

武定鸡肠黏膜乳酸菌的分离鉴定及应用

郑锦玲¹ 陈媛² 李云蓉³ 彭洁¹ 李石友¹ 李文贵⁴ 柴俊⁴ 卢志远⁴ 张以芳^{4*}

1. 云南农业职业技术学院, 昆明 650212; 2. 昆明医科大学海源学院, 昆明 650106;

3. 云南省昆明市五华区黑林铺农业综合服务站, 昆明 650106; 4. 云南农业大学动物科学技术学院, 昆明 650201

摘要 为进一步挖掘益生菌资源, 从武定鸡黏膜分离鸡源乳酸菌, 共分离到 20 株乳酸菌, 分别命名为 LacC1 ~ LacC20。根据培养特性、革兰氏染色、生理生化特性和 16s-rRNA 方法等鉴定为 7 个种。并通过乳酸菌益生特性试验筛选出 3 株优良菌株, 进行雏鸡饲喂试验。结果表明在雏鸡的饮水中添加乳酸菌, 可以明显增加武定鸡的日增重、法氏囊和脾脏等免疫器官的重量和鸡群肠道中乳酸菌含量, 提高鸡免疫器官指数和外周淋巴细胞指数 SI, 降低料肉比和死亡率。

关键词 武定鸡; 乳酸菌; 分离鉴定; 16s-rRNA; 益生特性

武定鸡是云南的一个优秀地方肉鸡品种, 其鸡肉中含有 10 多种对人体有益的微量元素, 其所含的氨基酸、活性蛋白酶等人体所需的营养成分远远高于省内其他优良的鸡种^[1]。

武定鸡在云南地区被广泛养殖, 然而随着规模化养殖的大力发展, 抗生素在鸡肉体内的富集也对人类的健康产生了威胁^[2]。因此, 急需开发一种可以增强鸡群抵抗力, 并且不会产生耐药问题的产品来代替抗生素的大量使用。

益生菌由此进入了人们的视野, 并越来越引起人们的关注^[3]。乳酸菌是一类能利用碳水化合物产生大量乳酸的非病原性、革兰氏阳性细菌的通称^[4]。乳酸菌在动物肠道中能产生乳酸及其他代谢产物, 抑制肠道内致病性微生物的生长繁殖^[5], 合成 B 族维生素, 促进钙磷吸收等, 对人和畜禽的健康起着有益作用。

为探究乳酸菌在鸡肠道内的作用, 本研究从武定鸡肠道分离、鉴定各种乳酸菌, 并通过乳酸菌益生特性试验筛选出优良菌株, 进行雏鸡饲喂试验, 探讨乳酸菌在改善武定鸡的生产性能及增强鸡群抵抗力方面所起的作用, 进一步验证其生物学功效及临床应用效果。

1 材料与方法

1.1 试验样品和试验动物

健康的武定成鸡(体重 2 000 g 左右), 来源于云南武定县周边农户自家养殖、没有饲喂添加抗生素饲料的武定鸡。动物试验所用武定雏鸡和饲料由云岭广大种畜禽饲料公司提供。

1.2 分离鉴定

1) 分离培养。将武定成鸡解剖取出肠道, 将小肠样品去除粪便, 无菌剪开, 用生理盐水冲洗, 用载玻片轻轻刮取肠道壁上的黏性物质 1 g, 加入生理盐水中, 梯度稀释($10^{-1} \sim 10^{-6}$), 取 1 mL 稀释液倾注培养于加碳酸钙 MRS 培养基内, 各稀释度倾注 2 个平皿, 分别在 37 °C 的恒温培养箱中厌氧培养 48 h。挑取单个有典型溶钙圈的菌落, MRS 平板划线传代, 纯培养^[6]。挑取典型菌落进行革兰氏染色, 筛选和保留革兰氏阳性菌。

2) 初步筛选鉴定。对分离菌株进行革兰氏染色、形态大小检查、运动力检查、过氧化氢酶试验, 淘汰革兰氏阴性、非杆状、有运动性、过氧化氢酶阳性的非乳酸菌菌株。

3) 分类鉴定。根据分离菌株的表型特性(培养

收稿日期: 2017-03-20

基金项目: 云南农业职业技术学院重点科研项目; 云南省重点新产品开发(2014BB04)及云南省院士专家工作站建设项目(2014IC034)

