

# 乳酸片球菌的抑菌能力及其对断奶仔猪肠道菌群及黏膜免疫的影响

周登峰<sup>1</sup> 刘雪连<sup>2</sup> 刘滢<sup>2</sup> 甘大维<sup>1\*</sup>

1. 武汉大北农农牧发展有限公司, 武汉 430000; 2. 北京市饲料安全生物调控工程技术研究中心, 北京 100192

**摘要** 体外抑菌试验采用牛津杯法, 动物试验选用 90 头 21 日龄断奶仔猪(杜长大), 随机分为空白组、菌粉组、上清液组和发酵液组, 试验期 49 d, 旨在研究乳酸片球菌 SKL-03 的抑菌性能及其对断奶仔猪肠道菌群及黏膜免疫的影响。试验结果显示: 乳酸片球菌 SKL-03 菌粉、上清液、发酵液对 3 种常见致病菌均有显著的抑菌效果; 动物试验结果显示: 相比空白组, 饲料中添加乳酸片球菌 SKL-03 菌粉、上清液、发酵液可降低盲肠、结肠中的大肠杆菌和沙门氏菌的数量, 提高乳杆菌数量和十二指肠、空肠黏膜中 SIgA 含量。综上所述, 乳酸片球菌 SKL-03 具有改善断奶仔猪肠道菌群, 提高小肠黏膜免疫功能的效果。

**关键词** 乳酸片球菌; 断奶仔猪; 肠道菌群; 免疫功能

新生期和断奶期是限制我国集约化、规模化养猪生产效率的 2 个关键环节, 改善新生和断奶仔猪肠道健康, 避免或减少肠道病原微生物感染是养猪生产中亟待解决的重大课题<sup>[1-2]</sup>。有报道<sup>[3-7]</sup>称乳酸片球菌在抑制病原菌生长、改善肠道微生物群落结构、刺激宿主免疫等方面表现出良好的益生性能, 但是相比较其他益生菌, 该菌在断奶仔猪上的应用报道较少。本试验研究乳酸片球菌 SKL-03 的体外抑菌能力及其对断奶仔猪肠道微生物菌群和免疫能力的影响, 以为乳酸片球菌制剂在断奶仔猪生产中的应用提供理论和实践依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1) 菌株。试验用乳酸片球菌 SKL-03 分离于健康断奶仔猪粪便; 大肠杆菌 k88、猪霍乱沙门氏菌 ATCC13312、金黄色葡萄球菌 ATCC6538 均由饲用微生物工程国家重点实验室保存。乳酸片球菌 SKL-03 试验品: 发酵液和冻干粉(活菌数  $\geq 5 \times 10^8$  cfu/g); 上

清液: 发酵液经 10 000 r/min, 3 min 离心后的上清液; 由北京大北农科技集团股份有限公司饲用微生物工程国家重点实验室制备。

2) 试验试剂。MRS 培养基(青岛奥博星)、NB 培养基(青岛奥博星)、脱脂乳粉、谷氨酸钠、抗坏血酸、蔗糖、海藻糖(北京绿琪生物科技有限公司)、乳酸、乙酸标准品(sigma 公司)。

### 1.2 抑菌性能

1) 试验设计。发酵液组: 乳酸片球菌 SKL-03 发酵液(含活菌数  $5 \times 10^8$  cfu/mL); 冻干粉组: 乳酸片球菌 SKL-03 冻干粉(含活菌数  $5 \times 10^8$  cfu/mL); 上清液组: 乳酸片球菌 SKL-03 发酵液经 10 000 r/min, 3 min 离心后的上清液; 培养基组: MRS 培养基; 冻干保护剂组: 冻干保护剂(脱脂乳粉 15%、谷氨酸钠 1.5%、抗坏血酸 1%、蔗糖 2%、海藻糖 7%)。

2) 试验方法。有机酸测定: HPLC 法; 流动相: 0.05% 硫酸溶液; 色谱柱: C18 柱; 流速: 1 mL/min, 紫外检测器, 210 nm。样品过 0.45  $\mu$ m 的滤膜后, 上机检测。

