

## 混菌固态发酵霉变全价饲料特性的研究

韩 信, 程茂基\*, 吴 超, 杨 骏, 柳俊超

(安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036)

**摘 要:** 本试验旨在研究混菌固态发酵霉变全价饲料的特性。按乳酸菌:酵母菌:枯草芽孢杆菌为 3%:1%:3% 的接种比例接种到霉变全价饲料中, 在发酵温度 35℃, 发酵时间 5 d, 料水比 1:0.6, pH 值为 7 的条件下进行发酵处理, 测定发酵期间产品 pH 和微生物类群的变化, 应用选择培养基测定发酵过程中乳酸菌、酵母菌、枯草芽孢杆菌、霉菌和大肠杆菌的动态变化; 最后应用酶联免疫试剂盒测定 AFB1 在霉变全价饲料发酵前后含量的变化。结果显示, 试验组 pH 下降显著, 发酵 72 h 时, pH 分别为 4.30, 显著低于空白对照( $P < 0.05$ )。乳酸菌的活菌数在发酵期间迅速增加, 接种的乳酸菌在发酵中快速增殖, 达到  $9.86 \log\text{CFU}\cdot\text{g}^{-1}$  以上, 这与发酵产品 pH 变化基本一致; 酵母菌的生长变化比较平和, 3 d 内达到生长高峰, 而后逐渐下降; 枯草芽孢杆菌在发酵中迅速增殖, 在发酵 3 d 左右达到最大, 而后又迅速下降。发酵结束时, 霉菌含量从  $5.31 \log\text{CFU}\cdot\text{g}^{-1}$  下降到  $2.92 \log\text{CFU}\cdot\text{g}^{-1}$ , 发酵 3 d 时, 相比于对照组, 试验组中的霉菌活菌数下降显著 ( $P < 0.05$ ); 相比对照组, 试验组发酵饲料中的大肠菌群活菌数下降趋势显著 ( $P < 0.05$ ), 发酵 3 d 时, 发酵的饲料中的大肠菌群只有  $3.90 \log\text{CFU}\cdot\text{g}^{-1}$ , 此时对照组中的大肠菌群活菌数处于较高的水平, 为  $9.01 \log\text{CFU}\cdot\text{g}^{-1}$ 。霉变处理的对照组 AFB1 含量平均达到  $22.46 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 经过混菌发酵处理的试验组含量平均还有  $4.32 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 与正常全价料中的 AFB1 含量 ( $5.63 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 相比差异显著 ( $P < 0.05$ )。结果表明, 中度霉变全价饲料经混菌发酵处理可以显著降低其 pH, 抑制其中杂菌的生长, 同时有效地降低霉菌毒素含量。

**关键词:** 固态发酵; 霉变全价饲料; 微生物类群; AFB1

中图分类号: S816.6

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2015)02-0223-05

### Characteristics of the mixed solid-state bacteria fermented moldy complete feed

HAN Xin, CHEN Maoji, WU Chao, YANG Jun, LIU Junchao

(School of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230001)

**Abstract:** The moldy complete feed was inoculated with the mixed bacteria (lactic acid bacteria: yeast: *Bacillus subtilis* in the proportion of 3%:1%:3%) and fermented at 35℃ for 5 days in a material/water ratio of 1:0.6 at pH 7.0. The changes of pH and microbial populations of the feed were measured during the fermentation period. The dynamic changes of lactic acid bacteria, yeast, *Bacillus subtilis* and *E. coli* were also measured with a selective medium. The changes of AFB1 in the moldy complete feed before and after fermentation were finally determined using enzyme-linked immunosorbent assay. The results showed that the fermented feed pH decreased to 4.30 after fermentation for 72 h, which was significantly lower compared to the control ( $P < 0.05$ ). The viable cell count of lactic acid bacteria rapidly increased during the fermentation period and reached to  $9.86 \log\text{CFU}\cdot\text{g}^{-1}$  and above because of the rapid proliferation of the inoculated lactic acid bacteria, which was consistent with the pH change of the fermented feed; the inoculated yeast proliferated moderately, which reached the peak after fermentation for 3 days, and then decreased gradually; the inoculated *Bacillus subtilis* proliferated rapidly, which reached the maximum after fermentation for 3 days and then decreased rapidly. At the end of fermentation, fungal number dropped from 5.31 to 2.92  $\log\text{CFU}\cdot\text{g}^{-1}$ . Compared to the control group, viable fungi and coliform bacteria number in the fermentation group all decreased significantly after fermentation for 3 days ( $P < 0.05$ ); compared to viable coliform bacteria cells of 9.01  $\log\text{CFU}\cdot\text{g}^{-1}$  in the control group, the number in the experimental group was only 3.90  $\log\text{CFU}\cdot\text{g}^{-1}$  after fermentation for 3 days. AFB1 content in mold contaminated feed and fermented feed was 22.46 and 4.32  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , respectively,

