(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 119242534 B
(45)授权公告日 2025.03.04

(21)申请号 202411729783.7
(22)申请日 2024.11.29
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 119242534 A
(43)申请公布日 2025.01.03
(83)生物保藏信息
CCTCC NO:M 20242269 2024.10.21
(73)专利权人 吉林农业大学
地址 130118 吉林省长春市南关区新城大街2888号
(72)发明人 姜延龙 张格瑞 王占楠 张宇航 卢新 徐瑶 王春凤
(74)专利代理机构 济南圣达知识产权代理有限公司 37221
专利代理师 吕薇
(51)Int.Cl.
C12N 1/20(2006.01)
A61K 35/744(2015.01)
A61P 1/00(2006.01)
A61P 31/04(2006.01)
A61P 33/02(2006.01)
A23K 10/18(2016.01)
A23K 50/75(2016.01)
C12R 1/01(2006.01)
(56)对比文件
CN 110004072 A,2019.07.12
CN 113645850 A,2021.11.12
审查员 何春征

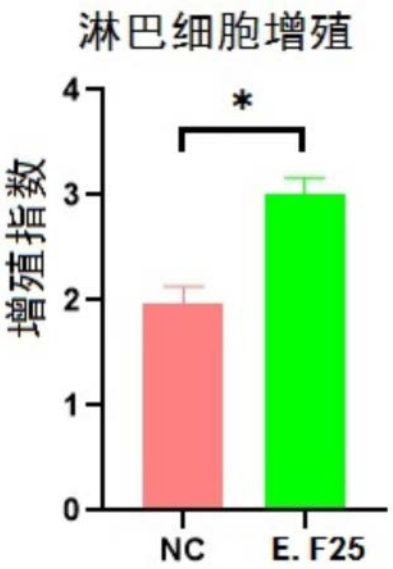
权利要求书1页 说明书9页
序列表（电子公布） 附图6页

(54)发明名称

一株粪肠球菌YL-EF25及其应用

(57)摘要

本发明公开了一株粪肠球菌YL-EF25及其应用,属于微生物技术领域。本发明提供的粪肠球菌YL-EF25保藏编号为CCTCC NO:M 20242269。该菌株对产气荚膜梭菌具有较强抑制能力同时,还可调节禽类免疫反应,提高饲料转化率,服用粪肠球菌YL-EF25组的鸡增重量升高,料重比改善,表明在日粮添加粪肠球菌YL-EF25有利于鸡的生长发育;本发明提供的粪肠球菌YL-EF25还有助于维持免疫系统的平衡状态,并在病原体入侵时可以更快产生更多的免疫细胞,提高疫苗接种效果。



CN 119242534 B

1.一株粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)YL-EF25,其特征在于,所述粪肠球菌YL-EF25于2024年10月21日保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏地址为中国武汉,保藏编号为CCTCC NO:M 20242269,分类命名为*Enterococcus faecalis*。

2.权利要求1所述的粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)YL-EF25在制备抗产气荚膜梭菌感染的产品中的应用。

3.权利要求1所述的粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)YL-EF25在制备防治禽类坏死性肠炎的产品中的应用;所述禽类为蛋鸡或肉鸡。

4.根据权利要求3所述的应用,其特征在于,所述禽类坏死性肠炎由产气荚膜梭菌诱导。

5.根据权利要求3所述的应用,其特征在于,所述禽类坏死性肠炎由产气荚膜梭菌和球虫共同诱导。

6.根据权利要求2或3任一项所述的应用,其特征在于,所述产品选自药物、饲料或饲料添加剂中的任一种。

7.根据权利要求6所述的应用,其特征在于,所述产品为饲料,其制备方法为,粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)YL-EF25接种于培养基进行发酵,将发酵液喷洒到饲料进行混合。

8.根据权利要求7所述的应用,其特征在于,所述饲料中含有1×10^{9} CFU/kg粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)YL-EF25。

9.一种微生物菌剂,其特征在于,以权利要求1所述的粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)YL-EF25为活性成分。

一株粪肠球菌YL-EF25及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于微生物技术领域,特别是涉及一株粪肠球菌YL-EF25及其应用。

背景技术

[0002] 家禽坏死性肠炎主要是由产气荚膜梭菌引起的,不同家禽发病后死淘率差异很大,且不表现典型症状,容易失去最佳治疗时机;一旦家禽肠道内微生物环境受到破坏,就会为产气荚膜梭菌营造良好的增殖条件,随着肠内气体和产气荚膜梭菌数量的增多,产生大量的内毒素和外毒素,最终导致家禽暴发坏死性肠炎。另外,大量病例证明:感染坏死性肠炎的禽群往往与暴发球虫病有关系,球虫病一般先发生,或者与坏死性肠炎一起出现,这种情况在平养肉种鸡管理中发生率较高。家禽感染球虫病后,胃肠上皮细胞受到破坏,产气荚膜梭菌更容易接近受到损坏的黏膜,从而提高增殖速度和危害程度。

[0003] 益生肠球菌广泛存在于健康鸡的肠道内,具有多种益生作用。其中,粪肠球菌能够通过竞争抑制和产生抑菌物质,抑制产气荚膜梭菌在肠道内的生长,促进有益菌的生长,维持肠道微生物的生态平衡。粪肠球菌还能通过促进肠道上皮细胞的增殖和修复,有助于增强肠道屏障功能,减少肠道炎症反应,改善肠道健康。通过引入粪肠球菌,能够有效替代或减少对传统抗生素的依赖,降低抗生素耐药性发展的风险。

[0004] 虽然粪肠球菌具备良好的益生作用,但由于不同菌株的抑菌能力和生化特性仍存在差异。筛选出具有抗菌活性、能够调整家禽免疫力、促进家禽生长的菌株将对家禽坏死性肠炎的防治做出贡献。

发明内容

[0005] 鉴于现有技术的不足,本发明提供了一株粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)YL-EF25及其应用,该菌株用于家禽具有免疫调节、促生长功能。本发明提供的技术方案如下所述:

[0006] 本发明提供了一株粪肠球菌YL-EF25,该菌株已保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏地址为中国武汉,保藏时间为2024年10月21日,保藏编号为CCTCC NO:M 20242269,分类命名为*Enterococcus faecalis*。

