

梁亚男,姜军坡,王世英,等. Z-27 菌剂对猪舍空气 NH_3 、 H_2S 浓度及排泄物含氮量的影响[J]. 江苏农业科学,2019,47(5):148-153.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.05.037

Z-27 菌剂对猪舍空气 NH_3 、 H_2S 浓度及排泄物含氮量的影响

梁亚男,姜军坡,王世英,朱宝成,王 伟

(河北农业大学生命科学学院,河北保定 071001)

摘要:为验证微生态制剂 Z-27(以下简称 Z-27 菌剂)对猪舍空气中有有害气体减排的效果,选取 400 头 50 kg 左右健康杜长白三元杂交育肥猪,随机平均分为对照组和试验组,每组 1 栋猪舍,每栋 20 栏,每栏 10 头猪。对照组饲喂基础日粮,试验组在基础日粮中添加 0.1% Z-27 菌剂。试验共 15 d,期间检测猪舍空气中 NH_3 、 H_2S 浓度及细菌、大肠杆菌数量,测定猪粪和尿中总氮含量、氨态氮含量和 pH 值,检测粪尿混合物 NH_3 、 H_2S 的 48 h 排放量;观察每组腹泻情况,计算腹泻率;每组分出 3 栏(30 头)分别于试验开始和结束时空腹 12 h 称体质量并结算剩余料,计算均增质量和料质量比。试验结果表明,试验前期试验组各参数有一个渐变过程,7 d 后方能达到稳定,故以第 8 天(含)后的数据将试验组和对对照组进行比较。试验组猪舍空气中 NH_3 、 H_2S 含量比对照组分别下降 63.27%、54.61%,细菌、大肠杆菌总数比对照组分别下降 46.68%、59.89%;试验组猪粪总氮含量和氨氮含量比对照组分别下降 46.32%、65.83%,猪粪的 pH 值比对照组降低 0.54;试验组猪尿总氮含量和氨氮含量分别降低 26.47%、27.59%,尿液 pH 值比对照组降低 0.86;试验组新鲜粪尿混合物的 NH_3 、 H_2S 的 48 h 释放量比对照组分别下降 32.76%、35.69%;同时试验组均增质量比对照组提高 10.38%,料质量比降低 9.05%,腹泻率降低 60.06%。表明该菌剂具有降低育肥猪氮素排泄的作用,可从源头降低猪排泄物 NH_3 、 H_2S 等有害气体排放,还能够显著提高育肥猪的生长性能,防治腹泻。

关键词:微生态制剂;育肥猪;粪;尿; NH_3 ; H_2S

中图分类号: S816.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)05-0148-05

随着生猪养殖规模化和集约化程度的不断提高,猪粪尿产生的臭味气体对环境、养猪生产及人类的危害已引起人们的普遍关注^[1-2]。研究发现,环境对畜禽生产力的贡献率可达 30%~40%^[3-4]。降低粪尿污染、减少氮气(NH_3)和硫化氢(H_2S)等有害气体的产生与排放已成为发展养殖业的迫切需求,也是当前畜牧领域研究的热点之一^[5-6]。据测算,1 个年出栏 10 万头的猪场排放 NH_3 约 148 kg/h、 H_2S 约 13.5 kg/h,污染半径达 5 km^[7]。为此我国规定保育猪舍、哺乳猪舍 NH_3 含量不超过 20 mg/m³, H_2S 的含量不超过 8 mg/m³,其他阶段要求猪舍 NH_3 含量不超过 25 mg/m³, H_2S 含量不超过 10 mg/m³^[8]。

为了降低猪舍臭味气体的浓度,可以采取通风换气、饲料中添加吸附性除臭剂、氨基酸平衡日粮^[9]、降低饲料粗蛋白水平^[10]、定期清理圈舍粪便及使用气体吸附剂等措施。饲喂

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)等微生物可以在肠道或在体外起到降低臭味气体排放的作用^[11,12],利用微生物的生理代谢作用减少臭味气体的产生,具有效率高、无二次污染等优点,已成为当前治理臭气的重要途径之一^[12]。枯草芽孢杆菌 Z-27 菌株是笔者所在研究室以产蛋白酶等多种消化酶和抑制腹泻病原菌等为主要筛选指标,从健康猪粪便中分离得到的^[13-14]。本研究将 0.1% Z-27 菌剂添加至育肥猪饲料中,现场检测猪舍空气中 NH_3 、 H_2S 的浓度,测定粪、尿中总氮含量、氨氮含量和 pH 值,测定新鲜粪尿混合物的 NH_3 、 H_2S 释放量,检测猪舍空气中的细菌和大肠杆菌数量,综合考察该菌剂对猪舍内环境的影响。

1 材料与方法

1.1 菌剂和培养基

Z-27 饲用微生态制剂为枯草芽孢杆菌制剂,活菌(芽孢)含量为 1.0×10^{10} CFU/g,由河北农业大学生命科学学院制药工程系研制,河北众邦生物技术有限公司生产提供。简称 Z-27 菌剂。