收稿日期: 2014-03-25

基金项目: 国家自然科学基金 (30871812) 资助。

作者简介: 韩 信, 硕士。E-mail: 1903303451@qq.com

\* 通信作者: 程茂基, 博士, 教授。E-mail: chengmaoji@ahau.edu.cn

which were significantly different from that in the normal complete feed ( $5.63 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) ( $P < 0.05$ ). The results showed that the pH of the moderate moldy complete feed treated with the mixed bacteria fermentation can be decreased significantly, the growth of infectious microbes can be inhibited, and the mycotoxin content in the contaminated complete feed can be effectively reduced.

**Key words:** solid-state fermentation; moldy complete feed; microbial population; AFB1

霉菌在自然界中种类繁多, 其中有许多霉菌能够在粮食、乳品、水果、蔬菜、牧草和饲料上迅速生长并使其发霉变质。据联合国粮农组织 (FAO) 统计表明, 全世界约有 25% 谷物不同程度受到霉菌毒素侵害。世界卫生组织统计资料表明, 全世界每年损失的食品和饲料约占总产量的 20%, 其中一半以上是由霉菌造成的, 亚洲和拉丁美洲的损失率高达 50%。我国饲料工业起步相对较晚, 霉菌污染造成的损失相对更大。因此, 霉菌毒素污染已经成为我国乃至全球共同关注的问题。大量研究证明, 微生物发酵过程中与饲料中杂菌竞争营养物质<sup>[1]</sup>, 同时产生有机酸 (乳酸、乙酸等) 降低全价饲料的 pH, 产生具有抑菌或杀菌效果的肽抗生素, 如细菌素, 有效地抑制病原微生物滋生, 减少有害微生物数量, 并且能生成可以水解细菌毒素的酶类物质<sup>[2-3]</sup>。微生物发酵后的全价饲料, 具有良好的适口性, 同时乳酸菌产生的各种促进动物消化吸收的活性物质, 可以显著地提高饲喂动物的生产性能<sup>[4-5]</sup>。另外, 饲料中的有益微生物活菌进入动物肠道后, 使动物肠道中有益菌数量增加, 促进肠道内形成有益优势菌群, 从而竞争性抑制病原微生物增殖, 保持肠道内微生态平衡, 同时对机体的调节免疫产生积极影响, 提高动物免疫力<sup>[6-8]</sup>。本试验研究了以乳酸菌、酵母菌、枯草芽孢杆菌混合菌种发酵霉变全价饲料过程中 pH、主要微生物类群及 AFB1 的变化, 为混菌发酵霉变全价饲料中应用提供数据支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

乳酸菌 ANCLA01、酵母菌、枯草芽孢杆菌均为安徽农业大学动物科技学院动物营养与饲料实验室保存。140 mm × 200 mm 真空包装袋 (市售); 全价饲料配方见表 1 (参照美国 NRC 1998 仔猪营养需要量配制基础日粮)。

### 1.2 主要试剂和仪器

主要试剂: MRS 培养基、土豆培养基(PDA)、牛肉膏蛋白胨培养基(NA)、麦康凯琼脂固体培养基、SS 琼脂固体培养基。

主要仪器: pH 计(雷磁 PHS-3C, 上海精密科学仪器有限公司), 超净工作 (SW-CJ-2D, 苏州净化

设备有限公司), 离心机 (LG10-2-4A, 北京医用离心机厂), 紫外可见分光光度计 (UV-2100, 尤尼柯上海仪器有限公司), 黄曲霉毒素 B1 (AFB1) ELISA 快速检测试剂盒 (Cusabio Biotech Co., Ltd)。

表 1 试验饲料组成和营养水平 (干物质基础)  
Table 1 Composition and nutrient levels of the experimental diet (DM basis)