[0007] 本发明还提供了所述的粪肠球菌YL-EF25在制备抗产气荚膜梭菌感染的产品中的应用。

[0008] 本发明还提供了所述的粪肠球菌YL-EF25在制备防治禽类坏死性肠炎的产品中的应用。

[0009] 优选的,所述禽类坏死性肠炎由产气荚膜梭菌诱导。

[0010] 进一步的,所述禽类坏死性肠炎由产气荚膜梭菌和球虫共同诱导。

[0011] 进一步的,所述禽类为蛋鸡或肉鸡。

[0012] 优选的,所述产品选自药物、饲料或饲料添加剂中的任一种。

[0013] 进一步的,所述产品为饲料,其制备方法为,粪肠球菌YL-EF25接种于培养基进行

发酵,将发酵液喷洒到饲料进行混合。

[0014] 本发明的一个实施例中,所述饲料中含有1×10^{9} CFU/kg粪肠球菌YL-EF25。

[0015] 本发明还提供了一种微生物菌剂,以所述的粪肠球菌YL-EF25为活性成分。

[0016] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:

[0017] (1)本发明提供了一株粪肠球菌YL-EF25,对产气荚膜梭菌具有较强抑制能力,同时,还可调节禽类免疫反应,提高饲料转化率,试验证明,服用粪肠球菌YL-EF25组的鸡增重量升高,料重比改善,表明在日粮添加粪肠球菌YL-EF25有利于鸡的生长发育。

[0018] (2)本发明提供的粪肠球菌YL-EF25有助于维持免疫系统的平衡状态,并在病原体入侵时可以更快产生更多的免疫细胞,提高疫苗接种效果。

[0019] (3)本发明提供的粪肠球菌YL-EF25对胆盐、人工胃液、苯酚的耐受能力较强,能够代谢果胶、葡聚糖及纤维二糖等膳食纤维,有利于禽类肠道健康。

[0020] (4)使用本发明的粪肠球菌YL-EF25作为饲料添加剂饲喂肉鸡,有助于增强肠道屏障功能,可显著缓解鸡坏死性肠炎特征性症状,有效降低肠道炎症反应,支持肠道菌群平衡。

附图说明

[0021] 构成本发明的一部分的说明书附图用来提供对本发明的进一步理解,本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明,并不构成对本发明的不当限定。

[0022] 图1为本发明实施例1中粪肠球菌YL-EF25、YL-EF7以及YL-EF28的镜检图片。

[0023] 图2为本发明实施例2中粪肠球菌YL-EF25、YL-EF7以及YL-EF28的溶血活性图。

[0024] 图3为本发明实施例2中粪肠球菌YL-EF25、YL-EF7以及YL-EF28的生长特性图。

[0025] 图4为本发明实施例2中粪肠球菌YL-EF25、YL-EF7以及YL-EF28的产酸能力图。

[0026] 图5为本发明实施例2中粪肠球菌YL-EF25、YL-EF7以及YL-EF28的产气荚膜梭菌共培养抑制试验图。

[0027] 图6为本发明实施例2中粪肠球菌YL-EF25、YL-EF7以及YL-EF28的产气荚膜梭菌生物膜抑制试验图。

[0028] 图7为本发明实施例3中鸡坏死性肠炎攻毒后肠道菌群中乳酸菌属相对丰度图。

[0029] 图8为本发明实施例3中鸡坏死性肠炎攻毒后鸡外周血淋巴细胞增殖能力图。

[0030] 图9为本发明实施例3中鸡坏死性肠炎攻毒后紧密连接蛋白的mRNA相对表达水平图。

[0031] 图10为本发明实施例3中鸡坏死性肠炎攻毒后炎性细胞因子的mRNA相对表达水平图。

具体实施方式

[0032] 应该指出,以下详细说明都是示例性的,旨在对本发明提供进一步的说明。除非另有指明,本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属技术领域的普通技术人员通常理解的相同含义。

[0033] 疱肉培养基:称取庖肉培养基基础(海博生物,青岛)48.0 g,加热溶解于1000 mL蒸馏水中。取数粒庖肉牛肉粒(海博生物,青岛)加入至试管中约1 cm高,121 ℃高压灭菌15

分钟,备用。

[0034] MRS培养基:称取MRS肉汤(海博生物,青岛)52.24 g,加热溶解于1000 mL蒸馏水中,118 ℃高压灭菌15分钟,备用。

[0035] 实施例1粪肠球菌YL-EF25的筛选与鉴定

[0036] 从健康、抗病能力强的野生鸟类粪便中分离筛选到若干株分离菌,通过牛津杯法在血平板上测试了这些菌株对产气荚膜梭菌的抑制能力,最终筛选出三株粪肠球菌,菌落形态为表面光滑的灰白色圆形菌落,参见图1。

[0037] 拮抗产气荚膜梭菌能力检测:分别在疱肉培养基和MRS培养基中37 ℃厌氧培养产气荚膜梭菌和33株分离菌株24小时备用。无菌收取乳酸菌发酵液置于1 mL离心管中,12000 r/min离心5分钟,取上清液,0.22 μm滤膜过滤除菌待用。用无菌PBS将产气荚膜梭菌菌液稀释至光密度为OD_{600}=0.8。在无菌环境下,吸取100 μL稀释好的产气荚膜梭菌菌液均匀涂布在含5%绵羊血的血平板表面,然后将牛津杯垂直放在血平板上,加入200 μL分离菌株发酵上清液于牛津杯中,置于厌氧工作站中37 ℃培养48小时,测量抑菌圈直径,结果如表1所示。

[0038] 表1 分离乳酸菌对产气荚膜梭菌的抑菌活性测量

[0039]

编号	抑菌圈直径（mm）	抑菌活性	编号	抑菌圈直径（mm）	抑菌活性
1	14	+	18	17.5	++
2	15	++	19	16.5	++
3	16.5	++	20	16.5	++
4	17	++	21	13.5	+
5	16	++	22	14	+
6	15.5	++	23	11.5	+
7	18.5	+++	24	12	+
8	17.5	++	25	18	+++
9	17.5	++	26	16	++
10	16.5	++	27	16	++
11	16	++	28	18	+++
12	0	-	29	16	++
13	0	-	30	16.5	++
14	0	-	31	17	++
15	17	++	33	17	++
16	0	-	34	16	++
17	17	++			