牛津杯法<sup>[8]</sup>: 将已灭菌的 LB 琼脂培养基加热到

收稿日期: 2020-11-11

基金项目: 武汉市科技计划项目(2018020402011234)

\* 通讯作者

周登峰, 男, 1986 年生, 硕士。

完全融化,倒在培养皿内,每皿 15 mL(下层),待其凝固。此外,将融化的培养基冷却到 50 ℃左右混入致病菌(大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌)浓度约为  $1 \times 10^8$  cfu/mL,将混有致病菌的培养基 5 mL 加到已凝固的培养基上待凝固(上层)。用无菌水将待检样品稀释:乳酸片球菌 SKL-03 发酵液稀释成 0.1 mL/mL、冻干粉 0.1 g/mL、上清液 0.1 mL/mL;在培养基表面垂直放上牛津杯,在杯中加入培养基空白及待检样品各 150  $\mu$ L,加满后在 37 ℃培养 16~18 h;游标卡尺测量抑菌圈大小。

### 1.3 动物功效试验

1)试验动物与试验设计。将 90 头体重、性别比

例相近的 21 日龄杜长大断奶仔猪随机分为 4 组,A 组:饲喂基础日粮;B 组:饲喂基础日粮+乳酸片球菌 SKL-03 菌粉 1 kg/t;C 组:饲喂基础日粮+乳酸片球菌 SKL-03 上清液 1 L/t;D 组:饲喂基础日粮+乳酸片球菌 SKL-03 发酵液 1 L/t。每组 6 个重复,每个重复 3 头猪,试验期 49 d。

2)试验饲料及饲养管理。试验基础日粮为玉米-豆粕型日粮,参照 NCR(2012)7~11、11~25 kg 阶段猪营养需要配制,基础日粮组成及营养水平见表 1。本试验在武汉绿色巨农牧股份有限公司进行,养殖及防疫程序按猪场规定进行。

3)样品采集与处理。于试验第 49 天结算饲料,

表 1 基础饲料组成及营养水平(风干基础)

项目	第 1~14 天	第 15~19 天
玉米(CP7.8%)	30	32
膨化玉米(CP7.8%)	27	30
去皮豆粕(44.2%)	13	16
膨化大豆	8.4	7.8
大豆浓缩蛋白	3.00	2.00
血浆蛋白粉	2.5	1.00
进口鱼粉(CP 62.5%)	3.00	2.00
乳清粉(3%)	7.00	3.00
大豆油	2.00	2.10
蔗糖	2.00	2.00
石粉	0.65	0.62
碳酸氢钙	0.30	0.31
氯化胆碱	0.15	0.15
食盐	0.40	0.40
L-赖氨酸盐酸盐(78.0%)	0.27	0.29
DL-蛋氨酸(99%)	0.08	0.08
维生素预混料	0.05	0.05
矿物质预混料	0.20	0.20
合计	100	100
消化能/(MJ/kg)	14.69	14.64
粗蛋白质/%	19.01	18.04
钙/%	0.61	0.53
总磷/%	0.55	0.49
有效磷/%	0.36	0.29
可消化赖氨酸/%	1.35	1.23
可消化蛋氨酸/%	0.39	0.37
可消化苏氨酸/%	0.80	0.73
可消化色氨酸/%	0.23	0.21

注:①维生素预混料为每千克饲料提供:VA 8 000 IU,VD<sub>3</sub> 2 000 IU,VE 25.0 IU,VK 1.2 mg,VB<sub>1</sub> 2.5 mg,VB<sub>2</sub> 6.5 mg,VB<sub>6</sub> 10.0 mg,VB<sub>12</sub> 50 mg,生物素 0.15 mg,叶酸 1.0 mg,D-泛酸 20.0 mg,烟酸 45 mg。②矿物质预混料为每千克饲料提供:Fe 100 mg,Cu 100 mg,Zn 100 mg,Mn 4 mg,Se 0.35 mg。③营养水平为计算值。

