30min,计算存活率,结果如表 4 所示。

[0067] 表 4 三种菌种在不同高温下处理不同时间的存活率 (%)

[0068]

处理温度	50℃		60℃		70℃		80℃	
处 理 时 间 (min)	15	30	15	30	15	30	15	30
地衣芽孢杆菌	100	100	100	100	100	100	100	100
短小芽孢杆菌	100	100	100	100	100	100	100	100
嗜酸乳杆菌	52.3	10.7	8.4	0	3.9	0	0	0

[0069] 7) 抑菌试验 :采用牛津杯法对常见致病菌进行抑菌测定。

[0070] a、在装有 10ml 营养肉汁培养基的试管中活化 4 株致病菌 :K88、K99、金黄色葡萄球菌、鸡白痢沙门氏菌,37℃ 恒温培养 20h ;

[0071] b、双层平板的制备 :取直径 90mm 的平板,注入灭菌的营养琼脂 15-20ml,水平放置使之凝固,作为底层,另取营养琼脂 (冷至 50℃ 左右) 与 37℃、24h 培养的指示菌液适量 (50ml 培养基加 8ml 左右) 混匀,吸取 10ml 浇在底层培养基上,水平放置使之凝固,作为菌层 ;

[0072] c、加样品 :用无菌镊子夹取已灭菌的牛津杯,打开皿盖,放在培养基上。在牛津杯中加满相同量的发酵液上清液 (约 200uL),每个样品 2 个重复。将加完样的双碟小心放入 37℃ 恒温箱内,培养 16-18h 后,取出测量抑菌圈大小,结果如表 5 所示。

[0073] 表 5 3 株菌种对常见致病菌的抑菌效果

[0074]

	抑菌圈直径 (mm)			
菌株	大肠杆菌 E88	大肠杆菌 E99	金黄色葡萄球菌	鸡白痢沙门氏菌
地衣芽孢杆菌	11.15	12.14	18.35	12.56
短小芽孢杆菌	8.74	7.88	9.56	7.32
嗜酸乳杆菌	15.05	18.9	17.2	11.32

[0075]

[0076] 2、粪肠球菌抗逆性的验证

[0077] (1) 耐高温性

[0078] 将培养 12h 的粪肠球菌进行离心收集,置入生理盐水中进行重悬后,取样涂布,计活菌数;再将生理盐水在 70℃ 的水浴锅里加热十分钟后,迅速冷却,再进行平板计数,残存活菌数为 85.3%。

[0079] (2) 人工胃液的耐受性

[0080] 取 0.5ml 培养 12h 粪肠球菌的菌液,溶于 4.5ml 生理盐水中,用平板计数法计活菌数。再取定量上述菌液加入 4.5ml 人工胆盐培养基中,37℃ 静置 2h,平板计数法计残存活菌数,残存活菌数为 92.2%。

[0081] (3) 人工胆汁液的耐受性

[0082] 取 0.5ml 培养 12h 粪肠球菌的菌液,溶于 4.5ml 生理盐水中,用平板计数法计活菌数。而后另取 0.5ml 上述菌液加入 4.5ml 人工胆汁液培养基中,37℃ 静置 2h,平板菌落计数法计残存活菌数,残存活菌数为 86.2%。

[0083] 结果:以上几个实验表明,本发明中从猪大肠中分离到的粪肠球菌的抗逆性较强,可以耐受较高的温度,耐受人工胃液,人工胆盐,因此作为饲料添加剂使用,能够保证大量的菌体顺利通过动物的肠道,在肠道中存活,发挥其益生功能。

[0084] 3、粪肠球菌 (CMGCC No. 5092) 的益生功能

[0085] (1) 抑菌功能验证

[0086] 过夜培养的致病性大肠杆菌 K88, K99 和金黄色葡萄球菌菌液用平板计数法计数。分别在 3 管 5ml 的大肠杆菌 K88、K99 和金黄色葡萄球菌中加入 5ml 粪肠球菌菌液。37℃ 培养 4h,平板菌落计数法计算残存的大肠杆菌 K88、K99 和金黄色葡萄球菌的活菌数。残存致病性大肠杆菌 K88、K99 和金黄色葡萄球菌的活菌数为 24.7%、30.2% 和 31.8%。

[0087] (2) 在豆粕或者玉米粉中抑制霉菌的验证

[0088] 取培养 12h 的粪肠球菌的菌液 20ml,与 30g 玉米粉或者豆粕进行均匀混合,空白实验为 20ml 无菌水与 30g 玉米粉或者豆粕进行均质混合,然后分别在 3d、5d、8d 和 10d 对两瓶里面的玉米或豆粕及霉菌的生长情况进行观察。通过实验表明,在 5 天后,没有加入粪肠球菌菌液的玉米粉和豆粕中均有霉菌丝长出,而加入粪肠球菌菌液的玉米粉和豆粕的颜色仍然新鲜,有所分解但无霉菌斑或者霉菌丝的出现。