营养琼脂(NA)培养基参见文献[15]。用于计数猪舍空气中的细菌数量。

伊红美蓝(EMB)琼脂培养基参见文献[16],用于鉴别、计数猪舍空气中大肠杆菌数量。

1.2 主要仪器

便携式智能环境气体检测仪,可同时记录空气中的 NH_3

收稿日期:2017-12-21

基金项目:河北省石家庄市科学技术研究与发展计划(编号:151500062A);教育部、河北省教育厅“生物技术”专业综合改革试点项目(编号:201202);河北省高等学校科学技术研究项目(编号:Z2015037)。

作者简介:梁亚男(1994—),女,河北张家口人,主要从事饲用益生菌研究。E-mail:865872710@qq.com。

通信作者:王世英,教授,主要从事农牧微生物研究。E-mail:wsy99999@126.com。

浓度、 H_2S 浓度、 CO_2 浓度、温度、湿度等数值。 NH_3 、 H_2S 的检测量程均为 0~100 $\mu\text{L/L}$,分辨率为 1 $\mu\text{L/L}$ 。

1.3 试猪分组和管理

饲喂试验于 2017 年 12 月 1—15 日在保定市侯村大庄养殖有限公司进行,共 15 d。按体质量、日龄相近的原则,选取 400 头 50 kg 左右健康杜长白三元杂交育肥猪,随机平均分为对照组和试验组,每组 1 栋猪舍,每栋 20 栏,每栏 10 头猪。对照组饲喂基础日粮(河北方田饲料有限公司提供的 T3-25A 通用型猪用 25% 浓缩料,配以 68% 玉米粉和 7% 麸皮),试验组饲喂的基础日粮中添加 0.1% Z-27 菌剂。每栋猪舍整体东西长约 100 m,南北宽约 10 m,猪栏分列南、北 2 排,每排 10 个猪栏,中间为约 1.5 m 的过道。在猪舍顶部设有主动通风换热系统,由带夹层的管道和排风扇组成,试验期间 2 组均正常开启。采用人工干清粪,每天 08:00—09:00 清粪 1 次。每天定时添料,旋转式漏料器和挤压式饮水器可以使猪自主采食、饮水。每天 08:00 观察记录 2 组(栋)猪舍温度,温度计放在猪舍中间和东西两头,离地面高度 0.7 m。2 组在其他管理方面保持一致。

1.4 猪粪、尿样品的采集

每天采集猪粪样品于灭菌牛皮纸袋,每组(栋)至少取 3 个栏,每栏至少取 3 头猪的粪便;分别于试验开始后 0、3、6、9、12、15 d 早晨(猪刚睡醒后)采集猪尿,每组(栋)至少取 3 个栏,每栏至少取 3 头猪的尿样。粪尿样品采集后及时送至河北农业大学制药工程系实验室进行相关检验。

1.5 猪舍空气中 NH_3 、 H_2S 浓度现场检测

在猪舍中轴线上,等间距选取 3 个点,分别位于东、中(过道中间)、西(猪舍门附近),垂直方向 2 个,分别为接近地面和距离地面 1.0 m。每天测 NH_3 、 H_2S 浓度 3 次,即 07:00—08:00、13:00—14:00、19:00—20:00 各测 1 次。测定前猪舍门窗呈关闭状态,将监测仪置于空气中,等数据稳定后记录并取平均值。

1.6 猪舍空气中细菌和大肠杆菌数量的检测

分别于试验开始后 0、3、6、9、12、15 d 上午清粪前按照文献[15]中的自然沉降法进行,具体做法如下。

选择 5 个采样点,即室内墙角对角线交点为 1 个采样点,该交点与 4 个墙角连线的中点为另外 4 个采样点。采样高度为 1.2~1.5 m。采样点均远离墙壁 1 m 以上,并避开了空调、门窗等空气流通处。将 NA 培养基平板置于采样点处,打开皿盖,暴露 5 min,盖上皿盖,翻转平板,置 $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ 恒温箱中,培养 48 h,计数每块平板上生长的菌落数,求出每天全部 5 个采样点的平均菌落数,以此代表该日猪舍空气中细菌总数。以每皿菌落数(CFU/皿)报告结果。

利用 EMB 培养基平板按以上步骤操作后,选择 30~300 菌落的平板,根据菌落大小、颜色、边缘、表面及透明度等计数可疑菌落数,然后按照文献[17]中的第一法大肠杆菌最大或然数(most probable number,简称 MPN)计数确认大肠杆菌数量。求出当天全部 5 个采样点的平均大肠杆菌菌落数,以此代表该日猪舍空气中大肠杆菌总数。以每皿菌落数(CFU/皿)报告结果。

1.7 猪粪和猪尿总氮、氨氮含量和 pH 值检测

1.7.1 总氮含量测定

每天分别称取对照组和试验组新鲜粪样各 3 份,每份 1.0 g,采用凯氏定氮法进行总氮含量测定;量取 2 组新鲜尿液各 3 份,每份 5.0 mL,采用凯氏定氮法进行总氮含量测定。称取样品的总氮量应该在 30~300 mg 范围内。

