

罗伊氏乳杆菌的抑菌能力及其对肉仔鸡盲肠内容物菌群的影响

刘 滢¹ 刘雪连^{1*} 魏秀莲² 娄迎霞² 李晟硕¹

1.北京大北农业科技集团股份有限公司饲用微生物工程国家重点实验室,北京 100192;

2.北京市饲料监察所,北京 100107

摘要 试验随机选用体重、健康情况基本一致的 1 日龄 AA 白羽肉仔鸡 720 羽,按体重相近、性别比例相同原则随机分为空白组、抗生素组、菌粉组、上清液组、发酵液组,每组 6 个重复,每个重复 24 羽鸡,试验期 42 d,以期研究罗伊氏乳杆菌的抑菌性能及其对肉仔鸡盲肠内容物菌群的影响。试验结果显示:罗伊氏乳杆菌 DBN-JP 发酵液对金黄色葡萄球菌和沙门氏菌的抑菌能力与 0.02%硫酸黏菌素差异不显著;80 °C 加热 15 min 对罗伊氏乳杆菌 DBN-JP 发酵液的抑菌能力影响不显著;与空白组相比,菌粉组、发酵液组或上清液可抑制肉仔鸡盲肠内容物中大肠杆菌和沙门氏菌,提高乳酸杆菌数量;与抗生素组相比,菌粉组和发酵液组盲肠内容物中乳酸杆菌数显著升高,发酵液组盲肠内容物中沙门氏菌数量与抗生素组相比差异不显著。综上所述,在肉仔鸡日粮中添加罗伊氏乳杆菌 DBN-JP 菌粉、发酵液、上清液可抑制病原菌生长、调节盲肠内容物菌群,具有替代抗生素的潜力。

关键词 罗伊氏乳杆菌;蛋雏鸡;抑菌性能;盲肠内容物菌群

罗伊氏乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*)是一种存在于人和动物肠道中具有抑制胃肠道病原菌繁殖、调节动物肠道菌群作用的饲用益生菌^[1]。随着饲料中促生长类抗生素的禁用,罗伊氏乳杆菌作为饲用微生物制剂开发具有较高的应用价值和市场潜力。雏鸡因生长迅速、消化系统发育不完善、抵抗力弱等生理特点对于养鸡全期的生产性能有重要影响,通过益生菌调节雏鸡盲肠菌群、改善雏鸡体质有助于提升养殖效益^[2-5]。本试验通过研究罗伊氏乳杆菌的抑菌能力及添加不同水平的罗伊氏乳杆菌制剂对肉仔鸡盲肠内容物菌群的影响,为罗伊氏乳杆菌制剂在肉仔鸡养殖上的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料及仪器

主要试材:罗伊氏乳杆菌 DBN-JP 分离自健康

仔猪粪便,保藏于大北农集团饲用微生物工程国家重点实验室;罗伊氏乳杆菌 CICC6118、CICC6119、CICC6121 购自中国工业微生物菌种保藏中心;罗伊氏乳杆菌制剂:罗伊氏乳杆菌 DBNDBN-JP 活菌数 $\geq 5 \times 10^{11}$ cfu/g,由北京大北农业科技集团股份有限公司饲用微生物工程国家重点实验室提供;试验用基础饲料由北京大北农业科技集团股份有限公司提供;硫酸黏菌素为市售。

主要仪器:酶标仪(Epoch,Thermo)。

1.2 检测指标与方法

1) 抑菌性能。牛津杯法。

2) 试验动物及分组。试验地点在大北农玉田养殖场进行,试验鸡舍及配备的肉仔鸡养殖设备均由该养殖场提供。随机选用体重、健康情况基本一致的 1 日龄 AA 白羽肉仔鸡 720 羽,按体重相近、性别比例相同原则随机分为 5 组,空白组:饲喂基础日

收稿日期:2020-12-14

基金项目:北京市农业农村局科技项目(20200115)

