



刘起军, 张志阳, 许宽, 等. 恒净酸的抑菌效果及对小鼠肠道菌群的影响[J]. 黑龙江农业科学, 2024(3):30-38.

# 恒净酸的抑菌效果及对小鼠肠道菌群的影响

刘起军<sup>1</sup>, 张志阳<sup>1</sup>, 许宽<sup>2</sup>, 张月<sup>2</sup>, 张楠<sup>2</sup>

(1. 四川恒通动保生物科技有限公司, 四川 内江 641100; 2. 内江师范学院 生命科学学院, 四川 内江 641100)

**摘要:**为探讨以枸橼酸、苹果酸、氨基磺酸、甲酸等为主要成分的恒净酸杀菌效果和对小鼠肠道微生物菌群的影响,采用悬液定量杀菌试验等方法观察恒净酸对大肠杆菌、白色念珠菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和非洲猪瘟病毒的杀菌效果;采用14 d最大给药量法观察恒净酸的急性毒性反应;通过观察不同稀释度恒净酸对HEK293T细胞形态的影响确定其对细胞的安全浓度;采用高通量测序技术分析恒净酸对小鼠肠道细菌群落结构多样性的影响。结果表明,0.1 g·L<sup>-1</sup>恒净酸溶液2 min内可有效杀灭大肠杆菌、白色念珠菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌;1.56 g·L<sup>-1</sup>恒净酸溶液5 min后可有效灭活非洲猪瘟病毒。恒净酸为实际无毒级物质,对细胞的安全浓度为≤1.56 g·L<sup>-1</sup>。与对照组相比,恒净酸处理显著提高了拟杆菌门的相对丰度,提高了拟杆菌门/厚壁菌门的比例。综上,恒净酸是一种可有效杀灭病原微生物的新型消毒剂,能改善小鼠的肠道菌群组成,且安全无毒。

**关键词:**恒净酸;杀菌效果;肠道菌群

水是畜禽生长过程中需求量最大的物质,为采食量的2.0倍~2.3倍,畜禽对矿物质与微量元素的需求很大一部分来源于水。此外,畜禽在患病或应激时会停止采食,仅靠饮水维持基本的生命活动<sup>[1]</sup>,因此,在集约化、规模化养殖模式下,饮用水成为比饲料、药品更具有决定性的控制生长因素。目前,很多养殖场容易忽略畜禽饮水质量的重要性,饮水水源污染、水线污染和终端污染都比较严重。例如水环境是非洲猪瘟防控的最大漏洞,中小规模养殖场饮用水的二次污染问题特别严重<sup>[1-4]</sup>。不洁饮水会引起畜禽腹泻、营养吸收障碍和其他多种疾病,从而导致畜禽生长缓慢和生产能力下降甚至是死亡。为了杜绝经水传染疾病的发生和流行,保证畜禽健康,养殖场应定期将水源和水线进行消毒,使用化学消毒剂是最为常用的方法<sup>[5]</sup>。酸化剂作为一种绿色、环保型添加剂备受青睐,不仅可以对水进行消毒,还可以对动物饲料和饮用水酸化处理以减少禁抗带来的各种问题<sup>[6-8]</sup>。酸化剂按照使用方式分为饮水型和饲料型,饮水型酸化剂具有广谱、高效的抗菌作用,对动物饮水起到消毒、防霉作用,且能有效提高动物的生产性能、减少消化道疾病,表现出良好的正效应<sup>[8-10]</sup>。目前,人们的研究多集中在饲料型酸

化剂,关于饮水型酸化剂的研究较少。饮水型酸化剂主要应用在肉鸡和蛋鸡生产中。如任方奎等<sup>[11]</sup>的研究表明液体酸化剂能很好地酸化水质、降低水的硬度、抑制大肠杆菌的繁殖,酸化水可以提高肉鸡的生长性能;于睿等<sup>[12]</sup>研究表明在饮水中添加饮水型酸化剂能够提高蛋重、蛋壳厚度和蛋壳强度,且有利于维持蛋鸡输卵管健康。本研究通过探讨饮水型酸化剂对畜禽养殖中常见微生物(如大肠杆菌、沙门氏菌、非洲猪瘟病毒等)的杀菌效果及对肠道微生物菌群的影响,为饮水型酸化剂在集约化、规模化养殖厂水源和水线消毒中的应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 酸化剂 恒净酸由四川恒通动保生物科技有限公司生产提供,主要成分包括枸橼酸、苹果酸、氨基磺酸、甲酸等;速可净购于韩国RNL科技公司,主要成分是枸橼酸和苹果酸;栏舍康购于湖南五指峰生化有限公司,主要成分枸橼酸和DL苹果酸。

