

地顶孢霉培养物对奶牛后肠道与乳中菌群数量、体细胞数及表观消化率的影响

李洋, 窦秀静, 张幸怡, 王一臻, 张永根*

(东北农业大学动物科学技术学院, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要: 本试验旨在研究地顶孢霉培养物 (*Acremonium Terricola* culture, ATC) 对奶牛后肠道与乳中菌群数量、体细胞数和表观消化率的影响。试验一采用随机分组试验设计, 选择 30 头生产性能相近的泌乳后期荷斯坦奶牛, 随机分为 3 组, 每组 10 头。对照组饲喂普通 TMR 日粮, 低剂量组、高剂量组在 TMR 日粮基础上分别每天每头添加 15 g 和 30 g ATC; 试验二采用自身对照试验设计, 选用 5 头体重、产奶量、胎次和体细胞数均相近的泌乳后期奶牛, 1 ~ 7 d (试验前期) 只饲喂 TMR 日粮, 8 ~ 28 d (试验期) 饲喂 TMR 日粮和 ATC, 29 ~ 35 d (试验后期) 停止添加 ATC。结果表明: ATC 能够提高后肠道粪便中的乳酸菌相对表达量 ($P < 0.05$) 以及干物质和粗蛋白的表观消化率 ($P < 0.05$); 降低试验期乳中体细胞数量和乳房链球菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的相对表达量 ($P < 0.05$)。综上所述, ATC 能够增殖奶牛后肠道益生菌的数量, 提高表观消化率; 对乳中体细胞数和致病菌相对数量的抑制也有显著效果。在本试验条件下, 适宜添加量为每天每头 30 g ATC。

关键词: 地顶孢霉培养物; 菌群数量; 体细胞数; 表观消化率

中图分类号: S823.5

文献标识码: A

DOI 编号: 10.19556/j.0258-7033.2017-02-110

在我国, 奶牛疾病的预防和生产性能的提高长期以应用抗生素为主要手段。然而, 由于畜产品中的抗生素残留和耐药性等问题日益突出, 包括我国在内的许多国家已经逐步全面禁止饲用抗生素的使用。因此, 寻找新的抗生素替代物已迫在眉睫。

地顶孢霉培养物 (*Acremonium Terricola* culture, ATC) 是从古尼虫草分离的地顶孢霉菌经人工发酵而得到的产品, 拥有虫草素、虫草酸、多糖、甾醇和氨基酸等与古尼虫草相似的功能性成分。ATC 能够提高仔猪增重和饲料利用效率^[1], 提高蛋鸭的体重和产蛋率, 改善蛋品质^[2]。ATC 所含有的功能性成分和虫草提取物能够改善动物机体的抗氧

化能力和免疫能力^[3-4], 通过选择性抑制致病菌和肠道有害菌^[5], 促进肠道益生菌的作用^[6], 从而提高动物生长性能。同时, 地顶孢霉发酵液提取物具有优于维生素 E 的自由基清除能力^[7]。由于乳中体细胞数与奶牛乳房炎的严重程度呈显著正相关^[8], 奶牛免疫能力低下会导致其清除细菌的能力下降^[9], 从而导致体细胞数升高和乳房炎的发生。因此, 控制乳中体细胞数和致病菌数量也是保证奶牛健康的重要手段之一。以上研究提示, ATC 可能在调节奶牛肠道菌群、提高饲料消化率、降低体细胞数等方面具有很大的潜力。因此, 本试验旨在研究 ATC 对奶牛后肠道与乳中菌群量、体细胞数及表观消化率的影响, 为 ATC 在奶牛生产中的应用提供理论基础和数据支持。

收稿日期: 2016-06-06; 修回日期: 2016-07-14

资助项目: 国家奶牛产业技术体系 (CARS-37)