1.7.2 氨态氮含量测定 采用文献[17]所述方法原理进行检测,具体步骤为称取对照组和试验组粪样各 3 份,每份 1.0 g,分别加蒸馏水稀释至 10 倍。置于离心管中,5 000 r/min 离心 5 min,上清液即为粪便待测液。

取适量体积(使 $D_{420\text{nm}}$ 在 0.25~0.65 之间)的粪便待测液或新鲜尿液,加蒸馏水至 10 mL,加入 0.50 mL 酒石酸钾钠溶液,摇匀,再加入 0.50 mL 纳氏试剂,摇匀,放置 10 min 后,在 $D_{420\text{nm}}$ 时,用 10 mm 比色皿,以水为参比,测定吸光度。通过标准曲线换算并以绝干含量报告粪便试验结果。猪粪绝干物质含量测定采用文献[18]所述方法进行含水量测定后再进行换算。

1.7.3 pH 值检测 每天称取对照组、试验组猪粪样品各 3 份,每份 2.5 g,加 10.0 mL 蒸馏水,充分混合,利用雷磁 PHS-3C 酸度计测定 pH 值。利用酸度计直接测定猪尿液的 pH 值。

1.8 新鲜猪粪尿混合物 NH_3 、 H_2S 的 48 h 释放量检测

将试验组 1 h 内的新鲜粪便,与等质量的新鲜猪尿充分混匀,准确称取 50.0 g 装入 250 mL 三角瓶中,25 $^\circ\text{C}$ 密封静置,48 h 后抽取三角瓶中 50 mL 的气体,以小于 0.005 L/min 的速度注入 0.005 mol/L 的 H_2SO_4 和 0.005 mol/L 的碘溶液中吸收,分别采用纳氏比色法^[17]和碘量法^[19]测定粪尿中 NH_3 和 H_2S 的释放量。对照组猪粪尿作同样的处理和检测。

1.9 Z-27 菌剂对猪生长性能的影响

于试验开始(0 d)和试验结束(15 d)的 08:00—09:00 分别对试验组 3 个栏和对照组 3 个栏的猪进行称质量。称质量方法为将数只猪放进专用铁车,在地磅上称取总质量后减去运送车的质量即为数只猪的总质量。每天记录这 6 栏猪的采食量,观察并记录猪的腹泻和健康情况。

1.10 数据记录及处理

试验数据采用 Excel 软件整理,SPSS 18.0 软件进行单因素方差分析,LSD 法进行组间差异显著性检验。数据以“平均数 \pm 标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 猪舍温度变化

猪舍内 NH_3 、 H_2S 浓度与舍内温度有一定的关系。在冬季温度越高粪尿中的微生物越活跃,生成 NH_3 和 H_2S 越快,生成的臭味气体也越容易挥发。试验组、对照组猪舍的温度随时间变化见图 1。

从图 1 可以看出,试验组猪舍、对照组猪舍的温度基本一致,对 2 组 NH_3 、 H_2S 的生成和挥发没有影响,也不会影响 2 组猪舍的 NH_3 、 H_2S 浓度。

2.2 Z-27 菌剂对猪舍空气中 NH_3 、 H_2S 浓度的影响

2.2.1 Z-27 菌剂对猪舍空气中 NH_3 浓度的影响 在猪舍过道东、中、西 3 个点,分别测定接近地面和距离地面 1.0 m 的 NH_3 浓度,每天分时段测 3 次,记录得到 18 个数据并取平均值,作为当天该栋猪舍的 NH_3 浓度, NH_3 浓度变化见图 2。

饲料中添加 Z-27 菌剂后,在试验开始的 7 d 内,随着时间的推移,试验组的 NH₃ 浓度逐渐降低,7 d 后达到较低水平,之后基本保持稳定,而对照组在整个试验的 15 d 内 NH₃ 浓度均保持高位水平。

根据以上规律和试验后 8~15 d 数据,试验组后期的空气中平均 NH₃ 浓度为 16.77 μL/L 比对照组 6.16 μL/L 降低了 63.27%。

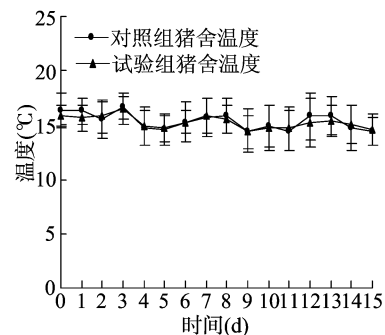


图1 试验期间 2 栋猪舍温度变化

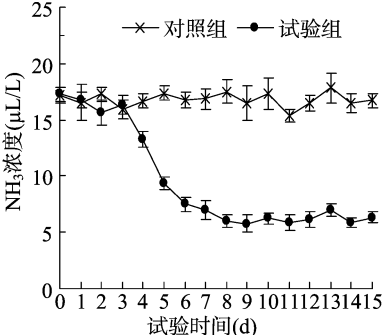


图2 Z-27 菌剂对猪舍 NH₃ 浓度的影响

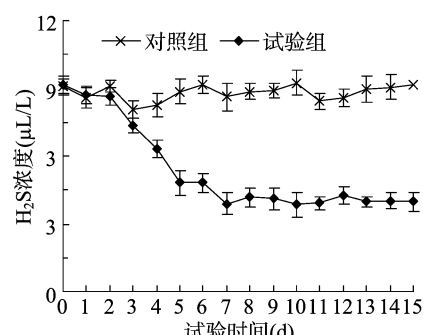


图3 Z-27 菌剂对猪舍空气中 H₂S 浓度的影响

通过对试验后 8~15 d 猪舍内 H₂S 浓度数据的计算,试验后期试验组空气中 H₂S 平均浓度为 8.90 μL/L,比对照组 4.04 μL/L 降低了 54.61%。