1.1.2 动物及菌种 健康成年昆明种小鼠,体重(20±1)g,SPF级,由斯贝福(北京)生物科技有限公司提供,许可证号:SCXK(京)2019-0010。大

收稿日期:2023-10-17

基金项目:内江市科学技术局科技支撑计划项目(NJKJ21-001);内江师范学院成果转化项目(2021ZH02)。

第一作者:刘起军(1983—),男,博士,高级工程师,从事兽药研发与生产工作。E-mail:nan25000@163.com。

通信作者:张楠(1980—),男,博士,副教授,从事应用微生物学研究。E-mail:zhangnan@njtc.edu.cn。

肠杆菌 (*Escherichia coli* 8099)、白色念珠菌 (*Candida albicans* ATCC 10231)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* CMCC(B) 26003)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442) 由四川恒通动保生物科技有限公司购买。非洲猪瘟病毒 (African Swine Fever Virus, ASFV) 和 HEK293T 细胞由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所提供。

1.1.3 主要设备 倒置荧光显微镜 X51, 奥林巴斯公司; T100™ PCR 仪, Bio-Rad 公司; NanoDrop 2000 超微量分光光度计, 赛默飞世尔科技公司; MISEQ 测序仪, Illumina 高通量测序仪, Illumina 公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 不同复合酸化剂产品的杀菌效果测定

参照 GB 15979—2002《一次性使用卫生用品卫生标准》附录 C4 溶出性抗(抑)菌产品抑菌性能试验方法<sup>[13]</sup>, 取 1:500 和 1:1 000 浓度的恒净酸、速可净和栏舍康 3 种酸化剂分别作用 2.5, 10 和 20 min。调查对大肠杆菌、白色念珠菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌的杀菌效果。

1.2.2 模拟浸泡消毒方式评价恒净酸对 ASFV 的杀灭效果 将恒净酸与无菌水按 1:640( $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 的比例配制溶液, 并过 0.22  $\mu\text{m}$  除菌过滤器。将配制的恒净酸溶液进行二倍梯度稀释: 1:640~1:5 120。将  $1.0\times 10^2$ ,  $1.0\times 10^3$ ,  $1.0\times 10^4$  和  $1.0\times 10^5$  TCID<sub>50</sub>·mL<sup>-1</sup> 的 ASFV 悬液分别与 4 个浓度 (1:640, 1:1 280, 1:2 560 和 1:5 120) 的恒净酸溶液按 50  $\mu\text{L}$  等体积均匀混合, 在 4, 25 和 37  $^{\circ}\text{C}$  条件下分别作用 5, 15 和 30 min, 再加入中和剂 (0.5% 硫代硫酸钠) 作用 10 min, 并将中和后的产物加入到融合率达 90% 以上的 HEK293T 细胞培养板中, 每个浓度 3 个重复孔, 同时设置中和剂对照组、阳性对照组 (rASFV-HLJ/2018-EGFP) 和阴性对照组 (RPMI 1640 培养基), 置入 37  $^{\circ}\text{C}$  5% CO<sub>2</sub> 温箱中培养, 5 d 后观察荧光并统计试验结果。

1.2.3 模拟喷雾消毒方式评价恒净酸对 ASFV 的杀灭效果 取直径为 2 cm 的圆形无菌滤纸片分别滴加 50  $\mu\text{L}$  的  $1.0\times 10^2$ ,  $1.0\times 10^3$  和  $1.0\times 10^4$  TCID<sub>50</sub>·mL<sup>-1</sup> 的 rASFV-HLJ/2018-EGFP, 取接种 3 个浓度 rASFV-HLJ/2018-EGFP 的滤纸片各 3 片加入细胞维持液中作为阳性对照, 其余已加 rASFV-HLJ/2018-EGFP 的纸片用 4 个浓度

