

网络出版时间:2017-08-21 13:50

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2017.10.004

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20170821.1350.008.html>

芽孢杆菌喷雾制剂对鸡舍环境微生物的影响

栾素军,孙永波,萨仁娜,张宏福

(中国农业科学院 北京畜牧兽医研究所 动物营养学国家重点实验室,北京 100193)

【摘 要】 【目的】研究芽孢杆菌喷雾制剂对鸡舍环境微生物的影响,为肉鸡鸡舍环境改善提供技术支持。【方法】试验在 4 间环控舱中进行,以 1 日龄 AA 肉公鸡为试验动物,采用交叉设计,先后进行 2 期试验,每期试验为期 42 d,设每日喷洒 2 mL/m³ 芽孢杆菌喷雾剂处理组和喷洒 2 mL/m³ 无菌水的对照组。以环控舱为试验单位,每个舱为 1 个重复,第 1 期试验以舱 1 和舱 2 为试验组,舱 3 和舱 4 为对照组;第 2 期试验舱 1 和舱 2 为对照组,舱 3 和舱 4 为试验组。于肉鸡 21 和 42 日龄时,利用六级空气微生物采样器采集环控舱内空气样品,并采集肉鸡排泄物样品,分别测定舍内空气和排泄物的微生物含量。【结果】1)21 和 42 日龄时,试验组舱内空气总需氧菌含量显著低于对照组,大肠杆菌含量极显著低于对照组;42 日龄时,试验组舱内空气中金黄色葡萄球菌含量极显著低于对照组。2)21 日龄时,排泄物总需氧菌和大肠杆菌含量极显著低于对照组;42 日龄时,排泄物总需氧菌含量极显著低于对照组,大肠杆菌和金黄色葡萄球菌含量显著低于对照组。3)舍内空气总需氧菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌主要分布在 1~4 级(粒子直径 7.0~2.1 μm),5~6 级(粒子直径 2.1~0.65 μm)分布较少。21 日龄时,试验组舍内空气中采样器 1~4 级总需氧菌数量显著低于对照组,大肠杆菌数量极显著低于对照组。42 日龄时,试验组舍内空气中采样器 2~5 级总需氧菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌数量极显著低于对照组;1 级总需氧菌数量显著低于对照组,大肠杆菌和金黄色葡萄球菌数量极显著低于对照组;6 级总需氧菌和大肠杆菌数量显著低于对照组,金黄色葡萄球菌数量极显著低于对照组。【结论】舍内定期喷洒芽孢杆菌喷雾制剂,能够降低鸡舍环境中的总需氧菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌数量,改善鸡舍环境。

【关键词】 芽孢杆菌;鸡舍;环境微生物;空气微生物粒径分布

【中图分类号】 S855.9

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2017)10-0021-09

Effects of *Bacillus* spray preparation on the environmental microbes in broiler house

LUAN Sujun, SUN Yongbo, SA Renna, ZHANG Hongfu

(Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Science, State Key

Laboratory of Animal Nutrition, Beijing 100193, China)

Abstract: 【Objective】 The experiment was conducted to investigate the effects of *Bacillus* spray preparation on the environmental microbes, expecting to provide information for improving environment of broilers house. 【Method】 Two trials with one-day AA male broilers were taken successively, which were conducted in four chambers and employed a cross-over design. Each trial period lasted for 42 days. The trial included treatment group sprayed 2 mL/m³ *Bacillus* and control group sprayed 2 mL/m³ sterile water. With the chamber as the experimental unit, each chamber represented a replicate. In the first trial, the first and the second chambers were treatment groups and the third and the fourth chambers were control groups. In

【收稿日期】 2016-07-18

【基金项目】 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-42);国家科技支撑计划项目(2012BDA39B01);中国农业科学院科技创新工程项目(ASTIP-IAS07)

【作者简介】 栾素军(1988—),女,山东鄄城人,在读硕士,主要从事家禽营养与环境研究。E-mail:sujuncaas@163.com

【通信作者】 萨仁娜(1972—),女,北京人,副研究员,博士,主要从事家禽营养与环境研究。E-mail:sa6289@126.com

the second trials, the first and the second chambers were control groups and the third and the fourth chambers were treatment groups. The air was collected by the six-stage microbial sampler and the feces was collected. Microbes in the air and feces were determined. 【Result】 The results showed that: 1) Compared with the control group, the content of total aerobic bacteria in the air of the treatment group were significantly decreased ($P < 0.05$) and the content of *E. coli* in the air of the treatment group were significantly decreased ($P < 0.01$) at the age of 21 days and 42 days; The content of *S. aureus* in the air of the treatment group were significantly decreased ($P < 0.01$) at the age of 42 days. 2) Compared with the control group, the content of total aerobic bacteria and *E. coli* in the feces of the treatment group were significantly decreased ($P < 0.01$) at the age of 21 days; The content of total aerobic bacteria in the feces of the treatment group were significantly decreased ($P < 0.01$) and the content of *E. coli* and *S. aureus* in the feces of the treatment group were significantly decreased ($P < 0.05$) at the age of 42 days. 3) Total aerobic bacteria, *E. coli* and *S. aureus* distributed mainly at one to four stage of the sampler with aerodynamic diameter ranged from $7.0\ \mu\text{m}$ to $2.1\ \mu\text{m}$ and only a small portion distributed at five and six stage with diameter ranged from $2.1\ \mu\text{m}$ to $0.65\ \mu\text{m}$. Compared with the control group, at the age of 21 days, from one to four stage of the sampler, the number of total aerobic bacteria in treatment group were decreased significantly ($P < 0.05$) while the number of *E. coli* in treatment group were decreased significantly ($P < 0.01$). At the age of 42 days, compared with the control group, from two to five stage of the sampler, the number of total aerobic bacteria, *E. coli* and *S. aureus* in the treatment group were significantly decreased ($P < 0.01$); In the first stage, the number of total aerobic bacteria in the treatment group were significantly decreased ($P < 0.05$) while the number of *E. coli* and *S. aureus* were significantly decreased ($P < 0.01$). In the sixth stage, the number of total aerobic bacteria and *E. coli* were significantly decreased ($P < 0.05$) while the number of *S. aureus* were significantly decreased ($P < 0.01$). 【Conclusion】 In summary, spraying *Bacillus* preparation regularly in broiler house decreased the number of total aerobic bacteria, *S. aureus* and *E. coli* in the environment and improved the environmental conditions of the broiler house.