2.3 Z-27 菌剂对猪舍空气中细菌和大肠杆菌数量的影响

Z-27 菌剂具有抑制腹泻病原菌的作用,对猪肠道中不

2.2.2 Z-27 菌剂对猪舍空气中 H₂S 浓度的影响 取得到的 18 个数据的平均值,作为当天该栋猪舍的 H₂S 浓度。试验结果见图 3。饲料中添加 Z-27 菌剂后,猪舍内 H₂S 浓度的变化规律与 NH₃ 浓度的变化规律基本相同,即在试验开始的 7 d 内,随着时间的推移,试验组的 H₂S 浓度逐渐降低,7 d 后达到较低水平,之后基本保持稳定,而对照组在整个试验的 15 d 内 H₂S 浓度均保持高位水平。

同的菌群产生促进或抑制作用,势必会对猪舍空气中的不同微生物数量产生影响。利用 NA 平板、EMB 平板结合 MPN 计数法,对猪舍空气中细菌、大肠杆菌总数进行检测。均以 CFU/皿为单位报告结果,试验结果见表 1、表 2。

表 1 Z-27 菌剂对猪舍空气中细菌总数的影响

处理	细菌总数(CFU/皿)						后 3 次平均值
	0 d	3 d	6 d	9 d	12 d	15 d	
对照组	489 ± 55a	502 ± 72b	465 ± 69B	491 ± 47B	562 ± 68B	483 ± 49B	512 ± 55.0B
试验组	526 ± 23a	418 ± 37a	305 ± 65A	281 ± 28A	268 ± 31A	270 ± 17A	273 ± 25.3A

注:同列数据后不同小写、大写字母分别表示差异显著($P < 0.05$)、极显著($P < 0.01$)。表 1~表 8 同。

表 2 Z-27 菌剂对猪舍空气中大肠杆菌数量的影响

组别	大肠杆菌数量(CFU/皿)						后 3 次平均值
	0 d	3 d	6 d	9 d	12 d	15 d	
对照组	18.6 ± 3.2a	17.5 ± 1.5a	17.1 ± 2.3b	16.7 ± 1.7B	18.4 ± 0.5B	17.9 ± 1.6B	17.7 ± 1.3B
试验组	17.3 ± 1.6a	16.7 ± 0.6a	9.5 ± 0.5a	7.4 ± 0.9A	6.6 ± 1.1A	7.3 ± 0.4A	7.1 ± 0.8A

从表 1、表 2 后 3 次平均值可得出,试验组猪舍空气中细菌总数、大肠杆菌总数比对照组分别降低 46.68% ($P < 0.01$)、59.89% ($P < 0.01$)。

2.4 Z-27 菌剂对猪粪总氮含量、氨氮含量和 pH 值的影响

2.4.1 Z-27 菌剂对猪粪总氮含量的影响 采用凯氏定氮法进行试验组、对照组猪粪残留总氮含量的检测,换算成绝干含量并取其平均值作为 2 个组当天猪粪总氮含量。试验期间猪粪总氮含量的变化见图 4。试验后 7 d 试验组猪粪总氮含量逐渐降低,7 d 后基本稳定。从 8~15 d 2 组数据可知,试验组猪粪总氮平均含量(1.46 ± 0.15)% 比对照组(2.72 ± 0.19)% 降低 46.32%。这应该与 Z-27 菌剂在猪肠道中利用肠道内环境生长繁殖,同时产生蛋白酶提高饲料蛋白的利用率有关。

2.4.2 Z-27 菌剂对猪粪氨氮含量的影响 将每天试验组、对照组的数据分别取平均数并换算成绝干含量,即为当天 2 组猪粪的氨氮含量。从图 5 可以看出,试验 7 d 试验组猪粪

氨氮含量逐渐降低,7 d 后基本稳定。从 2 组猪粪氨氮含量数据可知,8~15 d 试验组猪粪平均氨氮含量为 3.01 g/kg 比对照组 8.81 g/kg 降低 65.83% ($P < 0.01$)。猪粪中氨氮含量的高低直接关系到从猪粪中 NH₃ 的挥发量,试验结果表明,Z-27 菌剂能够极显著降低猪粪中氨氮的含量。