(1:640, 1:1 280, 1:2 560, 1:5 120) 的恒净酸进行喷雾法消毒处理, 采用高压气雾喷嘴喷 3 次, 每次间隔 2 s, 滤纸处于完全湿润且不滴水状态, 在 4, 25 和 37  $^{\circ}\text{C}$  条件下分别作用 5, 15 和 30 min。同时设未 rASFV-HLJ/2018-EGFP 的滤纸片作为阴性对照, 取直径为 2 cm 的圆形无菌滤纸片 3 片, 滴加 50  $\mu\text{L}$  的无菌水, 用装有无菌水高压气雾喷嘴喷 3 次, 每次间隔 2 s, 滤纸处于完全湿润且不滴水状态。将所有纸片放入 400  $\mu\text{L}$  中和剂中浸泡 10 min, 然后旋涡震荡 10 s, 加入到融合率达 90% 以上的 HEK293T 细胞培养板中, 每个浓度重复 3 孔, 置入 37  $^{\circ}\text{C}$  5% CO<sub>2</sub> 温箱中培养, 5 d 后观察荧光并统计试验结果。

1.2.4 恒净酸对 ASFV 杀灭结果判定标准 在阳性对照组, 孔内细胞荧光阳性率 90% 以上, 阴性对照组孔内无荧光信号成立前提下, 若消毒剂组孔内无荧光信号证明病毒被消毒剂完全灭活; 若消毒剂组孔内有明显荧光信号证明病毒未被消毒剂完全灭活。

1.2.5 恒净酸对小鼠的急性毒性结果 参照中华人民共和国国家标准《急性毒性试验: GB 15193.3—2014》的试验方法<sup>[14]</sup>, 将恒净酸按照 5 000  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  (体重) 单次经口给药, 14 d 内每天观察小鼠皮表、黏膜、分泌物和排泄物是否正常, 同时记录小鼠的一般表现、中毒表现以及死亡情况。试验结束后称重, 处死小鼠并解剖。

1.2.6 恒净酸对 HEK293T 细胞的毒性试验 将恒净酸用无菌水倍比稀释后, 接种到融合率达 90% 以上的 HEK293T 细胞培养板上, 置入 37  $^{\circ}\text{C}$  5% CO<sub>2</sub> 温箱中培养 8 h, 于倒置荧光显微镜下观察细胞形态。并按照 CCK-8 细胞增殖-毒性试剂盒说明书操作, 每孔加入 10  $\mu\text{L}$  的 CCK-8 溶液, 置入 37  $^{\circ}\text{C}$  5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中继续孵育 2 h, 根据说明书计算消毒剂处理后的细胞活性并分析结果。

1.2.7 小鼠粪便采集 小鼠按体重随机分成 5 组, 每组 12 只。分组如表 1 所示。饲养环境温度 22~27  $^{\circ}\text{C}$ , 相对湿度 50%~70%, 12 h 明暗交替, 每天上午 9:00 称量与添加饲料、计算饮水量并更换水瓶, 清洗托盘, 即时清除粪便等。饲养 21 d 后, 每天更换饮水瓶后, 将小鼠放入高压灭菌代谢笼, 收集各组小鼠粪便, 称量粪便质量、计数粪便粒数, 新鲜粪便于 60  $^{\circ}\text{C}$  烘箱中烘干后计算粪便含水率。同时, 无菌收集 10 粒新鲜粪便, 分

装于 2 个灭菌 EP 管中,放入-80 ℃的冰箱保存,连续收集 10 d,每个组 10 份粪便样品。

表 1 动物试验分组情况

序号	组别	数量/只	受试物
CK	正常对照组	12	饮用水为蒸馏水
L	恒净酸低剂量组	12	饮用水为含 0.01%恒净酸的蒸馏水
M	恒净酸中剂量组	12	饮用水为含 0.02%恒净酸的蒸馏水
H	恒净酸高剂量组	12	饮用水为含 0.04%恒净酸的蒸馏水
S	速可净组	12	饮用水为含 0.02%速可净的蒸馏水