* 通讯作者

郑锦玲, 女, 1967 年生, 博士, 副教授, 国家执业兽医师。

特性、形态特征、运动性、生理学特性及各种糖发酵性能等),参照《乳酸细菌分类鉴定及试验方法》^[7]及《伯杰氏细菌鉴定手册》^[8]乳酸菌种属特性鉴定到种或亚种。

4)乳酸菌 16s-rRNA 鉴定。根据 GenBank 上乳杆菌的 16s-rRNA 基因参考系列,使用 Primer 5.0 设计合成 16s-rRNA 的 2 条引物,由大连宝生物(TaKaRa)公司合成。首先通过 MRS 液体培养基培养至对数生长期,分别提取 3 株乳酸菌的总 DNA 作为模板。用引物进行 PCR 扩增,对扩增产物进行纯化,将已经纯化样品送大连宝生物(TaKaRa)公司进行测序。利用 DNASTAR 等生物软件将测序结果与 GenBank 中选择的参考菌株 16s-rRNA 序列进行同源性分析,构建进化树。

1.3 菌株筛选

1)乳酸菌产酸能力测定。配制 pH 7.0 的 MRS 肉汤,分别接种分离乳酸菌,37 °C 培养,每隔 6 h 用酸度计记录 pH 值。

2)乳酸菌耐酸能力测定试验。配制 pH 1.5、2.5、3.5、4.5 的液体培养基,以 pH 为 6.5 的液体培养基作对照。每 6 mL 培养基接种 300 μL 菌液,37 °C 静止培养 12 h 后,观察培养基中细菌生长情况。

3)乳酸菌的耐胆盐能力试验。配制胆盐浓度为 0.1%、0.2%、0.3%、0.4% (W/V) 的液体培养基,以不加胆盐的液体培养基作对照,然后在每 6 mL 的培养基中接种 300 μL 的菌液,于 37 °C 厌氧培养,在接种后的 300 min 取菌液做平板计数^[9]。

4)乳酸菌的肠黏膜吸附能力测定。

肠黏液的制备^[10]:解剖取小肠,无菌生理盐水冲洗 3 次,剪开肠壁,钝塑料片轻轻刮取肠黏液,无菌 PBS 混匀,4 °C、12 000 r/min 离心 2 次,每次 15 min。取上清液,用 Bradford 法测定蛋白含量,用 PBS (pH 值 7.4) 调整蛋白浓度为 1 mg/mL 后置于 -20 °C 保存备用。

体外黏附试验:肠黏液(1 mg/mL)100 μL 加入 96 孔培养板,4 °C 固定过夜。用 PBS 洗涤除去未黏附黏液,加 100 μL 益生菌悬液(10⁸ cfu/mL),30 °C 孵育 2 h。用 PBS 洗涤除去未黏附的益生菌,加 50 μL PBS 及 20 μL MTT(5 mg/mL),30 °C 孵育 1 h 后,加裂解液(20%SDS-50%DMSO)振荡 30 min,用酶标仪测定各孔吸光度值(λ=570 nm)^[10-11]。

重复 3 次,以脱脂奶粉作阴性对照组。益生菌黏附率(%)=(D₁-D₀)/(D₂-D₀)×100 式中,D₁、D₂、D₀ 分别是试验组、乳酸菌+原液、空白对照组吸光度值。

5)乳酸菌的抑菌试验。本试验采用牛津杯法^[12]在体外进行抑菌试验,并测量抑菌圈直径,来测定菌株抑菌能力。选取抑菌效果好的菌株进行后续动物试验。

1.4 动物生产性能及免疫指标和功能测定

将经过乳酸菌益生特性试验筛选的 3 株优良菌株,进行分组饲喂 1 日龄雏鸡,并设空白对照组,每组 20 只雏鸡。菌液制成 1.0×10¹⁰ cfu/mL 的菌液,每天取 5 mL 加入到 95 mL 的水中饲喂雏鸡,从雏鸡出生的第 2 天开始喂养。分别进行以下检测。