* 通讯作者

刘 滢,女,1983 年生,硕士,高级工程师。

粮; 抗生素组: 饲喂基础日粮+硫酸黏菌素 30 g/t; 菌粉组: 饲喂基础日粮+罗伊氏乳杆菌菌粉 1 kg/t; 上清液组: 饲喂基础日粮+罗伊氏乳杆菌上清液 1 L/t; 发酵液组: 饲喂基础日粮+罗伊氏乳杆菌发酵液 1 L/t。每组 6 个重复, 每个重复 24 羽鸡, 试验期 42 d, 常规饲养, 自由采食, 日常管理与免疫程序按鸡场常规办法进行。参照 NRC 肉仔鸡营养标准配制, 前期(1~21 日龄)和后期(22~42 日龄)日粮成分及营养水平见表 1 和表 2。料型为粉料, 基础日粮中只添加抗球虫药盐霉素(60 μg/mL), 不添加其他抗生素。

3) 样品采集与处理。于试验第 43 天结算饲粮, 所有鸡禁食 8 h。试验第 44 天对所有试验鸡进行称重并记录, 每个重复内选取 3 羽体重最接近该组平

均体重的肉仔鸡并标记, 按顺序剪断其颈静脉致死, 用卫生棉线分别将盲肠于两端结扎后从外端剪断, 置于密闭的样品袋中冰冻保存, 迅速带至实验室, 以无菌方法取肠道食糜于灭菌离心管中, 液氮速冻、放于-80 °C 冰箱中保存待测。

4) 盲肠内容物菌群。将含有大肠杆菌、乳酸杆菌和沙门氏菌目的片段的质粒作为标准质粒分别建立各菌群的标准曲线, 采用实时荧光定量方法对所有样本拷贝数进行测定, 通过标准曲线计算不同微生物的数量。

1.3 统计分析

采用 IBM SPASS Statistics 24 统计软件进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 运用 Dun-

表 1 1~21 日龄日粮组成

日粮配方	含量/%	营养指标	营养含量
玉米	59.10	代谢能/(MJ/kg)	12.77
豆粕	30.60	粗蛋白/%	21.20
玉米蛋白粉	3.80	有效磷/%	0.43
油脂	1.70	钙/%	1.00
石粉	1.31	赖氨酸/%	1.08
氯化钠	0.42	蛋氨酸/%	0.50
磷酸氢钙	1.77	蛋氨酸+胱氨酸/%	0.82
赖氨酸	0.15		
蛋氨酸	0.15		
预混料	1.00		

表 2 22~42 日龄日粮组成

日粮配方	含量/%	营养指标	营养含量
玉米	64.30	代谢能/(MJ/kg)	12.77
豆粕	24.30	粗蛋白/%	19.30
玉米蛋白粉	4.50	有效磷/%	0.43
油脂	2.50	钙/%	0.91
石粉	1.23	赖氨酸/%	0.95
氯化钠	0.33	蛋氨酸/%	0.43
磷酸氢钙	1.58	蛋氨酸+胱氨酸/%	0.73
赖氨酸%	0.16		
蛋氨酸%	0.10		
预混料	1.00		

注: 预混料为每千克饲粮提供: V_A 8 000 IU, V_D 4 000 IU, V_E 12 mg, VK₃ 1.6 mg, VB₁ 2 mg, VB₂ 6 mg, VB₆ 3 mg, VB₁₂ 0.012 mg, 泛酸 9 mg, 烟酸 20 mg, 叶酸 0.8 mg, 生物素 0.04 mg, Cu 8 mg, Fe 80 mg, Zn 75 mg, Mn 100 mg, I 0.35 mg, Se 0.15 mg。

can's 法进行多重比较,结果用平均值±标准误差表示,以 $P<0.05$ 判断差异显著性。

2 结果与分析

2.1 罗伊氏乳杆菌的抑菌能力

由表 3 可知,罗伊氏乳杆菌 DBN-JP 对大肠杆菌 k88 的抑菌能力虽低于 0.02%硫酸黏菌素,但显著高于罗伊氏乳杆菌 CICC6118、CICC6119 和 CICC6121;对金黄色葡萄球菌的抑菌能力与 0.02%硫酸黏菌素相比差异不显著,显著高于罗伊氏乳杆菌 CICC6118、CICC6119 和 CICC6121;对沙门氏菌的抑菌能力与 0.02%硫酸黏菌素相比差异不显著,但显著高于罗伊氏乳杆菌 CICC6118、CICC6119 和 CICC6121。由表 4 可知,80 °C 加热 15 min 对罗伊氏乳杆菌 DBN-JP 的抑菌能力影响不显著。

