

## 纳豆芽孢杆菌在奶牛瘤胃和十二指肠存活规律

董淑慧<sup>1,2</sup> 王加启<sup>1\*</sup> 彭华<sup>1</sup> 孙鹏<sup>1</sup> 卜登攀<sup>1</sup> 周凌云<sup>1</sup> 康海英<sup>1</sup>

(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 100193;

2. 甘肃农业大学 动物科学技术学院,兰州 730070)

**摘要** 通过体内外试验研究纳豆芽孢杆菌(*Bacillus subtilis natto*,BSN)在奶牛胃肠道存活规律及停留时间。试验1:经过滤的荷斯坦奶牛瘤胃液或十二指肠液加入BSN菌液(芽孢含量为 $10^5$  cfu/mL),对照组不添加;将处理好的发酵液于39℃厌氧培养,瘤胃液检测发酵0、6、12、24、48和72h挥发性脂肪酸浓度和芽孢数,十二指肠液检测发酵0、1、2、3、4、5和6h芽孢数。试验2:选取7头瘃管牛随机分成2组,处理组(4头)通过瘤胃瘃管投放100mLBSN菌液(芽孢含量为 $10^8$  cfu/mL),对照组(3头)不投放;投放后6、12、24、48和72h采集瘤胃液、十二指肠液和粪样。BSN在瘤胃液发酵过程中芽孢数呈先增高后降低的趋势,发酵24和72h的存活率分别为191.3%和175.9%,并促进了丙酸和丁酸的产生( $P<0.05$ ),减少了乙酸、异丁酸和异戊酸的产生( $P<0.01$ )。BSN在十二指肠液中发酵1h内芽孢数有上升的趋势( $P>0.05$ ),发酵3h后急剧降低,发酵1、3和6h的存活率分别为159.2%、121.4%和35.7%。体内试验结果表明瘤胃、十二指肠和粪便中的芽孢数均随投喂时间的延长而逐渐降低,48h后各位点均很难检测到芽孢。总之,BSN能耐受奶牛瘤胃液环境,并能影响瘤胃发酵,在十二指肠液的耐受时间约为3h,但不能在奶牛胃肠道中定植。

**关键词** 奶牛; 纳豆芽孢杆菌; 芽孢; 瘤胃; 十二指肠; 体外发酵

中图分类号 S 852.21; S 823.3

文章编号 1007-4333(2011)05-0104-06

文献标志码 A

## Survival of *Bacillus subtilis natto* in rumen and duodenum of Holstein dairy cows

DONG Shu-hui<sup>1,2</sup>, WANG Jia-qi<sup>1\*</sup>, PENG Hua<sup>1</sup>, SUN Peng<sup>1</sup>, BU Deng-pan<sup>1</sup>,  
ZHOU Ling-yun<sup>1</sup>, KANG Hai-ying<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory of Animal Nutrition/ Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;

2. College of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

**Abstract** Experiments *in vitro* and *in vivo* were conducted to evaluate the survival of *B. subtilis natto* (BSN) in the gastrointestinal tract of Holstein dairy cows. In experiment 1: the two treatment groups were strained rumen fluid and duodenum fluid inoculated with BSN at  $10^5$  cfu/mL level, and control group was strained rumen fluid or duodenum fluid without BSN inoculations, all three groups were incubated *in vitro* at 39℃. Changes of BSN spore counts and volatile fatty acid in rumen fluid were monitored at 0, 6, 12, 24, 48 and 72 h. Changes of BSN spore counts in duodenum fluid were monitored at 0, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 h. In experiment 2: 7 cows were randomly assigned to two groups. Four cows were infused with 100 mL BSN culture ( $10^8$  spores/mL) into rumen through rumen cannula, and the other three cows did not receive infusion. Rumen fluid, duodenum fluid and feces were collected at 6, 12, 24, 48, 72 h after the infusion. The results of rumen fermentation showed that spores increased in the first 24 h, and then decreased. The survival rate of BSN was 191.3% and 175.9% at 24 h and 72 h, respectively. In addition, BSN increased the concentration of propionate and butyrate in rumen fluid ( $P<0.05$ ), but reduced the concentration of acetic acid, isobutyric acid and

收稿日期: 2011-01-05

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金资助(nycytx-04-01)