[0089] 4、枯草芽孢杆菌 CGMCC No. 4628 抗逆性的验证

[0090] (1) 制粒高温的耐受性

[0091] 将 0.5g 菌粉溶于 4.5mL 灭菌生理盐水的玻璃试管中,用平板菌落计数法计算活菌数。将玻璃试管在 90℃ 水浴锅中加热 10 分钟后,迅速冷却到室温,平板菌落计数法计算残存活菌数,残存活菌数为 95.4%。

[0092] (2) 人工胃液的耐受性

[0093] 将 0.5g 菌粉溶于 4.5mL 灭菌生理盐水的玻璃试管中,用平板菌落计数法计活菌数。取 0.5mL 上述菌液加入 4.5mL 人工胃液中,37℃ 静置 2 小时,平板菌落计数法计残存活菌数,残存活菌数为 93.7%。

[0094] (3) 人工胆盐的耐受性

[0095] 将 0.5g 菌粉溶于 4.5mL 灭菌生理盐水的玻璃试管中,用平板菌落计数法计活菌

数。取 0.5mL 上述菌液加入 4.5mL 人工胆盐培养基中,37℃静置 2 小时,平板菌落计数法计残存活菌数,残存活菌数为 97.7%。

[0096] 验证性实验表明本发明的枯草芽孢杆菌 CGMCC No. 4628 的抗逆性强,可以耐受制粒高温,耐受人工胃液,人工胆盐,因此在经过饲料制粒,动物胃肠道环境后,还有大量活菌可以顺利进入动物的肠道,在肠道中存活,发挥益生功能。

[0097] 5、枯草芽孢杆菌 CGMCC No. 4628 益生功能验证

[0098] (1) 抑菌功能验证

[0099] 过夜培养的致病性大肠杆菌 K88、K99 和金黄色葡萄球菌菌液用平板菌落计数法计数。分别在 3 管 4.5ml 的大肠杆菌 K88、K99 和金黄色葡萄球菌菌液中加入 0.5g 枯草芽孢杆菌 CGMCC No. 4628 的菌粉,37℃培养 4 小时,平板菌落计数法计算残存的大肠杆菌 K88、K99 和金黄色葡萄球菌的活菌数。残存致病性大肠杆菌 K88、K99 和金黄色葡萄球菌的活菌数为 24.7%、28.8%和 30.4%。

[0100] (2) 产纤维素酶能力的验证

[0101] 以 2%接种量接种枯草芽孢杆菌 CGMCC No. 4628 菌粉到 1000ml LB 培养基,28℃发酵 14 小时,滴 20μL 发酵液在含 0.5%羧甲基纤维素的 LB-CMC 培养基平板上,观察纤维素水解透明圈大小,计算水解透明圈直径与菌落直径比值为 3.0。

[0102] 实施例 3、菌粉的制备

[0103] 1、粪肠球菌 (CMGCC No. 5092)

[0104] (1) 粪肠球菌 (CMGCC No. 5092) 的高密度发酵

[0105] 发酵粪肠球菌时用的发酵培养基由以下成分组成:红糖 18g/L,蛋白胨 4g/L,牛肉膏 3g/L,酵母浸粉,0.8/L,七水合硫酸镁 0.4g/L,硫酸锰 0.005g/L, pH 为 7.2。

[0106] 发酵条件为:发酵温度为 37℃,发酵时间为 12h, pH 值为 7.2,转速为 100rpm,初始接种量为 2%。发酵结束后,得到 7.3×10^9 cfu/ml 的菌液。

[0107] (2) 粪肠球菌 (CMGCC No. 5092) 菌粉的制备

[0108] 对粪肠球菌进行高温喷雾干燥,保护剂与发酵液的质量体积比为 1 : 3 的比例配制保护剂,其保护剂成分为:黄原胶:海藻糖:甘油:谷氨酸钠:麦芽糊精=10 : 10 : 2.5 : 2.5 : 75,进风 180℃,出风 70℃,得到流散性好,易溶于水、活菌数在 4×10^{10} cfu/g 的粪肠球菌菌粉。

[0109] 2、枯草芽孢杆菌 CGMCC No. 4628 菌粉的制备

[0110] 取过夜培养的枯草芽孢杆菌 CGMCC No. 4628 10mL 转接入 500ml 发酵培养基(初始接种量为 2%),28℃发酵 14 小时, pH 值为 7.0,转速为 180rpm。发酵后,菌体离心,60℃烘干,菌粉 4℃保存。