Key words: *Bacillus*; broiler house; environmental microbes; the size distribution of airborne microbes

肉鸡规模化养殖过程中, 动物饲养密度高, 通风不易控制, 容易造成舍内空气污浊、微生物数量升高、环境质量降低, 从而影响动物生产性能和健康水平, 限制畜禽遗传潜力的发挥。同时, 微生物特别是条件性致病菌通过气体交换传播到舍外, 污染畜禽舍周边环境, 对周边居民的健康构成一定威胁^[1]。因此, 有效控制舍内环境微生物, 改善畜禽环境条件, 对于提高人畜健康水平、保障畜禽遗传潜力的充分发挥具有重要意义。芽孢杆菌作为一种天然、安全、无污染的绿色添加剂, 其在动物机体代谢过程中分泌脂肽类^[2-3]、蛋白类^[4-5]等活性物质, 通过拮抗肠道或排泄物条件性致病菌, 减少有害气体的逸出, 在改善畜禽养殖环境方面渐显优势。Melegy 等^[6]报道, 饲料中添加 $0.5\ \text{g/kg}$ 枯草芽孢杆菌, 能显著降低肉鸡排泄物中总需氧菌和产气荚膜梭菌的数量。Jeong 等^[7]研究表明, 肉鸡饲料中添加 $600\ \text{mg/kg}$ 枯草芽孢杆菌制剂, 能显著降低肉鸡盲肠及排泄物中的大肠杆菌和沙门氏菌数量及排泄物氨气排放

量。Song 等^[8]研究表明, 饲料中添加 $1.5\ \text{g/kg}$ 复合枯草芽孢杆菌及地衣芽孢杆菌的益生菌制剂, 能降低肉鸡肠道大肠杆菌和梭状芽孢杆菌数量。Park 等^[9]研究表明, 肉鸡饲料中添加 0.1% 的枯草芽孢杆菌, 能显著降低排泄物中沙门氏菌数量和 NH_3 排放量。Ahmed 等^[10]研究发现, 饲料中添加 $5\ \text{g/kg}$ 解淀粉芽孢杆菌, 能显著降低肉鸡盲肠内容物的大肠杆菌数量及排泄物中 NH_3 和 H_2S 的产生, 改善鸡舍环境。综观现有研究, 芽孢杆菌主要以饲料添加剂的形式用于改善鸡舍环境, 鲜有采取喷洒方式应用芽孢杆菌改善鸡舍环境的报道。为此, 本试验通过在肉鸡舍中定期喷洒芽孢杆菌制剂, 系统研究喷雾制剂对鸡舍环境微生物及舍内空气粒子所携带微生物的影响, 以期对肉鸡养殖环境的改善提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

解淀粉芽孢杆菌 SKN01 和 SKN02, 由北京畜

牧兽医研究所保存。

分析天平(精度 0.000 1 g,SWCJ-B),梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;立式压力蒸汽灭菌器(LS-50LJ),江阴滨江医疗设备有限公司;超净工作台(YT-CJ-1ND),北京亚泰科隆仪器技术有限公司;培养箱(SPXMP-B-2),上海福玛设备有限公司;摇床(HZS-H),哈尔滨市东联电子技术开发有限公司;JWL-S6 六级空气微生物采样器,北京先能技术开发有限责任公司。营养琼脂、伊红美蓝琼脂、LB

肉汤,北京陆桥技术有限公司;蛋白胨、牛肉粉、D-甘露醇、氯化钠、酚红、琼脂粉,购于北京奥博星生物技术有限公司;大肠埃希氏菌干制生化鉴定试剂盒(DBI-01),北京陆桥技术有限公司;冻干兔血浆(CM304),北京陆桥技术有限公司。

1.2 饲 粮

试验饲粮为玉米-豆粕型饲粮,营养水平参考鸡饲养标准 NY/T33—2004 确定,基础饲粮配方及营养水平见表 1。

表 1 基础饲粮配方及营养水平(风干基础)

Table 1 Composition and nutrient levels of basal diets (air-dry basis)

项目 Item	配方及成分 Composition	日龄/d Age		项目 Item	配方及成分 Composition	日龄/d Age	
		1~21	22~42			1~21	22~42
配方 Composition	玉米/(g·kg ⁻¹) Corn	550.00	590.00	营养水平 Nutrient levels	代谢能/(MJ·kg ⁻¹) ME	12.60	12.77
	大豆粕/(g·kg ⁻¹) Soybean meal	362.00	324.00		蛋白质/(g·kg ⁻¹) CP	212.70	199.40
	植物油/(g·kg ⁻¹) Vegetable oil	40.00	40.00		钙/(g·kg ⁻¹) Ca	10.00	9.00
	石粉/(g·kg ⁻¹) Limestone	12.10	11.40		有效磷/(g·kg ⁻¹) AP	4.50	4.00
	磷酸氢钙/(g·kg ⁻¹) CaHPO ₄	19.10	16.50		赖氨酸/(g·kg ⁻¹) Lys	11.50	11.40
	50%氯化胆碱/(g·kg ⁻¹) Choline chloride	0.50	0.50		蛋氨酸/(g·kg ⁻¹) Met	5.00	5.00
	预混料/(g·kg ⁻¹) Premix	10.00	10.00		(蛋氨酸+半胱氨酸)/ (g·kg ⁻¹) Met+Cys	6.90	6.80
	赖氨酸/(g·kg ⁻¹) Lys	0.70	1.80				
	食盐/(g·kg ⁻¹) NaCl	2.50	2.50				
	蛋氨酸/(g·kg ⁻¹) Met	3.10	3.30				