1)动物生产性能测定。每隔 30 d 测 1 次体重,统计增重结果;在饲喂雏鸡过程中记录每天每组所喂饲料的重量,并最后与体重一起计算每组的料肉比;统计每组雏鸡在 60 d 内的死亡只数,计算每组的死亡率。

2)肠道乳酸菌数量测定。分别在饲喂到 30 日龄和 60 日龄时取鸡肠道除去粪便,分离肠道中乳酸菌(方法同上),通过平板划线分离计数,计算并记录每克肠道内容物中乳酸菌数量。

3)免疫器官指数测定。在饲喂到 60 d 时,每组随机选取 2 只鸡解剖,分别取完整脾脏和法氏囊称重。然后计算免疫器官指数。免疫器官指数=免疫器官重量/体重×100。

4)淋巴细胞转化试验。

淋巴细胞转化试验:在饲喂乳酸菌 60 d,采集鸡翅膀内侧静脉血液,颠倒混匀采血管,防止血液局部凝集。

抗凝血 3 000 r/min 离心取血浆,血细胞用灭菌生理盐水按体积 1:1 重悬,然后小心平铺于等体积外周淋巴细胞分离液的上部。3 000 r/min 离心 15 min,PBMC 将分布于中间层,用移液器吸出 PBMC,置于已灭菌的 5 mL 离心管内,加入灭菌生理盐水重悬洗涤,3 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,得到 PBMC 用完全 PRMI 1640 培养液(含青霉素 100 IU/mL,链霉素 100 μg/mL,小牛血清 10%),将细胞稀释成 5×10⁶ 个/mL 待用。

将匀好的细胞悬液加入 96 孔板,每份淋巴细胞悬液分 4 个孔,每孔 100 μL。其中 2 孔加入浓度

为 5 $\mu\text{g/mL}$ ConA 刺激 (0.1 mg/mL ConA 加入 10 μL , 孔内液体总体积为 200 μL), 阴性对照 2 孔不加入 ConA, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中培养 66 h。融化, 向各孔中加入 40 μL 试剂继续培养 4 h。最后, 每孔加入 25 μL 10% SDS 终止反应。酶标仪 490 nm 测吸光度 (OD_{490}), 计算刺激指数 SI, $\text{SI} = \text{试验孔 } \text{OD}_{490} \text{ 均值} / \text{阴性对照 } \text{OD}_{490} \text{ 均值}$, 以 SI 高低来判断淋巴细胞增殖能力。

1.5 数据处理

数据统计分析采用 SAS 8.12 统计软件 ANOVA 进行显著性分析, 并采用邓肯氏进行多重比较; 统计结果所有数据均以 $\text{mean} \pm \text{SE}$ 表示, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 分离鉴定结果

1) 形态学鉴定。从武定鸡肠道中共分离到 20 株乳酸菌, 分别命名为 LacC1 ~ LacC20。20 株菌株在含有碳酸钙的 MRS 培养基琼脂平板上, 形成乳白色、圆形、边缘整齐、光滑、隆起有溶钙现象的菌落。将 20 株乳酸菌进行革兰氏染色镜检, 1 000 倍光镜下 20 株乳酸菌均为蓝紫色, 呈长短不一杆状、线状排列, 无鞭毛, 无荚膜, 无芽孢的 G⁺ 杆菌。

2) 分离菌株的生化特性。将所分离菌株进行属的生化试验和种的生化试验, 参考《乳酸细菌分类鉴定及试验方法》^[7]和《伯杰氏鉴定手册》^[8], 初步判断含有唾液乳杆菌 4 株、阴道乳杆菌 4 株、4 株短乳杆菌、2 株果糖乳杆菌、3 株罗伊乳杆菌、1 株约氏乳杆菌、2 株鸡乳杆菌。其中 LacC1 和 LacC3 为唾液乳杆菌, LacC2 为阴道乳酸杆菌。

3) 乳酸菌 16s-rRNA 鉴定结果。用引物对提取的 DNA 进行 16s-rRNA 基因片段 PCR 扩增, 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。优化后的体系具有专一性的扩增效果, 无非特异性的扩增, 无拖带, 扩增片段在 1 500 bp 左右, 与期望值相符。

