



王丽娜, 高飞, 朱晓彤, 等. 不同有机酸对断奶仔猪肠道厌氧培养微生物菌群的影响[J]. 华南农业大学学报, 2015, 36(6): 9-14.

不同有机酸对断奶仔猪肠道厌氧培养微生物菌群的影响

王丽娜¹, 高飞¹, 朱晓彤¹, 高萍¹, 王松波¹, 江青艳¹, 刁欠云¹, 张永亮¹, 吴仕林², 束刚¹
(1 华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642; 2 广州智特奇生物科技股份有限公司, 广东 广州 510663)

摘要:【目的】建立仔猪肠道微生物菌群调控的离体模型, 并研究有机酸对断奶仔猪肠道微生物菌群的影响. 【方法】每次试验选取 2 头 40 日龄杜 × (长 × 大) 仔猪, 屠宰后取其空肠和回肠混合食糜, 按照每管 300 μL 分装于 2 mL 离心管, 分别添加 30 mmol · L⁻¹ 不同有机酸 (甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、乳酸、富马酸、柠檬酸、苯甲酸、苹果酸和山梨酸), 置于厌氧工作站中, 厌氧培养 4 h 后提取食糜中基因组 DNA, 应用绝对定量 PCR 技术测定食糜中乳杆菌属 *Lactobacillus*、双歧杆菌属 *Bifidobacterium*、沙门菌属 *Salmonella* 和大肠埃希菌 *Escherichia coli* 的数量变化. 随后进一步选择抑菌活性较强的甲酸、乙酸、丁酸、乳酸、柠檬酸研究其抑菌活性的浓度梯度效应. 【结果和结论】成功建立了体外全食糜厌氧培养体系, 研究结果发现, 甲酸、丁酸和柠檬酸能呈剂量依赖性地抑制细菌增殖, 而乙酸对总菌数量影响不大; 对益生菌而言, 柠檬酸能显著抑制乳杆菌属和双歧杆菌属的增殖, 但低剂量的乳酸 (10 mmol · L⁻¹) 能显著促进乳杆菌属和双歧杆菌属的增殖, 且低剂量的乙酸 (15 mmol · L⁻¹) 也能促进双歧杆菌属的增殖; 所选择的有机酸在浓度达到 10 ~ 15 mmol · L⁻¹ 时, 均能有效抑制病原菌 (沙门菌和大肠埃希菌) 的增殖.

关键词: 有机酸; 断奶仔猪; 肠道微生物; 厌氧培养
中图分类号: S811.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2015)06-0009-06

Effects of different organic acids on anaerobically cultured intestinal microflora in weaned piglets

WANG Lina¹, GAO Fei¹, ZHU Xiaotong¹, GAO Ping¹, WANG Songbo¹, JIANG Qingyan¹,
XI Qianyun¹, ZHANG Yongliang¹, WU Shilin², SHU Gang¹
(1 College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;
2 Guangzhou Wisdom Bio-Technology Co., Ltd., Guangzhou 510663, China)

Abstract:【Objective】A research model of piglet intestinal microbial flora regulation was established *in vitro*. The effect of organic acids on intestinal microflora of piglets was studied. 【Method】In this study, for each experiment, two 40-day-old Duroc × (Landrace × large) weaned piglets were slaughtered, and the mixed chyme of jejunum and ileum was aliquoted as 300 μL every tube to 2 mL centrifuge tube, then anaerobically cultured without or with 30 mmol · L⁻¹ organic acid (including formic acid, acetic acid, propionic acid, butyric acid, lactic acid, fumaric acid, citric acid, benzoic acid, malic acid and sorbic acid, respectively). Genome DNA in chyme was extracted after 4 h anaerobic culture, and the numbers of the genus *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Salmonella* and *Escherichia coli* in the chyme were detected using the method of absolute quantitative PCR. Then five organic acids (formic acid, acetic acid, butyric acid, lactic acid and citric acid) which had a stronger antibacterial activity were selected for further study