1.2.8 小鼠粪便 DNA 提取和 16S rRNA 基因 PCR 扩增 小鼠粪便中微生物群落总 DNA 的提取、16S rRNA 基因 V3~V4 可变区的 PCR 扩增及 PCR 产物回收均参照文献[15]。

1.2.9 小鼠肠道微生物群落结构的高通量测序分析 构建 PE 300 文库,利用 Illumina 公司的 Miseq PE300 平台进行测序,由上海美吉生物医药科技有限公司完成测序。使用 fastp(<https://github.com/OpenGene/fastp>,version 0.19.6)软件对双端原始测序序列进行质控,使用 FLASH(<http://www.cbcb.umd.edu/software/flash>,version 1.2.11)软件进行拼接。使用 UPARSE v7.1 软件(<http://drive5.com/uparse/>),根据 97%的相似度对质控拼接后的序列进行操作分类单元 OTU(Operational taxonomic unit)聚类并剔除嵌合体。利用 RDP classifier(<http://rdp.cme.msu.edu/>,version 2.11)比对 Silva 16S rRNA 基因数据库(v138)进行 OTU 物种分类学注释,置信度阈值为 70%,并在不同物种分类水平下统

计每个样本的群落组成。

1.2.10 数据分析 所有试验重复 3 次,数据以平均值表示。小鼠肠道微生物测序数据分析均在美吉生物云平台(<https://cloud.majorbio.com>)上进行,具体如下:采用 Mothur 软件(<http://www.mothur.org/wiki/Calculators>)计算 Alpha 多样性知识 Chao 1、Shannon 指数等,并采用 Wilcoxon 秩和检验进行 Alpha 多样性的组间差异分析;用 LEfSe 分析(Linear discriminant analysis Effect Size)(<http://huttenhower.sph.harvard.edu/LEfSe>)( $LDA>2$ , $P<0.05$ )确定不同组间从门到属水平丰度显著差异的细菌类群。使用基于距离的冗余分析(distance-based redundancy analysis,db-RDA)用来调查酸化剂对肠道细菌群落结构的影响。线性回归分析用于评估 db-RDA 分析中确定酸化剂对微生物 Alpha 多样性指数的影响。基于 Spearman 相关性 $|r|>0.6$ , $P<0.05$ 挑选物种进行相关性网络图分析。

2 结果与分析

2.1 不同酸化剂的杀菌效果

由表 2 可知,恒净酸、速可净和栏舍康 3 种酸化剂在 1:1 000 浓度下对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌作用 2 min 的杀灭率均达到了 99.00%以上;3 种酸化剂在 1:1 000 浓度下对白色念珠菌作用 2 min 的杀灭率分别为 96.53%、99.99%和 95.14%,说明恒净酸、速可净和栏舍康均具有显著杀灭大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、粪白色念珠菌的作用。

表 2 不同酸化剂的杀菌效果

酸化剂	浓度	试验菌	杀菌率/%				对照回收菌量/ (CFU·mL <sup>-1</sup> )
			2 min	5 min	10 min	20 min	
恒净酸	1:1000	大肠杆菌	99.77	99.96	99.99	99.99	1.35×10 <sup>5</sup>
		白色念珠菌	96.53	98.59	98.78	99.34	1.01×10 <sup>5</sup>
		金黄色葡萄球菌	99.62	99.75	99.99	99.99	1.38×10 <sup>5</sup>
		铜绿假单胞菌	99.99	99.99	99.99	100.00	1.39×10 <sup>5</sup>
	1:500	大肠杆菌	99.95	99.99	99.99	99.99	1.24×10 <sup>5</sup>
		白色念珠菌	99.92	99.96	99.83	99.99	1.01×10 <sup>5</sup>
		金黄色葡萄球菌	99.99	99.99	100.00	100.00	1.43×10 <sup>5</sup>
		铜绿假单胞菌	99.99	100.00	100.00	100.00	1.36×10 <sup>5</sup>
速可净	1:1000	大肠杆菌	99.93	99.99	99.99	99.99	1.39×10 <sup>5</sup>
		白色念珠菌	99.99	99.99	99.99	97.59	1.05×10 <sup>5</sup>
		金黄色葡萄球菌	99.99	99.99	100.00	100.00	1.44×10 <sup>5</sup>
		铜绿假单胞菌	99.99	100.00	100.00	100.00	1.35×10 <sup>5</sup>