2.2 罗伊氏乳杆菌对肉仔鸡盲肠内容物菌群的影响

由表 5 可知,与空白组相比,上清液组、发酵液组盲肠内容物中大肠杆菌的数量显著降低,菌粉组和发酵液组盲肠内容物中乳酸杆菌数量显著提高,

发酵液组盲肠内容物中沙门氏菌的数量显著降低;与抗生素组相比,上清液组、发酵液组盲肠内容物中大肠杆菌数量差异不显著,菌粉组、发酵液组盲肠内容物中乳酸杆菌数显著升高,发酵液组盲肠内容物中沙门氏菌数量差异不显著,菌粉组、上清液组盲肠内容物中沙门氏菌数量显著高于抗生素组。

3 讨论

罗伊氏乳杆菌是一种专性异型发酵菌株,其作为一种饲料添加剂菌株具有广阔的发展前景^[6]。大量研究^[7-9]表明,罗伊氏乳杆菌具有多种生物学功能,尤其在抑制病原菌生长和调节肠道菌群方面发挥重要作用。本研究发现,罗伊氏乳杆菌 DBN-JP 对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌具有较好的抑菌作用,这与吴惠贞等^[10]、朱振军等^[11]的研究结果相似;但张紫薇^[12]的研究表明,罗伊氏乳杆菌 J1 对以大肠杆菌和沙门氏菌为代表的革兰氏阴性菌和以金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌为代表的革兰氏阳性菌无抑菌效果,这可能与不同菌株产生的抑

表 3 不同样品对致病菌的抑菌能力

mm

组别	大肠杆菌 k88	金黄色葡萄球菌	沙门氏菌
培养基空白	6.00±0.10	6.00±0.10	6.00±0.10
DBNSKL-01	18.73±0.23a	19.68±0.26a	18.84±0.04a
CICC6118	14.55±0.22b	15.48±0.21b	14.47±0.20b
CICC6119	14.85±0.08b	15.30±0.17b	15.28±0.19c
CICC6121	14.99±0.10b	15.81±0.09b	15.97±0.09d
0.02%硫酸黏菌素	20.08±0.05d	19.92±0.03a	19.34±0.30a

注:同列标注的不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$),相同字母表示差异不显著 ($P>0.05$),下同。

表 4 加热对罗伊氏乳杆菌 DBN-JP 发酵液抑菌能力的影响

mm

种类	大肠杆菌 k88	金黄色葡萄球菌	沙门氏菌
发酵液	18.46±0.30	19.27±0.36	18.35±0.43
发酵液(80 °C加热 15 min)	18.35±0.34	19.23±0.26	18.06±0.11

表 5 对肉仔鸡盲肠内容物菌群的影响

项目	空白组	抗生素组	菌粉组	上清液组	发酵液组
大肠杆菌(Lg(CFU/g))	11.56±0.17a	11.23±0.29b	11.45±0.15a	11.34±0.23ab	11.27±0.33b
乳酸杆菌(Lg(CFU/g))	8.60±0.30a	8.20±0.10b	8.76±0.38a	8.21±0.21b	9.20±0.37c
沙门氏菌(Lg(CFU/g))	8.56±0.19a	8.23±0.11b	8.52±0.23a	8.45±0.43 a	8.31±0.78b

菌物质的结构和种类具有多样性有关。本研究结果表明,罗伊氏乳杆菌 DBN-JP 对金黄色葡萄球菌和沙门氏菌的抑菌能力与 0.02% 硫酸黏菌素差异不显著,对大肠杆菌的抑菌能力略低于 0.02% 硫酸黏菌素,显著高于对照菌株;乳酸菌的耐热能力直接关系到其产业化,良好的耐热能力有助于乳酸菌在饲料中的添加和应用。一般来说,制备颗粒料的温度一般在 75~80 °C、15 min, 本研究发现,80 °C 加热 15 min 对罗伊氏乳杆菌 DBN-JP 的抑菌能力影响不显著,这说明罗伊氏乳杆菌 DBN-JP 发酵液具有较好的耐热能力,更适用于产业化应用需求。