作者简介: 李洋 (1989-), 男, 肇东市人, 博士, 主要从事反刍动物生产的研究, Email: liyang1405053@sina.com

* 通讯作者: 张永根, 教授, E-mail: zhangyonggen@sina.com

1 材料与方法

1.1 试验样品来源 ATC 来自合肥迈可罗生物工程有限公司。ATC 是一种由古尼虫草上提取的地顶孢霉菌 (菌种号: CGMCC NO. 0346) 经固液双

相发酵获得的灭活的虫草类真菌饲料添加剂, 含有 26.84% 粗蛋白 (CP)、5.00% 粗纤维 (CF)、3.06% 粗脂肪 (EE)、4.04% 粗灰分 (Ash) 和 61.06% 无氮浸出物 (NFE) (干物质基础)。其中功能性成分含量虫草酸 84.50 g/kg、虫草多糖 44.60 g/kg、虫草素 0.432 g/kg、甾醇 0.597 g/kg、总氨基酸 218.1 g/kg。

1.2 试验设计与日粮管理 试验一: 选用 30 头体重相近 (650 kg 左右) 的经产荷斯坦奶牛, 随机分为 3 组。3 组奶牛的生产性能参数见表 1。

对照组饲喂普通 TMR 日粮, 低剂量组饲

奶牛完全采食添加剂。每天 07:00 和 19:00 各饲喂 1 次, 每天分别在 06:30、12:00 和 18:30 进行挤奶, 自由饮水。日粮配方及营养成分见表 2。

试验二: 采用自身对照试验设计。选用 5 头体重 (637 ± 25) kg、产奶量 (25.74 ± 0.87) kg/d、胎次相同 (3 胎)、泌乳期 (230 ± 6) d、体细胞数 (34.29 ± 4.79) 万 /mL 的泌乳奶牛。每天 07:00 和 19:00 各饲喂 1 次, 每天 06:30、12:00 和 18:30 挤奶 3 次, 自由饮水。试验期共 35 d, 分为 3 期。1~7 d 为试验前期, 奶牛饲喂 TMR 日粮 (日粮配方同试

表 1 3 组奶牛的生产性能参数 (n=10)

组别	胎次	产奶量, kg/d	泌乳天数, d
对照组	2.5 ± 0.53	24.56 ± 1.80	233 ± 5
低剂量组	2.4 ± 0.52	24.23 ± 2.32	230 ± 7
高剂量组	2.4 ± 0.52	24.77 ± 2.70	235 ± 2

喂 TMR+ATC 15 g/(d·头), 高剂量组饲喂 TMR+ATC 30 g/(d·头)。试验共 8 周, 第 1 周预试, 后 7 周为正试期。每天晨饲前, 将 ATC 与 100 g 左右 TMR 日粮均匀混合, 单独饲喂给试验牛, 保证

试验一); 8~28 d 为试验期中期, 奶牛饲喂 TMR 日粮 +30 g/(d·头) ATC; 29~35 d 为试验后期, 奶牛停止饲喂 ATC, 只饲喂 TMR 日粮。饲喂方式与试验一相同。

表 2 TMR 日粮组成及营养成分 (干物质基础)

项目	含量
日粮组成, %	
全株玉米青贮	25.0
苜蓿	17.0
羊草	12.7
玉米	23.9
豆粕	9.0
豆皮	5.4
麦麸	4.5
磷酸氢钙	1.0
石粉	0.5
盐	0.5
预混料 ^①	0.5
总计	100.0
营养成分 ^②	
干物质, %	43.6
产奶净能, MJ/kg DM	6.4
粗蛋白, %DM	13.2
中性洗涤纤维, %DM	47.5
酸性洗涤纤维, %DM	26.9
淀粉, %DM	29.4
钙, %DM	1.01
磷, %DM	0.54

注: ① TMR 日粮中每千克预混料含: 锰 6 000 mg, 铁 5 000 mg, 锌 9 000 mg, 铜 2 600 mg, 碘 120 mg, 硒 80 mg, 钴 70 mg, 维生素 A 130 000 IU, 维生素 D₃ 6 000 IU、维生素 E 465 IU。