第一作者: 董淑慧, 硕士研究生, E-mail: dong-shu-hui@163.com

通讯作者: 王加启, 研究员, 博士生导师, 主要从事反刍动物营养与牛奶质量改良研究, E-mail: wang-jia-qi@263.net

isovaleric acid ( $P < 0.01$ ). The results of duodenum fermentation showed that spore counts tended to increase in the first 1 h ( $P > 0.05$ ), and then decreased gradually, decreased sharply after 3 h. The survival rate of BSN was 159.2%, 121.4% and 35.7% at 1, 3 and 6 h, respectively. The results of in vivo experiments indicated that spore counts continued to decrease in rumen, duodenum as well as feces and almost cannot be detected at 48 h after infusion in all of the location. In conclusion, BSN spores have the ability to survive in rumen and alter rumen fermentation. BSN spores are able to survive in duodenum fluid up to 3 h. However, the spores cannot permanently colonize in the gastrointestinal tract of Holstein dairy cows.

**Key words** dairy cow; *B. subtilis natto*; spores; rumen; duodenum; culture *in vitro*

由于抗生素在动物生产中的种种弊端,使得发展绿色无公害饲料添加剂成为饲料工业重要的研究方向,而微生物添加剂正是实现这一目的主要途径。1999年6月,我国农业部公布了包括纳豆芽孢杆菌(*Bacillus subtilis natto*, BSN)在内的12种可直接饲用的动物饲料级微生物添加剂。BSN来源于日本的发酵食品纳豆,属于革兰氏阳性孢子萌生菌,经16S rRNA鉴定属于枯草芽孢杆菌亚种<sup>[1]</sup>。

目前,BSN作为一种新型的微生态制剂,在畜禽生产中的应用效果显著。Samanya和Yamauchi的研究证实在鸡的日粮中添加BSN可以激活鸡的肠道功能,降低血中氨的浓度,并有改善饲料转化率的趋势<sup>[2]</sup>。Chen等研究证实使用BSN和啤酒酵母进行两阶段发酵生产,可以提高肉仔鸡的体重和饲料转化率<sup>[3]</sup>。Liu等发现BSN可提高河豚的生长性能<sup>[4]</sup>。在反刍动物上,Sun等发现BSN可以提高犊牛日增重<sup>[5]</sup>。BSN发生这些益生作用的机理还不能确定,可能是BSN与动物胃肠道微生物相互作用,于萍等发现BSN能促进琥珀酸丝状杆菌、白色瘤胃球菌及溶纤维丁酸弧菌等纤维分解功能菌群在断奶后犊牛消化道中的定植和生长<sup>[6]</sup>,进而改善胃肠道功能及动物生产性能。有几项研究证实芽孢杆菌芽孢能在单胃动物消化道存活,通过消化道并在粪便中排出<sup>[7-8]</sup>,BSN也被证实可在小鼠的肠道萌发<sup>[9]</sup>。在单胃动物上已证实枯草芽孢杆菌不能在动物胃肠道定植,只能短暂寄居,一旦停止饲喂,粪便中芽孢数很快就降低至饲喂前水平或低于检出限<sup>[10-12]</sup>。但这些结论能否推论到反刍动物需要进一步研究。

要证实BSN能与胃肠道微生物发生相互作用,必须首先证实其能耐受胃肠道环境。本研究通过体外试验验证BSN能否耐受奶牛瘤胃及十二指肠环境,并进一步利用瘘管牛投喂BSN试验确定BSN能否在奶牛胃肠道定植,旨在为BSN在奶牛生产中的应用提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌种

BSN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。

### 1.2 LB平板培养基的制备

1 mg/mL大豆蛋白胨、0.5 mg/mL牛肉膏、0.5 mg/mL NaCl和2 mg/mL琼脂,pH 6.0~7.0,121 °C高压灭菌30 min,冷却到60 °C在超净工作台倒平板。

### 1.3 BSN培养物的制备

从LB培养基上取一环活化菌种,接入装有40 mL种子培养基(含蔗糖1 g/dL,大豆蛋白胨1 g/dL,NaCl 0.5 g/dL,pH调至7.0)的100 mL锥形瓶中,37 °C、180 r/min培养14 h。

### 1.4 试验动物及饲养管理

从北京畜牧兽医研究所实验牧场,选择安装有永久性三位点瘘管的健康荷斯坦奶牛7头(体重600 kg左右)。试验奶牛日粮(质量分数):苜蓿5.0%、羊草20.0%、青贮玉米35.0%、玉米22.1%、大豆粕3.0%、小麦麸2.0%、棉籽粕11.0%、石粉0.8%、磷酸氢钙0.3%、食盐0.4%和预混料0.4%。每天饲喂2次(7:00和16:00),自由饮水。