4) 同源性分析结果。为简化工作量, 只对筛选

出的 3 株乳酸菌进行测序, 将 3 株乳酸菌与 Genbank 所收入的 39 株乳酸菌, 用 Blast、Clustal、MEGA 等生物软件分析, 构建遗传进化树。可知 LacC1 和 LacC3 与唾液乳杆菌 (*Lactobacillus salivarius*) 在同一分支上, 说明其同源性较近。LacC2 与阴道乳酸杆菌 (*Lactobacillus vaginalis*) 处于同一分支, 其二者同源性较近。

2.2 菌株筛选结果

1) 乳酸菌产酸、耐酸和耐胆盐测定。

乳酸菌产酸能力测定表明 LacC1、LacC2 和 LacC3 的产酸能力相对较高; 乳酸菌的耐酸能力测定表明均能耐受 pH 为 3.5 以上的强酸环境, 其中, LacC1、LacC2、LacC3 等 9 株能耐受 pH 为 1.5 的强酸环境; 乳酸菌耐胆盐能力测定表明 LacC1、LacC2、LacC3 在 0.4% 的胆盐浓度下有较高的存活数。

根据以上 20 株乳酸菌的生物学特性部分研究结果表明, 其中 LacC1、LacC2、LacC3 产酸值、耐酸耐胆盐能力较好, 主要选择这 3 株乳酸菌进行后续试验。

2) 乳酸菌肠道黏附能力测定。3 株乳杆菌对鸡肠道都有一定的黏附能力, 黏附率分别为 4.01%、4.31%、4.11%。

3) 乳酸菌抑菌能力测定结果。3 株乳酸菌对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均有一定的抑菌效果, LacC1 ~ LacC3 抑菌圈分别高达 10 ~ 16 mm 和 13 ~ 18 mm。

2.3 动物试验结果

1) 动物生产性能测定结果。由表 1 可知饲喂乳酸菌组雏鸡的增重显著高于对照组 ($P < 0.05$), 各组的平均增重与对照组相比分别有 6.3%、5.0%、6.3% 的优势; 饲喂乳酸菌组雏鸡的料肉比显著低于对照组 ($P < 0.05$); 死亡率明显低于对照组。

2) 动物肠道中乳酸菌数量。由表 2 可知试验组雏鸡的肠道中乳酸菌含量显著高于对照组 ($P < 0.05$)。在 30 日龄各组与对照组相比肠道中乳酸菌数量分别有 12%、7%、12% 的优势; 在 60 日龄各组

表 1 试验动物日增重、料肉比和死亡率

组别	1 日龄平均重量/g	30 d 平均重量/g	60 d 平均重量/g	平均日增重/g	30 d 料肉比	60 d 料肉比	死亡率/%
对照组	40.2	386.7	968.0	15.4	2.62:1	2.84:1	25
LacC1 组	41.0	400.1	1 029.5	16.5	2.51:1	2.78:1	10
LacC2 组	40.3	412.1	1 014.9	16.2	2.53:1	2.76:1	10
LacC3 组	41.2	408.9	1 030.6	16.5	2.49:1	2.79:1	10

表 2 肠道中乳酸菌含量 cfu/g

组别	30 日龄	60 日龄
对照组	4.1×10 ⁷	4.3×10 ⁷
LacC1 组	4.6×10 ⁷	5.1×10 ⁷
LacC2 组	4.4×10 ⁷	5.3×10 ⁷
LacC3 组	4.6×10 ⁷	5.2×10 ⁷

分别有 18%、23%、21% 的优势。

3) 试验动物的免疫器官指数和刺激指数。由表 3 可知饲喂乳酸菌组的雏鸡的免疫器官指数显著高于对照组 ($P < 0.05$), 雏鸡的法氏囊和脾脏的平均重量显著高于对照组 ($P < 0.05$); 饲喂乳酸菌各组的外周淋巴细胞增殖刺激指数平均值均显著高于对照组 ($P < 0.05$), 而 3 个试验组相比较差异不显著 ($P >$