日粮组成 Ingredient	含量 Content
玉米/% Corn	53
豆粕/% Soybean meal	20
碎米/% Rice	10
乳清粉/% Whey	5
鱼粉/% Fishmeal	4
蔗糖/% Sucrose	4
预混料 Premix	4
小计/% Total	100
营养水平 Nutrient level	
消化能/MJ·kg <sup>-1</sup> DE	13.95
粗蛋白/% CP	18.2
钙/% Ca	0.85
总磷/% P	0.63
赖氨酸/% Lys	1.1
蛋+胱氨酸/% Met+Cys	0.63

### 1.3 试验方法

**1.3.1 霉变全价饲料的预处理及发酵饲料的制作**  
按照饲料营养配方配好后放置于屋内 20 d, 温度控制在 25℃, 适合于霉菌的生长。向混合均匀的霉变全价饲料中加入蒸馏水, 使饲料含水量达到 38%。向霉变全价饲料中接种乳酸菌: 酵母菌: 枯草芽孢杆菌 (3%:1%:3%), 充分混匀。准确称取 50 g 霉变全价饲料于真空包装袋中, 将包装袋压实以尽量排空空气, 用封口机将包装袋封口, 35℃ 发酵。每组 3 个平行, 并做空白对照试验。

**1.3.2 发酵霉变全价饲料 pH 及活菌数的测定**  
pH 的测定: 全价饲料发酵期间, 在 0、8、16、24、32、40、48、56、64 和 72 h 分别取样测定其 pH, 平行试验重复 3 次, 取平均值。

微生物活菌数的测定: 从密封袋中准确称取 10 g 发酵样品于 250 mL 灭菌三角瓶中, 加入 90 g 灭菌蒸馏水, 置于摇床上 160 r·min<sup>-1</sup> 摇动 15 min, 取 0.5 mL 稀释液用灭菌蒸馏水稀释至一定倍数时, 采

用各选择培养基,对乳酸菌、酵母菌、枯草芽孢杆菌、霉菌、大肠杆菌进行选择计数。其中:乳酸菌的选择培养,采用 MRS 琼脂培养基,平板倾注,30℃厌氧培养 48 h;酵母菌和霉菌的选择培养,采用土豆葡萄糖琼脂(PDA)培养基(含 0.09%的酒石酸),涂布,30℃培养 48 h;枯草芽孢杆菌的选择培养,采用牛肉膏蛋白胨琼脂培养基,涂布,30℃培养 48 h;大肠杆菌的选择培养,采用麦康凯琼脂培养基,涂布,30℃培养 24 h。

**1.3.3 AFB1 含量测定** 采用黄曲霉毒素 B1 (AFB1) ELISA 快速检测试剂盒机测定。采用酶联免疫竞争法检测 AFB1 含量。首先用 AFB1 偶联物包被微孔板,然后加入待测样品、辣根过氧化物酶标记 AFB1 以及抗 AFB1 抗体,有力 AFB1 与辣根过氧化物酶标记 AFB1 竞争结合抗 AFB1 抗体,再向反应孔中加入相应的反应底物,作用一定时间后,结合的酶结合物将显色剂转化为蓝色,转化为最终的黄色。颜色的深浅和样品中有力 AFB1 呈负相关。用酶标仪在 450 nm 测定吸光度(OD 值),计算样品浓度。将系列 AFB1 标准溶液(0、0.1、0.25、0.5、1 和 2 ng·mL<sup>-1</sup>)测得的吸光度 A 值,绘制成标准曲线( $y = -0.1688x + 0.9668$ ,  $R^2 = 0.9951$ )。横坐标为标准溶液浓度的常用对数值(lgC),纵坐标为各标准液孔 A 值与 0 ng·mL<sup>-1</sup>标准液孔 A 值的比值。计算待测样品孔 A 值与 A (0 ng·mL<sup>-1</sup>)的比值(A 样品/A (0 ng·mL<sup>-1</sup>)),查标准曲线,可得到相应待测样液浓度(C)的常用对数值 lgC,对其求反对数,可求得待测样液的 AFB1 浓度 C。按下列公式计算出样品中 AFB1 含量:

$$\text{AFB1 含量}/\text{ng}\cdot\text{g}^{-1} = C \times (V/m) \times D$$

式中: C 为待测样液中 AFB1 含量(ng·mL<sup>-1</sup>); V 为样品提取液体积 (mL); m 为样品质量 (g); D 为样品稀释倍数。