注:预混料为每 kg 全价料提供 V_A 5 000 IU,V_D 10 000 IU,V_E 75.0 mg,V_{K₃} 18.8 mg,V_{B₁} 9.8 mg,V_{B₂} 28.8 mg,V_{B₆} 19.6 mg,V_{B₁₂} 0.1 mg,泛酸钙 58.8 mg,烟酸 196.0 mg,叶酸 4.9 mg,生物素 2.5 mg,Cu(以 CuSO₄ 形式)4.0 mg,Fe(以 FeSO₄ 形式)40.0 mg,Mn(以 MnSO₄ 形式)50.0 mg,Zn(以 ZnSO₄ 形式)37.6 mg,I(以 KI 形式)0.20 mg,Se(以 Na₂SeO₃ 形式)0.20 mg。
Note:The premix provided the following per kg of diets: V_A 5 000 IU,V_D 10 000 IU,V_E 75.0 mg,V_{K₃} 18.8 mg,V_{B₁} 9.8 mg,V_{B₂} 28.8 mg,V_{B₆} 19.6 mg,V_{B₁₂} 0.1 mg,calcium pantothenate 58.8 mg, nicotinic acid 196.0 mg, folic acid 4.9 mg,biotin 2.5 mg,Cu (as copper sulfate) 4.0 mg,Fe (as ferrous sulfate) 40.0 mg,Mn (as manganese sulfate) 50.0 mg,Zn (as zinc sulfate) 37.6 mg,I (as potassium iodide) 0.20 mg,Se (as sodium selenite) 0.20 mg.

1.3 试验设计

根据预试验结果,2 株解淀粉芽孢杆菌以 1:1 比例混合作为芽孢杆菌喷剂,其细菌含量 8×10⁸ CFU/mL。试验在动物营养学国家重点实验室昌平基地进行,利用养殖条件一致的环控舱(长×宽×高=4.2 m×3 m×2.5 m)控制环境。采用交叉试验设计,以环控舱为试验单位,先后进行 2 期试验。第 1 期试验:将 320 只体质量接近((36.1±0.1) g/只)的 1 日龄 AA 肉公鸡随机分配在 4 间环控舱,环控舱饲养 80 只。每间环控舱由中间过道分为左右两侧,每侧放置 2 个独立的栏,即每个舱放置 4 个栏,每个栏中饲养 20 只鸡,饲养周期为 42 d。随机选择 2 间环控舱作为试验组(1 和 2 号舱),喷洒芽孢杆菌喷雾剂 2 mL/m³;另外 2 间环控舱(3 和 4 号

舱)喷洒等量的无菌水,作为对照组。第 2 期试验:另选一批来源、体质量、数量与第 1 期试验一致的 AA 肉公鸡进行试验,环控舱进行交换处理,即 1 和 2 号舱作为对照组,喷洒 2 mL/m³ 无菌水;3 和 4 号舱作为试验组,喷洒芽孢杆菌喷雾剂 2 mL/m³。每天中午 12:00 使用小型喷壶喷洒芽孢杆菌喷雾剂和无菌水,喷洒高度为距离鸡体上方 50 cm 处,雾滴粒径控制在 100~150 μm,采取侧身平行推进方式,按照由左向右、由内至外的顺序进行。

1.4 饲养管理

肉鸡网上平养,自由采食和饮水,每天光照 24 h,3~4 d 清粪 1 次。利用计算机控制系统保持 4 间环控舱内的温度、湿度、光照、通风等环境条件,使其保持一致。1~3 日龄时温度为 35~36 ℃,4~7 日

龄为 32~33 ℃,以后每 3~4 d 降 1 ℃,至 36~42 日龄降为 23~24 ℃。试鸡按照常规程序进行免疫,7 日龄进行新城疫和传支二联苗点眼滴鼻免疫,21 日龄进行新城疫饮水免疫。

1.5 测定指标及方法

1.5.1 空气微生物测定 分别于肉鸡 21 和 42 日龄,每间环控舱在中轴位置选择 2 点(分别距门 1 和 3 m 处),利用 JWJL-S6 六级空气微生物采样器采集舍内空气样本,各级样本粒子直径(d)依次为:1 级 $d>7.0\text{ }\mu\text{m}$,2 级 $4.7\text{ }\mu\text{m}<d\leq 7.0\text{ }\mu\text{m}$,3 级 $3.3\text{ }\mu\text{m}<d\leq 4.7\text{ }\mu\text{m}$,4 级 $2.1\text{ }\mu\text{m}<d\leq 3.3\text{ }\mu\text{m}$,5 级 $1.1\text{ }\mu\text{m}<d\leq 2.1\text{ }\mu\text{m}$,6 级 $0.65\text{ }\mu\text{m}<d\leq 1.1\text{ }\mu\text{m}$ 。每个采样点设 3 个平行(即在同一时间点采集样品时,每个采样点由 3 台机器同时采集),采集高度为网床上方 70 cm。总需氧菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌分别以营养琼脂培养基、伊红美兰培养基和甘露醇高盐培养基为采样介质。采样器采样流量设置为 28.3 L/min,总需氧菌和金黄色葡萄球菌采集时间为 2~3 min,大肠杆菌采集时间为 2~4 min。采样期间关闭风机,样品采集完成后,立即放入恒温培养箱培养,总需氧菌和大肠杆菌培养 18~24 h,金黄色葡萄球菌培养 24~36 h,之后进行鉴定计数。大肠杆菌利用大肠埃希氏菌生化鉴定试剂盒进行鉴定(靛基质试验大肠杆菌菌液有黄色变化,甲基红试验有红色变化,VP 试验无颜色变化,柠檬酸盐试验无颜色变化);金黄色葡萄球菌经血浆凝固酶试验进行鉴定(金黄色葡萄球菌使兔血浆呈凝固反应)。然后计算空气微生物含量:空气微生物含量(CFU/ m^3)=(平皿菌落总数 $\times$ 1 000)/(28.3 L/min $\times$ 采样时间),试验结果以空气微生物含量(CFU/ m^3)的常用对数值表示。