②产奶净能为计算值, 其他指标为实测值

1.3 测定指标及方法

1.3.1 试验一指标测定 后肠道粪中菌群相对表达量的测定: 于试验期的最后 2 d, 对所有试验牛 (30 头) 进行直肠 (距肛门约 20~30 cm 处) 采粪, 收取 100 g 左右粪样, 立即置于液氮中, 带回实验室保存于 -80℃ 冰箱内, 以备菌群 DNA 提取。按照 OMEGA Stool DNA Kit (D4015, 上海玉博) 试剂盒直接对粪便样本进行细菌总 DNA 的提取。荧光定量所用仪器为 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪, Real-time PCR SYBR Green I RT-PCR 试剂盒购自大连宝生物公司。Real-time PCR 扩增反应参数包括 95℃ 变性 7 min, 55℃ 1 min, 72℃ 3 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 7 min。特异性引物序列由生工生物工程股份有限公司设计 (上海), 具体序列见表 3。本试验中, 粪便中检测的细菌有乳酸菌、大肠杆菌和双歧杆菌。试验通过荧光定量方法, 测定不同细菌相对于总菌的基因倍数。所有试验重复 3 次。基因的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行计算。

养分消化率的测定: 于试验期的最后 2 d, 对所有试验牛 (30 头) 进行直肠采粪 (方法同上), 加入 10% 的硫酸 10 mL 固氮。采样结束后, 将同一头牛 2 d 的粪样等质量均匀混合, 取 150 g, -20℃ 保存, 待测。于试验结束前 2 d, 四分法收集各组日

表3 粪便和原奶中菌群的PCR引物序列

目标菌	引物 (5' → 3')	GenBank 号
总细菌	CCTACGGGAGGCAGCAG	JQ170163.1
	ATTACCGCGGCTGCTGG	
乳酸菌	TTGGTGAAGAAGGACAAGGGTAGT	KM068133.1
	TTCCCCAGTTAAGCTGAAGGCT	
双歧杆菌	GCTGGTGGTAATGCCCGATG	NR_113173.1
	GCCGTTAGCCCGCCGTC	
乳房链球菌	TCGGCAATGGGGGAACC	KT376984.1
	GGATTTTCCACTCCCATTACCGTTC	
停乳链球菌	GTTGTTAGAGAAGAATGATGGTGGG	KR819487.1
	AAGTTCCTCAGTTTCCAAAGCGT	
无乳链球菌	TGAGGCTTGGTGTTTACACTAGACTGAT	CP012480.1
	ATTGCTCCTTTCAAATAACTAACCTGTG	
金黄色葡萄球菌	CCGAAGGGGAAGGCTCTATC	KT390730.1
	TAAGTGTTAGGGGTTCCGC	
大肠杆菌	CGTCAATGAGCAAAGGTAATAACT	KT630840.1
	TCGGATGTGCCAGATGG	

粮 2 kg, 送往实验室待测。消化率的测定采用酸不容灰分法 (AIA 法) 测定, 计算公式:

$$\text{某养分表观消化率} = [100 - (\text{饲料中 AIA 含量} / \text{粪中 AIA 含量}) \times (\text{粪中某养分含量} / \text{饲料中某养分含量})] \times 100\%$$

其他指标测定: 干物质和粗蛋白含量根据 (AOAC, 2000) [10] 测定, 中性洗涤纤维和酸性洗涤纤维含量的测定参考 Van Soest 的方法 [11]。

1.3.2 试验二指标测定 乳中体细胞数的测定: 于试验前期、试验期和试验后期的最后 2 d 收集奶样, 每次挤奶时弃掉头三把奶后, 收集 100 mL 奶样, 将早、中、晚的奶样按照 4: 3: 3 进行混合, 加入防腐剂后送往实验室, 采用利拉伐体细胞计数仪记录体细胞数量。

乳中病原微生物的测定: 于试验前期、试验期和试验后期的最后 2 d 收集奶样后, 将早、中、晚的奶样按照 4: 3: 3 进行混合, 并立即保存于 -80℃ 冰箱内, 以备菌群 DNA 的提取。