[0040] +:低抑菌活性;++:较强抑菌活性;+++:强抑菌活性;-:无抑菌圈。

[0041] 菌落的纯化和富集:采用平板划线法挑取单菌落在MRS培养基平板上37 ℃倒置培养一天,继续挑取MRS平板上单菌落重复纯化2-3次后,挑取单菌落在5 mL MRS培养基试管中37 ℃摇床培养两天,待充分富集后进行16S rDNA鉴定,剩余部分菌液加入甘油,使菌液中的甘油终浓度范围为15%-25%,置于-80 ℃冰箱中保存。

[0042] 16S rDNA鉴定:提取菌液的基因组DNA,使用细菌通用测序引物27F进行菌落PCR扩增,进行16S rDNA测序鉴定,将得到的16S序列在NCBI上数据库中进行序列比对分析,比对结果显示与粪肠球菌的序列相似性为100%。确定这三株菌均为粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*),并将其正式命名为YL-EF7、YL-EF25、YL-EF28。上述粪肠球菌YL-EF7、YL-EF25、

YL-EF28的16S rDNA全序列如序列表SEQ ID NO.1所示。

[0043] GGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCTTCTTTCCTCCCGAGTGCT
TGCACTCAATTGGAAAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAACAC
TTGGAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCT
GATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGA
GAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAA
TGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAG
AACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGA
TGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATT
CCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACTGAC
GCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAG
TGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTT
GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCT
TACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATG
GTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCA
TTTAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCC
TTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCTAGACCGCGAGGTCATGCAAATCTCTT
AAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGC
ACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCG
GTGAGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGATAGATGATTGGGGTGAAGTCGT。

[0044] 实施例2粪肠球菌(Enterococcus faecalis)的特性检测

[0045] 溶血性试验:无菌沾取粪肠球菌菌液在血平板上划线,厌氧培养24小时,溶血活性见图2,图中,7,25和28分别为YL-EF7,YL-EF25和YL-EF28。

[0046] 生长曲线和产酸曲线:将粪肠球菌菌种在MRS平板中划线活化,接种单菌落于5 mL MRS培养基试管在摇床37 ℃过夜培养,将粪肠球菌菌液按照1:100比例接种于200mL MRS培养基中在摇床中37 ℃培养,在第2小时、第4小时及每隔6小时取5 mL测pH值及菌液OD_{600}值,MRS液体培养基作为空白对照,由图3图4可知,三株粪肠球菌的生长特性和产酸能力基本相同,从第2小时开始进入对数生长期,到第6小时左右,开始进入稳定期,直至第36小时,菌液OD_{600}值一直维持在1.2-1.3之间。产酸能力检测发现,三株菌在培养第6小时后,菌液pH值下降至4.8。在进入平台期(12-18小时),菌液pH值变为4.6左右,在第24-36小时,菌液pH值下降至4.4左右。图3和图4中,E.F7、E.F25和E.F28分别为YL-EF7、YL-EF25和YL-EF28。

[0047] 耐人工胃液、耐胆盐试验:将粪肠球菌菌种在MRS平板中划线活化,接种单菌落于5 mL MRS培养基试管,在摇床37 ℃过夜培养,将粪肠球菌菌液按照1:100比例接种于200mL MRS培养基中在摇床中37 ℃培养,将得到的菌液用比色皿调节菌液浓度在OD_{600}下为0.8(大约10^8)。各取1 mL调整好浓度的粪肠球菌至EP管中,5000 rpm离心10分钟。离心期间,准备好胆盐(0.2%、0.25%,PBS溶解)和人工胃液MRS培养基试管(人工胃液:0.32%胃蛋白酶,1.6 μg/ml 溶菌酶,pH=2),分别各取1 mL至EP管中备用。弃去离心后的培养基上清,用1 mL的相应条件的胆盐溶液和人工胃液MRS培养基重悬菌体沉淀,置于37 ℃温箱中孵育3小时,用

PBS梯度稀释孵育后的待测菌种至10^{-9},滴板计数于相应区域。在超净台晾板,待晾干后放于温箱培养同时用PBS梯度稀释三株菌菌液至10^{-9},将100 μL各个梯度稀释菌液滴板于MRS平板。在超净台晾板,待晾干后放于温箱培养过夜,计算初始活菌数。记录数据,计算平均值、标准差、存活率,见表2,表3。

[0048] 表2 耐胆盐试验

[0049]

分离株	胆盐耐受试验				
	初始活菌数	0.2%胆盐	存活率(%)	0.25%胆盐	存活率(%)
YL-EF7	8.63±0.25	7.57±0.06	87.7	5.53±0.09	64.0
YL-EF25	8.61±0.17	7.55±0.08	87.6	5.27±0.32	61.2
YL-EF28	8.46±0.26	7.65±0.06	90.4	6.23±0.15	73.6

[0050] 表3 耐人工胃液试验

[0051]

分离株	人工胃液耐受试验		
	初始活菌数	人工胃液	存活率(%)
YL-EF7	8.74±0.23	3.85±0.13	44.1
YL-EF25	8.48±0.11	3.66±0.17	43.2
YL-EF28	8.56±0.24	3.81±0.08	44.5

[0052] 耐苯酚试验:将粪肠球菌菌种在MRS平板中划线活化,接种单菌落于5 mL MRS培养基试管在摇床37 ℃过夜培养作为菌种。配制含0.1%、0.2%、0.3%、0.4%苯酚的MRS培养基试管,将菌种按1:100比例加入相应苯酚浓度MRS试管中,37 ℃ 220 rpm培养24小时,每组3个重复试验测量各组菌液OD_{600}值,MRS液体培养基作为空白对照,见表4。

[0053] 表4 耐人工苯酚试验

[0054]

	分离株	YL-EF7	YL-EF25	YL-EF28
耐苯酚试验	空白对照（OD_{600}）	1.359±0.059	1.373±0.004	1.325±0.005
	0.1%苯酚（OD_{600}）	1.227±0.017	1.227±0.007	1.250±0.040
	存活率（%）	90.3	89.3	94.3
	0.2%苯酚（OD_{600}）	1.157±0.027	0.850±0.020	1.067±0.123
	存活率（%）	85.1	61.9	80.5
	0.3%苯酚（OD_{600}）	0.670±0.140	0.360±0.060	0.363±0.017
	存活率（%）	49.3	26.2	27.4
	0.4%苯酚（OD_{600}）	0.110±0.02	0.123±0.027	0.123±0.043
	存活率（%）	8.1	9	9.3