所有猪只禁食 12 h。试验第 50 天对所有试验猪进行称重并记录,按顺序屠宰。采集十二指肠、空肠黏膜样品和结肠、盲肠食糜样品,液氮速冻后置于-80 ℃冰箱保存。

4)肠道微生物群落。采用实时荧光定量法<sup>[9]</sup>测定得到断奶仔猪结肠和盲肠中大肠杆菌、沙门氏菌和乳酸杆菌的数量。

5)免疫功能。十二指肠和空肠黏膜中 SigA 的含量采用猪分泌型免疫球蛋白 A(SigA)酶联免疫吸附试验试剂盒检测。

#### 1.4 数据分析

使用 SPASS 20.0 统计软件进行单因素方差分析,数据以“平均值±标准误差”表示, $P<0.05$  为差异显著, $0.05 \leq P<0.10$  为有显著差异趋势。

## 2 结果与分析

### 2.1 乳酸片球菌 SKL-03 试验品对致病菌的抑制作用

由表 2 可知,相比于培养基组和冻干保护剂组,不同试验品对致病菌均有显著抑制作用( $P<0.05$ ),乳酸片球菌 SKL-03 发酵液组抑菌效果最佳,上清液组次之,冻干粉组抑菌圈直径最小;不同试验品组抑菌圈直径随乳酸和乙酸含量的降低而下降。

表 2 乳酸片球菌 SKL-03 试验品有机酸含量及对指示菌的抑制效果

项目	发酵液组	冻干粉组	上清液组	培养基组	冻干保护剂组	P 值
大肠杆菌/mm	20.30±0.26a	14.21±0.09b	18.41±0.20c	7.80±0.10d	7.80±0.10 d	0.236
金黄色葡萄球菌/mm	18.03±0.45a	15.20±0.07b	16.31±0.13c	7.80±0.10d	7.80±0.10d	0.009
沙门氏菌/mm	19.39±0.21a	15.28±0.36b	17.29±0.16c	7.80±0.10d	7.80±0.10d	0.858
乳酸/(g/L)	10.81±0.24	6.76±0.12	9.24±0.05	未检出	未检出	未检出
乙酸/(g/L)	9.79±0.03	3.61±0.07	4.38±0.15	未检出	未检出	未检出

注:同行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 3 乳酸片球菌制剂对 70 日龄仔猪盲肠和结肠菌群的影响

项目	A 组	B 组	C 组	D 组	P 值	
盲肠	大肠杆菌 lg(CFU/g)	8.51±0.16a	7.97±0.13b	8.02±0.09b	8.01±0.08b	0.04
	乳酸杆菌 lg(CFU/g)	10.23±0.12a	10.83±0.14b	10.84±0.14b	11.08±0.30b	0.05
	沙门氏菌 lg(CFU/g)	3.63±0.10a	2.75±0.15b	2.73±0.12b	2.47±0.08b	0.00
结肠	大肠杆菌 lg(CFU/g)	8.74±0.10a	8.43±0.10b	8.41±0.09b	8.46±0.08a	0.11
	乳酸杆菌 lg(CFU/g)	11.03±0.10	11.21±0.11	11.25±0.12	11.23±0.09	0.46
	沙门氏菌 lg(CFU/g)	3.46±0.26a	2.73±0.31b	2.82±0.11ab	2.75±0.08b	0.12

### 2.2 乳酸片球菌 SKL-03 对断奶仔猪肠道菌群的影响

由表 3 可知,与空白组相比,菌粉组、上清液组、发酵液组盲肠中的大肠杆菌和沙门氏菌的数量显著降低( $P<0.05$ )、乳杆菌数量显著提高( $P<0.05$ );菌粉组、上清液组结肠中大肠杆菌数量显著降低( $P<0.05$ ),发酵组差异不显著( $P>0.05$ );各组间结肠中乳酸杆菌数量差异不显著( $P>0.05$ );菌粉组和发酵液组结肠中沙门氏菌数量显著降低( $P<0.05$ ),上清液无显著差异( $P>0.05$ )。