2.4.3 Z-27 菌剂对猪粪 pH 值的影响 猪粪的 pH 值高低会影响 NH₃、H₂S 等有害气体从猪粪中的溢失速度和挥发量。利用酸度计每天测定试验组、对照组猪粪 5 倍稀释液的 pH 值,并分别计算平均 pH 值,以此代表当天 2 组猪粪的 pH 值。试验期内 2 组粪便 pH 值变化规律见图 6。试验初期试验组猪粪的 pH 值与对照组相比有一个逐渐降低的趋势,到试验中后期试验组猪粪的 pH 值基本保持稳定。因此,以 8~15 d 的平均 pH 值数据相比较,试验组猪粪的 pH 值比对照组降低 0.54,比对照组降低了 7.65% ($P < 0.05$)。pH 值降低使猪粪中以 NH₄⁺ 形式存在的氮素得以保留,不利于 NH₃ 的形成和挥发,对降低猪舍内 NH₃ 浓度有一定作用。

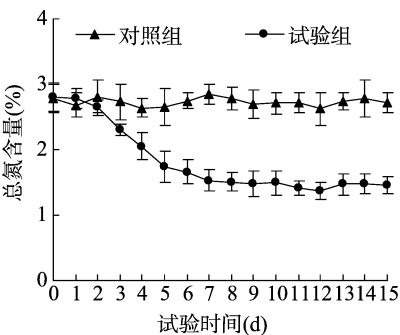


图4 Z-27 菌剂对猪粪总氮含量的影响

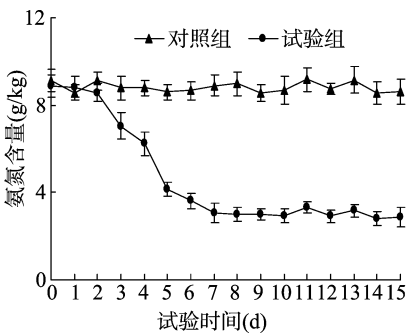


图5 Z-27 菌剂对猪粪氨氮含量的影响

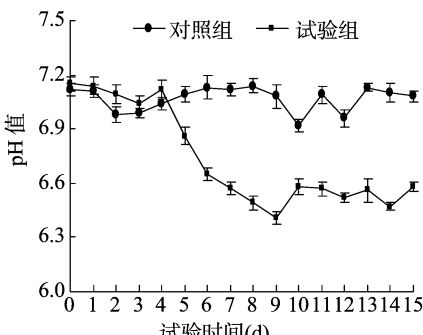


图6 Z-27 菌剂对猪粪 pH 值的影响

2.5 Z-27 菌剂对猪尿总氮含量、氨氮含量及 pH 值的影响

2.5.1 对猪尿总氮含量、氨氮含量的影响 试验期间共采猪尿样 6 次,每次每组至少采尿样 9 个。测定每个猪尿样品总氮含量、氨态氮含量,2 组样品分别取平均数作为当天该组猪尿的总氮含量、氨氮含量。从猪舍气体含量和猪粪含氮量等试验结果,饲喂 Z-27 菌剂后,其作用有一个逐渐提高的过

程,需要在 7 d 后达到最好且稳定下来。根据这一规律,为了体现试验组、对照组的区别,笔者所在课题组取最后 3 次(9、12、15 d)数据的平均值进行比较,结果见表 3、表 4。Z-27 菌剂对 2 组猪尿总氮含量、氨氮含量的影响按后 3 次平均值进行比较,试验组猪尿总氮含量比对照组降低 26.47% ($P < 0.05$),氨氮降低 27.59% ($P < 0.05$)。

表 3 Z-27 菌剂对猪尿总氮含量的影响

组别	总氮含量(g/L)					
	0 d	3 d	6 d	9 d	12 d	15 d
对照组	7.07 ± 0.63a	7.85 ± 0.35a	6.93 ± 0.27a	7.02 ± 0.58b	6.84 ± 0.48b	7.10 ± 0.29b
试验组	7.05 ± 0.43a	6.84 ± 0.36a	6.33 ± 0.72a	5.15 ± 0.28a	5.09 ± 0.30a	5.18 ± 0.27a

表 4 Z-27 菌剂对猪尿氨氮含量的影响

组别	氨氮含量(g/L)					
	0 d	3 d	6 d	9 d	12 d	15 d
对照组	0.38 ± 0.08a	0.29 ± 0.20a	0.32 ± 0.16b	0.26 ± 0.07b	0.25 ± 0.11b	0.36 ± 0.06b
试验组	0.36 ± 0.07a	0.27 ± 0.13a	0.21 ± 0.05a	0.20 ± 0.09a	0.23 ± 0.09a	0.19 ± 0.14a

2.5.2 对猪尿 pH 值的影响 分别于试验后 0、3、6、9、12、15 d 取试验组、对照组的猪尿样品,测定并计算当天试验组、对照组的平均 pH 值,以此代表当天 2 组猪尿的 pH 值。试验结果见表 5。比较最后 3 次检测的 pH 值平均值可知,试验组尿液的 pH 值比对照组降低 0.86,降低了 11.32% ($P <$

0.05)。这可能与 Z-27 菌株除了能产生蛋白酶外,还能产生淀粉酶、脂肪酶及纤维素酶等多种消化酶,提高饲料中供能物质的利用率,降低氨基酸分解代谢有关。pH 值的降低不利于猪尿中氨的形成与挥发,从而降低猪舍 NH₃ 的含量。