[0055] 抗生素耐药性试验:将粪肠球菌菌种在MRS平板中划线活化,接种单菌落于5 mL MRS培养基试管,在摇床37 ℃过夜培养,将得到的菌液用比色皿调节菌液浓度在OD_{600}下为0.8(大约10^8)。将100 μL稀释好的菌液涂布在MRS培养基平板表面,将抗生素药片贴在MRS

平板上,放置于细菌培养箱37 ℃培养24小时,测量抑菌圈直径,见表5。

[0056] 表5 常见抗生素耐药性试验

抗生素药片名称	药片含药量	抑菌圈标准判断标准（mm）			分离菌株		
		耐药（R）	中介（I）	敏感（S）	YL-EF7	YL-EF25	YL-EF28
两性霉素B	30μg	≤15	16~24	≥25	/（R）	/（R）	/（R）
链霉素	10μg	≤11	10~14	≥15	/（R）	/（R）	/（R）
庆大霉素	10μg	≤12	13~14	≥15	/（R）	/（R）	/（R）
四环素	30μg	≤14	15~18	≥19	35（S）	33（S）	33（S）
卡那霉素	30μg	≤13	14~17	≥18	/（R）	/（R）	/（R）
红霉素	15μg	≤13	14~22	≥23	22（I）	23（S）	21（I）
万古霉素	30μg	≤14	15~16	≥17	17（S）	18（S）	17（S）
多粘菌素B	300IU	≤8	9~11	≥12	/（R）	/（R）	/（R）
氨苄西林	10μg	≤16	16~17	≥17	33（S）	35（S）	33（S）
氯霉素	30μg	≤12	13~17	≥18	26（S）	26（S）	28（S）

[0057]

[0058] 产气荚膜梭菌生物膜抑制试验:将粪肠球菌菌种在MRS平板中划线活化,接种单菌落于5 mL MRS培养基试管,在摇床37 ℃过夜培养,将产气荚膜梭菌菌种按1:100比例接种于TSB培养基中,在厌氧工作站37 ℃过夜培养,准备培养好的产气荚膜梭菌菌液(C.P)和粪肠球菌菌液(E.F),通过0.22 μm滤膜过滤离心后的粪肠球菌(4000转/分,5分钟)上清得到粪肠球菌上清液(E.F上清)。将产气荚膜梭菌菌液和粪肠球菌菌液用TSB培养基稀释至菌液浓度在OD_{600}下为0.1,在96孔板中按下列分组(表6)混合方法进行混合,每组做6个重复,封口膜将96孔板封口隔绝氧气,在室温条件下静置培养5天。

[0059] 表6 产气荚膜梭菌生物膜抑制试验分组

分组	混合方法
产气荚膜梭菌对照组	100 μL C.P+200 μL TSB
高浓度菌液抑制组	100 μL C.P+100 μL E.F+100 μL TSB
低浓度菌液抑制组	100 μL C.P+200 μL E.F
低浓度上清液抑制组	100 μL C.P+100 μL E.F上清+100 μL TSB
高浓度上清液抑制组	100 μL C.P+200 μL E.F上清
粪肠球菌对照组	100 μL E.F+200 μL TSB
空白对照组	300 μL TSB

[0060]

[0061] 注:表6中C.P代指产气荚膜梭菌,E.F分别代指YL-EF25,YL-EF7或YL-EF28。

[0062] 培养结束后,转移每孔中悬浮液,测上清OD_{600}值,并用无菌PBS梯度稀释每组悬浮液至10^{-9},滴板计数于TSN培养基平板上。用PBS轻轻冲洗两次转移上清后的培养孔,加入300 μL的结晶紫染色室温放置30分钟。移去结晶紫后,再次用PBS轻轻冲洗两次。每孔加入300 μL的甲醇溶液室温孵育30分钟,将每孔中液体转移至新的96孔板中,测量每孔OD_{570}值,记为A_{570}。计算生物膜相对测量值=A_{570}/OD_{600}。由图6可知,三株粪肠球菌菌液和无菌粪肠球菌上清液均对产气荚膜梭菌的生物膜形成发挥了抑制作用。根据图5、图6分析表明,比较三株菌的抑制产气荚膜梭菌活性的能力从强到弱排序为:YL-EF25,YL-EF7,YL-EF28。选取抑制产气荚膜梭菌形成的生物膜保护的活性最强的YL-EF25进行动物实验。

[0063] 微生物代谢分析:将粪肠球菌菌种在MRS平板中划线活化,接种单菌落在MRS平板中再次划线活化,按照BIOLOG公司的自动微生物鉴定系统提供的方法,挑取活化菌落于200 μL IF-B培养基中制成接种液。用接种液将IF-B培养基(BIOLOG公司,美国)调至合适的透光度制成菌悬液。在GEN III板每孔加入100 μL菌悬液,放置于微生物代谢鉴定培养箱中36小

时,分析数据,由表7可知,YL-EF25展现了典型的粪肠球菌株的代谢特征,证实粪肠球菌YL-EF25对葡聚糖、纤维二糖、果胶等膳食纤维具有较强的代谢能力,从而产生短链脂肪酸,促进肠道健康。

[0064] 表7 碳源代谢分析

[0065]

碳源	菌株反应 YL-EF25	碳源	菌株反应 YL-EF25
葡聚糖	+	D-丝氨酸	-
D-麦芽糖	+	明胶	-
D-海藻糖	+	甘氨酸-L-脯氨酸	-
D-纤维二糖	+	L-丙氨酸	-
龙胆二糖	+	L-组氨酸	-
蔗糖	+	L-焦谷氨酸	-
D-松二糖	w^+	L-丝氨酸	-
水苏糖	-	果胶	+
D-棉子糖	-	D-半乳糖醛酸	+
α-D-乳糖	+	L-半乳糖酸-1,4-内酯	+
D-蜜二糖	-	D-葡萄糖酸	+
B-甲基-D-葡萄糖苷	+	D-葡萄糖醛酸	-
D-水杨苷	+	葡罗酰胺	-
N-乙酰基-D-氨基葡萄糖	w^+	粘酸	-