### 2.3 乳酸片球菌 SKL-03 对断奶仔猪十二指肠和空肠 SIgA 的影响

由表 4 可知,与空白组相比,上清液组、发酵液组十二指肠黏膜中 SIgA 含量显著提高( $P<0.05$ ),菌粉组差异不显著( $P>0.05$ );菌粉组、上清液组、发酵液组空肠黏膜中 SIgA 含量显著提高( $P<0.05$ ),菌粉组对空肠黏膜中 SIgA 含量影响最大,显著高于上清液组和发酵液组( $P<0.05$ )。

## 3 讨论

### 3.1 乳酸片球菌 SKL-03 对致病菌的抑制作用

研究<sup>[10-12]</sup>表明,乳酸片球菌产生的有机酸和乳酸片球菌素等能有效抑制致病菌。本试验研究表明,乳酸片球菌 SKL-03 菌粉、上清液、发酵液对大

表 4 乳酸片球菌制剂 70 日龄仔猪十二指肠和空肠黏膜中 SIgA 含量的影响

项目	A 组	B 组	C 组	D 组	P 值
十二指肠黏膜中 SIgA 含量/( $\mu\text{g/g}$ )	5.56 $\pm$ 0.06a	5.68 $\pm$ 0.04ab	5.89 $\pm$ 0.13b	5.85 $\pm$ 0.11b	0.076
空肠黏膜中 SIgA 含量/( $\mu\text{g/g}$ )	11.39 $\pm$ 0.46a	14.52 $\pm$ 0.68b	13.04 $\pm$ 0.42c	13.01 $\pm$ 0.15c	0.002

肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌均有显著的抑菌效果,这与王建设等<sup>[13]</sup>、Mduduzi<sup>[14]</sup>、陈亚男等<sup>[15]</sup>的研究结果相似;在牛津杯法抑菌试验中,发酵液组的抑菌效果最好,其次是上清液组;且抑菌能力与试验品中的有机酸含量有关,试验品种有机酸含量越高,抑菌圈直径越大,表明乳酸片球菌可通过产生有机酸等抑菌物质抑制病原菌的生长。

### 3.2 乳酸片球菌 SKL-03 对断奶仔猪肠道菌群的影响

断奶应激因降低仔猪肠道有益菌数量,增加有害菌数量而危害断奶仔猪的健康<sup>[16]</sup>。诸多研究<sup>[17-20]</sup>表明,在断奶仔猪饲料中添加乳酸菌具有调节肠道微生物群、保持仔猪肠道微生物群稳定的效果。本试验研究表明,与空白组相比,菌粉组、上清液组、发酵液组盲肠中的大肠杆菌和沙门氏菌的数量显著降低( $P<0.05$ )、乳杆菌数量显著提高( $P<0.05$ );菌粉组、上清液组结肠中大肠杆菌数量显著降低( $P<0.05$ ),菌粉组和发酵液组结肠中沙门氏菌数量显著降低( $P<0.05$ ),乳酸杆菌数量差异不显著( $P>0.05$ ),这与学者们<sup>[21-24]</sup>的研究结果相似;这表明饲料中添加乳酸片球菌及其代谢产物能够抑制有害菌生长,改善肠道微生态环境。

### 3.3 乳酸片球菌 SKL-03 对断奶仔猪十二指肠和空肠 SIgA 的影响

SIgA 具有对机体实现免疫保护的作用<sup>[16]</sup>,本试验结果表明,饲料中添加乳酸片球菌 SKL-03 及其代谢产物可通过提高十二指肠及空肠黏膜中 SIgA 的含量来对机体实现免疫保护。

## 4 结 论

本试验条件下,乳酸片球菌 SKL-03 菌粉、上清液、发酵液具有抑制病原菌生长的作用,在饲料中添加上述试验品具有降低肠道致病菌的数量,提高有益菌数量和小肠黏膜免疫功能的效果。