表 2 (续)

酸化剂	浓度	试验菌	杀菌率/%				对照回收菌量/ (CFU·mL <sup>-1</sup> )
			2 min	5 min	10 min	20 min	
栏舍康	1:500	大肠杆菌	99.99	100.00	99.99	99.99	1.28×10 <sup>5</sup>
		白色念珠菌	99.99	99.99	99.99	100.00	1.10×10 <sup>5</sup>
		金黄色葡萄球菌	99.99	99.99	100.00	100.00	1.31×10 <sup>5</sup>
		铜绿假单胞菌	100.00	100.00	100.00	100.00	1.36×10 <sup>5</sup>
	1:1000	大肠杆菌	99.02	99.28	99.53	99.71	1.38×10 <sup>5</sup>
		白色念珠菌	95.14	97.34	98.26	98.89	1.07×10 <sup>5</sup>
		金黄色葡萄球菌	99.03	99.14	99.38	99.57	1.39×10 <sup>5</sup>
		铜绿假单胞菌	99.99	99.99	99.99	100.00	1.41×10 <sup>5</sup>
	1:500	大肠杆菌	99.26	99.57	99.83	99.99	1.29×10 <sup>5</sup>
		白色念珠菌	98.84	99.05	99.27	99.68	1.27×10 <sup>5</sup>
		金黄色葡萄球菌	99.36	99.82	99.94	99.99	1.52×10 <sup>5</sup>
		铜绿假单胞菌	99.99	99.99	99.99	100.00	1.46×10 <sup>5</sup>

2.2 恒净酸对 ASFV 的杀灭效果

由表 3 可知,当 ASFV 的滴度为 1.0×10<sup>2</sup>和 1.0×10<sup>3</sup> TCID<sub>50</sub>·mL<sup>-1</sup>时,在浸泡消毒和喷雾消毒过程中,在 4、25 和 37 ℃条件下,1:5 120、1:2 560、1:1 280、1:640 浓度的恒净酸均只需作用 5 min 即可完全杀灭病毒。当 ASFV 的滴度为 1.0×10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub>·mL<sup>-1</sup>时,在浸泡消毒过程中,在 4 和 25 ℃条件下,1:2 560 浓度、1:1 280 浓度的恒净酸分别需要作用 30 和 15 min 才能完全灭活 ASFV,1:640 浓度的只需作用 5 min 就能完全灭活 ASFV;在 37 ℃条件下,1:5 120 和 1:2 560 浓度恒净酸作用 30 min 才能完全灭活 ASFV,1:1 280 浓度的作用 15 min 才能完全灭活 ASFV,1:640 浓度的作用 5 min 就能完全灭活 ASFV;在喷雾消毒过程中,在 4 ℃条件下,1:5 120 和 1:2 560 浓度恒净酸作用 30 min 才能完全灭活 ASFV,1:1 280

和 1:640 浓度恒净酸作用 15 min 能完全灭活 ASFV;在 25 ℃条件下,1:5 120 浓度恒净酸作用 30 min 才能完全灭活 ASFV,1:2 560 和 1:1 280 浓度的作用 15 min 才能完全灭活 ASFV,1:640 浓度的作用 5 min 就能完全灭活 ASFV;在 37 ℃条件下,喷雾方式对 ASFV 灭活效果与浸泡方式的灭活效果相同。当 ASFV 的滴度为 1.0×10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>·mL<sup>-1</sup>时,在浸泡消毒过程中,在 4、25 和 37 ℃条件下仅有 1:640 浓度的恒净酸能完全灭活 ASFV,需要作用的时间分别是 30、15 和 5 min;在喷雾消毒过程中,在 25 和 37 ℃条件下 1:1 280、1:640 浓度的恒净酸均需作用 30 min 才能完全灭活 ASFV。综上,恒净酸对非洲猪瘟病毒具有良好的杀灭作用,随着温度提高和作用时间延长,杀灭效果更显著。