收稿日期: 2014-12-09 优先出版时间: 2015-10-16
优先出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20151016.1446.010.html>
作者简介: 王丽娜 (1982—), 女, 讲师, 博士, E-mail: wanglina@scau.edu.cn; 通信作者: 束刚 (1979—), 男, 副教授, 博士, E-mail: shugang@scau.edu.cn
基金项目: 国家自然科学基金 (31272447); 企业委托课题: 猪用抗生素替代品——新型高效有机酸制剂的研发

of its concentration gradient effects on antibacterial activities. 【Result and conclusion】 The total chyme anaerobic culture system was successfully established *in vitro*. As a result, formic acid, butyric acid, and citric acid present dose dependently inhibited the proliferation of bacteria, but acetic acid had no obvious effects on the number of total bacteria. As for probiotics, citric acid could significantly inhibit the proliferation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. However, the low dose of lactic acid ($10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) could significantly promote the proliferation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, and the low dose of acetic acid ($15\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) could also promote *Bifidobacterium* proliferation. At the concentration levels of $10 - 15\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, all of the organic acids tested in this study effectively inhibited the proliferation of pathogenic bacteria (*Salmonella* and *E. coli*). The results of this study provide a simple and effective model for optimizing the species and optimal dose of acidifier used in pig production, and when microflora is regulated with single organic acid under the anaerobic condition, $15\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ acetic acid and $10 - 15\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ lactic acids are good choices.

Key words: organic acid; weaned piglet; intestinal microflora; anaerobic culture

动物肠道存在数量众多和种类各异的微生物, 既包括乳酸杆菌和双歧杆菌等有益菌, 也存在沙门菌和大肠埃希菌等致病菌或条件致病菌^[1]. 肠道内正常微生物菌群不仅是肠道内抵抗外来病原菌以及内源条件致病菌的第一道防线, 而且也是影响动物肠道发育和消化吸收功能的重要因素^[2-3]. 仔猪, 尤其是从出生到断奶前后的仔猪, 由于肠道发育尚不成熟, 其肠道微生态的平衡容易受到气候、断奶应激和饲料等因素的影响, 从而造成微生物菌群失调, 病原微生物感染, 进而出现腹泻甚至导致仔猪死亡^[4]. 因此, 如何调节仔猪肠道微生物区系, 改变有益菌和病原菌的比例, 对养猪生产具有重要意义.

长期以来, 抗生素一直被认为是抑制猪肠道病原微生物的首选添加剂. 但抗生素滥用所造成的药物残留和细菌耐药性等问题也日益凸显. 近年来的大量动物试验研究表明, 酸制剂在降低肠道 pH、提高饲料蛋白消化率和抑制有害微生物生长等方面均发挥着重要的作用^[5], 因而被认为是能有效替代抗生素的饲料添加剂之一^[6]. 目前养殖生产中常用的酸制剂的种类和组合多样, 既包括各种单一有机酸及其盐和无机酸, 又包括各种复合酸^[7]. 由于动物活体试验存在干扰因素多, 动物个体差异大和试验重复性差等限制, 导致不同酸制剂以及不同酸制剂组合之间的效果往往难以进行客观的评价和系统性地比较.

为快速便捷地测定有机酸对有害微生物的抑菌效应, 研究人员多选择标准菌株进行药敏试验^[8-9]. 但标准菌株既不能完全代表肠道野生菌株, 同时又忽略了肠道内多种微生物之间的互作效应, 其研究结果往往也很难在活体动物试验中得到重复验证.

因此, 本试验利用体外厌氧共培养技术, 分离培养仔猪小肠内微生物, 并利用 16S rRNA 定量分析食糜内微生物菌群的数量. 研究结果不仅可以为有机酸的效价分析提供有效的体外模型, 而且对于养猪生产中有有机酸种类和剂量的选择同样具有指导意义.

1 材料与方法

1.1 试验材料

有机酸: 甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、乳酸、富马酸、柠檬酸、苯甲酸、苹果酸和山梨酸, 均为广州吉祥生物科技有限公司产品, 为分析纯.