### 参 考 文 献

[1] 刘红宾. 母猪微生物垂直传递影响仔猪肠道的微生物定植与功

能发育[D].北京:中国农业大学,2019.  
 [2] 侯成立. 罗伊氏乳杆菌全基因组序列分析及其调节仔猪肠黏膜免疫功能的研究[D].北京:中国农业大学,2015.  
 [3] WALSH T R, WU Y. China bans colistin as a feed additive for animals[J]. Lancet infect dis, 2016(16): 1102.  
 [4] 刘珊珊, 李欣颖, 樊秀花. 无害李斯特菌生长特性及乳酸片球菌发酵上清液抑菌效果研究[J]. 食品科技, 2018, 43(4): 5-9.  
 [5] 檀克勤, 唐嘉虹, 马现永, 等. 片球菌抑菌机制及其在畜禽生产中的应用[J]. 中国畜牧兽医, 2020(10): 3203-3213.  
 [6] 廖波, 王薇薇, 王永伟, 等. 饲用乳酸菌在畜禽养殖上的应用研究进展[J]. 中国饲料, 2019(19): 13-18.  
 [7] 张旭, 赵斌, 张香美, 等. 产细菌素乳酸菌的筛选及细菌素相关基因的分析[J]. 中国农业大学学报, 2013(4): 168-177.  
 [8] 董婷, 周志江, 韩焯, 等. 乳酸片球菌 PA003 抑菌作用及体外耐受性的研究[J]. 食品工业科技, 2014(5): 140-144.  
 [9] 王淑楠. 茶树油对断奶仔猪生长性能及肠道屏障功能的影响[D]. 扬州: 扬州大学, 2017.  
 [10] 章文明, 汪海峰, 刘建新. 乳酸杆菌益生作用机制的研究进展[J]. 动物营养学报, 2012, 24(3): 389-396.  
 [11] ROSELLI M, FINAMORE A, BRITTI M S, et al. Alternatives to in-feed antibiotics in pigs: evaluation of probiotics, zinc or organic acids as protective agents for the intestinal mucosa. A comparison of in vitro and in vivo results [J]. Animal reaserch, 2005, 54(3): 203-218.  
 [12] CASTILLO M, MARTIN-ORUE S M, MANZANILLA E G, et al. Quantification of total bacteria, enterobacteria and lactobacilli populations in pig digesta by real-time PCR [J]. Veterinary microbiology, 2006, 114(1/2): 165-170.  
 [13] 王建设, 赵海燕, 王凡, 等. 乳酸片球菌的分离鉴定与益生功能的初步研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(24): 201-206.  
 [14] MDUDUZI P M. Lactin acid bacteria and the irbacterins: classification, biosynthesis and application against uropathogens. Amini-review[J]. Molecules, 2017(22): 1255.  
 [15] 陈亚男, 郭伟强, 陈翠英, 等. 3 株乳酸片球菌的鉴定及其耐酸耐盐特性和抑菌作用研究[J]. 动物医学进展, 2020, 41(7): 42-47.  
 [16] 邢帅兵, 陈代文, 余冰, 等. 枯草芽孢杆菌对断奶仔猪生长性能和肠道形态、黏膜免疫及菌群数量的影响[J]. 动物营养学报, 2020(5): 2066-2073.  
 [17] 蔡艳, 叶盛, 韩晓云, 等. 乳酸菌对仔猪生长性能及肠道菌群的影响[J]. 江西畜牧兽医杂志, 2018(5): 15-16.  
 [18] 饶甜甜. 高稳定性乳酸菌饲料添加剂的开发[D]. 福州: 福州大学, 2016.  
 [19] 刘志昌, 王喜亮, 毕丁仁, 等. 枯草芽孢杆菌 TL 对断奶仔猪生长发育、肠道环境及健康状况的影响 [J]. 华中农业大学学报,