## 1.4 数据处理

数据处理与分析使用 SAS 软件,进行方差分析与多重比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 霉变饲料发酵过程中 pH 的变化

在混菌发酵霉变饲料过程中(以不接种混菌的霉变饲料作为对照),发酵期间 pH 的变化如图 1 所示。混菌发酵组 pH 下降明显,其中混菌发酵组 pH 在 24 h 后呈现明显的下降趋势,在发酵 72 h 时达到 4.30,混菌发酵组 pH 在发酵 36 h 时相对于对照组下降显著,在发酵 72 h 时 pH 分别为 4.30,显著低于空白对照( $P < 0.05$ )。由图 1 可以发现,随着发酵的深

入, pH 下降趋缓,最终基本维持在平稳的水平。这是由于随着 pH 的降低和营养物质主要是可溶性碳水化合物的消耗,菌体活性受到抑制,产酸能力降低。

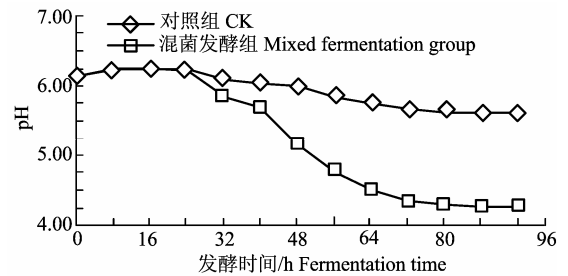


图 1 对照组和混菌发酵组发酵期间 pH 的变化  
Figure 1 The changes of pH during the control group and the mixed fermentation group

pH 是衡量发酵饲料质量的一项重要指标, pH 迅速下降到 4.0 左右,从而抑制其他微生物的繁殖。动物采食酸化饲料后,可使胃内 pH 下降,从而激活胃蛋白酶原转化为胃蛋白酶,促进蛋白质的分解,提高幼龄动物对饲料的利用率。

### 2.2 霉变饲料发酵过程中主要微生物类群的变化

**2.2.1 乳酸菌、酵母菌、枯草芽孢杆菌在发酵过程中的动态变化** 应用选择培养基对发酵霉变饲料中乳酸菌的动态变化进行测定,结果如图 2 所示,乳酸菌的活菌数在发酵期间迅速增加,接种的乳酸菌在发酵中快速增殖,达到(9.86±0.13) logCFU·g<sup>-1</sup>以上,这与发酵产品 pH 变化基本一致,正是由于乳酸菌在快速增殖过程中产生了大量的酸类物质,从而使 pH 快速下降。酵母菌的生长变化比较平和,3 d 内达到生长高峰,而后逐渐下降。枯草芽孢杆菌在发酵中迅速增殖,在发酵 3 d 左右达到最大,而后又迅速下降。

**2.2.2 霉菌在发酵过程中的动态变化** 从图 3 可看出,发酵结束时,霉菌含量从(5.31±0.07) logCFU·g<sup>-1</sup>下降到(2.92±0.03) logCFU·g<sup>-1</sup>。发酵 3 d 时,相比于对照组,试验组中霉菌活菌数下降显著( $P < 0.05$ )。在发酵的第 3 天,试验组中的霉菌活菌数只有(3.63±0.04) logCFU·g<sup>-1</sup>,而此时对照组中的霉菌活菌数仍处在较高水平,为(5.32±0.06) logCFU·g<sup>-1</sup>。

**2.2.3 大肠杆菌在发酵过程中的动态变化** 霉变饲料发酵过程中的大肠菌群的活菌数变化如图 4 所示。相比对照组,试验组发酵饲料中的大肠菌群活菌数下降趋势显著( $P < 0.05$ ),发酵 3 d 时,发酵的饲料中的大肠菌群只有(3.90±0.05) logCFU·g<sup>-1</sup>,此时对照组中的大肠菌群活菌数处于较高的水平,为(9.01±0.07) logCFU·g<sup>-1</sup>。