原奶中总 DNA 的提取: 采用细菌 DNA 提取试剂盒 (美国, Sigma 公司), 具体操作步骤参照说明书。荧光定量所用仪器及反应条件同试验一, 乳中菌群 PCR 引物序列由生工生物工程有限公司设计 (上海), 具体序列见表 3。

本试验中, 乳中病原菌有乳房链球菌、无乳链球菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和停乳链球菌。数据处理同试验一。

1.4 统计分析 利用 7500 System Software 分析 Real-time PCR 结果。所有数据分析采用 SAS 9.1 软件中 ANOVA 程序进行统计分析, 多重比较采用 Duncan's 法, 菌群相对数量以平均值 ± 标准差的形式表示, 表观消化率与体细胞数以平均值和标准误的形式表示, $P < 0.05$ 代表差异显著。

2 结果

2.1 ATC 对奶牛后肠道菌群相对数量的影响 如图 1 所示, 试验组显著提高了奶牛后肠道粪便中乳酸菌的相对表达量 ($P < 0.05$), 但是低剂量组和高剂量组间差异不显著 ($P > 0.05$)。同时, ATC 对后肠道粪便中大肠杆菌和双歧杆菌的相对表达量无显著影响 ($P > 0.05$)。

2.2 ATC 对奶牛养分表观消化率的影响 由表 4 可见, 随着 ATC 添加量的提高, 干物质和粗蛋白的表观消化率显著增加 ($P < 0.05$)。但是, ATC 对纤维的表观消化率没有显著改善 ($P > 0.05$)。低剂量组各指标与对照组相比均有下降, 但差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.3 ATC 对乳中体细胞数的影响 由表 5 可知, 试验期和试验后期乳中体细胞数量显著低于试验前期 ($P = 0.0034$), 试验期和试验后期体细胞数差异不显著, 说明 ATC 的有效作用时间至少持续 1 周。