表 3 恒净酸不同处理方式对 ASFV 的杀灭效果

处理方式	温度/℃	浓度	杀灭效果											
			1.0×10 <sup>2</sup> TCID <sub>50</sub> ·mL <sup>-1</sup>			1.0×10 <sup>3</sup> TCID <sub>50</sub> ·mL <sup>-1</sup>			1.0×10 <sup>4</sup> TCID <sub>50</sub> ·mL <sup>-1</sup>			1.0×10 <sup>5</sup> TCID <sub>50</sub> ·mL <sup>-1</sup>		
			5 min	15 min	30 min	5 min	15 min	30 min	5 min	15 min	30 min	5 min	15 min	30 min
浸泡	4	1:5120	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
		1:2560	—	—	—	—	—	—	+	+	—	+	+	+
		1:1280	—	—	—	—	—	—	+	—	—	+	+	+
		1:640	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—
	25	1:5120	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
		1:2560	—	—	—	—	—	—	+	+	—	+	+	+
		1:1280	—	—	—	—	—	—	+	—	—	+	+	+
		1:640	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—
	37	1:5120	—	—	—	—	—	—	+	+	—	+	+	+
		1:2560	—	—	—	—	—	—	+	+	—	+	+	+
		1:1280	—	—	—	—	—	—	+	—	—	+	+	+
		1:640	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—



表 3 (续)

处理方式	温度/℃	浓度	杀灭效果											
			1.0×10 <sup>2</sup> TCID <sub>50</sub> ·mL <sup>-1</sup>			1.0×10 <sup>3</sup> TCID <sub>50</sub> ·mL <sup>-1</sup>			1.0×10 <sup>4</sup> TCID <sub>50</sub> ·mL <sup>-1</sup>			1.0×10 <sup>5</sup> TCID <sub>50</sub> ·mL <sup>-1</sup>		
			5 min	15 min	30 min	5 min	15 min	30 min	5 min	15 min	30 min	5 min	15 min	30 min
喷雾	4	1:5120	—	—	—	—	—	—	+	+	—	+	+	+
		1:2560	—	—	—	—	—	—	+	+	—	+	+	+
		1:1280	—	—	—	—	—	—	+	—	—	+	+	+
		1:640	—	—	—	—	—	—	+	—	—	+	+	+
	25	1:5120	—	—	—	—	—	—	+	+	—	+	+	+
		1:2560	—	—	—	—	—	—	+	—	—	+	+	+
		1:1280	—	—	—	—	—	—	+	—	—	+	+	—
		1:640	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—
	37	1:5120	—	—	—	—	—	—	+	+	—	+	+	+
		1:2560	—	—	—	—	—	—	+	+	—	+	+	+
		1:1280	—	—	—	—	—	—	+	—	—	+	+	—
		1:640	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—

注:“—”代表 HAD 阴性,表示病毒被完全杀灭;“+”代表 HAD 阳性,表示病毒未被完全杀灭。

2.3 恒净酸对小鼠急性毒性试验结果

给予受试物后,小鼠大小便正常,肛门无分泌物,体重正常增长,精神状态良好,鼻、眼、口腔无异常分泌物,观察期内未见死亡。由表 4 可知,在试验 1,7 和 14 d 时,受试物组小鼠的体重与同期的阴性对照组相比无显著性差异( $P>0.05$ ),且受试物组中雌、雄小鼠之间也无显著性差异( $P>$

0.05)。试验期结束后将小鼠处死并解剖检查肝、脾、心、肾、肠、胃、肺、脑等,与对照组小鼠比较,均未发现异常情况。结果说明,酸化剂对小鼠急性经口最大耐受剂量(Maximum Tolerated Dose, MTD)值大于 5 000 mg·kg<sup>-1</sup>(体重),按急性毒性分级标准<sup>[16-17]</sup>,恒净酸属于无毒级物质。

表 4 恒净酸对雄性和雌性小鼠体重的影响

组别	酸化剂灌胃剂量/ (mg·kg <sup>-1</sup> )	小鼠体重/g		
		第 1 天	第 7 天	第 14 天
♂	5000	18.96±1.25 a	25.47±1.53 a	32.32±1.68 a
♀	5000	19.32±1.34 a	26.32±1.64 a	33.42±1.42 a
♂CK	0	19.15±1.28 a	25.78±1.46 a	32.86±1.39 a
♀CK	0	19.82±1.41 a	26.63±1.67 a	33.67±1.72 a