[0066] 注:+:代谢活性阳性,-:代谢活性阴性,w^+:代谢活性弱阳性。

[0067] 实施例3 粪肠球菌YL-EF25对鸡坏死性肠炎的保护作用

[0068] 选取体重相近的1日龄肉鸡,随机分为4个处理组,每组18只鸡。(1)对照组喂基础日粮(NC组);(2)坏死性肠炎组攻毒球虫和产气荚膜梭菌(4×10^8CFU/mL),饲喂基础日粮(PC组);(3)抗生素组攻毒球虫和产气荚膜梭菌(4×10^8CFU/mL),饲喂含有20 mg/kg恩拉霉素的基础日粮(PT组,抗生素组);(4)YL-EF25试验组攻毒球虫和产气荚膜梭菌(4×10^8CFU/mL),饲喂含有1×10^9CFU/kg粪肠球菌YL-EF25的基础日粮(E.F25组)。

[0069] 在本发明实施例中,NC组代表对照组、PC组代表肠炎组、PT组代表抗生素组、E.F25组代表YL-EF25组。

[0070] 鸡的生产性能包括产蛋量、生长速度、饲料转化率、采食量等参数,本发明对增重、采食量、料重比等参数进行了记录,汇总如表8所示:

[0071] 表8 添加粪肠球菌YL-EF25对鸡生产性能的影响

[0072]

	对照组	肠炎组	抗生素组	YL-EF25组	标准误	P值
1-7天（生长期）						
平均增重	18.49	18.76	20.8	23.93	1.854	0.694
平均采食量	35.84	36.08	38.33	37.34	2.142	0.422
料重比	1.939	1.923	1.842	1.561	0.192	0.241
7-14天（生长期）						
平均增重	28.94	30.68	32.76	32.78	1.893	0.07
平均采食量	85.88	89.40	96.8	86.89	3.124	0.188
料重比	2.968	2.91	2.951	2.65	0.174	0.225
1-14天（生长期）						
平均增重	47.43	49.44	53.56	56.71	1.742	0.082
平均采食量	121.72	125.48	135.13	124.23	2.014	0.316
料重比	2.57	2.54	2.52	2.19	0.156	0.119

[0073] 由表8可知,在第1-14天,与对照组相比,粪肠球菌YL-EF25组的增重量升高,改善了料重比,而肠炎组和抗生素组与对照组之间的料重比没有显著差异,表明在日粮添加粪肠球菌YL-EF25有利于鸡的生长发育。

[0074] 饲养至第15天时,除对照组外所有组通过口服接种2×10^4个鸡球虫卵囊。在第21天至第24天,除对照组外所有组通过口服每天攻毒产气荚膜梭菌(4×10^8CFU/mL)诱导鸡坏死性肠炎。在第25天对所有组鸡进行病变观察评分,并取样。评分标准为:0分(无明显损伤);1分(肠壁变薄、变脆,白色伪膜脱落,肠壁出血点);2分(出现1-5个坏死灶);3分(出现6-15个坏死灶);4分(出现15个以上坏死灶);5分(出现2-3cm长的片状坏死)。结果如表9所示。

[0075] 表9 添加粪肠球菌YL-EF25对鸡坏死性肠炎攻毒后肠道病变的影响

[0076]

	对应病变分数鸡的数量						平均
	0	1	2	3	4	5	分数
对照组(n=8)	8	0	0	0	0	0	0^a
肠炎组(n=7)	2	1	1	0	3	0	2.29^b
抗生素组(n=9)	9	0	0	0	0	0	0^a
YL-EF25组(n=13)	5	2	6	0	0	0	1.0^a

[0077] 注:上标小写字母不同表示差异显著($P<0.05$),上标字母相同则表示差异不显著($P>0.05$)。

[0078] 由表9可知,与对照组相比,肠炎组的肠道病理变化差异显著升高($P<0.05$),与肠炎组相比,抗生素组、YL-EF25组肠道病变评分显著降低($P<0.05$)。

[0079] 由图7可知,与对照组相比,在攻毒后,肠炎组和抗生素组的肠道菌群中乳酸菌属相对丰度下降,其它属的细菌相对丰度升高,表现肠道菌群平衡被破坏,而在YL-EF25组中,肠球菌属相对丰度升高,有益菌唾液乳杆菌属的相对丰度升高,其它菌群相对稳定,表现出对攻毒后肠道菌群紊乱的平衡作用。

[0080] 淋巴细胞增殖试验:淋巴细胞增殖和分化是机体免疫应答过程的一个重要阶段。因此,检测淋巴细胞增殖水平是细胞免疫研究和临床免疫功能检测的一种常用方法。首先,

分离对照组(NC组)、YL-EF25组(E.F25组)各5只鸡的外周血淋巴细胞,对分离细胞计数。将各组淋巴细胞1×10^6/孔铺板,加入刀豆蛋白刺激细胞增殖,终浓度为10 μg/ml,作为试验组,并设置不加刀豆蛋白刺激的对照组。设置空白孔(空白组;PBS+CCK8)细胞培养箱中刺激48小时后,加入CCK8测吸光度,淋巴细胞增殖指数换算公式为$(OD_{试验}-OD_{空白})/(OD_{对照}-OD_{空白})$。检测到NC组、E.F25组的$OD_{试验}$和$OD_{对照}$平均值分别为0.40、0.51和0.37、0.4,空白组$OD_{空白}$的平均值为0.34。通过计算,由图8可知,YL-EF25组(E.F25)的鸡外周血淋巴细胞增殖能力显著高于对照组($P<0.05$),表明在日粮添加粪肠球菌YL-EF25有助于维持免疫系统的平衡状态,并在病原体入侵时可以更快产生更多的免疫细胞,提高疫苗接种效果。