### 1.5 BSN瘤胃液耐受性试验

从试验的7头瘘管牛中选择2头,经瘤胃瘘管采集2 L瘤胃液,迅速送回实验室,将瘤胃液经2层纱布过滤进灭菌的充满氮气的三角瓶内(37 °C水浴),然后分装至36个充满氮气的100 mL血清瓶中(30 mL/瓶)。瓶中事先加入BSN菌液和/或50%(体积分数)葡萄糖溶液。试验处理如下:C组(对照组)中只含有瘤胃液(6瓶);CG组(添加葡萄糖对照组)中含有瘤胃液和5 g/L葡萄糖(6瓶);N组(添加纳豆芽孢杆菌)中含有瘤胃液和 $1 \times 10^5$  cfu/mL BSN(12瓶,每时间点2个重复);NG(添加

纳豆芽孢杆菌和葡萄糖, natto+glucose)组中含有瘤胃液、5 g/L 葡萄糖和  $1 \times 10^5$  cfu/mL BSN(12瓶, 每时间点2个重复)。将各处理的液体放入生化培养箱(LRH-150B)于39℃培养, 培养0、6、12、24、48和72 h分别取NG组和N组各2瓶, C组和CG组各1瓶, 测定pH后, 分装至10 mL 灭菌离心管, -20℃冻存, 用于后续挥发性脂肪酸(Volatile Fatty Acid, VFA)分析和芽孢数检测。

### 1.6 十二指肠液 BSN 耐受性试验

从试验的7头瘰管牛中另外选择2头, 经十二指肠瘰管采集500 mL 十二指肠液, 迅速带回实验室, 将十二指肠液经2层纱布过滤, 装入灭菌充满氮气的三角瓶内(37℃水浴), 然后分至21个充满氮气的厌氧发酵管中(10 mL/管), 其中14个厌氧发酵管中事先加入0.1 mL BSN 菌液(BSN 芽孢含量为  $1 \times 10^5$  cfu/mL)作为处理组, 其余为对照组。将厌氧发酵管放入生化培养箱39℃进行厌氧培养; 于培养0、1、2、3、4、5和6 h各取3管(处理组2管, 对照组1管), 分装至10 mL 灭菌离心管, -20℃冻存, 用于后续芽孢数检测。

### 1.7 BSN 单次投喂奶牛试验

7头瘰管牛随机分成2组: 处理组(4头)于早上9:00通过瘤胃瘰管多位点投放100 mL BSN 发酵菌液( $1 \times 10^8$  cfu/mL), 对照组(3头)不投放。在菌液投放后0、6、12、24、48和72 h采集瘤胃液、十二指肠液和粪样(用一次性手套从直肠采集), 分装至10 mL 灭菌离心管, -20℃冻存。

### 1.8 样品分析

#### 1.8.1 芽孢的检测

1) 瘤胃液芽孢的检测: 样品于80℃水浴10 min后采用倍比稀释, 涂布平板计数法进行检测<sup>[13]</sup>。2) 十二指肠液芽孢的检测: 直接或梯度稀释100倍后, 80℃水浴10 min涂布平板计数法检测。3) 粪中芽孢数的检测: 在超净工作台将5 g 粪样置于含45 g 灭菌生理盐水及玻璃珠的100 mL 三角瓶中, 80℃水浴10 min振荡混匀后梯度稀释, 涂布平板计数法进行检测。各时间点采集的样品均做3个重复。选择与本研究所用BSN菌株菌落形态类似的菌落进行芽孢计数, 菌落呈不规则形, 表面粗糙起皱, 灰白色不透明<sup>[14-15]</sup>。

#### 1.8.2 瘤胃液挥发性脂肪酸的测定

不同发酵时间点瘤胃液与25%偏磷酸按体积

比为3:1混合, 于10 000g离心10 min, 取上清液利用气相色谱仪(GC-4800A), 外标法测定乙酸、丙酸、丁酸和总挥发酸(VFA)浓度。测定条件为: 色谱柱DB-FFAP(15 m×0.32 mm×0.25 μm); 柱温100℃, 2℃/min至120℃, 保持10 min; 进样口温度250℃, 检测器温度280℃, 恒压21.8 kPa, 分流比为50:1, 进样量2 μL。