[0111] 平板菌落计数法检测菌粉的活菌数约为 10^{10} CFU/g。

[0112] 发酵培养基的组成为:蔗糖 10g/L,蛋白胨 5g/L,牛肉膏 3g/L,酵母浸粉 1g/L,七水合硫酸镁 0.5g/L,硫酸锰 0.0005g/L, pH 7.0。

[0113] 平板菌落计数法的操作方法为:待测样品经适当倍数稀释之后,其中的微生物充分分散成单个细胞,取一定量的稀释样品涂布到平板上,经过培养,每个单细胞生长繁殖形成肉眼可见的菌落,即一个单菌落代表原样品中的一个单细胞。统计菌落数,根据其稀释倍数和取样接种量即可换算出样品中的活菌数。

[0114] 3、地衣芽孢杆菌 CGMCC No. 5094 菌粉的制备

[0115] a. 地衣芽孢杆菌菌粉的制备方法,包括如下的步骤

[0116] 1) 平板培养复壮:将地衣芽孢杆菌菌种接种于 BPY 平板培养基上,于 37℃ 培养 16h,使地衣芽孢杆菌复壮,并形成单菌落,挑取单菌落于接种培养基上,37℃ 培养 24h;

[0117] 2) 一级种子的制备:将步骤 1) 培养的枯草芽孢杆菌菌种转接茄子瓶 BPY 斜面培养基上,37℃ 培养 16h,使处于对数后期,得一级种子;

[0118] 3) 二级种子的制备:将步骤 2) 制备的一级种子用无菌水制成菌悬液,接种到装有 60L BPY 种子培养基的 100L 种子罐中,温度 37℃,转速 220rpm,罐压 0.05MPa,通风比:1 : 0.7,培养 12h,得二级种子液。

[0119] 4) 地衣芽孢杆菌发酵液的制备:将步骤 3) 制备的二级种子液按照 1% 的接种量接种到 5-8m³ 发酵培养基的发酵罐中,温度 37℃,转速 220rpm,罐压 0.05Mpa,通风比:1 : 0.7,培养 20h,至芽孢生成率 90% 以上,活菌数为 1.6×10^{10} cfu/ml,则终止发酵,得地衣芽孢杆菌发酵液;

[0120] 所述的发酵培养基为:麸皮 1.8%,玉米粉 1.5%、豆粕 2%,硫酸铵 2%,硫酸镁 0.04%;柠檬酸铵 0.8%、消泡剂 0.06%,pH 为 6.8。

[0121] 5) 地衣芽孢杆菌菌粉的制备:在步骤 4) 制备的发酵液中加入 25% 的填充物麦芽糊精,混匀,进行喷雾干燥,进风温度 160℃,排风温度 50℃,雾化器转速 16000rpm,得到水分含量 4.78% 的地衣芽孢杆菌菌粉。

[0122] 4、嗜酸乳杆菌菌粉的制备

[0123] 1) 平板培养复壮:将嗜酸乳杆菌菌种接种于 MRS 平板培养基上,于 37℃ 培养 16h,使嗜酸乳杆菌菌复壮,并形成单菌落,挑取单菌落于接种培养基上,37℃ 培养 14h;

[0124] 2) 一级种子的制备:将步骤 1) 培养的嗜酸乳杆菌菌种转接装有 300ml MRS 液态培养基 2L 摇瓶里,37℃ 静置培养 18h,至对数后期,得一级种子;

[0125] 3) 二级种子的制备:将步骤 2) 制备的一级种子转接到装有 75LMRS 种子培养基的 100L 种子罐中,温度 37℃,转速 80rpm,培养 18h,得二级种子液。

[0126] 4) 嗜酸乳杆菌发酵液的制备:将步骤 3) 制备的二级种子液按照 1.5% 的接种量接种到 0.75m³ 发酵培养基的发酵罐中,温度 37℃,转速 80rpm,罐压 0.05Mpa,通风比:1 : 0.2,培养 18h,得到活菌数为 4.67×10^9 cfu/ml 嗜酸乳杆菌发酵液。

[0127] 所述的发酵培养基为:葡萄糖 2%,大豆蛋白胨 1.8%,酵母膏 1.5%,硫酸铵 0.75%,磷酸氢二钾 0.4%、氯化钠 0.6%,硫酸镁 0.04%;