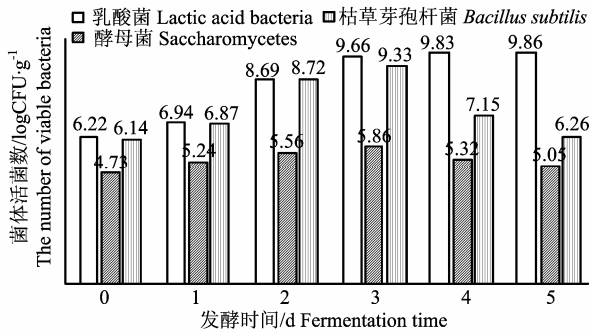


图 2 霉变全价饲料在发酵过程中 3 种菌的动态变化  
Figure 2 Dynamic changes of the three bacteria in the moldy complete feed during fermentation process

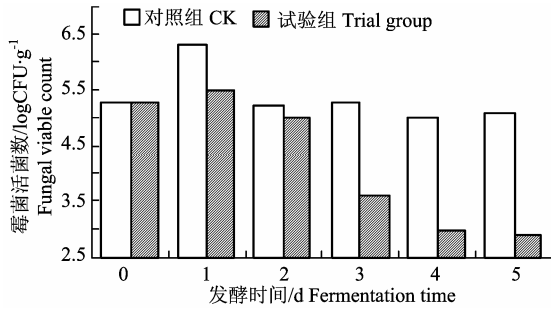


图 3 霉变全价饲料在发酵过程中霉菌的动态变化  
Figure 3 Dynamic changes of mould in the moldy complete feed during fermentation process

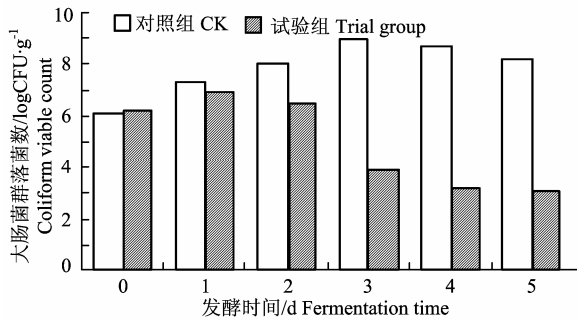


图 4 霉变全价饲料在发酵过程中大肠杆菌的动态变化  
Figure 4 Dynamic changes of *E. coli* in the moldy complete feed during fermentation process

### 2.3 霉变全价饲料发酵过程中霉菌毒素含量的测定结果

从图 5 可以看出, 发酵期间, AFB1 含量下降显著。从初期含量 (22.46±0.09) μg·kg<sup>-1</sup> 下降到 (4.32±0.05) μg·kg<sup>-1</sup>, 差异显著 (P<0.05)。经过发酵处理的霉变全价饲料 AFB1 含量下降到国家允许的范围内 (<10.00 μg·kg<sup>-1</sup>)。并且在发酵第 3 天 AFB1 含量下降趋势最大, 这与在发酵第 3 天时 pH 和乳酸菌活菌数的变化一致。pH 的急剧变化, 不适应霉菌的生长, 从而抑制霉菌的生长, 从源头上抑制霉菌毒素的形成, 有益微生物的大量增殖, 一部分菌体能够吸附霉菌毒素, 再加上其产生的抑菌物质和代谢产物更好的降低了霉菌毒素的含量。

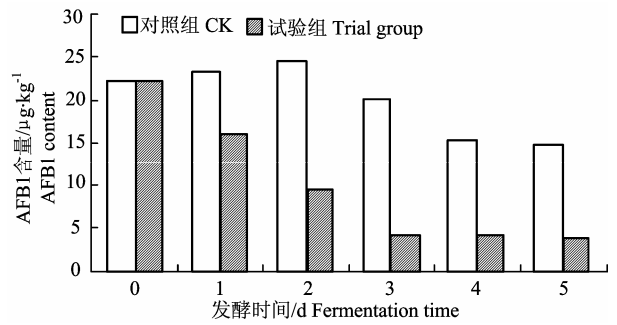


图 5 霉变全价饲料在发酵过程中霉菌毒素含量的变化  
Figure 5 Mycotoxin change in the moldy complete feed during the fermentation process

## 3 讨论

### 3.1 混菌发酵霉变全价饲料过程中 pH 的变化

在霉变全价饲料中接种混菌进行发酵能够明显降低饲料的 pH。在发酵 0~48 h 时 pH 降低缓慢, 这是由于包装袋中存有氧气, 菌体大量繁殖, 还没有进入发酵期。48~72 h 里 pH 下降迅速, 这是由于袋中的氧气消耗殆尽, 菌体开始进入无氧发酵期, 大量的产生乳酸, 导致 pH 迅速下降。实验结束时接种混菌发酵霉变全价饲料组的 pH 低于对照组, 说明混菌发酵有较好的促进作用。