注:小写字母代表在 0.05 水平差异显著性。下同。

2.4 恒净酸对 HEK293T 细胞的毒性试验结果

由图 1 可知,不同浓度的恒净酸溶液对细胞影响较大,1:320 浓度的恒净酸可使细胞崩解、聚集、脱落,随着浓度的降低,对细胞形态的影响逐

渐减弱,浓度为 1:320 时的细胞活性为 20%左右,浓度为 1:640 及其以下时细胞的活性均在 75%以上,结果表明,恒净酸对细胞的安全浓度为 1:640 或更低浓度。

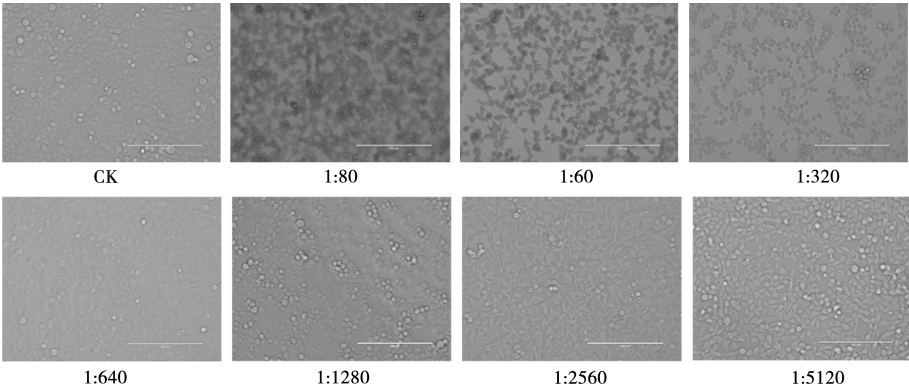


图 1 不同浓度恒净酸对细胞形态及细胞活性的影响

2.5 小鼠肠道微生物 OTU 比较

通过 16S rRNA 测序,共得到 2 074 249 条有效序列,序列长度从 401 bp 到 440 bp 不等,平均序列长度为 419 bp。对获得的序列经聚类分析后,CK 组、L 组、M 组、H 组和 S 组分别获得 569,567,579,580 和 558 个代表性的菌群 OTU,表明随着恒净酸浓度的增加,OTU 数目逐渐升高。CK 组、L 组、M 组、H 组和 S 组共有 OTU 为 435 个,而特有的 OTU 分别为 11,8,7,6 和 9 个(图 2)。

2.6 小鼠肠道细菌门水平菌群组成分析

由图 3 可知,处理组与对照组小鼠肠道中的优势菌群为拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes),两个门细菌数量均占各组肠道细菌总量的 87.26%以上,其中,L 组、M 组和 H 组的占比分别为 91.58%、90.32%和 90.95%。与对照组比较,L 组、M 组、H 组和 S 组小鼠肠道菌的拟杆菌门丰度占比均有所增加,仅有 L 组和 H 组存在显著性差异( $P<0.05$ );厚壁菌门丰度占比有所下降,但不存在显著性差异( $P>0.05$ )。对照组中拟杆菌门与厚壁菌门相对丰度的比值

为 0.78,L 组、M 组、H 组和 S 组中拟杆菌门与厚壁菌门相对丰度的比值增至 1.75,1.29,1.54 和 0.93,与对照组相比,L 组、M 组、H 组比值增加显著( $P<0.05$ )。