1.2 试验动物和厌氧培养

每次选择 2 头 35 日龄健康断奶仔猪 (华南农业大学原种猪场), 于代谢笼中饲养 (饲料配方见表 1) 5 d 后, 屠宰取其空肠和回肠内食糜, 放入冰浴的烧杯中, 用保鲜膜封口后置于厌氧工作站 (试验开始前用氮气和二氧化碳混合气体将厌氧工作站内氧气排尽, 温度调节至 $39\text{ }^{\circ}\text{C}$) 中, 并搅拌混匀, 按照每管 $300\text{ }\mu\text{L}$ 食糜分装于 40 个 2 mL 离心管中. 40 个离心管随机分成 4 组, 即未培养组、空白培养组、 $5\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 氨苄青霉素组 ($5\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}\text{ AMP}$) 和 $10\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 氨苄青霉素组 ($10\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}\text{ AMP}$). 其中, 未培养组和空白培养组添加 $100\text{ }\mu\text{L}$ 无菌生理盐水, 抗生素组添加不同剂量氨苄青霉素. 除未培养组外, 其余 3 组均厌氧培养 4 h 后立即置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用. 采用定量 PCR 检测微生物菌群, 每个处理设 10 个重复.

1.3 有机酸对全食糜厌氧培养体系微生物菌群的影响

按照“1.2”方法制备仔猪肠道食糜, 分别采用 $30\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、乳酸、富马酸、

表 1 饲粮配方表(风干基础)

Tab.1 Diet formulations (air dry basis)

原料	质量分数/%	营养成分 ²⁾	质量分数/%
玉米	63.70	粗蛋白	20.00
豆粕	21.00	赖氨酸	1.23
乳清粉	4.30	蛋氨酸+胱氨酸	0.68
鱼粉	8.00	苏氨酸	0.73
大豆油	0.70	色氨酸	0.20
赖氨酸	0.33	精氨酸	1.09
蛋氨酸	0.09	组氨酸	0.46
苏氨酸	0.10	异亮氨酸	0.70
色氨酸	0.02	亮氨酸	1.49
磷酸氢钙	0.07	苯丙氨酸	0.80
石粉	0.36	缬氨酸	0.77
食盐	0.30		
1%预混料 ¹⁾	1.00		

1)每千克预混料提供:Cu 60 mg,Fe 51.6 mg,Co 0.5 mg,Mn 25 mg,Zn 27.2 mg,I 0.039 mg,Se 0.03 mg,维生素 A 11 269.7 kIU,维生素 D₃ 2 372.6 kIU,维生素 E 26.7 IU,维生素 K₃ 2 965.7 mg,维生素 B₁ 2 965.7 mg,维生素 B₂ 5 934.1 mg,维生素 B₆ 3 558.9 mg,维生素 B₁₂ 29.7 mg,胆碱 50.0 g,烟酸 29 657.2 mg,叶酸 1 186.3 mg,泛酸钙 14 828.6 mg,生物素 148.3 mg,抗氧化剂 59.3 mg;2)消化能(计算值)为 14.60 MJ·kg⁻¹.

表 2 荧光定量 PCR 引物一览表

Tab.2 Primer sequences used in real-time PCR analyses

目的菌属序列	引物序列 ¹⁾ (5'→3')	<i>t</i> _{退火} /℃	产物长度/bp
总菌共有序列	F:GCAGGCCTAACACATGCAAGTC	60	314
	R:TGCTGCCTCCCGTAGGAGT		
双歧杆菌属共有序列	F:CGCGTCYGGTGTGAAAG	60	244
	R:CCCCACATCCAGCATCCA		
乳杆菌属共有序列	F:GAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC	61	126
	R:GGCCAGTTACTACCTCTATCCTTCTTC		
沙门菌属共有序列	F:AGGCCTTCGGGTTGTAAAGT	58	97
	R:GTTAGCCGGTGCTTCTTCTG		
大肠埃希菌共有序列	F:CATGCCGCGTGTATGAAGAA	61	96
	R:CGGGTAACGTCAATGAGCAAA		

1)F和R分别代表上游引物和下游引物.

1.6 16S rRNA 定量分析

采用 Mx3005P 型实时荧光定量 PCR 仪进行扩增与分析,20 μL 反应体系包括基因组 DNA 1 μL,上、下游引物(10 μmol·L⁻¹)1 μL,RealtimePCR Master Mix(含荧光染料 SYBR green)10 μL,ddH₂O 8 μL.反应程序为:95℃预变性 1 min;95℃变性 15 s,58~61℃退火 15 s,72℃延伸 30 s,共 40 个循环后结束.PCR 产物胶回收后制作标准曲线.扩增结果用

柠檬酸、苯甲酸、苹果酸和山梨酸培养食糜 4 h.采用定量 PCR 检测有机酸对食糜内微生物菌群的影响.随后选择抑菌活性较强的甲酸、乙酸、丁酸、乳酸、柠檬酸,每种有机酸分别设置 5、10、15、20、25 和 30 mmol·L⁻¹浓度梯度,研究这些有机酸抑菌活性的浓度梯度效应.有机酸与食糜厌氧条件下共培养 4 h 后立即置于-20℃保存备用.每个处理设 10 个重复.