1.5.2 排泄物微生物测定 如 1.3 节中所述,每间环控舱内放置 4 个独立的栏,分别于肉鸡 21 和 42

日龄,在每个栏选取 1 个采样点,即每间环控舱取 4 个采样点,用无菌镊子采集肉鸡新鲜排泄物 5 g 左右,装于 10 mL 灭菌离心管中,于 4 ℃冰箱保存。24 h 内测定排泄物中总需氧菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌含量。在超净台中,取 1 g 排泄物,放入装有 9 mL 无菌水的离心管中,于漩涡混合仪上振荡混合均匀,静置 10 min,取上清逐级稀释至 10^{-6} 备用。

将上述不同稀释度菌液接种于培养基上,以每个培养基长 30~300 个菌落为标准,选取 3 个合适的稀释度(总需氧菌选择的稀释度:21 日龄为 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ;42 日龄为 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 。大肠杆菌选择的稀释度:21 日龄为 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} ;42 日龄为 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} 。金黄色葡萄球菌选择的稀释度:21 日龄为 100, 10^{-1} , 10^{-2} ;42 日龄为 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3})。每个稀释度用移液枪吸取 3 份,每份 20 μL ,分别接种于营养琼脂、伊红美兰琼脂和甘露醇高盐培养基中于 37 ℃培养,其中总需氧菌和大肠杆菌培养 18~24 h,金黄色葡萄球菌培养 24~36 h,之后测定排泄物中 3 种微生物的数量,每个稀释度进行 3 个平行测定,结果以排泄物中微生物含量(CFU/g)的常用对数值表示。

1.6 数据统计与分析

本试验在环控舱中进行,将第 1、2 期试验所得数据放在一起进行统计与分析。利用 SAS 9.2 软件的 MIXED 模块进行处理,结果以“平均数 $\pm$ 标准误”表示,以 $P>0.05$ 为差异不显著, $P<0.05$ 为差异显著水平, $P<0.01$ 为差异极显著水平。

2 结果与分析

2.1 芽孢杆菌喷雾制剂对鸡舍空气微生物的影响
芽孢杆菌喷雾制剂对鸡舍空气微生物含量的影响如表 2 所示。

表 2 芽孢杆菌喷雾制剂对鸡舍空气微生物含量的影响

Table 2 Effects of *Bacillus* spray preparation on airborne microorganism of the broilers house

日龄/d Age	组别 Group	总需氧菌 Total aerobic bacteria	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>
21	对照组 Control group	4.20 $\pm$ 0.02 a	2.60 $\pm$ 0.04 aA	3.14 $\pm$ 0.08
	试验组 Treatment group	3.93 $\pm$ 0.03 b	2.20 $\pm$ 0.04 bB	2.99 $\pm$ 0.04
42	对照组 Control group	4.73 $\pm$ 0.02 a	3.12 $\pm$ 0.01 aA	4.08 $\pm$ 0.02 aA
	试验组 Treatment group	4.10 $\pm$ 0.01 b	2.45 $\pm$ 0.01 bB	3.60 $\pm$ 0.01 bB

注:表中数据为空气微生物含量(CFU/ m^3)的常用对数值。同一日龄同列数据标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),标不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$),不标注字母表示差异不显著,下表同。

Note: Values in the table are the common logarithm of airborne microorganism. Values with different lowercase letters in the same column with the same age are significantly different ($P<0.05$). Values with different upper case letters in the same column are significantly different ($P<0.01$). Values with no letters in the same column are not significantly different ($P>0.05$). The same as below.

由表 2 可知,随着肉鸡日龄的升高,舍内空气总需氧菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌均呈上升趋势。21 日龄时,试验组(芽孢杆菌喷雾制剂组)舍内空气中总需氧菌显著低于对照组($P<0.05$),大肠杆菌极显著低于对照组($P<0.01$),金黄色葡萄球菌与对照组相比无显著差异($P>0.05$)。42 日龄时,芽孢杆菌喷雾剂处理组舍内空气中总需氧菌显著低于

对照组($P<0.05$),大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均极显著低于对照组($P<0.01$)。

2.2 芽孢杆菌喷雾制剂对肉鸡排泄物微生物的影响

芽孢杆菌喷雾制剂对肉鸡排泄物微生物含量的影响如表 3 所示。

表 3 芽孢杆菌喷雾制剂对肉鸡排泄物微生物含量的影响
Table 3 Effects of *Bacillus* spray preparation on fecal microbes of broilers

日龄/d Age	组别 Group	总需氧菌 Total aerobic bacteria	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>
21	对照组 Control group	6.57±0.01 aA	5.46±0.02 aA	3.19±0.01
	试验组 Treatment group	5.80±0.04 bB	4.81±0.02 bB	3.14±0.02
42	对照组 Control group	7.45±0.02 aA	6.38±0.06 a	4.74±0.05 a
	试验组 Treatment group	6.72±0.03 bB	5.66±0.06 b	4.45±0.03 b

注:表中数据为排泄物微生物含量(CFU/g)的常用对数值。
Note: Values in the table are the common logarithm of fecal microbes.