研究^[13]发现,罗伊氏乳杆菌具有调节肠道菌群、改善肠道环境、维持动物肠道微生物的菌群平衡等功能。本研究表明,与空白组相比,饲料中添加罗伊氏乳杆菌 DBN-JP 上清液和发酵液可以显著降低盲肠内容物中的大肠杆菌的数量,添加发酵液可显著降低沙门氏菌的数量,添加菌粉和发酵液可以显著提高盲肠内容物中乳酸杆菌数量;与抗生素组相比,饲料中添加上清液或发酵液对盲肠内容物中大肠杆菌数量的抑菌效果和添加抗生素差异不大,添加菌粉或发酵液盲肠内容物中乳酸杆菌数显著升高,添加发酵液对盲肠内容物中沙门氏菌数量差异不显著,添加菌粉或上清液对盲肠内容物中沙门氏菌的抑制效果差于抗生素组。这与杨家军等^[14]、WALSHAM 等^[15]的研究结果相似,说明饲料中添加罗伊氏乳杆菌 DBN-JP 菌粉、发酵液或上清液具有抑制肉仔鸡盲肠内容物中大肠杆菌和沙门氏菌,提高乳酸杆菌数量的有益效果,具有替代抗生素的潜力。

4 结 论

在肉仔鸡日粮中添加罗伊氏乳杆菌 DBN-JP 制剂具有抑制病原菌生长、调节盲肠内容物菌群的有益效果。

参 考 文 献

- [1] 张如春,司华哲,陈双双,等.罗伊氏乳杆菌在畜禽生产中应用的研究进展[J].动物营养学报,2019,31(3):1031-1036.
- [2] MATHIEU C, LIET C, DOMINIQUE P, et al. Probiotic *P. acidilactici* application in shrimp *Litopenaeus stylirostris* culture subject to vibriosis in New Caledonia[J]. Aquaculture, 2008, 275(1-4): 182-193.
- [3] CASTEX M, LEMAIRE P, WABETE N, et al. Effect of probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress of *Litopenaeus stylirostris* under *Vibrio nigripulchritudo* challenge[J]. Fish shellfish immu, 2010, 28(4): 622-631.
- [4] 龚琪,曾娟娟,石德时,等.益生性屎肠球菌 HDRsEf1 对雏鸡盲肠菌群发育的影响[J].华中农业大学学报,2015,34(1):78-82.
- [5] 庞洁,周娜,刘鹏,等.罗伊氏乳杆菌的益生功能[J].中国生物工程杂志,2011,31(5):131-137.
- [6] 张如春.狐源罗伊氏乳杆菌 ZJF036 益生特性研究[J].动物营养学报 2020,32(8):3819-3829.
- [7] 杜志琳,尹望,李雪平.一株罗伊氏乳杆菌的分离鉴定及其益生性能研究[J].饲料研究,2017(11):10-13.
- [8] 邵景海,杨郁茹,李亮,等.一株罗伊氏乳杆菌的生物学特性研究[J].中国乳品工业,2012,40(3):28-30.
- [9] 周凌华,王豪,王荫榆,等.功能性益生乳酸菌的研究进展[J].天然产物研究与开发,2012,24(7):990-997.
- [10] 吴惠贞,夏枫耿,陈中,等.碳源与罗伊氏乳杆菌 LYS-1 发酵上清液抑菌效果的关系[J].现代食品科技,2020(4):119-125.
- [11] 朱振军,黄国宏,梁晓琳,等.罗伊氏乳杆菌的益生特性及安全性分析[J].现代食品科技,2016,32(6):315-320.
- [12] 张紫薇.罗伊氏乳杆菌 J1 益生特性初步评价及基因组学研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2019.
- [13] 董晓丽,刁其玉,邓凯东,等.微生态制剂在反刍动物营养与饲料中的应用[J].中国饲料,2011(4):8-11.
- [14] 杨家军,钱坤,李庆岗,等.罗伊氏乳杆菌抑制致病性大肠杆菌感染效果的研究[J].中国畜牧兽医,2017,44(8):2431-2436.
- [15] WALSHAM A D, MACKENZIE D A, COOK V, et al. *Lactobacillus reuteri* inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to human intestinal epithelium [J]. Frontiers in microbiology, 2016(7):244.

【责任编辑:胡 敏】