表 5 Z-27 菌剂对猪尿 pH 值的影响

组别	pH 值					
	0 d	3 d	6 d	9 d	12 d	15 d
对照组	7.55 ± 0.54a	7.66 ± 0.27a	7.59 ± 0.39b	7.63 ± 0.32b	7.57 ± 0.63b	7.60 ± 0.58b
试验组	7.91 ± 0.25a	7.56 ± 0.42a	6.69 ± 0.36a	6.77 ± 0.52a	6.75 ± 0.64a	6.69 ± 0.49a

2.6 Z-27 菌剂对新鲜猪粪尿 NH₃、H₂S 释放量的影响 Z-27 菌剂能降低猪舍空气中 NH₃、H₂S 等臭味气体的浓度,而这些臭味气体主要来自于粪尿。因此笔者所在试验组将试验组、对照组的粪和尿各 50% 分别混合均匀,在密闭的容器中做了 48 h 气体释放量对比试验,结果见表 6、表 7。试验组新鲜猪粪尿混合物 NH₃、H₂S 的 48 h 释放量比对照组

分别下降 32.76% ($P < 0.01$)、35.69% ($P < 0.01$)。说明 Z-27 菌剂除了能在猪肠道起应有的作用外,在猪体外可继续起到抑制粪尿有害气体产生和挥发的效果。

2.7 Z-27 菌剂对猪生长性能的影响

称取猪只始质量和末质量,统计各组采食量,计算料质量比,结果见表 8。

表 6 Z-27 菌剂对猪粪尿 NH₃ 释放量的影响

组别	48 h 释放量(mg/L)					
	0 d	3 d	6 d	9 d	12 d	15 d
对照组	85.63 ± 5.72a	89.45 ± 9.53b	88.67 ± 5.24B	86.42 ± 7.58B	86.31 ± 5.46B	87.19 ± 6.35B
试验组	87.05 ± 5.63a	75.84 ± 3.47a	60.13 ± 6.57A	58.14 ± 4.28A	58.42 ± 3.97A	58.23 ± 4.17A

表 7 Z-27 菌剂对猪粪尿 H₂S 释放量的影响

组别	48 h 释放量 (mg/L)						
	0 d	3 d	6 d	9 d	12 d	15 d	后 3 次平均值
对照组	6.88 ± 0.26a	7.25 ± 0.56a	7.13 ± 0.38b	6.76 ± 0.47B	7.10 ± 0.51B	6.91 ± 0.46B	6.92 ± 0.48B
试验组	7.36 ± 0.67a	6.27 ± 0.60a	5.01 ± 0.45a	4.44 ± 0.49A	4.61 ± 0.24A	4.31 ± 0.31A	4.45 ± 0.35A

表 8 Z-27 菌剂对育肥猪生长性能的影响

组别	平均始质量 (kg/头)	平均末质量 (kg/头)	均增质量 (kg/头)	平均耗料 (kg/头)	料质量比	腹泻率 (%)
对照组	50.42 ± 1.27a	61.79 ± 1.38a	11.37 ± 0.35b	23.88a	2.10b	3.33B
试验组	50.57 ± 1.19a	63.12 ± 1.14a	12.55 ± 0.41a	23.97a	1.91a	1.33A

养猪生产中饲料成本占总成本的比例约为 60% ~ 80%^[20],因此提高饲料利用率是许多微生态制剂需要追求的功能之一。从表 8 可以看出,与对照组相比,试验组均增质量提高 10.38% ($P < 0.05$),料质量比降低 9.05% ($P < 0.05$)。说明 Z-27 菌剂能够显著提高育肥猪的生长性能。在试验期间,对照组 30 头猪中有 5 头分别出现大约 3 d 的稀便现象,而试验组 30 头猪中只有 2 头出现 3 d 的稀便,腹泻率降低了 60.06% ($P < 0.01$)。

3 结论与讨论

在基础日粮中添加 0.1% Z-27 菌剂可显著降低猪舍空气中 NH₃、H₂S 浓度、细菌和大肠杆菌总数,显著降低猪粪、尿中的总氮、氨氮含量及 pH 值,显著降低猪粪尿混合物的 NH₃、H₂S 释放量。还能显著提高育肥猪的生长性能,防治腹泻。