1.4 引物设计

根据 NCBI 中 GenBank 发表的基因序列,用 Primer Premier 5.0 软件设计不同菌属 16S rRNA 的上、下游引物(表 2),引物由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成.

1.5 细菌 DNA 的提取

食糜解冻后,定量称取 300 mg 于离心管中,加入 50 μL 溶菌酶,轻轻振荡混匀,于 37℃水浴放置 30 min,随后加入 40 μL 的 0.1 g·mL⁻¹SDS 和 10 μL 蛋白酶 K,65℃水浴 20 min 后加入 5 mol·L⁻¹NaCl 100 μL 于 65℃水浴 10 min.采用酚/三氯甲烷/异戊醇法提取 DNA.所得 DNA 用体积分数为 75%的预冷乙醇洗涤沉淀并干燥,最后用含有终质量浓度为 20 μg·μL⁻¹RNAase 的灭菌 TE Buffer 溶解沉淀,于 37℃水浴中孵育 30 min.所得 DNA 样品置于-20℃保存备用.

Mx3005P 型实时荧光定量 PCR 仪进行分析并制作标准曲线.细菌数量(以拷贝数计)采用下列公式计算:

细菌数量 = $\frac{C \times 6.023 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}}{S \times 660 \times 10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}} \times V,$

式中,C 表示各样品根据标准曲线计算得到的 DNA 浓度,单位 μg·μL⁻¹;S 表示待测细菌基因组 DNA 的定量 PCR 产物的碱基数;V 表示从单位质量食糜中获取的 DNA 溶液体积,单位 μL.

1.7 数据统计

数据采用 SPSS19.0 软件进行统计分析,检验试验数据的正态分布性,对不同处理组间的数值进行单因素方差分析(Analysis of variance,ANOVA)和独立 t 检验(Independent samples t test).数值用平均值 $\pm$ 标准误表示.

2 结果与分析

2.1 断奶仔猪肠道食糜厌氧培养效果鉴定

经过 4 h 厌氧培养后,食糜中总菌和各菌属的数

量均急剧增加,添加 5 和 10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 氨苄青霉素可极显著抑制总菌、沙门菌属和大肠埃希菌的数量(表 3).氨苄青霉素对乳杆菌属和双歧杆菌属也有显著抑制作用,但抑菌活性相对较弱.上述结果表明该体外培养模型可用于后续试验.

2.2 不同种类有机酸对仔猪全食糜培养体系微生物菌群的影响

试验选取的 10 种有机酸对微生物菌群的影响如表 4 所示.结果发现:与对照组相比,30 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、乳酸和山梨酸能提高乳杆菌

表 3 断奶仔猪肠道食糜体外厌氧培养效果¹⁾

Tab.3 The construction of <i>in vitro</i> anaerobic culture system for total chyme from the small intestine of weaned piglets					
组别	总菌数/ (10^{12} g^{-1})	乳杆菌属数/ (10^{10} g^{-1})	双歧杆菌属数/ (10^8 g^{-1})	沙门菌属数/ (10^{10} g^{-1})	大肠埃希菌数/ (10^9 g^{-1})
未培养	2.06 $\pm$ 0.26	0.54 $\pm$ 0.07	0.11 $\pm$ 0.03	1.63 $\pm$ 0.15	0.64 $\pm$ 0.04
空白培养	110.26 $\pm$ 16.71	12.63 $\pm$ 0.70	2.78 $\pm$ 0.15	45.11 $\pm$ 1.48	15.11 $\pm$ 2.76
5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ AMP	2.44 $\pm$ 0.15 **	4.90 $\pm$ 0.21 **	2.30 $\pm$ 0.16 *	1.86 $\pm$ 0.11 **	0.57 $\pm$ 0.05 **
10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ AMP	1.39 $\pm$ 0.09 **	1.35 $\pm$ 0.07 **	1.49 $\pm$ 0.07 **	0.06 $\pm$ 0.01 **	0.02 $\pm$ 0.01 **

1) 同列数据后 *、** 分别表示与空白培养组差异达 0.05、0.01 的显著水平(t 检验).