[0128] 嗜酸乳杆菌菌粉的制备:将步骤 4) 制备的发酵液,4000rpm 离心,得到菌泥,加入与菌泥的质量/体积百分比为 20% 的冻干保护剂,混匀,于 -40℃ 冷冻干燥,得到水分含量为 4.5% 的粪肠球菌菌粉。

[0129] 冻干保护剂的组成为:脱脂奶粉、甘油、乳糖、玉米淀粉和谷氨酸钠的混合物,按照脱脂奶粉:甘油:乳糖:玉米淀粉:谷氨酸钠=2 : 1 : 1 : 0.8 的比例混合而成。

[0130] 5、短小芽孢杆菌菌粉的制备

[0131] 1) 平板培养复壮:将短小芽孢杆菌菌种接种于 BPY 平板培养基上,于 37℃ 培养 18h,使短小芽孢杆菌复壮,并形成单菌落,挑取单菌落于接种培养基上,37℃ 培养 30h;

[0132] 2) 一级种子的制备:将步骤 1) 培养的短小芽孢杆菌菌种转接茄子瓶 BPY 斜面培

培养基上,36℃培养 14h,使处于对数后期,得一级种子 ;

[0133] 3) 二级种子的制备 :将步骤 2) 制备的一级种子用无菌水制成菌悬液,接种到装有 60L BPY 种子培养基的 100L 种子罐中,温度 37℃,转速 300rpm,罐压 0.05MPa,通风比 : 1 : 0.8,培养 12h,得二级种子液。

[0134] 4) 短小芽孢杆菌发酵液的制备 :将步骤 3) 制备的二级种子液按照 1% 的接种量接种到 6m³ 发酵培养基的发酵罐中,温度 30-40℃,转速 280rpm,罐压 0.05Mpa,通风比 : 1 : 0.8,培养 24h,得到芽孢生成率 90% 以上,活菌数为 5.48×10⁹cfu/ml 的短小芽孢杆菌发酵液 ;

[0135] 所述的发酵培养基为 :葡萄糖 1.5%,大豆蛋白胨 1.5%,豆粕 1.5%,硫酸铵 0.75%,氯化钠 0.6%,硫酸镁 0.05% ;pH 自然。

[0136] 5) 短小芽孢杆菌菌粉的制备 :在步骤 4) 制备的发酵液中加入 25% 的填充物玉米淀粉,混匀,进行喷雾干燥,进风温度 165℃,排风温度 60℃,雾化器转速 16000rpm,得到水分含量 3.85% 的短小杆菌菌粉。

[0137] 实施例 4、复合微生态制剂的制备

[0138] 实施例 3 中得到的几种菌粉根据不同的比例与载体混合后,可以得到适用于不同的禽畜的专用性复合微生态,其中仔猪专用、母猪专用和蛋鸡专用型复合微生态如表 6 所示。

[0139] 表 6 几种复合微生态的制备方法

[0140]

	仔猪专用	母猪专用	蛋鸡专用
嗜酸乳杆菌	10	-	-
粪肠球菌	7.5	-	5
地衣芽孢杆菌	7.5	10	5
枯草芽孢杆菌	-	10	-
短小芽孢杆菌	-	10	10
载体	葡萄糖 75	硫酸铵 45, 油饼粉 25	稻壳粉 80

[0141] 实施例 5、实施例 4 制备的仔猪专用型复合微生态制剂对仔猪的功效试验

[0142] 试验动物 :选用 35 日龄断奶,体重在 9KG 左右的杜长白仔猪做为试验动物 300 头,一批选齐,出生日期相差不超过 7 天。试验期为 30 天,预饲期为 7 天。饲养采用地面平养饲养,各组件除日粮不同外,其他条件完全一致,按常规进行,人工投料、自由采食、自由饮水、保持猪舍清洁。

[0143] 测试指标及方法 :在试验开始和结束时早晨空腹对猪只进行称重,分别以重复组为单位进行全群称重、计算耗料量、日增重、料肉比、腹泻率等指标,并进行差异性显著检验,试验结果如表 7 所示 :

[0144] 表 7 仔猪专用型微生态制剂对仔猪饲喂功效试验结果

[0145]

组别	始 均 重 (kg)	末 均 重 (kg)	日 均 增 重 (g/头·d)	平 均 耗 料 (g/头·d)	料 肉 比	腹 泻 率 (%)
对照组	8.8±0.42	23.6±1.32	493±21	856±45	1.74±0.08	10.7±0.6
试验组 I	8.7±0.37	24.5±1.47	526±35	851±39	1.61±0.07	3.5±0.3
试验组 II	8.9±0.45	24.8±1.43	530±31	873±42	1.65±0.09	5.6±0.5
试验组 III	8.8±0.4	25.0±1.26	540±40	864±51	1.60±0.1	3.2±0.4