生猪的规模化生产不可避免地会产生 NH₃、H₂S 等臭味气体。在猪舍内这些气体不仅影响猪的正常生长、诱发疾病、给养猪业带来经济损失,而且影响饲养人员的健康。同时,NH₃ 排出舍外会引起大气环境污染,NH₃ 的氮沉降后还可引起土壤和水体酸化^[5]。由益生菌制成的微生态制剂具有对动物无毒无害、无残留等优点,从有害气体产生源头减少 NH₃、H₂S 的排放,已经成为畜牧业减排的主要研究方向之一。王晓霞等在肉鸡基础日粮中添加果寡糖和枯草芽孢杆菌,取新鲜鸡粪放入三角瓶中密闭自然发酵,结果表明,NH₃ 和 H₂S 的 3 d 散发量比基础日粮组分别降低 62.14% 和 28.49%^[21]。刘鹄等将含有枯草芽孢杆菌的复方除臭剂添加到仔猪饲料中,对猪舍 NH₃ 的平均除臭率为 33%,最高除臭率可达 61%^[11]。杨峰在仔猪饲料中添加枯草芽孢杆菌制剂研究其对 NH₃ 排放的影响,试验结果表明,添加量为 0.3%、0.5% 时,可使猪尿液总氮含量、氨氮含量及粪便脲酶活性显著降低;添加量为 0.1%、0.3%、0.5% 时,猪舍 NH₃ 浓度分别降低 34.1%、48.6%、50.3%;添加量为 0.5% 时,猪粪 pH 值由 7.56 降为 7.03^[22]。Z-27 菌剂添加至饲料中,可以利用胃肠道内环境生长繁殖,产生蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶和脂肪酶等外源消化酶,全面提高饲料中各种营养成分的利用率^[14],从而可以提高氮素等在猪体内的沉积,降低氮素通过粪尿的排放量。因此,可以显著降低猪舍空气中 NH₃ 等臭味气体的浓度,同时使猪生长速率提高,显著降低料质量比。

本试验中笔者所在课题组只称取了猪的始质量和末质量,整个试验期 15 d 内的平均增质量和料质量比,试验组与

对照组相比,平均增质量提高 10.38%,料质量比降低 9.05%。如按照试验中发现的各种参数前 7 d 和 7 d 后的变化规律,并参考往年饲喂试验中 Z-27 菌剂对育肥猪和仔猪肠道消化酶活力、消化性能影响的变化规律^[14,23] 分析,试验组在试验前期育肥猪的生长性能应该有一个逐渐提高的过程。因此推测在本试验后期,该菌剂在提高猪生长性能和降低料质量比方面的效果可能比以上计算的结果更好。

参考文献:

[1] 朱丽媛,卢庆萍,张宏福,等. 猪舍中氨气的产生、危害和减排措施[J]. 动物营养学报,2015,27(8):2328-2334.

[2] 张生伟,姚拓,黄旺洲,等. 猪粪高效除臭微生物菌株筛选及发酵条件优化[J]. 草业学报,2015,24(11):38-47.

[3] Cook R N, Xin H, Nettleton D. Effects of cage stocking density on feeding behaviors of group-housed laying hens[J]. Transactions of the ASABE,2006,49(1):187-192.

[4] Li B M, Geng L Q, Wang Q, et al. Effects of housing conditions on health and welfare of caged laying hens [C]//Asabe Annual International Meeting,2007:17-20.

[5] 李勋,时建忠,唐湘方. 猪舍氨气排放量及其检测技术的研究进展[J]. 中国畜牧兽医,2014,41(2):258-263.

[6] Elmrini H, Bredin N, Shareefdeen Z, et al. Biofiltration of xylene emissions; bioreactor response to variations in the pollutant inlet concentration and gas flow rate[J]. Chemical Engineering Journal, 2004,100(1/2/3):149-158.

[7] 褚贵芳. 养殖业污染及其综合防治措施[J]. 养殖与饲料,2011(2):14-16.

[8] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. 规模猪场环境参数及环境管理;GB/T 17824.3—2008[S]. 北京:中国标准出版社,2008.

[9] 元娜,臧素敏,张志刚. 配制氨基酸平衡日粮降低猪氮排泄的研究进展[J]. 中国饲料,2008(17):4-7.

[10] 孙俊伟. 营养调控对猪生产性能及氮磷排放影响的研究[D]. 郑州:河南农业大学,2011.

[11] 刘鹄,方热军,黄田明,等. 复方除臭剂对仔猪生长性能及舍内氨气的影响[J]. 家畜生态学报,2015,36(3):38-42.

[12] Chen X G, Geng A L, Yan R, et al. Isolation and characterization of sulphur-oxidizing *Thiomonas* sp. and its potential application in biological deodorization[J]. Letters in Applied Microbiology,2004,39(6):495-503.

[13] 李梓慕. 猪源芽孢微生态制剂 Z-27 菌株的分离及应用[D]. 保定:河北农业大学,2013.

崔潇婷,顾玲玲,吴 萌,等. 杆状病毒表达系统制备的重组禽腺联病毒的鉴定[J]. 江苏农业科学,2019,47(5):153-155.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.05.038

杆状病毒表达系统制备的重组禽腺联病毒的鉴定

崔潇婷,顾玲玲,吴 萌,张继玲,王安平

(江苏农牧科技职业学院/江苏省兽用生物制药高技术研究重点实验室,江苏泰州 225300)