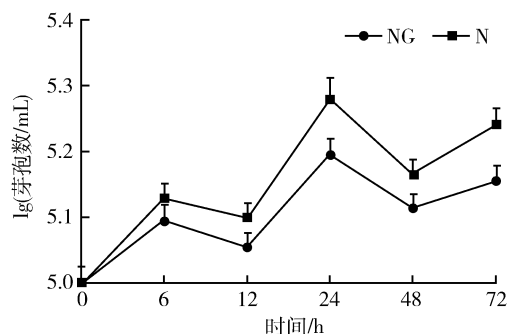
### 1.9 统计分析

瘤胃液耐受性试验不同发酵时间点芽孢数、pH和VFA浓度采用SAS mix模型进行分析, 菌液和/或葡萄糖添加处理和发酵时间为固定效应, 瓶号为随机效应。十二指肠液静态发酵不同时间点芽孢数, 采用SAS mix模型进行分析, 菌液和添加处理和发酵时间为固定效应, 管号为随机效应。瘰管牛试验瘤胃液、十二指肠液、粪样不同时间点芽孢数采用SAS mix模型进行分析, 菌液投放处理和采样时间为固定效应, 牛号为随机效应。

## 2 结果与分析

### 2.1 BSN 在瘤胃液中的耐受性

由图1可以看出, BSN在瘤胃液发酵72 h过程中无论添加葡萄糖与否芽孢数均呈先增高后降低的趋势, 在发酵24 h芽孢数达到高峰, 添加葡萄糖发酵液芽孢数显著低于未添加组( $P < 0.05$ ), 对照组瘤胃液中的芽孢数约为  $3.4 \times 10^3 \sim 3.8 \times 10^3$  mL<sup>-1</sup>。瘤胃液在处理前未检测到枯草芽孢杆菌, 对照组检测到的芽孢可能是在操作环节中污染所致。



N 为含  $1 \times 10^5$  cfu/mL BSN 芽孢的瘤胃液; NG 为含  $1 \times 10^5$  cfu/mL BSN 芽孢和 5 g/L 葡萄糖的瘤胃液。

图1 不同发酵时间瘤胃液中的芽孢数

Fig. 1 Changes of spore counts in strained rumen fluid after incubation with *Bacillus subtilis natto* (BSN)

BSN 在未添加葡萄糖瘤胃液中发酵 24 和 72 h 存活效率分别为 191.3% 和 175.9%。

由表 1 可以看出,与对照组相比,BSN 增加了瘤胃液中丙酸和丁酸浓度及总 VFA 的含量( $P < 0.05$ ),降低了乙酸、异丁酸和异戊酸浓度( $P < 0.01$ )。未添加葡萄糖瘤胃液总 VFA 低于添加葡萄糖瘤胃液( $P < 0.05$ ),pH 前者高于后者( $P < 0.01$ )。

表 1 纳豆芽孢杆菌对瘤胃 pH 和挥发性脂肪酸的影响

Table 1 Effects of *Bacillus subtilis natto* (BSN) on rumen pH and volatile fatty acid (VFA)

指标	C	CG	N	NG	P	
pH	6.96 a	6.00 b	7.00 a	6.17 b	0.01	
$\rho$ (总挥发性脂肪酸)/(mmol/L)	126.7 b	157.0 a	126.7 b	153.9 a	0.02	
与总 VFA 的摩尔比/ (mol/100 mol)	乙酸	69.3 a	68.7 a	66.0 b	66.7 b	0.01
	丙酸	15.4 c	16.0 b	17.2 a	16.4 b	0.02
	异丁酸	1.3 b	1.5 a	1.0 d	1.1 c	0.01
	丁酸	10.3 b	9.7 b	12.7 a	12.5 a	0.02
	异戊酸	2.3 b	2.6 a	1.7 d	1.9 c	0.01
	戊酸	1.4	1.5	1.4	1.5	0.06

注:同行数字不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。C 为仅含瘤胃液;CG 为瘤胃液中含 5 g/L 葡萄糖;N 为瘤胃液中含  $1 \times 10^5$  cfu/mL BSN 芽孢;NG 为瘤胃液中含  $1 \times 10^5$  cfu/mL BSN 芽孢和 5 g/L 葡萄糖。