2.4 ATC 对乳中病原微生物相对数量的影响 图 2 显示, 与试验前期相比, 试验期 ATC 的添加显著降

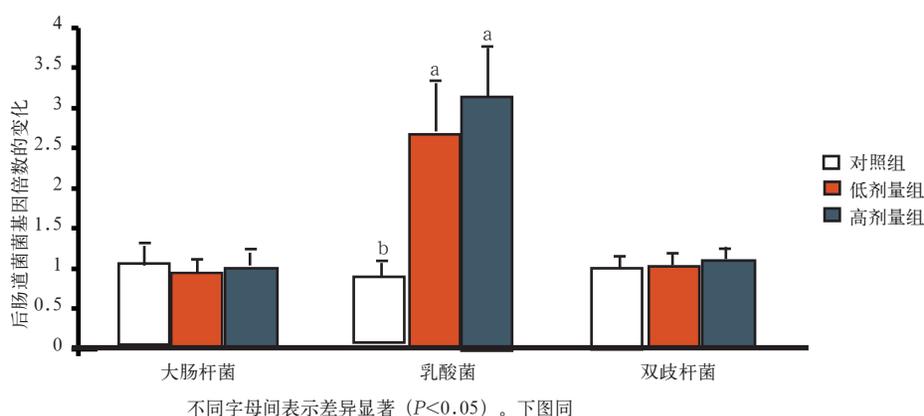


图1 不同添加量 ATC 对奶牛后肠道菌群相对数量的影响

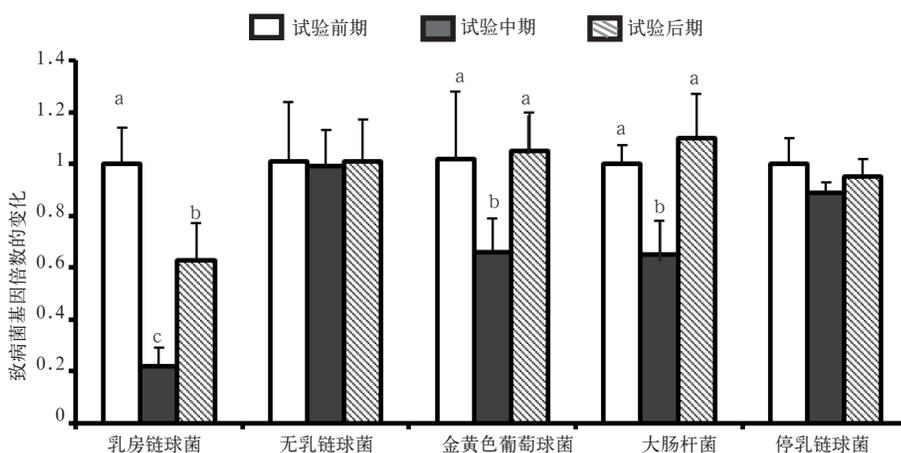


图2 ATC 对乳中病原菌的影响

表4 不同添加剂量 ATC 对奶牛表观消化率的影响

项目	对照组	低剂量组	高剂量组	SEM	P 值
干物质	81.75 ^b	80.50 ^b	84.10 ^a	0.62	0.0011
粗蛋白	72.32 ^b	70.52 ^b	79.57 ^a	1.82	0.0038
中性洗涤纤维	73.51	69.31	74.52	2.62	0.34
酸性洗涤纤维	62.63	58.90	63.97	3.34	0.55

表5 ATC 对乳中体细胞数的影响

项目	对照组	低剂量组	高剂量组	SEM	P 值
体细胞数量	34.29 ^a	23.22 ^b	26.61 ^b	2.13	0.0034

低了乳房链球菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的丰度 ($P < 0.05$)。试验后期, 几种病原菌的丰度均有所回升。然而, 乳房链球菌的基因相对表达量仍然低于试验前期 ($P < 0.05$)。试验期间, 停乳链球菌与试验前期相比有降低趋势 ($P = 0.07$), 但是 ATC

对无乳链球菌的基因表达量没有影响 ($P = 0.91$)。

3 讨论

3.1 ATC 对奶牛后肠道粪便菌群的影响 动物肠道内各种微生物区系间的动态平衡对动物机体非常重要。家畜的健康状况与家畜本身肠道内的菌群平衡

关系密切。大肠杆菌等致病菌的数量会随着家畜肠道内的微生态平衡的破坏而显著增加,从而产生毒副作用,引起消化机能的紊乱,导致动物生长性能和消化机能的下降^[12]。本试验中,ATC虽然没有抑制粪便中大肠杆菌的量,但显著增加了乳酸菌的相对表达量。Koh等^[6]已经证明,蛹虫草提取物能够降低肉鸡小肠内沙门氏菌和大肠杆菌的数量,并增加乳酸菌的数量,从而提高其生长性能,与本试验结果相似。虫草素对梭菌的选择抑制作用也有报道^[5]。而本试验中,ATC对致病菌的抑制作用不明显可能与加工工艺和成分含量不同有关,但ATC对益生菌的选择增殖作用同样非常重要。研究表明,有益优势菌群数量的增加能够降低病原菌或有害菌的数量。益生菌能够同有害菌竞争养分或吸附位点,并消耗氧气、产生抑菌物质等途径抑制致病菌等有害微生物的增殖;同时益生菌本身能够成为非特异性免疫因子,通过细菌本身或细胞壁成分刺激宿主细胞的体液免疫和细胞免疫水平来提高机体抵抗力^[12]。