[0081] 由图9可知,与对照组(NC组)相比,肠炎组(PC组)的紧密连接蛋白OLCN、ZO-1的mRNA相对表达水平下调,肌球蛋白轻链激酶(MLCK)的mRNA相对表达水平上调;抗生素组(PT组)可逆转紧密连接蛋白OLCN的下调,但对紧密连接蛋白ZO-1下调的逆转不明显,肌球蛋白轻链激酶(MLCK)的mRNA相对表达水平上调;YL-EF25组(E.F25组)紧密连接蛋白OLCN、ZO-1的mRNA相对表达水平上调,YL-EF25组(E.F25组)肌球蛋白轻链激酶(MLCK)的mRNA相对表达水平下调。如图10所示,与对照组(NC组)相比,肠炎组(PC组)的炎性细胞因子(TNF-α、IFN-γ、IL-10)的mRNA相对表达水平显著升高;与肠炎组(PC组)相比,抗生素组(PT组)、YL-EF25组(E.F25组)的炎性细胞因子(TNF-α、IFN-γ、IL-10)的mRNA相对表达水平降低,其中,YL-EF25组(E.F25组)降低效果更显著($P<0.05$),表明在日粮添加粪肠球菌YL-EF25在鸡坏死性肠炎攻毒后表现出较强的抗炎效果及对肠道屏障功能的改善作用。

[0082] 经分析,本发明中分离的粪肠球菌YL-EF25具有良好的益生特性,可在体外抑制产气荚膜梭菌的生长。在肉鸡日粮中添加粪肠球菌YL-EF25可有效改善生长发育,增强肠道屏障,平衡肠道菌群稳定以及缓解炎症反应等方式显著改善了球虫和产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)诱导的坏死性肠炎,可在畜禽养殖中用于抗产气荚膜梭菌感染。