### 2.2 BSN 在十二指肠液耐受性

由图 2 可以看出,芽孢数在十二指肠液中发酵前 1 h 内有上升的趋势( $P = 0.06$ ),之后便逐渐降低( $P > 0.1$ ),发酵 3 h 后急剧降低( $P < 0.001$ ),发酵 4 h 后几乎不再变化,对照组始终无法检测出芽孢。BSN 在十二指肠液发酵 1、3 和 6 h 的存活率分别为 159.2%、121.4% 和 35.7%。

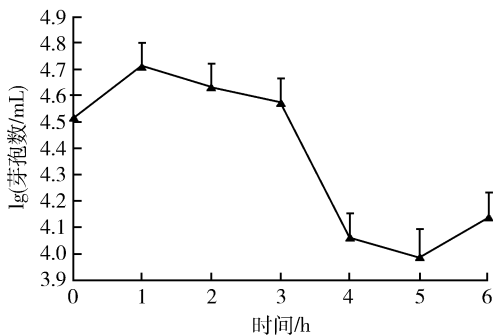


图 2 不同发酵时间十二指肠液芽孢数

Fig. 2 Changes of spore counts in strained duodenum fluid after incubation with *Bacillus subtilis natto* (BSN)

### 2.3 BSN 在奶牛胃肠道停留规律

由图 3 可以看出,BSN 投入瘤胃后,瘤胃液中芽孢浓度维持在  $10^5$  cfu/mL 以上至少 6 h。BSN 投入瘤胃后 6 h 十二指肠液中即可检测到芽孢( $8.5 \times 10^4$  cfu/mL),但粪便中直到 12 h 才有芽孢检出( $6.1 \times 10^5$  cfu/g)。瘤胃、十二指肠、粪便中的芽孢数均随投喂时间的增长而逐渐降低,投喂 48 h 后 3 个位点都很难检出芽孢。对照组各时间点芽孢数均无法检测出。

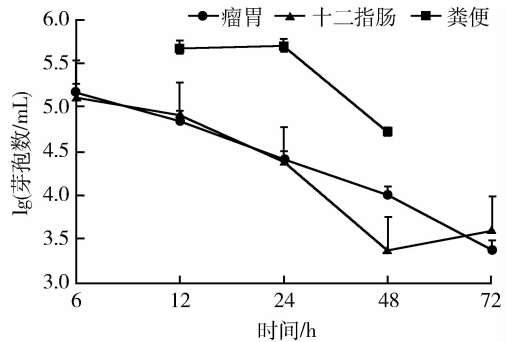


图 3 不同采样时间点瘤胃液、十二指肠液和粪中芽孢数

Fig. 3 Changes of spore counts in rumen fluid, duodenum fluid and faeces

### 3 讨论

#### 3.1 BSN 在瘤胃液和十二指肠液中的耐受性

本研究探讨 BSN 如何改善反刍动物生产性能,首先要确定 BSN 能否在奶牛瘤胃及十二指肠存活并生长,经过滤后的瘤胃液可以模拟瘤胃环境(39℃,pH 为 5.5~7.0,正常的瘤胃 VFA 浓度及其他化学成分)。结果显示发酵 24 和 72 h 的存活率分别为 191.3%和 175.9%,可见 BSN 能在模拟瘤胃环境中存活并繁殖。Duc 等发现枯草芽孢杆菌在模拟胃液(1 mg/mL 来自于猪胃黏膜的胃蛋白酶,pH 2.0) 1 h 存活率低于 100%<sup>[16-17]</sup>,其存活率低于本研究结果的原因可能是单胃动物胃液的 pH 远低于牛(2.0 vs. 6.5),另一方面,瘤胃是反刍动物的主要消化器官,营养成分远比单胃动物的胃液丰富。枯草芽孢杆菌曾被认为是严格厌氧菌,但 Nakano 等证实枯草芽孢杆菌可以在硝酸盐存在的情况下进行无氧呼吸,或在葡萄糖和丙酮酸存在时进行厌氧发酵<sup>[18-19]</sup>。Hong 等也曾指出 BSN 可以在硝酸盐存在的情况下进行厌氧生长<sup>[20]</sup>。BSN 可能以类似的机理在瘤胃液中进行厌氧生长。

添加葡萄糖后瘤胃发酵液芽孢数显著低于未添加组( $P < 0.05$ )。产生这种情况的原因可能是营养物质可以促进芽孢的萌发<sup>[21]</sup>,添加葡萄糖的瘤胃液激发了 BSN 芽孢的萌发,进而形成营养细胞,添加葡萄糖处理组低 pH 环境在热处理时更易杀死营养细胞,使得添加葡萄糖发酵液芽孢数低于未添加组。可见 BSN 可以与瘤胃微生物竞争利用外源葡萄糖从而促进芽孢的萌发。