由表 3 可知,相同日龄下,肉鸡排泄物中总需氧菌高于大肠杆菌和金黄色葡萄球菌。随着肉鸡日龄的增大,3 种菌的含量均逐渐增多。21 日龄时,试验组排泄物总需氧菌和大肠杆菌极显著低于对照组($P<0.01$);金黄色葡萄球菌含量也低于对照组,但差异未达到显著水平($P>0.05$)。42 日龄时,试验组排泄物总需氧菌含量极显著低于对照组($P<0.01$),大肠杆菌和金黄色葡萄球菌含量均显著低于

对照组($P<0.05$)。

2.3 鸡舍空气微生物的动力学分布

表 4 为 21 和 42 日龄时 JWL-S6 型六级采样器采集的试验组及对照组的微生物($n=32$)分析结果。由表 4 可知,空气粒子所携带的总需氧菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌主要分布在采样器 1~4 级上,粒子直径 $>2.1\text{ }\mu\text{m}$;少部分分布在 5~6 级上,粒径为 $0.65\sim2.1\text{ }\mu\text{m}$ 。

表 4 鸡舍空气中各粒径级别微生物含量及其占比($n=32$)

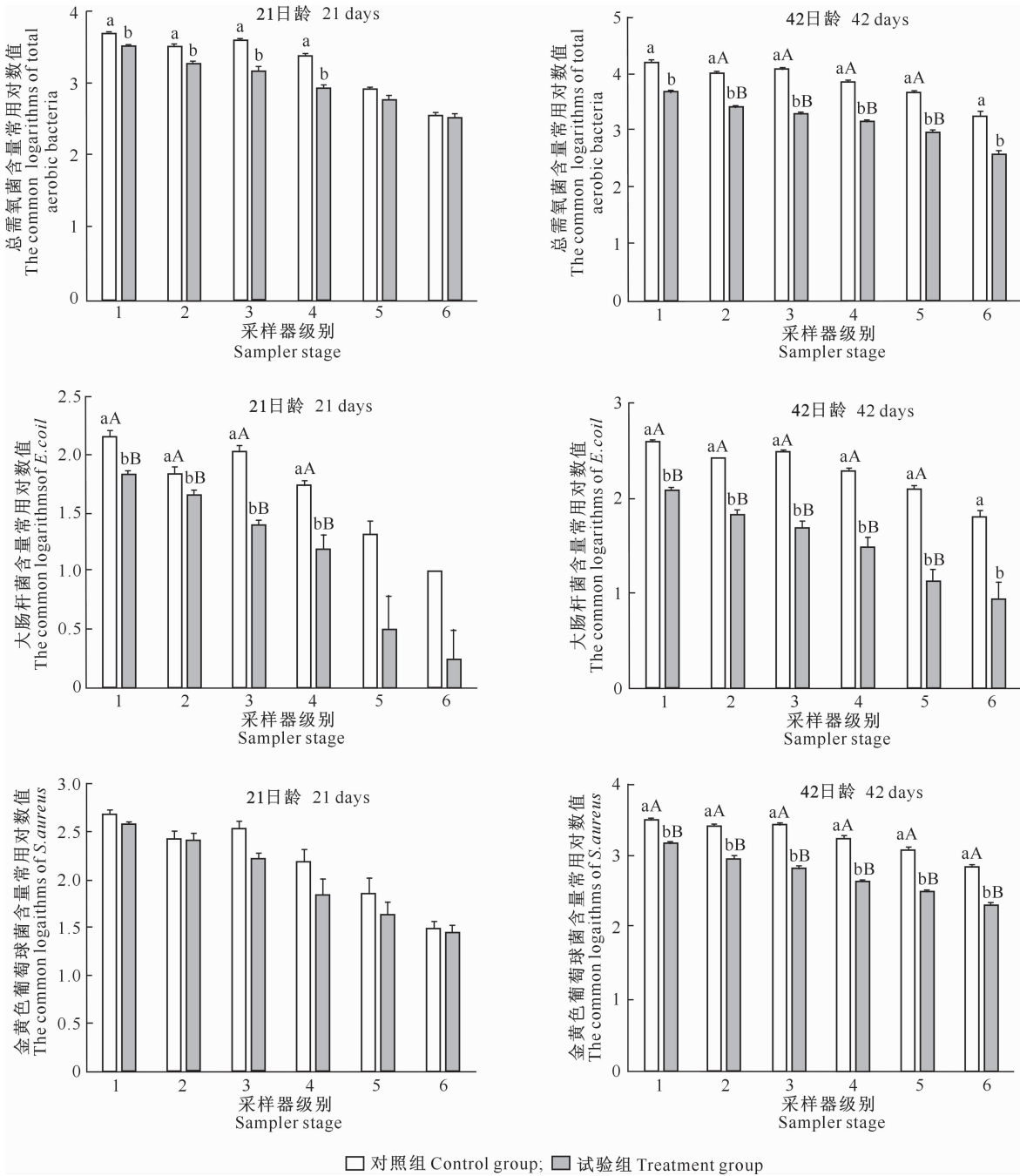
Table 4 The number and percentages of airborne microbes in different diameters in broiler house ($n=32$)

细菌种类 Bacterial family	1 级 Grade 1		2 级 Grade 2		3 级 Grade 3	
	含量/(CFU·m ⁻³) Content	占比/% Ratio	含量/(CFU·m ⁻³) Content	占比/% Ratio	含量/(CFU·m ⁻³) Content	占比/% Ratio
总需氧菌 Total aerobic bacteria	6 985	31.29	4 615	20.67	5 090	22.80
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	183	32.30	113	19.91	123	21.68
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	1 395	29.49	1 033	21.83	1 000	21.14
细菌种类 Bacterial family	4 级 Grade 4		5 级 Grade 5		6 级 Grade 6	
	含量/(CFU·m ⁻³) Content	占比/% Ratio	含量/(CFU·m ⁻³) Content	占比/% Ratio	含量/(CFU·m ⁻³) Content	占比/% Ratio
总需氧菌 Total aerobic bacteria	3 045	13.64	1 825	8.18	763	3.42
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	78	13.72	45	7.96	25	4.42
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	623	13.16	428	9.04	253	5.34