属数量 2 倍以上,而丁酸、乳酸和山梨酸能显著提高双歧杆菌属数量 1.4 ~ 2.0 倍.对于病原菌,柠檬酸、甲酸、乙酸和苹果酸表现出对大肠埃希菌和沙门菌属较强的抑菌效应.与对照组相比,柠檬酸、甲酸、乙酸、苹果酸、丁酸和乳酸处理组沙门菌数仅分别为对照组的 5.2%、7.8%、10.0%、10.1%、12.6% 和 17.4%,大肠埃希菌数仅分别为对照组的 5.5%、11.2%、12.7%、

16.1%、20.2% 和 40.0%.因此,30 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 情况下综合各种有机酸对有益菌和有害菌的效应,甲酸和乙酸可以有效提高乳杆菌的数量,抑制有害菌的繁殖,但对双歧杆菌没有显著的促进作用;柠檬酸对有害菌具有最强的抑制作用,但是对有益菌也表现出抑制作用;只有丁酸和乳酸既能够有效促进有益菌的繁殖,又能较有效地抑制有害菌.

表 4 不同种类有机酸对仔猪空肠和回肠中厌氧培养微生物菌群的影响¹⁾

Tab.4 The effects of organic acids on intestinal bacteria profiles <i>in vitro</i> anaerobic culture system					
组别	总菌数/ (10^{12} g^{-1})	乳杆菌属数/ (10^{10} g^{-1})	双歧杆菌属数/ (10^8 g^{-1})	沙门菌属数/ (10^{10} g^{-1})	大肠埃希菌数/ (10^9 g^{-1})
对照	11.03 $\pm$ 1.67	1.26 $\pm$ 0.07	2.30 $\pm$ 0.16	45.11 $\pm$ 1.48	15.11 $\pm$ 2.76
甲酸	1.77 $\pm$ 0.07 *	3.29 $\pm$ 0.12 *	2.45 $\pm$ 0.39	3.51 $\pm$ 0.58 *	1.69 $\pm$ 1.10 *
乙酸	1.37 $\pm$ 0.09 *	2.59 $\pm$ 0.16 *	2.02 $\pm$ 0.21	4.50 $\pm$ 0.50 *	1.92 $\pm$ 0.07 *
丙酸	2.07 $\pm$ 0.22 *	2.67 $\pm$ 0.13 *	2.35 $\pm$ 0.22	10.22 $\pm$ 1.14 *	5.60 $\pm$ 0.45 *
丁酸	1.54 $\pm$ 0.14 *	2.59 $\pm$ 0.22 *	3.51 $\pm$ 0.29 *	5.68 $\pm$ 0.71 *	3.05 $\pm$ 0.27 *
乳酸	2.29 $\pm$ 0.27 *	2.45 $\pm$ 0.15 *	3.25 $\pm$ 0.59 *	7.85 $\pm$ 0.98 *	6.04 $\pm$ 0.28 *
柠檬酸	0.17 $\pm$ 0.01 *	0.17 $\pm$ 0.01 *	1.05 $\pm$ 0.05 *	2.35 $\pm$ 0.18 *	0.83 $\pm$ 0.03 *
苹果酸	0.36 $\pm$ 0.02 *	0.21 $\pm$ 0.01 *	2.90 $\pm$ 0.10 *	4.54 $\pm$ 0.06 *	2.44 $\pm$ 0.34 *
富马酸	1.05 $\pm$ 0.23 *	0.49 $\pm$ 0.03 *	1.92 $\pm$ 0.08	7.24 $\pm$ 0.39 *	2.54 $\pm$ 0.26 *
苯甲酸	0.51 $\pm$ 0.07 *	1.08 $\pm$ 0.06	2.96 $\pm$ 0.18	4.54 $\pm$ 0.24 *	2.87 $\pm$ 0.55 *
山梨酸	2.11 $\pm$ 0.37 *	2.44 $\pm$ 0.33 *	4.77 $\pm$ 0.37 *	14.82 $\pm$ 1.48 *	4.52 $\pm$ 0.32 *

1) 各有机酸的浓度为 30 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; * 表示与同列对照组差异显著($P < 0.05$, t 检验).