纳豆芽孢杆菌通过促进丙酸和丁酸的产生( $P < 0.05$ ),减少乙酸、异丁酸和异戊酸的产生( $P < 0.01$ ),进而改变瘤胃发酵模式,可能是纳豆芽孢杆菌影响了瘤胃微生物的组成,但具体机制还有待进一步研究。

纳豆芽孢杆菌接种在非选择性分离培养基(LB 培养基),可利用芽孢杆菌耐热的特性,采用 80℃水浴 10 min 除去营养细胞和基质中的杂菌后,根据培养基上菌落形态对纳豆芽孢杆菌芽孢进行计数,但酸性条件和加热会激发芽孢的萌发<sup>[22]</sup>,因此,十二指肠液直接 80℃水浴后无法检测出芽孢。Spinosa 等发现枯草芽孢杆菌营养细胞加热 1 min 后,只有 0.000 1%存活,而对芽孢无影响<sup>[23]</sup>。将十二指肠液稀释 100 倍后 pH 由 2.76 上升至 6.56,因此,可

以计数芽孢,更准确反映纳豆芽孢杆菌在十二指肠液中的存活率。

BSN 在十二指肠液发酵 1、3 和 6 h 的存活率分别为 159.2%、121.4%和 35.7%。可见 BSN 芽孢可在十二指肠液耐受约 3 h。Duc 等发现枯草芽孢杆菌接种进模拟小肠液(0.2%(质量浓度)胆盐(V(胆酸钠):V(脱氧胆酸钠)=50:50),胰酶,pH 7.4) 4 h,存活率接近于 100%(94%)<sup>[16-17]</sup>。

#### 3.2 BSN 在奶牛胃肠道停留规律

单胃动物的研究表明,芽孢杆菌芽孢能在消化过程中以营养细胞这种活性形式存在,并在消化道内萌发,最终通过粪便排除<sup>[7-8,12]</sup>。投喂 BSN 后,奶牛粪便中可检测出芽孢,而对照组无法检出,前者检出的芽孢很可能是 BSN 在奶牛胃肠道萌发为营养细胞,再进一步产生新的芽孢,进而在粪便中排出。

BSN 投入奶牛瘤胃后,瘤胃、十二指肠和粪便中芽孢数量不断降低,48 h 后每 g 粪便中的芽孢低于  $1 \times 10^4$  cfu。Spinosa 等<sup>[11]</sup>和 Tam 等<sup>[10]</sup>发现小鼠投喂  $10^9$  cfu 枯草芽孢杆菌芽孢后,粪便中芽孢数逐渐降低,不同菌株在粪便中的芽孢数维持在检测限( $10^3$  cfu/g)以上的时间不同(15~27 d)。Leser 等也发现猪饲喂枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌复合菌剂 20 d,停喂后粪中的芽孢数逐渐降低,在停喂后 10~11 每 g 粪便中的芽孢数接近于对照组水平( $1 \times 10^4$  cfu)<sup>[12]</sup>。饲喂芽孢杆菌后动物粪便中消失时间的长短不尽一致,可能是不同畜种胃肠道环境的差异造成的,也可能是不同的菌株对胃肠道的营养环境的响应不同,即一些菌的营养细胞更易萌发<sup>[10]</sup>。一些研究也发现绵羊或羔羊瘤胃停止投入酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)后,随着时间的延长,瘤胃和粪便中可检出的酵母菌数量逐渐降低,并最终消失<sup>[24-25]</sup>。BSN 和酵母菌均不属于瘤胃本土微生物,不能在奶牛胃肠道定植,为了维持其代谢活性并对奶牛胃肠道微生物产生影响,应在日粮中持续添加<sup>[25]</sup>。

### 参 考 文 献

- [1] 覃宗华,蔡建平,叶秀华,等. 纳豆芽孢杆菌 16S rRNA 基因的克隆及其系统进化分析[J]. 中国微生态学杂志,2005,17(5): 324-326
- [2] Samanya M, Yamauchi K. Histological alterations of intestinal villi in chickens fed dried *Bacillus subtilis* var. *natto*[J]. Comp Biochem Physiol A, Physiol, 2002, 133(1): 95-104