表 3 免疫器官指数和刺激指数

组别	法氏囊平均重量/g	脾脏平均重量/g	免疫器官指数(法氏囊)	免疫器官指数(脾)	刺激指数 SI ($X \pm S$)
对照组	2.55	1.44	0.26	0.15	1.127 5±0.025 0
LacC1 组	4.43	2.06	0.43	0.20	1.479 5±0.061 5
LacC2 组	4.14	1.96	0.40	0.19	1.516 0±0.277 7
LacC3 组	4.36	2.16	0.42	0.20	1.659 0±0.082 0

本研究从武定鸡的肠道样品分离到 20 株乳酸菌, 根据培养特性、革兰氏染色、生理生化特性, 初步鉴定为 7 个种。16s-rRNA 同源性分析表明 LacC1 和 LacC3 为唾液乳杆菌, LacC2 为阴道乳酸杆菌。通过乳酸菌特性分析筛选出 LacC1、LacC2 和 LacC3 等 3 株菌株, 其耐酸、耐胆盐能力, 抑菌及产酸能力和肠道黏附力都相对优秀, 适合作为益生菌候选菌株。研究表明乳酸菌饲喂动物可提高饲料利用率、体增重, 并增强机体免疫水平。张以芳等^[10]用乳酸菌制剂饲喂雏鸡, 在 16 日龄时用沙门氏菌攻毒, 有 3 个试验组的平均增重比对照组高 7.23%, 试验组各组的成活率比对照组高出 10% ~ 13%。本研究选择 3 株候选菌株进行武定鸡饲喂试验, 结果表明添加乳酸菌可以明显增加武定鸡的日增重、法氏囊和脾脏等免疫器官的重量和鸡群肠道中乳酸菌含量; 提高鸡免疫器官指数和外周淋巴细胞指数 SI; 降低料肉比和死亡率, 获得了较好效果。

综上所述, 乳酸菌在改善武定鸡的生产性能, 以及增强鸡群抵抗力方面起到了一定的作用。且由于菌株来源于武定鸡本身, 因此更加适宜武定鸡肠道环境, 可以起到更好的保护作用。本研究为乳酸菌在地方养鸡生产的应用做出了探讨, 为未来乳酸

菌的研究和发展奠定了良好的基础。

3 讨 论

长期以来抗生素在畜牧业的大量使用, 给我国带来了严重的经济损失, 威胁着我国居民的健康。益生菌作为良好的抗生素替代品已经逐渐成熟。理想的益生乳酸菌应该来自健康动物肠道的自然菌群, 本身无致病性, 能顺利通过消化道, 在消化道极端条件(高胃酸、高胆汁)下具有较高的存活率^[13], 并能在消化道上皮细胞表面内黏附定殖^[14], 与宿主肠道内的有害菌群竞争。此外, 还具有拮抗、免疫调节等生理作用^[15]。

参 考 文 献

- [1] 董平. 发挥品牌资源优势做强武定鸡产业[J]. 畜禽业, 2014(4): 52-54.
- [2] MA YUE. Overuse antibiotics and its harmful consequences for public health[C]. The 5th Congress of Asian Society for Pediatric Research, 2009: 5, 21.
- [3] 黄广明, 劳晔. 益生菌代替抗生素的可行性研究[J]. 饲料工业, 2013(7): 41-42.
- [4] GILLILAND S E. Health and nutritional benefit from lactic acid bacteria[J]. FEMS Microbiology Rev, 1999(1/2): 175-188.
- [5] CLAESON M J, VAN S D, O'TOOLE P W. The genus Lactobacillus—a genomic basis for understanding its diversity [J]. FEMS Microbiolog Lett, 2007, 269(1): 22-28.
- [6] 张以芳, 王生奎. 肉鸡嗉囊内容物中乳杆菌的鉴定[J]. 中国家禽, 2000, 22(3): 11-12.
- [7] 凌代文, 东秀珠. 乳酸细菌分类鉴定及试验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998.
- [8] 布砍南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984: 797-821.
- [9] 李妍, 张兰威. 几株乳酸菌益生潜力及降低胆固醇的研究[J]. 微生物学通报, 2007, 34(6): 1146-1149.
- [10] PEREZ, MINNAARD Y, DISALVO E, et al. Surface properties of bifidobacterial strains of human origin [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(1): 21-26.