3.2 ATC对奶牛表观消化率的影响 动物机体对饲料营养物质的高消化率是动物高消化性能的重要体现,更是促进家畜生长的重要保证。本试验中,奶牛后肠道营养物质表观消化率的提高与ATC提高奶牛后肠道乳酸菌数量有关。后肠道乳酸菌数量的提高有利于肠道内有机酸的产生,从而提高动物肠胃的消化机能^[13];同时,有益微生物的增殖能够将饲料中更多的非蛋白氮转化为可被机体吸收利用的菌体蛋白,从而提高氨基酸含量和蛋白质质量^[14],并提高日粮中粗蛋白和干物质的表观消化率,与本试验结果相似。魏建忠等^[1]通过仔猪饲喂试验证明了ATC能够提高其饲料转化率,并改善其生长性能。同时,ATC对蛋鸭的体重、产蛋率和蛋品质也有明显的改善作用^[2]。因此,可以推测ATC在提高饲料消化吸收、改善饲料利用率、提高动物机体生长性能方面具有一定的作用。

3.3 ATC对奶牛乳中体细胞数和菌群的影响 作为衡量奶牛乳腺健康的重要检测指标,乳中体细胞数与奶牛乳房炎的严重程度呈显著正相关^[8],乳房的感染几率会随着体细胞数的增加而上升,从而导致奶牛乳房炎发病率的提高。本试验中,ATC对乳中体细胞数量有显著降低作用,可能与ATC的功能性成分的抗氧化作用有关。本课题组的前期研究结果已经证明,ATC能够提高SD大鼠肝脏和血液中的

抗氧化酶活性,改善机体的抗氧化和免疫功能^[15]。国内外大量试验也证明,虫草类物质以及活性成分(虫草多糖,虫草素)具有调节动物机体抗氧化能力的作用^[3-4]。而前人研究已经证明,抗氧化剂的摄入能够提高水牛谷胱甘肽过氧化物酶活性和总抗氧化能力,并降低乳中体细胞数量^[16]。因此,ATC的功能性成分是该添加剂发挥作用的基础。而本试验中ATC对乳中病原菌丰度的调节也是降低体细胞数的重要原因。当乳中体细胞数超过10万时,体细胞数与乳房感染间存在着高度相关性^[17]。而导致乳房感染和体细胞数升高的最主要致病菌有金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和无乳链球菌。本试验中,随着ATC的饲喂,金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和无乳链球菌的丰度显著降低,随之而来的就是体细胞数的降低。虽然前人研究证明,虫草素和虫草多糖具有抑制梭菌^[5]和肠道内大肠杆菌^[6]等有害菌的作用,但是ATC在控制乳腺病原菌方面的机理还不清楚,有待进一步研究。

4 结论

ATC能够增殖奶牛后肠道益生菌的数量,提高营养物质表观消化率;同时,对乳中体细胞数和致病菌相对数量的抑制也有显著效果。在本试验条件下,适宜添加量为每头每天30g。

参考文献:

- [1] 魏建忠,张玮,李郁,等.地顶孢霉培养物对保育仔猪生产性能及免疫水平的影响[J].中国畜牧兽医,2009,(2):33-35.
- [2] 孙汉巨,李晓祥,丁琦,等.虫草饲料添加剂对蛋鸭生产性能及鸭蛋品质的影响[J].安徽农业科学,2011,39(6):3618-3620.
- [3] 朴美子,王晓东.蛹虫草黄豆对小鼠的抗氧化及免疫作用[J].中国食品学报,2014,14(5):32-37.
- [4] Deng B, Wang Z P, Tao W J, et al. Effects of polysaccharides from mycelia of *Cordyceps sinensis* on growth performance, immunity and antioxidant indicators of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Aquacult Nutr, 2015, 21(2):173-179.
- [5] Ahn Y, Park S, Lee S, et al. Cordycepin: selective growth inhibitor derived from liquid culture of *cordyceps militaris* against *clostridium* spp[J]. J Agr Food Chem, 2000, 48(7):2744-2748.
- [6] Koh J H, Suh H J, Ahn T S. Hot-water extract from mycelia