2.3 有机酸调控仔猪全食糜培养体系微生物菌群的剂量效应

为进一步研究有机酸调控猪肠道微生物菌群的剂量效应,试验选择甲酸、乙酸、丁酸、乳酸和柠檬

酸,分别设置 6 个浓度梯度进行试验.试验结果如图 1 所示,甲酸、丁酸和柠檬酸能呈现剂量依赖性地抑制细菌增殖,而乙酸对总菌数量影响不大(图 1A).对益生菌而言,柠檬酸能显著抑制乳杆菌属和双歧

杆菌属的增殖,但低剂量的乳酸($10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)能显著促进乳杆菌属和双歧杆菌属的增殖(图1B、1C),且低剂量的乙酸($15\sim 20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)也能促进双歧杆菌属的增殖(图1C).所选择的5种有机酸在浓度达到 $10\sim 15\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,均能有效抑制病原菌(沙门菌和大肠埃希菌)的增殖(图1D、1E).因此,体外厌氧培养条件下使用单一有机酸时:乙酸应使用约 $15\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,丁酸约 $15\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,乳酸约 $10\sim 15\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,柠檬酸只能使用约 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$.

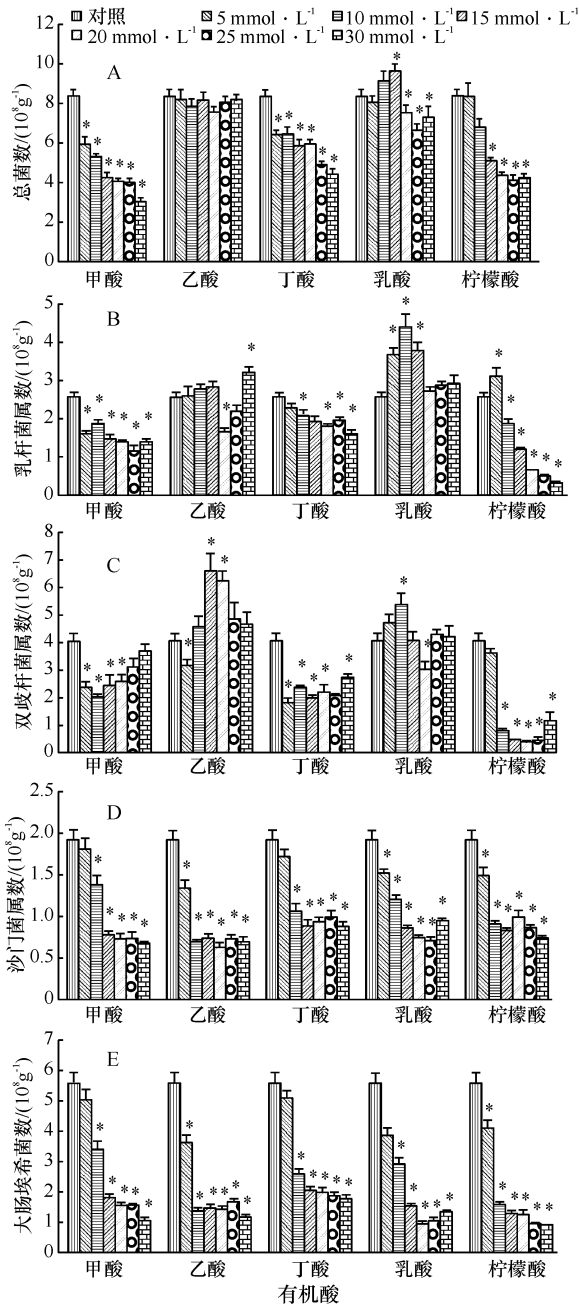


图1 不同浓度有机酸对断奶仔猪全食糜培养体系微生物菌群的影响

Fig.1 The effects of different levels of concentration on organic acids on intestinal bacteria profiles *in vitro* total chyme anaerobic culture system

综上所述,体外厌氧培养条件下使用单一有机酸调节微生物菌群, $15\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸和 $10\sim 15\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乳酸是较好的选择.