### 3.2 混菌发酵霉变全价饲料过程中活菌数的变化

在霉变全价饲料中接种混菌后, 对其中的大肠菌群、霉菌有良好的抑制效果。发酵初期, 饲料中微生物开始大量增殖, 消耗了饲料环境中的少量氧气, 使饲料中的厌氧程度逐渐增强, 促进了乳酸菌的生长, 对其中好氧细菌有抑制作用。同时发酵霉变饲料中乳酸菌在发酵 3 d 左右达到 9.66 logCFU·g<sup>-1</sup> 以上, 在饲料中形成绝对的优势, 乳酸菌的代谢过程中产生大量的酸性物质, 使发酵组在发酵 3 d 左右 pH 达到 5.0 以下, 有效的抑制了饲料中不耐酸的菌种如梭状芽孢杆菌、霉菌、大肠菌群的生长, 并且由于乳酸菌的优势菌群地位, 与酵母菌争夺饲料中糖分的过程中, 抑制酵母菌的增殖。乳酸菌在代谢过程中还产生的一些抑菌物质 (如乳酸、过氧化氢、乙醛等), 较好的抑制甚至杀灭饲料中的杂菌。Elferink<sup>[9]</sup>研究也证实了这一点。蔡义民<sup>[10]</sup>的研究也证实, 在饲料中添加乳酸菌能够有效地抑制霉菌、酵母菌和一般细菌的繁殖。发酵组中对饲料中大肠菌群、霉菌抑制作用明显, 这主要是由于发酵过程中产生的抑菌物质造成的<sup>[11]</sup>, 再结合 pH 的变化情况也较好的说明了这一点。酵母菌菌体中含有丰富的蛋白质、B 族维生素、脂肪、糖、酶等多种营养成分。大量的应用研究实验证明, 酵母和芽孢杆

菌在提高动物免疫力、提高动物生产性能和减少应激等方面均起作用<sup>[12-13]</sup>, 同时菌体之间互有协同作用, 缩短了发酵的时间, 主要是由于乳酸菌利用乳糖发酵产生乳酸, 使发酵液的 pH 值有所降低, 适合酵母菌的生长代谢, 酵母菌的代谢加快, 因此生长速度开始加快, 可见乳酸菌和酵母菌有共生作用, 乳酸菌的加入会大大促进酵母菌的生长, 加快发酵速度。所以, 在评价发酵饲料的质量时, 不能简单的认为这两种菌越少越好。

### 3.3 霉变全价饲料发酵过程中霉菌毒素含量变化

混菌发酵降低霉菌毒素含量的主要机制有: ①混菌通过与霉菌竞争营养成分, 同时产生抑菌物质的方式直接抑制霉菌的生长, 从源头上抑制霉菌毒素的形成, 比如枯草芽孢杆菌产生的一大类脂肽类化合物伊枯草菌素以及抗霉枯草菌素等<sup>[14]</sup>, 它们都是由 7 个氨基酸残基组成的一个肽环, 它们对大多数霉菌具有强烈的抗菌能力。Nakayama 等研究表明, 某些枯草芽孢杆菌能产生抗菌物质伊枯草素 (Iturin)<sup>[15]</sup>。Ei-Nezami 等<sup>[16]</sup>利用培养基的方法研究了乳酸菌对霉菌生长和黄曲霉毒素形成的影响, 结果证实, 乳酸菌可以抑制霉菌的生长和毒素的形成。参照本实验中霉菌的活菌数变化可以发现, 混菌发酵可以很好抑制霉菌的生长, 从而控制毒素的形成; ②发酵菌体代谢过程中产生的代谢产物与霉菌毒素结合形成无毒或毒性较低的化合物, 从而降低霉菌毒素危害, 比如乳酸菌的代谢产物与 AFB1 结合形成无毒化合物来降低毒素含量; ③菌体可以吸附霉菌毒素, 形成菌体-黄曲霉毒素复合体, 降低霉菌毒素含量, 比如酵母菌细胞壁特有的吸附能力来稀释某些霉菌毒素。Kankaanpaa 等<sup>[17]</sup>研究证实, 在反应中有 90% 以上黄曲霉毒素结合在酵母菌细胞壁上。