由图 1 可知,21 日龄时,试验组空气微生物分布在采样器 1~4 级上的总需氧菌显著低于对照组($P<0.05$),大肠杆菌极显著低于对照组($P<0.01$);分布在采样器 5~6 级上的总需氧菌、大肠杆菌均低于对照组,但差异未达到显著水平($P>0.05$);分布在采样器 1~6 级上的金黄色葡萄球菌均低于对照组,但差异不显著($P>0.05$)。

布在采样器 2~5 级上的总需氧菌极显著低于对照组($P<0.01$),分布在 1、6 级上的总需氧菌显著低于对照组($P<0.05$);分布在采样器 1~5 级上的大肠杆菌极显著低于对照组($P<0.01$),分布在 6 级上的大肠杆菌显著低于对照组($P<0.05$);分布在采样器 1~6 级上的金黄色葡萄球菌极显著低于对照组($P<0.01$)。

由图 1 可知,42 日龄时,试验组空气微生物分



不同处理间标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),标注不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$),
未标注字母表示差异不显著($P>0.05$)

Groups with significant difference are indicated by different lowercase letters ($P<0.05$). Groups with significant difference are indicated by different uppercase letters ($P<0.01$). Groups without significant difference are indicated by no letters ($P>0.05$)

图 1 芽孢杆菌喷雾剂对 21 日龄和 42 日龄鸡舍各粒级空气微生物分布的影响
Fig. 1 Effects of *Bacillus* spray preparation on the distribution of airborne microbes at 1-6 stage of the JWL-S6 sampler at the age of 21 days and 42 days

3 讨论

3.1 芽孢杆菌喷雾剂对鸡舍环境微生物的影响

畜禽舍高浓度的微生物不仅对人及动物的健康存在威胁,同时还会导致周边环境污染。一些学者

以空气中的细菌为研究对象,通过检测畜禽舍空气中的需氧菌含量,衡量空气污染程度^[11-12]。大肠杆菌是畜禽舍内常见的条件性致病菌,能够诱发禽类败血病、慢性呼吸道疾病等^[13]。金黄色葡萄球菌主要存在于人及动物的鼻腔、咽喉等部位,是引起化脓

型疾病的重要病原菌^[14]。芽孢杆菌是一类好氧或兼性厌氧菌,在其生长代谢过程中,可以消耗氧气而分泌脂肽类、蛋白类等活性抗菌物质。有研究报道,芽孢杆菌作为饲料添加剂,能够降低肉鸡肠道内容物大肠杆菌^[10]、沙门氏菌^[7]等有害菌含量,增加乳酸杆菌、双歧杆菌等有益菌数量^[15],降低排泄物中氨气、硫化氢等有害气体浓度^[16],净化饲养环境。在水产养殖的水体中投放芽孢杆菌,可抑制水体病原菌,降低水体氨氮、亚硝酸氮等的含量,改善养殖环境^[17-21]。本试验以总需氧菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌作为指示菌,分析定期喷洒芽孢杆菌对畜禽舍环境的影响作用,结果表明喷雾制剂能明显降低鸡舍空气及排泄物的总需氧菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌含量,净化鸡舍微生物环境。菌悬液喷洒在畜舍空气中,除了吸附在空气微粒上外,有部分散落在粪便上,一方面抑制了空气中需氧微生物的生长,另一方面也抑制了粪便中大肠杆菌和金黄色葡萄球菌等条件性致病菌的增殖,有效降低了舍内空气及排泄物中条件性致病菌的数量,起到净化养殖环境的作用,这与其他研究结果^[22-23]相类似。

3.2 空气微生物的粒径分布及其健康危害评估

畜禽舍内,畜禽排泄物、垫料、饮水及饲料中的微生物在空气气流弥散作用下,与水和尘埃颗粒相结合,悬浮在空气中形成微生物气溶胶,微生物通常吸附在气溶胶的表面。不同粒径的微生物气溶胶沉降在呼吸道不同位置,粒径 $>6.0\ \mu\text{m}$ 的微粒被截留在鼻腔或者气管内,而粒径 $<2\ \mu\text{m}$ 的微粒可以到达下层呼吸道,对动物呼吸道构成潜在威胁^[24]。有研究报道,鸡舍有 67.1% 的总需氧菌^[25]、40.0% 的大肠杆菌^[25]及 42.6% 的金黄色葡萄球菌^[26]分布在采样器 3~6 级,其粒径 $<4.7\ \mu\text{m}$ 。因此,大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等条件性致病菌可以到达支气管、细支气管、肺泡等下层呼吸道部位,对肉鸡呼吸道构成感染威胁。本试验利用 JWLS-6 六级微生物采样器采集空气微生物,采样器 1~2 级所采集的微生物吸附在粒径为 $7.0\sim 4.7\ \mu\text{m}$ 的微粒上,类似于上呼吸道捕获的大粒子;而 3~6 级所采集的微生物吸附在粒径为 $4.7\sim 0.65\ \mu\text{m}$ 的微粒上,类似于下呼吸道所捕获的小粒子。根据采样器级别的不同,可以估测空气微生物进入肉鸡呼吸道的部位和深度。本研究测定数据表明,舍内空气中总需氧菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌主要分布在采样器 1~4 级的微粒上,可以到达支气管及次级支气管;少部分分布在采样器 5~6 级的微粒上,能进入细支气管和肺泡。

有 48.0% 的总需氧菌、47.5% 的大肠杆菌和 48.7% 的金黄色葡萄球菌分布在采样器的 3~6 级上,能够到达气管、支气管、肺泡等下呼吸道部位,对肉鸡呼吸道构成一定威胁,这与前人在其他动物上的研究结果^[27-28]相似。