3 讨论与结论

3.1 不同有机酸对肠道有害菌的影响

多数研究显示,有机酸在抑制肠道病原菌(大肠埃希菌、沙门菌)方面作用显著^[10-12],本研究待筛选的10种酸所用浓度为 $30\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,换算成质量分数后结果与部分文献的结果也基本一致^[6, 13],但关于有机酸作用效果的报道仍存在差异,主要原因包括有机酸种类的不同、添加剂量存在差异.有学者认为有机酸抑制病原菌的机制主要有2个方面,首先是有机酸电离产生的氢离子,可以通过降低消化道pH间接减少细菌数量;其次,有机酸在某些复杂的酶作用下直接进入细菌的细胞从而抑制革兰阴性菌^[14-15].现有的有机酸中,已有研究表明富马酸、柠檬酸、苹果酸和乳酸主要通过改变pH来抑菌,而甲酸、乙酸、丙酸和山梨酸等则可以进入细菌内,从而杀灭或抑制细菌^[16].本文中的甲酸和乙酸等对大肠埃希菌和沙门菌的抑菌活性明显高于乳酸和富马酸等,说明甲酸和乙酸等直接添加在体外培养食糜中,可能同时通过两方面不同的机制发挥抑菌作用,因而表现出更强的抑菌活性.此外,有机酸电离氢离子的部位对其抑菌活性也有不同的影响. Gauthier等^[17]则将肠道细菌分为pH敏感型(大肠埃希菌等)和pH不敏感型(乳酸杆菌和双歧杆菌).研究表明,未解离状态的有机酸能够穿透某些细菌的细胞膜,在细菌体内发生解离,释放出氢离子和阴离子.细胞内pH降低,无法耐受细胞内外pH变化的pH敏感型细菌则会由于消耗大量能量用来维持正常pH而被杀灭^[18].由此可以推测,由于柠檬酸的pKa值较低,将保留更多的未解离状态,从而可能产生更强的抑菌活性.

3.2 不同有机酸对仔猪肠道有益菌的影响

本文研究结果发现,短链脂肪酸和乳酸能显著提高乳杆菌属数量,而丁酸、乳酸和山梨酸则对双歧杆菌属增殖有明显的促进效应.陈宝江等^[19]通过试验也发现,添加酸化剂后,回肠中乳酸杆菌、厌氧菌数量呈上升趋势,且随着添加剂量增加,乳酸杆菌随之上升.而且多数报道也指出,添加单一有机酸或者复合酸化剂后,肠道内乳酸杆菌数量呈上升趋势^[20-21],这主要是由于肠道pH降低,抑制有害微生物的活动和繁殖,从而促使有益菌繁殖^[22],由此可见,不同种类和配比的酸化剂对仔猪肠道微生物区系的影响也不尽相同.

目前对有机酸的研究大多是通过动物试验的方式进行,添加的有机酸也都通过不同的工艺方式

进行加工处理,常用的酸化剂的加工工艺有吸附混合、流化床包衣和脂埋等技术,而随着工艺的改进,酸化剂的使用效果将不受饲料因素影响,且缓释性能得到极大的提高,从而导致不同研究中的添加剂量差异很大^[23]. 本文通过体外研究模型,筛选出每种酸的最佳处理浓度,以期在生产实践中添加剂量的选择提供参考. 而生产实践中,通过合理设置酸化剂的组合是增加肠道有益菌,降低病原菌,改善肠道健康的有效途径.

3.3 结论

综上所述,本试验采用仔猪食糜离体厌氧培养体系,研究各种有机酸对肠道微生物菌群的影响,并初步筛选确定了体外厌氧培养条件下使用单一有机酸调节微生物菌群,15 mmol · L⁻¹ 乙酸和 10 ~ 15 mmol · L⁻¹ 乳酸是较好的选择. 研究结果为进一步优化仔猪用有机酸制剂的配比提供了直接的试验依据.

参考文献:

- [1] VONDRUSKOVA H, SLAMOVA R, TRCKOVA M, et al. Alternatives to antibiotic growth promoters in prevention of diarrhoea in weaned piglets: A review [J]. Vet Med, 2010, 55(5): 199-224.
- [2] BERNET M F, BRASSART D, NEESER J R, et al. Lactobacillus acidophilus LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria [J]. Gut, 1994, 35(4): 483-489.
- [3] 高权新,吴天星,王进波. 肠道微生物与寄主的共生关系研究进展[J]. 动物营养学报, 2010, 22(3): 519-526.
- [4] 谢倩,姚明,黄晓慧,等. 某猪场腹泻仔猪沙门氏菌分离鉴定与药敏试验[J]. 猪业科学, 2014, 31(1): 94-96.
- [5] KASPROWICZ-POTOCKA M, FRANKIEWICZ A, SELWET M, et al. Effect of salts and organic acids on metabolite production and microbial parameters of piglets' digestive tract [J]. Livest Sci, 2009, 126(1): 310-313.
- [6] CANIBE N, HØJBERG O, HØJSGAARD S, et al. Feed physical form and formic acid addition to the feed affect the gastrointestinal ecology and growth performance of growing pigs [J]. J Anim Sci, 2005, 83(6): 1287-1302.
- [7] 王杰. 复合酸化剂的筛选及其对断奶仔猪的应用研究 [D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2004.
- [8] SKRIVANOVA E, MAROUNEK M, BENDA V, et al. Susceptibility of *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. and *Clostridium perfringens* to organic acids and monolaurin [J]. Vet Med, 2006, 51(3): 81.
- [9] 马鑫,马秋刚,计成,等. 蛋氨酸羟基类似物和有机酸化剂对主要肠道病原菌体外抑菌效果的比较 [J]. 动物营养学报, 2008, 20(2): 238-241.
- [10] CREUS E, PÉREZ J F, PERALTA B, et al. Effect of Acidified feed on the prevalence of *Salmonella* in market-age pigs [J]. Zoonoses Public Hlth, 2007, 54(8): 314-319.
- [11] PIVA A, GRILLI E. Role of benzoic, lactic and sorbic acid in *in vitro* swine cecal fermentation [J]. Vet Res Commun, 2007, 31(Suppl 1): 401-404.
- [12] KNARREBORG A, MIQUEL N, GRANLI T, et al. Establishment and application of an *in vitro* methodology to study the effects of organic acids on coliform and lactic acid bacteria in the proximal part of the gastrointestinal tract of piglets [J]. Anim Feed Sci Tech, 2002, 99(1): 131-140.
- [13] TSILOYIANNIS V K, KYRIAKIS S C, VLEMMAS J, et al. The effect of organic acids on the control of porcine post-weaning diarrhoea [J]. Res Vet Sci, 2001, 70(3): 287-293.
- [14] PAPATSIROS V, TASSIS P, TZIKA E, et al. Effect of benzoic acid and combination of benzoic acid with a probiotic containing *Bacillus cereus* var. *toyoi* in weaned pig nutrition [J]. Pol J Vet Sci, 2011, 14(1): 117-125.
- [15] PIVA A, CASADEI G, BIAGI G. An organic acid blend can modulate swine intestinal fermentation and reduce microbial proteolysis [J]. Can J Anim Sci, 2002, 82(4): 527-532.
- [16] CASTRO M. Use of additives on the feeding of monogastric animals [J]. Cuban J Agr Sci, 2005, 39: 439-445.
- [17] GAUTHIER R. Intestinal health, the key to productivity: The case of organic acids [C] // Anon. XXVII Convención ANECA-WPDC. Jal., Mexico: Puerto Vallarta, 2002: 1-14.
- [18] LAMBERT R J, STRATFORD M. Weak-acid preservatives: Modelling microbial inhibition and response [J]. J Appl Microbiol, 1999, 86(1): 157-164.
- [19] 陈宝江,景翠,于会民,等. 酸化剂对早期断奶仔猪肠黏膜形态、微生物区系及挥发性脂肪酸产生的影响 [J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(10): 23-26.
- [20] 冷向军,王康宁,杨凤,等. 酸化剂对早期断奶仔猪胃酸分泌、消化酶活性和肠道微生物的影响 [J]. 动物营养学报, 2002, 14(4): 44-48.
- [21] 林映才,陈建新,蒋宗勇,等. 复合酸化剂对早期断奶仔猪生产性能、血清生化指标、肠道形态和微生物区系的影响 [J]. 养猪, 2001(1): 13-16.
- [22] BARROW P A. The attachment of bacteria to the gastric epithelium of pig and its importance in the microecology of the intestine [J]. J Appl Bacteriol, 1980, 48(1): 147-154.
- [23] 刘庚寿. 不同剂型的酸化剂对乳猪生产性能的影响 [J]. 饲料广角, 2012(19): 37-40.

【责任编辑 柴 焰】