摘要:为对杆状病毒表达系统制备的重组禽腺联病毒进行生物学特性的鉴定,将含 GFP 报告基因及 AAV 两侧末端重复序列的重组杆状病毒 rBac - GFP、表达 AAV 结构蛋白的重组杆状病毒 rBac - VP、表达 AAV 功能蛋白的重组杆状病毒 rBac - Rep 以感染复数为 5,同时感染摇瓶培养中的昆虫细胞 Sf9,72 h 后收集细胞沉淀,反复冻融 3~5 次后,离心取上清。经滤膜过滤、氯仿抽提和 PEG 沉淀后,进行电镜观察和 Western blot 分析,并体外感染鸡成纤维细胞和鸡肝细胞系。SDS - PAGE 结果显示,rAAV 得到了较好的纯化,电镜下可观察到大小约 20 nm 的典型细小病毒样粒子,Western blot 分析数据显示 rAAV 由 3 个结构蛋白组成,与野生病毒相似。体外表达试验结果显示,rAAV 能介导 GFP 报告基因在鸡细胞中稳定持久地表达。表明杆状病毒表达系统制备的 rAAV 具有与野生病毒相似的性质,可应用于后继研究和开发应用。

关键词:重组禽腺联病毒;杆状病毒表达系统;鉴定

中图分类号:S852.65 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)05-0153-03

腺联病毒(adeno-associated virus, AAV)又称腺病毒相关病毒,作为一种新型的病毒载体,与其他重组病毒载体相比较,具有对宿主没有致病性、免疫原性极低、宿主范围广、表达时间持久等优点^[1],因此被认为是一种比较理想的基因转移载体,目前广泛地用于基因治疗和基因工程疫苗等方面的研究。rAAV 已有效地转导了小鼠和灵长类动物的多个组织和细胞,并能介导外源基因在肺脏、中枢神经系统、肝脏、视网膜及骨骼肌等器官和组织中的长期表达^[2-6]。

禽腺联病毒(avian adeno-associated virus, AAV)于

1973 年由 Yates 等首次发现并报道^[7],AAV 的理化性质、基因组结构等与 AAV 基本相似,提示可作为有潜力的重组病毒载体开发应用^[8-9]。目前,重组禽腺联病毒的制备方法主要是三质粒共转染法,即将顺式(携带 ITR 和外源基因)、反式(编码 rep 和 cap)和辅助基因的 3 种质粒共同转染 293 细胞系,这种方法成本偏高、程序较繁、不宜扩大生产,且获得的重组禽腺联病毒滴度偏低。2002 年,Masahi 等发现 Rep78 在昆虫细胞 Sf9 中无需辅助病毒或质粒就能支持 AAV DNA 复制^[10],将重组杆状病毒/昆虫细胞系统应用于 rAAV 的生产,这种方法克服了传统三质粒法的技术难关,rAAV 滴度大大提高,生产出的 rAAV 与使用 293 细胞生产得到的病毒载体在生物功能上没有差异,杆状病毒/昆虫细胞悬浮生产系统被证明是一种简单、高效、经济的可以大规模生产的方法。

本实验室首次利用重组杆状病毒/昆虫细胞系统制备 rAAV 的生产,本研究对昆虫细胞制备的 rAAV 进行以系列的鉴定,为 rAAV 的应用奠定基础。

收稿日期:2017-11-21

基金项目:国家自然科学基金(编号:31302096);江苏省科技支撑计划(编号:BE2013415);江苏省六大人才高峰项目(编号:NY-009)。

作者简介:崔潇婷,女,江苏如皋人,讲师,主要从事兽用生物制药的研究。E-mail:419445466@qq.com。

通信作者:王安平,博士,副教授,主要从事兽用生物制药的研究。E-mail:wap4017@163.com。

[14]姜军坡,李 毅,王世英,等. Z-27 菌剂对育肥猪生长性能、肠道酶活力及消化性能的影响[J]. 河南农业科学,2015,44(6):131-136.

[15]中华人民共和国卫生部. 公共场所空气微生物检验方法 细菌总数测定:GB/T 18204.1-2000[S]. 北京:中国标准出版社,2000.

[16]中华人民共和国卫生部. 食品安全国家标准 食品微生物检验 大肠埃希氏菌计数:GB 4789.38-2012[S]. 北京:中国标准出版社,2012.

[17]环境保护部. 环境空气和废气 氨的测定 纳氏试剂分光光度法:HJ 533-2009[S]. 北京:中国标准出版社,2009.

[18]中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. 饲料中水分的测定:GB/T 6435-2014[S]. 北京:中国标准出版社,2014.

[19]中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. 天然气 含硫化化合物的测定 第 1 部分:用碘量法测定硫化氢含量:GB/T 11060.1-2010[S]. 北京:中国标准出版社,2010.

[20]王晓锋,李 凯,蒋亚东,等. 长白猪与杜洛克猪繁育阶段生长性能的比较分析[J]. 养猪,2014(4):59-61.

[21]王晓霞,易中华,计 成,等. 果寡糖和枯草芽孢杆菌对肉鸡肠道菌群数量、发酵粪中氨气和硫化氢散发量及营养素利用率的影响[J]. 畜牧兽医学报,2006,37(4):337-341.

[22]杨 峰. 枯草芽孢杆菌的抗逆特性及其对仔猪生化指标和氨气排放的影响[D]. 杭州:浙江工商大学,2011.

[23]李梓霖,姜军坡,周曙光,等. *Bacillus subtilis* Z-27 制剂对仔猪肠道酶活及消化性能的影响[J]. 饲料工业,2012,33(20):41-45.