3.3 芽孢杆菌喷雾制剂对采样器不同层级空气微生物的影响

本试验数据表明,在肉鸡 42 日龄时,微生物采样器 1~6 级微粒上所吸附的微生物数量高于 21 日龄,说明随着饲养时间的延长及肉鸡个体的增长,随呼吸作用进入呼吸系统的微生物数量呈增加趋势。试验组与对照组舍内微生物分级采样分析结果显示,在肉鸡 21 日龄时,喷洒芽孢杆菌能显著降低采样器 1~4 级粒子所吸附的总需氧菌和大肠杆菌;在肉鸡 42 日龄时,喷洒芽孢杆菌能显著降低采样器 1~6 级粒子所吸附的总需氧菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌,表明喷雾制剂对不同大小粒子所吸附的微生物均会产生抑制作用。芽孢杆菌抗逆性强,生长迅速,虽然不是环境中的优势菌群,但是随着喷洒时间的积累,存活下来的芽孢杆菌能竞争性抑制空气中致病菌及条件性致病菌的生长,净化养殖环境,使得进入肉鸡呼吸道不同部位和深度,尤其是进入肉鸡下呼吸道的微生物明显减少,患呼吸道疾病的几率降低,健康水平提高。

4 结 论

1) 肉鸡舍定期喷洒芽孢杆菌制剂,能有效减少 21 和 42 日龄肉鸡鸡舍空气及排泄物中的总需氧菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌,提高畜舍环境质量。

2) 肉鸡舍定期喷洒芽孢杆菌制剂,能降低沉积在肉鸡呼吸道不同部位和深度的总需氧菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌,尤其是在肉鸡 42 日龄时,能极显著降低进入肉鸡下呼吸道的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌量。

【参考文献】

- [1] 钟召兵,柴同杰,段会勇,等. 鸡舍环境金黄色葡萄球菌气溶胶产生及其传播的 REEP-PCR 鉴定 [J]. 畜牧兽医学报,2008,39(10):1395-1401.
Zhong Z B,Chai T J,Duan H Y,et al. REP-PCR identification of airborne *Staphylococcus aureus* isolated from chicken houses and their spreading around the farms [J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences,2008,39(10):1395-1401.
- [2] 荣艳君. 解淀粉芽孢杆菌 R3 菌株抗菌脂肽及其作用于病原大

- 肠杆菌的研究 [D]. 山东青岛:中国海洋大学,2014.
- Rong Y J. Antibacterial activity of lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* R3 against multidrug-resistant pathogenic *E. coli* [D]. Qingdao, Shandong: Ocean University of China, 2014.
- [3] Xu H M, Rong Y J, Zhao M X, et al. Antibacterial activity of the lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* M1 against multidrug-resistant *Vibrio* spp. isolated from diseased marine animals [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(1): 127-136.
- [4] Stover A G, Driks A. Regulation of synthesis of the *Bacillus subtilis* transition-phase, spore-associated antibacterial protein TasA [J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(17): 5476-5481.
- [5] Wong J H, Hao J, Cao Z, et al. An antifungal protein from *Bacillus amyloliquefaciens* [J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 105(6): 1888-1898.
- [6] Melegy T, Khaled N F, El-Bana R, et al. Effect of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* PB6 (CLOSTATTM) on performance, immunity, gut health and carcass traits in broilers [J]. Journal of American Science, 2011, 7(12): 891-898.
- [7] Jeong J S, Kim I H. Effect of *Bacillus subtilis* C-3102 spores as a probiotic feed supplement on growth performance, noxious gas emission, and intestinal microflora in broilers [J]. Poultry Science, 2014, 93(12): 3097-3103.
- [8] Song J, Xiao K, Ke Y L, et al. Effect of a probiotic mixture on intestinal microflora, morphology, and barrier integrity of broilers subjected to heat stress [J]. Poultry Science, 2014, 93(3): 581-588.
- [9] Park J H, Kim I H. The effects of the supplementation of *Bacillus subtilis* RX7 and B2A strains on the performance, blood profiles, intestinal *Salmonella* concentration, noxious gas emission, organ weight and breast meat quality of broiler challenged with *Salmonella typhimurium* [J]. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 2015, 99(2): 326-334.
- [10] Ahmed S T, Islam M M, Mun H S, et al. Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* as a probiotic strain on growth performance, cecal microflora, and fecal noxious gas emissions of broiler chickens [J]. Poultry Science, 2014, 93(8): 1963-1971.
- [11] Wiegand B, Hartung J, Hinz T, et al. Air quality in Louisiana type broiler houses; Part 2. Bacteria and endotoxin levels in airborne dust [J]. Landbauforschung Voelkenrode (Germany), 1993, 43(4): 236-241.
- [12] Agranovski V, Reponen T, Ristovski Z D. Survey of bioaerosol emissions from Australian poultry buildings [C]// Claudia H, Regina H, Pierre M. Symposium of European Aerosol Conference. Salzburg: Wladysla W W S, 2007: 194.
- [13] Dho-Moulin M, Fairbrother J M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) [J]. Veterinary Research, 1999, 30(2): 299-316.
- [14] 刘敦江. 养鸡舍环境携带耐药基因的金黄色葡萄球菌的气溶胶形成及传播研究 [D]. 山东泰安: 山东农业大学, 2012.
- Liu D J. Formation and transmission of the aerosols of bacterial *Staphylococcus aureus* carrying antibiotic-resistant genes in a poultry farming environment [D]. Tai'an, Shandong: Shandong Agricultural University, 2012.
- [15] 唐小波, 杨晓尧, 潘康成. 产植酸酶芽孢杆菌的筛选及对肉鸡生长性能的影响 [J]. 中国畜牧杂志, 2013, 49(1): 60-64.
- Tang X B, Yang X Y, Pan K C. Screening of phytase-producing *Bacillus* and its effects on growth performance of broilers [J]. Chinese Journal of Animal Science, 2013, 49(1): 60-64.
- [16] Zhang Z F, Cho J H, Kim I H. Effects of *Bacillus subtilis* UBT-MO2 on growth performance, relative immune organ weight, gas concentration in excreta, and intestinal microbial shedding in broiler chickens [J]. Livestock Science, 2013, 155(2): 343-347.
- [17] 黄洪辉, 林 钦, 郭志勋, 等. 有益微生物的应用对海水对虾养殖池塘中细菌数量动态变化的影响 [J]. 南方水产科学, 2007, 3(3): 14-19.
- Huang H H, Lin Q, Guo Z X, et al. Effects of probiotics on the dynamic of bacteria in marine shrimp pond [J]. South China Fisheries Science, 2007, 3(3): 14-19.
- [18] 仇 明, 齐志涛, 王爱民, 等. 枯草芽孢杆菌对斑点叉尾鲷生长及养殖水体水质的影响 [J]. 饲料工业, 2010, 31(24): 29-32.
- Qiu M, Qi Z T, Wang A M, et al. Effects of *Bacillus subtilis* on growth performance of channel catfish and aquaculture water quality [J]. Feed Industry, 2010, 31(24): 29-32.
- [19] Vaseeharan B, Ramasamy P. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. Letters in Applied Microbiology, 2003, 36(2): 83-87.
- [20] Laloo R, Ramchuran S, Ramduth D, et al. Isolation and selection of *Bacillus* spp. as potential biological agents for enhancement of water quality in culture of ornamental fish [J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 103(5): 1471-1479.
- [21] Ghosh S, Sinha A, Sahu C. Bioaugmentation in the growth and water quality of livebearing ornamental fishes [J]. Aquaculture International, 2008, 16(5): 393-403.
- [22] 全永娟, 萨仁娜, 张宏福, 等. 三株芽孢杆菌抑菌活性分析及对