- [3] Chen K L, Kho W L, You S H, et al. Effects of *Bacillus subtilis* var. *natto* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed fermented feed on the enhanced growth performance of broilers[J]. *Poult Sci*, 2009, 88(2):309-315
- [4] Liu C H, Chiu C S, Ho P L, et al. Improvement in the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by a protease-producing probiotic, *Bacillus subtilis* E20, from natto[J]. *J Appl Microbiol*, 2009, 107(3):1031-1041
- [5] Sun P, Wang J Q, Zhang H T. Effects of *Bacillus subtilis natto* on performance and immune function of preweaning calves[J]. *J Dairy Sci*, 2010, 93(12):5851-5855
- [6] 于萍, 王加启, 卜登攀, 等. 日粮添加纳豆芽孢杆菌对断奶后犊牛胃肠道纤维分解菌的影响[J]. *中国农业大学学报*, 2009, 14(1):111-116
- [7] Hoa T T, Duc L H, Istitico R, et al. Fate and dissemination of *Bacillus subtilis* spores in a murine model[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(9):3819-3823
- [8] Casula G, Cutting S M. *Bacillus* probiotics: spore germination in the gastrointestinal tract[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(5):2344-2352
- [9] Hosoi T, Ametani A, Kiuchi K, et al. Changes in fecal microflora induced by intubation of mice with *Bacillus subtilis* (*natto*) spores are dependent upon dietary components[J]. *Can J Microbiol*, 1999, 45(1):59-66
- [10] Tam N K, Uyen N Q, Hong H A, et al. The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives[J]. *J Bacteriol*, 2006, 188(7):2692-2700
- [11] Spinosa M R, Braccini T, Ricca E, et al. On the fate of ingested *Bacillus* spores[J]. *Res Microbiol*, 2000, 151(5):361-368
- [12] Leser T D, Knarreborg A, Worm J, et al. Germination and outgrowth of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* spores in the gastrointestinal tract of pigs[J]. *J Appl Microbiol*, 2008, 104(4):1025-1033
- [13] Weinberg Z G, Muck R E, Weimer P J, et al. The survival of silage inoculant lactic acid bacteria in rumen fluid[J]. *J Appl Microbiol*, 2003, 94:1066-1071
- [14] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001:353-381
- [15] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 北京: 中国科学出版社, 1998:732
- [16] Duc L H, Hong H A, Barbosa T M, et al. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(4):2161-2171
- [17] Duc L H, Hong H A, Cutting S M. Germination of the spore in the gastrointestinal tract provides a novel route for heterologous antigen delivery[J]. *Vaccine*, 2003, 21(27/28/29/30):4215-4224
- [18] Nakano M M, Dailly Y P, Zuber P, et al. Characterization of anaerobic fermentative growth of *Bacillus subtilis*: identification of fermentation end products and genes required for growth[J]. *J Bacteriol*, 1997, 179(21):6749-6755
- [19] Nakano M M, Zuber P. Anaerobic growth of a "strict aerobe" (*Bacillus subtilis*) [J]. *Annu Rev Microbiol*, 1998, 52(1):165-190
- [20] Hong H A, Duc L H, Cutting S M. The use of bacterial spore formers as probiotics[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2005, 29(4):813-835
- [21] Moir A, Smith D A. The genetics of bacterial spore germination[J]. *Annu Rev Microbiol*, 1990, 44(1):531-553
- [22] Faille C, Membre J M, Kubaczka M, et al. Altered ability of *Bacillus cereus* spores to grow under unfavorable conditions (presence of nisin, low temperature, acidic pH, presence of NaCl) following heat treatment during sporulation[J]. *J Food Prot*, 2002, 65(12):1930-1936
- [23] Spinosa M R, Braccini T, Ricca E, et al. On the fate of ingested *Bacillus* spores[J]. *Res Microbiol*, 2000, 151(5):361-368
- [24] Fiems L O, Cottyn B G, Dussert L, et al. Effect of a viable yeast culture on digestibility and rumen fermentation in sheep fed different types of diets[J]. *Reprod Nutr Dev*, 1993, 33(1):43-49
- [25] Durand-Chaucheyras F, Fonty G, Bertin G, et al. Fate of Levucell SC I-1077 yeast additive during digestive transit in lambs[J]. *Reprod Nutr Dev*, 1998, 38(3):275-280

(责任编辑: 苏燕)