# 重庆动物园游蛇展示笼舍的环境丰容及其影响

欧洁 袁梨 吴登虎 姚勇 张邓华 唐家桂

重庆市动物园管理处,重庆 400050

**摘要** 本文采用环境丰容的方法对重庆动物园 4 种游蛇的 4 个展示笼舍进行丰容, 通过比较丰容前后 4 种游蛇的饲养生存状况对丰容效果进行评估。结果显示: 丰容前, 4 种蛇死亡主要集中在引入初期和喂食期, 禁食期死亡数量较少。丰容后, 展示笼舍中饲养的王锦蛇的新引入个体于引入初期出现死亡, 而黑眉锦蛇、滑鼠蛇和乌梢蛇在引入初期和喂食期尚未发生死亡。由此表明, 丰容笼舍基本满足王锦蛇、黑眉锦蛇、滑鼠蛇和乌梢蛇的生存需求, 值得推广应用。

**关键词** 游蛇; 环境丰容; 生存状况; 动物园

王锦蛇 (*Elaphe carinata*)、黑眉锦蛇 (*Elaphe taeniura*)、滑鼠蛇 (*Ptyas mucosus*) 和乌梢蛇 (*Zaocys dhumnades*) 广泛分布于我国, 它们在药用和食用等方面有巨大的经济价值, 被列入《国家保护的有益的或者有重要经济、科学研究价值的陆生野生动物名录》。近年来, 随着生态环境的恶化和人为因素等的影响, 野外蛇类的种群及其数量正日益减少。动物园肩负着野生动物异地保护、科学研究和保护教育的重任, 也是蛇类进行异地保护的重要场所<sup>[1]</sup>。但是, 由于两栖爬行动物对环境的高要求, 同时圈养展出模式不同于经济蛇和宠物蛇的饲养模式, 因此国内动物园的蛇类饲养普遍存在管理相对薄弱、死亡较多、研究较少的问题。重庆动物园近年来将环境丰容的理念融入到两栖爬行动物特别是蛇类的饲养和保护教育工作中, 通过利用植物、水体及躲

避等各种自然要素还原其原生境, 并通过对灯光、通风和保暖的改善, 以期达到为蛇类创造一个适宜的生存环境, 并满足公众认知的目的。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

2015 年 1 月-2019 年 6 月, 重庆动物园两栖爬行馆饲养展出的所有有鳞目 (Squamata)、游蛇科 (Colubridae) 蛇: 王锦蛇、黑眉锦蛇、滑鼠蛇和乌梢蛇。所有游蛇均不冬眠 (展示笼舍温度维持在 20 ℃ 左右), 每年 3-10 月为喂食期, 每年 11 月至第 2 年 2 月为禁食期。

研究期间, 所有游蛇均饲养在两栖爬行馆的 8 个展示笼舍中。展示笼舍为近长方体构造, 底面和操作面为水泥结构, 顶面为铁密网结构, 其余三面

收稿日期: 2020-10-29

欧洁, 女, 1984 年生, 硕士, 畜牧师。

2018, 37(3): 75-81.

[20] 李涛. 乳酸杆菌发酵饲料对猪生长、肉质、血清抗氧化及肠道菌群的影响[D]. 雅安: 四川农业大学, 2014.

[21] 刘公言, 孙海涛, 刘策, 等. 乳酸片球菌对断奶仔猪生长性能及肠道微生物的影响[J]. 山东农业科学, 2020, 52(1): 131-135.

[22] 秦红, 赵燕, 车向荣, 等. 乳酸片球菌对肥育猪生长性能及肠道抗氧化能力、形态结构和菌群的影响[J]. 动物营养学报, 2017, 29

(8): 2953-2960.

[23] 赵悦, 王志跃, 杨海明, 等. 乳酸菌的益生功能及其在畜牧生产中的应用[J]. 饲料研究, 2015, 15(2): 6-10.

[24] 赵树平, 高鹏, 包维臣, 等. 乳酸菌在反刍动物应用中的研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2015, 47(3): 130-132.

【责任编辑: 胡敏】