[0083] 以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。



图1

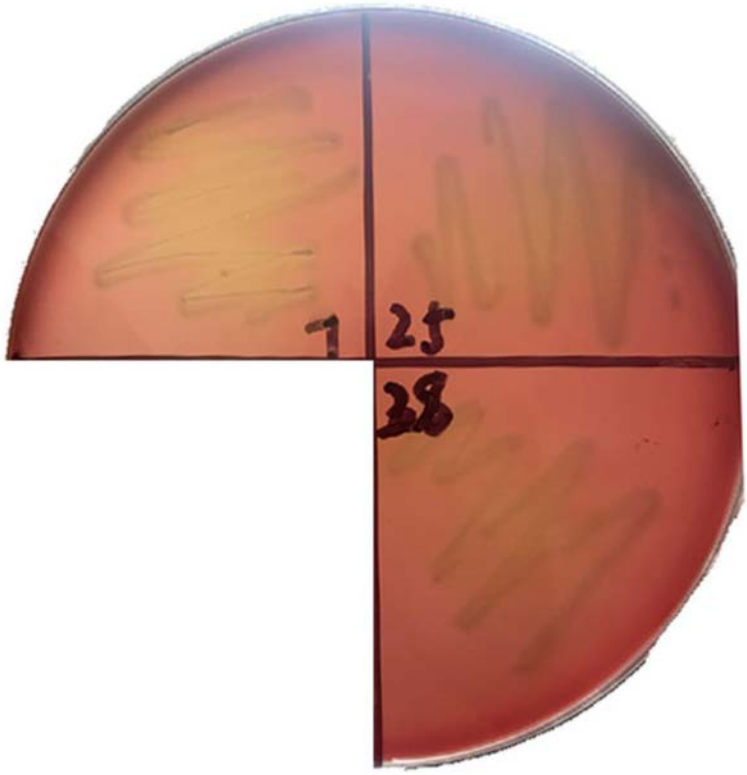


图2

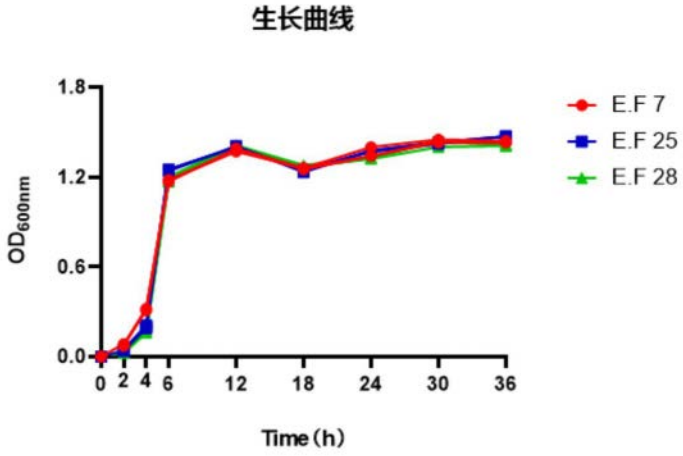

生长曲线
1.8
1.2
0.6
0.0
OD600nm
0 2 4 6 12 18 24 30 36
Time (h)
E.F 7
E.F 25
E.F 28

图3

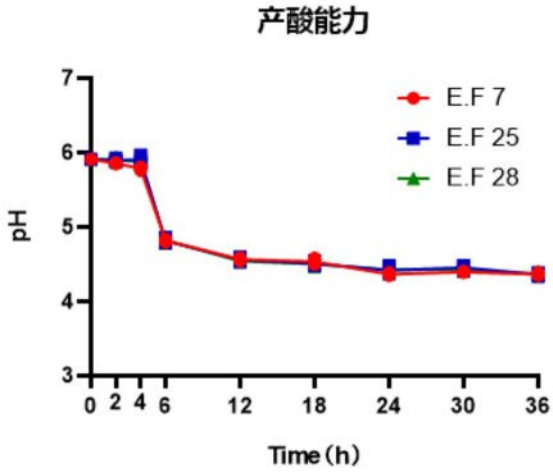

产酸能力
7
6
5
4
3
pH
0 2 4 6 12 18 24 30 36
Time (h)
E.F 7
E.F 25
E.F 28

图4

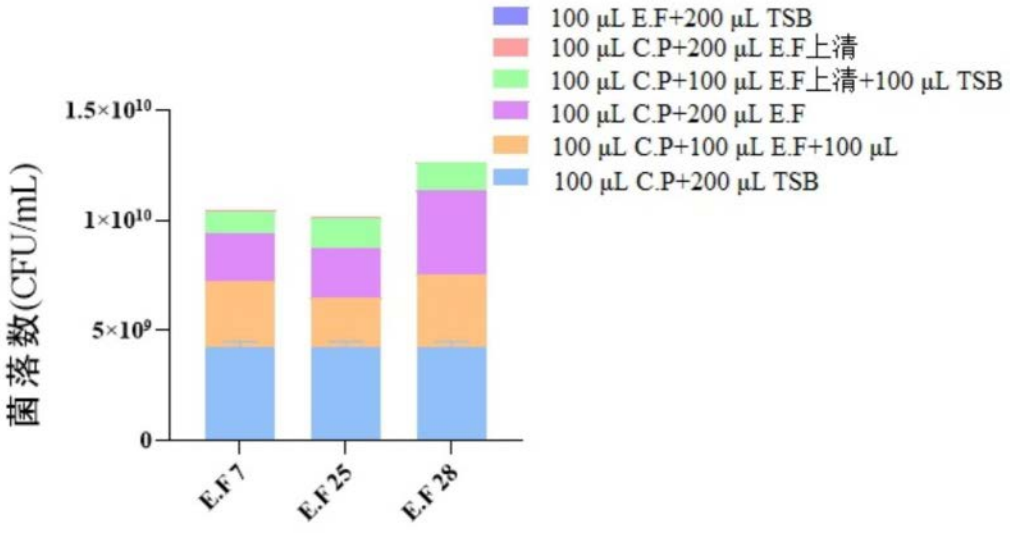

100 μL E.F+200 μL TSB
100 μL C.P+200 μL E.F上清
100 μL C.P+100 μL E.F上清+100 μL TSB
100 μL C.P+200 μL E.F
100 μL C.P+100 μL E.F+100 μL
100 μL C.P+200 μL TSB
菌落数(CFU/mL)
1.5×10¹⁰
1×10¹⁰
5×10⁹
0
E.F 7
E.F 25
E.F 28

图5

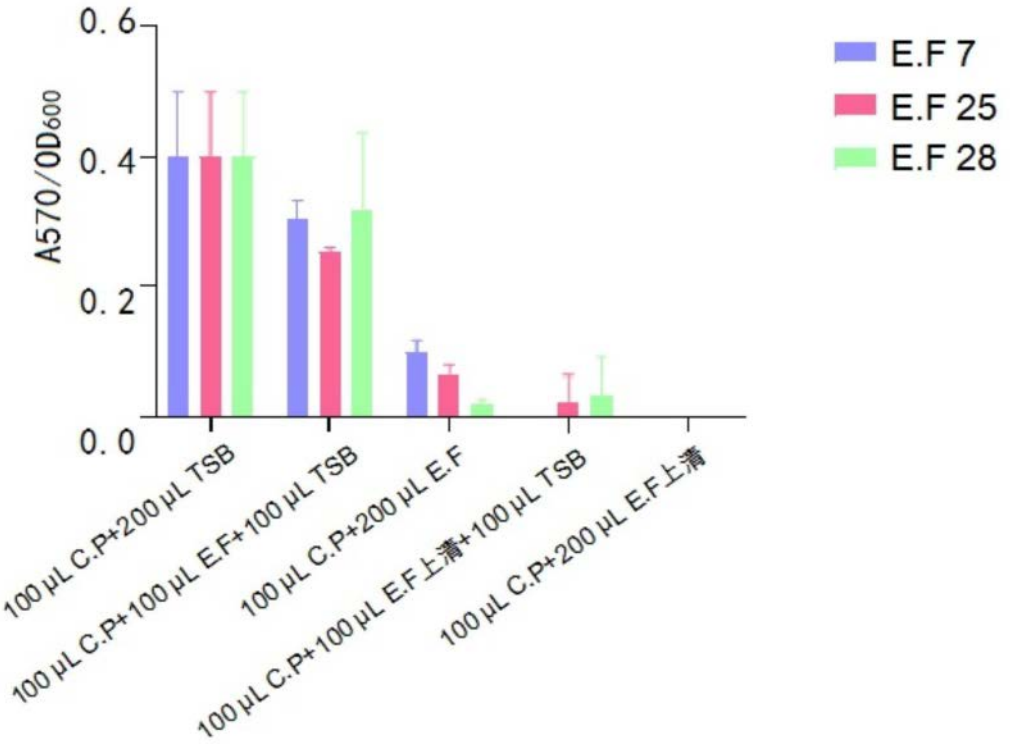

A570/0D600
0.6
0.4
0.2
0.0
E.F 7
E.F 25
E.F 28
100 μL C.P+200 μL TSB
100 μL C.P+100 μL E.F+100 μL TSB
100 μL C.P+200 μL E.F
100 μL C.P+100 μL E.F上清+100 μL TSB
100 μL C.P+200 μL E.F上清