## 4 结论

混菌发酵缩短了发酵时间, pH 下降明显。发酵期间乳酸菌的活菌数迅速增加, 接种的乳酸菌在发酵中快速增殖, 达到  $9.86 \log \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$  以上。酵母菌的生长变化比较平和, 3 d 内达到生长高峰, 而后逐渐下降。枯草芽孢杆菌在发酵中迅速增殖, 在发酵 3 d 左右达到最大, 而后又迅速下降。霉菌含量在发酵结束时, 从  $5.31 \log \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$  下降到  $2.92 \log \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ , 相比于对照组, 试验组中的霉菌活菌数下降显著 ( $P < 0.05$ )。发酵结束时, 大肠杆菌含量下降明显。

对于中度霉变饲料经过混菌发酵处理, 能有效降低霉菌毒素含量, 使其下降到允许的含量范围内。

## 参考文献:

- [1] Freter R. In vivo and in vitro antagonism of intestinal bacteria against *Shigella flexneri* II. the inhibitory mechanism[J]. The Journal of Infectious Diseases, 1962, 110: 38-46.
- [2] Buts J P. Exemple d'un médicament probiotique: Saccharomyces boulardii lyophilize[M]//Rambaud J C, Buts J P, Corthier G, et al. Flore microbienne intestinale. Montrouge: John Libbey Eurotext, 2004: 221-244.
- [3] Harris L J, Daeschel M A, Stiles M E, et al. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*[J]. Journal of Food Protection, 1989, 52(6): 384-387.
- [4] Bohmer B M, Kramer W, Roth-Maier D A. Dietary probiotic supplementation and resulting effects on performance, health status, and microbial characteristics of primiparous sows[J]. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 2006, 90(7/8): 309-315.
- [5] Tortuero F, Fernandez E. Effects of inclusion of microbial cultures in barley-based diets fed to laying hens [J]. Animal Feed Science and Technology, 1995, 78(12): 255-265.
- [6] Hong H A, Duc L H, Cutting S M. The use of bacterial spore formers as probiotics[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2005, 29(4): 813-835.
- [7] Bergogne-Berezin E. Treatment and prevention of antibiotic associated diarrhea[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2000, 16(4): 521-526.
- [8] Marteau P R, Vrese M D, Cellier C J, et al. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics[J]. American Journal of Clinical Nutrition, 2001, 73(2 Suppl): 430-436.
- [9] Oude Etferink S J, Krooneman J, Gottschal J C, et al. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1, 2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(1): 125-132.
- [10] Cai Y M, Kumai S, Fukumi R. Effect of lactic acid bacteria inoculants on fermentative quality of silage [J]. Scientia Agricultura Sinica, 1995, 28(2): 73-82.
- [11] 王旭明, 陈宗泽, 倪永珍, 等. EM 发酵饲料中主要微生物类群的动态变化[J]. 沈阳农业大学学报, 2002, 33(5): 363-366.
- [12] Jouany J P. Optimizing rumen functions in the close-up transition period and early lactation to dry matter intake and energy balance in cows [J]. Animal Reproduction Science, 2006, 96: 250-264.
- [13] Stella A V, Paratte R, Valnegri L, et al. Effect of administration of live *Saccharomyces cerevisiae* on milk production, milk composition, blood metabolites, and faecal flora in early lactating dairy goats [J]. Small Ruminant Research, 2007, 67(1): 7-13.
- [14] Deleu M, Paquot M, Nylander T. Fengycin interact ion with lipid monolayers at the air-aqueous interface implications for the effect of fengycin on biological membranes[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2005, 283(2): 358-365.
- [15] Fernando W G D, Nakayama, Zhang Y, et al. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary by *Pseudomonas* and *Bacillus* species on canolapetals[J]. Crop Prot, 2007, 26(2): 100-107.
- [16] Ei-Nezami H, Kankaanpaa P, Salminen S, et al. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food careinogen, aflatoxin B1[J]. Food and Chemistry Toxicology, 1998, 36(4): 321-326.
- [17] Kankaanpaa P, Tuomola E, Ei-Nezami H, et al. Binding of aflatoxin B1 alter the adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in a Caco-2 mode [J]. Journal of Food Protection, 2000, 63 (3): 412-414.