[0146] 从表中可以看出,在平均增重仔猪试验组 I、试验组 II 和试验组 III 比对照组分别提高了 7.5%、7.3%、9.5%;在料肉比方面试验 I、试验组 II 和试验组 III 比对照组分别降低了 5.5%、5.2%、8.0%;在腹泻率方面试验 I、试验组 II 和试验组 III 比对照组分别降低了 67.3%、47.7%、70.1%。试验 I 组和试验 II 相比在日增重、料肉比方面差异不显著,但是在预防腹泻方面差异显著,说明仔猪专用型复合微生态制剂可以替代饲料中预防腹泻的抗生素。

[0147] 实施例 6、实施 4 中制备的母猪专用型复合微生态制剂对哺乳母猪的试验

[0148] 1、试验方法

[0149] 试验猪的选择 :从猪场选择临产前一周左右的母猪,选取健康无病、猪龄、胎次、体重基本一致的母猪 18 头随机分成两组,试验组和对照组 9 头。

[0150] 饲料组成 :对照组饲喂基础日粮,试验组为基础日粮基础上添加 1%母猪专用型复合微生态制剂。

[0151] 饲养管理 :试验在本场的同一产房内进行,由同一饲养人员饲喂,饲养管理条件一致,饲料采取干料加水拌湿后饲喂,在试验母猪转入产床时开始饲喂试验料,日喂 3 次,自由采食,以吃饱不剩料为原则。试验组和对照组分别统计耗料量、仔猪出生重和 28 天断奶体重,采取全天供水的办法,任猪自由饮水。每日清扫圈舍,随时观察生长和健康情况。

[0152] 2、试验结果分析

[0153] 在试验期内,添加饲喂 0.1%母猪专用型复合微生态制剂的试验组 28 天断奶均重为 8.27kg,而未添加母猪专用型复合微生态制剂的对照组 28 天断奶均重为 7.54,试验组比对照组多增重 0.73kg,经检验,两组差异显著 ($p < 0.05$),且试验组成活率明显高于对照组,其成活率分别为 85.83%和 91.67%。结果见表 8。

[0154] 表 8 母猪专用型复合微生态制剂对哺乳母猪生产性能的影响

[0155]

	对照组平均值	试验组平均值
出生活仔数	9.11	9.44
出生均重 (kg)	1.60	1.56
3 日龄调整数	10.67	10.67

3 日龄调整均重 (kg)	1. 90	1. 79
7 日龄补饲前均重 (kg)	2. 53	2. 50
28 天断奶数	9. 78	10. 22
断奶均重	7. 54	8. 27

[0156]

[0157] 实施例 7 实施 4 中制备的蛋禽专用型复合微生态制剂对蛋鸡的功效试验

[0158] 试验动物 :随机选用 60 周龄矮小蛋鸡 3000 只,随机分为 2 组,每组 1500 只,按照随机分组安排试验。试验组 I 为空白对照组 (基础日粮);试验组 II 为试验组 (基础日粮 +0. 1%蛋禽专用型复合微生态制剂),试验鸡尾三层笼养,每笼 3 只,自由采食和饮水,按常规进行饲养和管理。

[0159] 测定指标 :每天观察记录每重复产蛋数、蛋重、不合格蛋数和鸡汁死淘情况 ;每周末统计耗料量 ;分别统计每组鸡产蛋后期的产蛋率、蛋重、破损率、死亡率、采食量和料蛋比。

[0160] 表 9 蛋禽专用型复合微生态制剂对矮小蛋鸡生产性能的影响

[0161]	组别		
	指标	对照组	试验组
	蛋重 g/个	33. 34	33. 66
	日耗量 g/只	126. 5	123. 9
	料蛋比	2. 28	2. 23
	产蛋率%	70. 79	73. 69
	破损率%	0. 21	0. 22
	死亡率%	0. 5	0. 2

[0162] 结果分析 :1、在饲料中添加 0. 1%蛋禽专用型复合微生态制剂能够显著提高蛋鸡的产蛋率,产蛋率提高 2. 80%;2、在饲料中添加 0. 1%蛋禽专用型复合微生态制剂能够减少疾病的发生和降低蛋鸡的死亡率 ;3、在饲料中添加 0. 1%蛋禽专用型复合微生态制剂能够提高机体的免疫力,预防由于热应激或接种疫苗等方面引起的应激反应。

[0163] 综上所述,本发明的微生态制剂添加至饲料中,对保证鸡只监控状态、协调促进机体消化吸收能力、提高蛋鸡生产性能和饲料的消化利用率等均有很好的作用。