图6

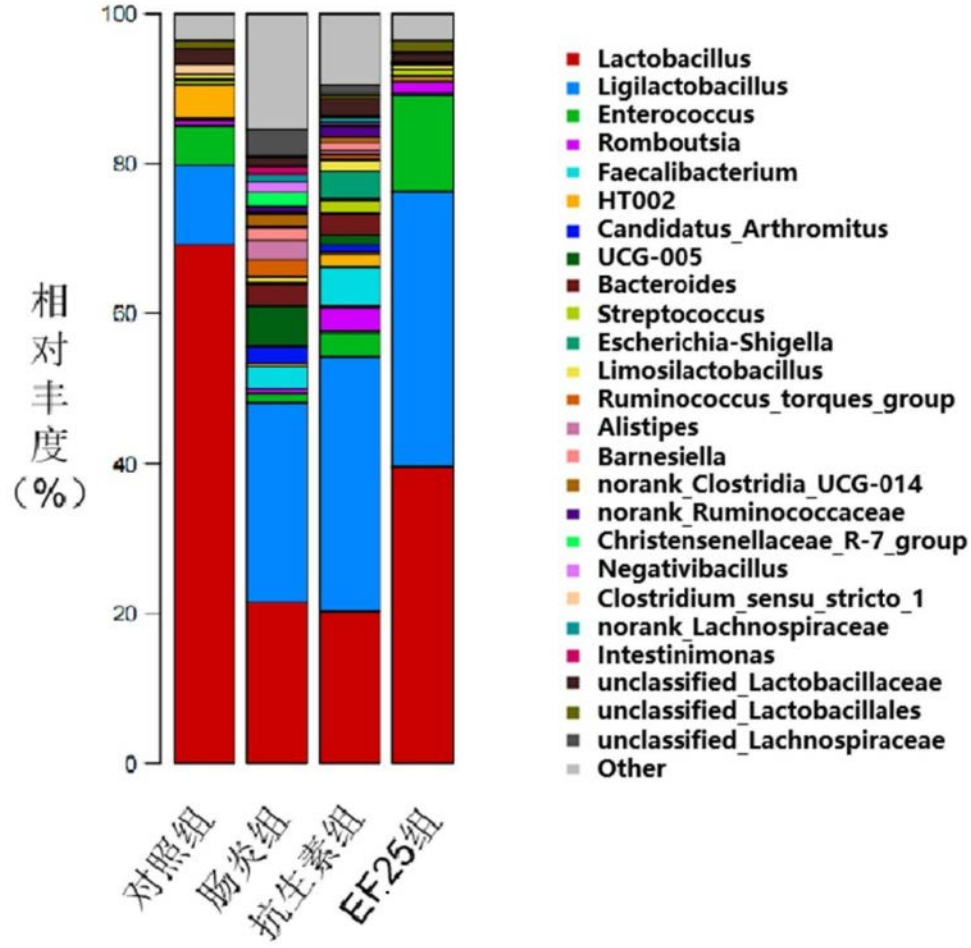

100
80
60
40
20
0
相对丰度（%）
对照组
肠炎组
抗生素组
EF25组
Lactobacillus
Ligilactobacillus
Enterococcus
Romboutsia
Faecalibacterium
HT002
Candidatus_Arthromitus
UCG-005
Bacteroides
Streptococcus
Escherichia-Shigella
Limosilactobacillus
Ruminococcus_torques_group
Alistipes
Barnesiella
norank_Clostridia_UCG-014
norank_Ruminococcaceae
Christensenellaceae_R-7_group
Negativibacillus
Clostridium_sensu_stricto_1
norank_Lachnospiraceae
Intestinimonas
unclassified_Lactobacillaceae
unclassified_Lactobacillales
unclassified_Lachnospiraceae
Other

图7

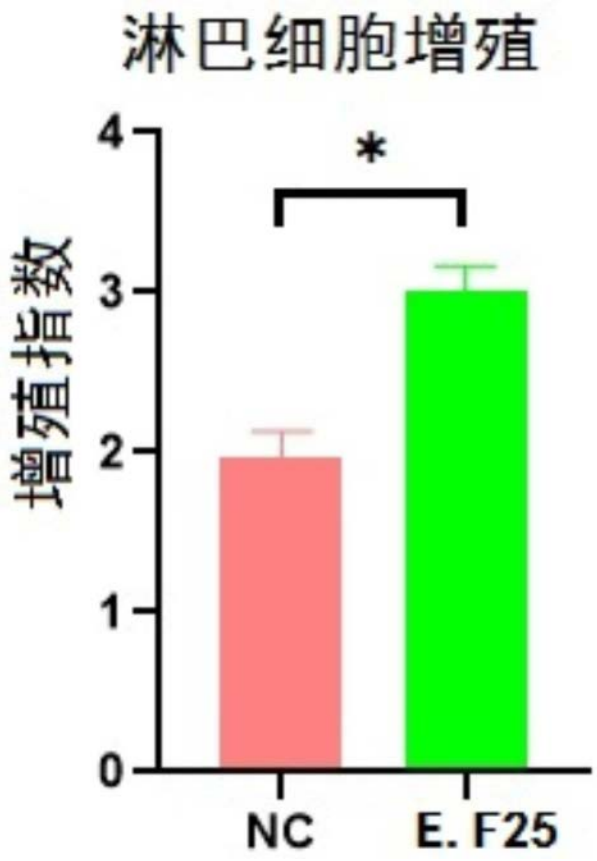

淋巴细胞增殖
增殖指数
4
3
2
1
0
*
NC
E. F25

图8

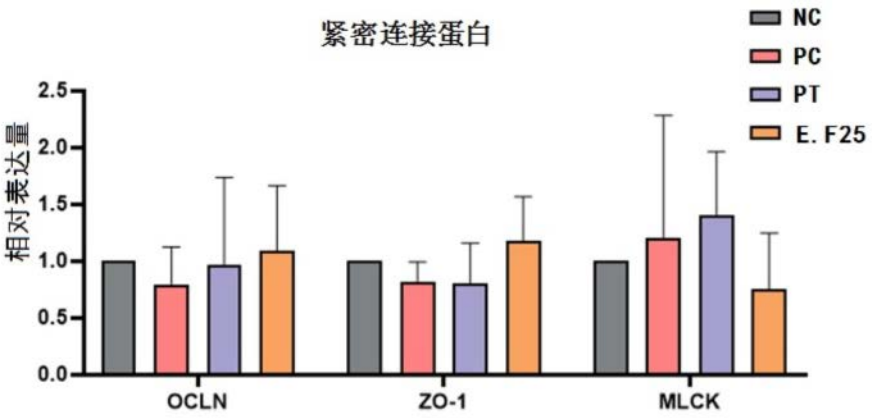

紧密连接蛋白
NC
PC
PT
E. F25
相对表达量
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
OCLN
ZO-1
MLCK

图9

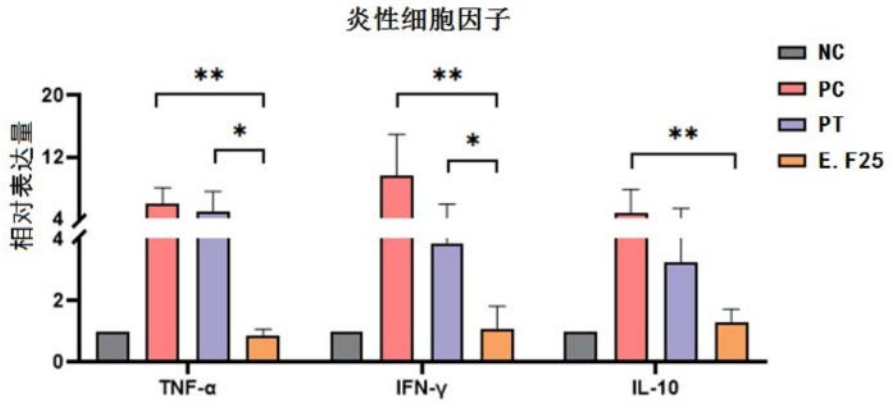


图10