肉鸡舍空气微生物的影响 [J]. 中国农业科学,2013,46(20): 4344-4353.

Tong Y J,Sa R N,Zhang H F,et al. Comparative studies on the bacteriostatic activity of three *Bacillus strains* and its effects on air microorganisms [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2013,46(20):4344-4353.

[23] 孙春阳. 复合芽孢杆菌喷剂对鸡舍环境及肉鸡呼吸道菌群结构的影响 [D]. 北京:中国农业科学院,2013.

Sun C Y. Effect of the composite *Bacillus* sprays on the environment of the house and respiratory tract microflora of broilers [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Science, 2013.

[24] 高 敏,贾瑞志,仇天雷,等. 集约化养鸡场空气中生物气溶胶特点研究 [J]. 农业环境科学学报,2015,34(4):787-794.

Gao M,Jia R Z,Qiu T L,et al. Characteristics of bioaerosols in air environment of confined poultry feeding operations [J]. Journal of Agro-Environment Science,2015,34(4):787-794.

[25] 段会勇. 动物舍微生物气溶胶及其向周围环境的传播 [D]. 山东泰安:山东农业大学,2008.

Duan H Y. Microbiological aerosol of animal houses and their transmission to the surroundings [D]. Tai'an, Shandong: Shandong Agricultural University,2008.

[26] 柴同杰,赵云玲,刘 辉,等. 禽舍微生物气溶胶含量及其空气动力学研究 [J]. 中国兽医杂志,2001,37(3):9-11.

Chai T J,Zhao Y L,Liu H,et al. Studies on the concentration and aerodynamic diameters of microbiological aerosol in the poultry house [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2001,37(3):9-11.

[27] Hu D,Wang-Li L J,Simmons III O D,et al. Size distributions of bioaerosols in an egg production facility and its vicinity [J]. Environmental Engineering Science, 2016, 33(4): 215-223.

[28] 袁 文,柴同杰,苗增民,等. 猪舍环境气载需氧菌含量的季节性变化及其健康风险评估 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2010,38(5):51-55.

Yuan W,Chai T J,Miao Z M,et al. The seasonal changes and health risk assessment of airborne aerobic bacteria concentration in closed pig house [J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition),2010,38(5):51-55.

(上接第 20 页)

[17] Ostrowski M,Galeota J A,Jar A M,et al. Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain [J]. Journal of Virology,2002,76(9):4241-4250.

[18] Zhou Y J,Yu H,Tian Z J,et al. Monoclonal antibodies and conserved antigenic epitopes in the C terminus of GP5 protein of the North American type porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. Vet Microbiol,2009,138(1/2):1-10.

[19] 张松林,韩 静,李 峰,等. 猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒的免疫学和免疫逃避研究进展 [J]. 病毒学报,2012,28(6): 689-698.

Zhang S L,Han J,Li F,et al. Advance in immunology and immune evasion of PRRSV [J]. Chinese Journal of Virology, 2012,28(6):689-698.

[20] Rascón-Castelo E,Burgara-Estrella A,Mateu E,et al. Immunological features of the non-structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. Viruses, 2015,7(3):873-886.

[21] Loving C L,Osorio F A,Murtaugh M P,et al. Innate and adaptive immunity against porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. Vet Immunol Immunopathol,2015,167(1/2):1-14.

[22] 刘 杏,王风雪,温永俊. 猪繁殖与呼吸综合征病毒感染和复制机制及其毒力研究进展 [J]. 病毒学报,2015,31(5):585-592.

Liu X,Wang F X,Wen Y J,et al. Advances in understanding of the infection/replication mechanisms and virulence determinants of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. Chinese Journal of Virology,2015,31(5):585-592.

[23] Serão N V,Kemp R A,Mote B E,et al. Genetic and genomic basis of antibody response to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in gilts and sows [J]. Genet Sel Evol,2016,48(1):51.

[24] Chen P,Rayner S,Hu K. Advances of bioinformatics tools applied in virus epitopes prediction [J]. Virol Sin,2011,26(1): 1-7.

[25] 郭春艳,赵向绒,胡 军. B 细胞抗原表位的研究进展及其应用 [J]. 生物技术通讯,2012,24(2):266-270.

Guo C Y,Zhao X R,Hu J. Research and application of B cell epitope [J]. Letters in Biotechnology,2012,24(2):266-270.

[26] He L,Zhu J. Computational tools for epitope vaccine design and evaluation [J]. Curr Opin Virol,2015,11:103-112.