- of Cordyceps sinensis as a substitute for antibiotic growth promoters[J]. *Biotechnol Lett*, 2003, 25(7):585-590.
- [7] 程洁, 陈双林. 顶孢霉发酵液提取物清除自由基能力的研究[J]. *食品工业科技*, 2010, 31(11):155-157.
- [8] 甘宗辉, 杨章平, 李云龙, 等. 奶牛乳房炎的细菌感染与奶中体细胞数及乳成分的关系[J]. *畜牧兽医学报*, 2013, 44(6):972-979.
- [9] 周国胜. 影响牛奶体细胞数的因素[J]. *今日畜牧兽医: 奶牛*, 2013, (8):44.
- [10] AOAC. *Official Methods of Analysis*[M]. 17th ed. Arlington VA USA: Association of Official Analytical Chemist, 2000.
- [11] Van Soest P J, Robertson J B, Lewis B A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition[J]. *J Dairy Sci*, 1991, 74(10):3583-3597.
- [12] 杨朋飞, 闫素梅, 王鹏宇, 等. 饲喂微生态制剂对奶牛后肠道微生物数量及营养物质消化率的影响[J]. *饲料工业*, 2009, 30(1):37-39.
- [13] 周映华, 胡新旭, 卞巧, 等. 无抗发酵饲料对生育肥猪生长性能, 肠道菌群和养分表观消化率的影响[J]. *动物营养学报*, 2015, 27(3):870-877.
- [14] 张宇红. 不同复合菌比例发酵饲料对饲料营养价值及生长猪生产性能的影响[D]. 雅安: 四川农业大学, 2004.
- [15] 李洋, 林聪, 许文斌, 等. 地顶孢霉培养物对大鼠生长性能, 血清与肝脏抗氧化及免疫指标的影响[J]. *动物营养学报*, 2016, 28(8):2657-2666.
- [16] Umesh D, Mahesh Chandra S, Singh S K, et al. Amelioration of altered oxidant/antioxidant balance of Indian water buffaloes with subclinical mastitis by vitamins A, D₃, E, and H supplementation[J]. *Trop Anim Health Prod*, 2013, 45(4):971-978.
- [17] Schukken Y H, Wilson D J, Welcome F, et al. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts[J]. *Vet Res*, 2003, 34(5):579-596.

Effects of *Acremonium terricola* Culture on Flora Amount in Intestinal and Milk, Somatic Cell Counts and Nutrients Apparent Digestibility of Dairy Cows

LI Yang, DOU Xiu-jing, ZHANG Xing-yi, WANG Yi-zhen, ZHANG Yong-gen*

(College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Heilongjiang Harbin 150030, China)

Abstract: This experiment was conducted to study the effects of *Acremonium terricola* culture (ATC) on flora amount in intestinal and milk, somatic cell counts (SCC) and apparent digestibility of dairy cows. In experiment 1, according to completely randomized design, thirty late-lactating Holstein dairy cows with similar performance were randomly allotted to three treatments, ten cows in each group: a basal diet plus 0, 15 or 30 g/d·cow ATC. In experiment 2, by self-control design, five late-lactating Holstein dairy cows with similar body weight, milk production, parity and SCC were used. Five dairy cows were fed the TMR diet from d 1 to 7 (Pre-trial period). From d 8 to 28 (trial period), the same cows were fed 30 g/d·cow ATC. Supplementation with ATC was stopped from d 29 to 35 (Post-trial period). The results showed that the relative expression of lactobacillus in intestinal in experimental group was significantly higher than that in control group after supplementing with ATC ($P < 0.05$), and the nutrient apparent digestibility of crude protein and dry matter in experimental group was significantly higher than that in control group ($P < 0.05$). Meanwhile, SCC and the relative expression of *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in milk were significantly decreased ($P < 0.05$). In conclusion, *Acremonium Terricola* culture can improve the relative expression of intestinal probiotics and enhance apparent digestibility of some nutrients in TMR, and significantly inhibit SCC and the relative expression of pathogenic bacteria. In the conditions of this study, the suitable recruitment is 30 g / d·cow.

Key words: *Acremonium Terricola* culture; Flora amount; Somatic cell counts; Apparent digestibility