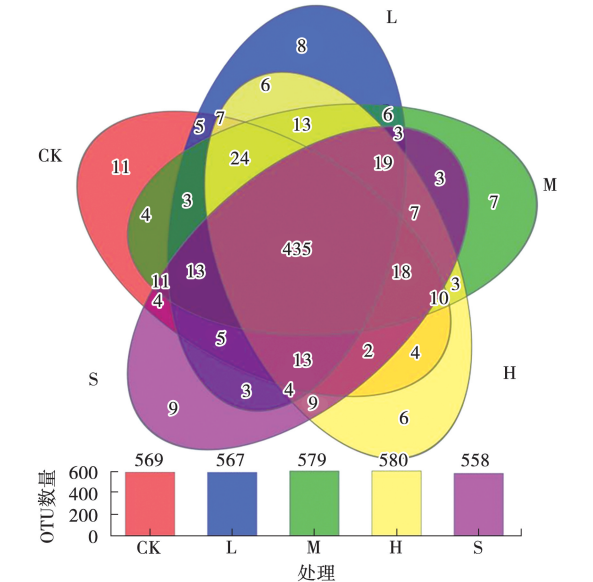


图 2 各试验组小鼠肠道细菌运算分类单元比较

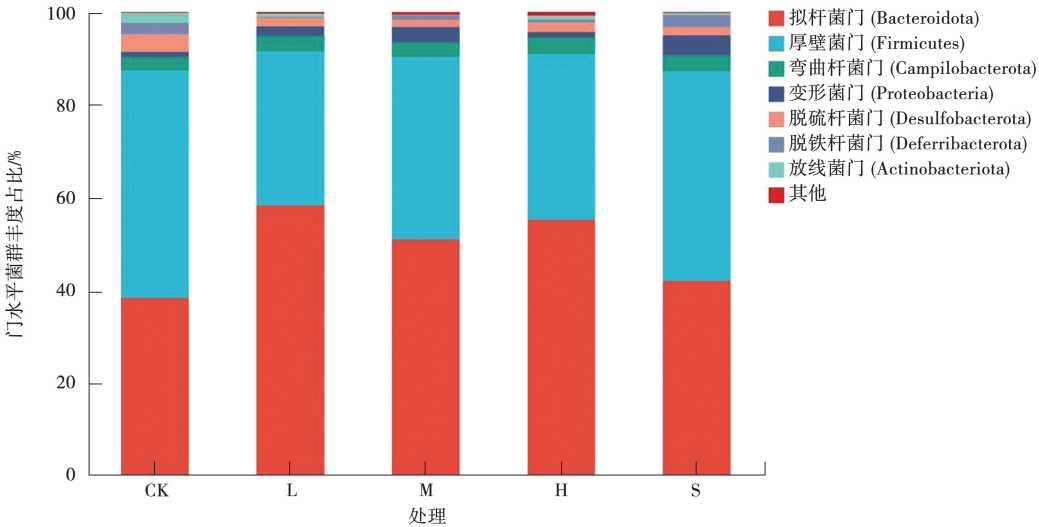


图 3 各试验组小鼠肠道细菌在门水平的菌群丰度

表 5 各组小鼠肠道细菌在门水平的菌群差异性比较

菌门	菌群丰度占比/%				
	CK	L	M	H	S
拟杆菌门(Bacteroidetes)	38.27 c	58.27 a	50.92 abc	55.16 ab	41.97 bc
厚壁菌门(Firmicutes)	49.09	33.31	39.40	35.79	45.29
弯曲杆菌门(Campilobacterota)	2.95	3.27	3.18	3.58	3.43
变形菌门(Proteobacteria)	1.11	2.28	3.33	1.17	4.30
脱硫杆菌门(Desulfobacterota)	3.79	1.64	15.56	2.11	1.82
脱铁杆菌门(Deferribacterota)	2.47	0.73	0.92	1.12	2.58
放线菌门(Actinobacteriota)	2.17 a	0.29 b	0.40 b	0.41 b	0.34 b
其他	0.15	0.21	0.29	0.66	0.27

2.7 小鼠肠道细菌属水平菌群组成分析

在属水平,处理组与对照组小鼠肠道中的优势菌群为未分类的 *Muribaculaceae* 属、拟杆菌属、乳杆菌属、毛螺菌科 NK4A136 组和未分类的毛螺菌科(图 4)。与对照组比较,L 组、M 组和

S 组小鼠肠道菌中的未分类的 *Muribaculaceae* 属丰度占比有所增加,但不存在显著性差异( $P>0.05$ );L 组、M 组和 S 组小鼠肠道菌中的拟杆菌属丰度占比有所增加,H 组有所下降,均不存在显著性差异( $P>0.05$ )。

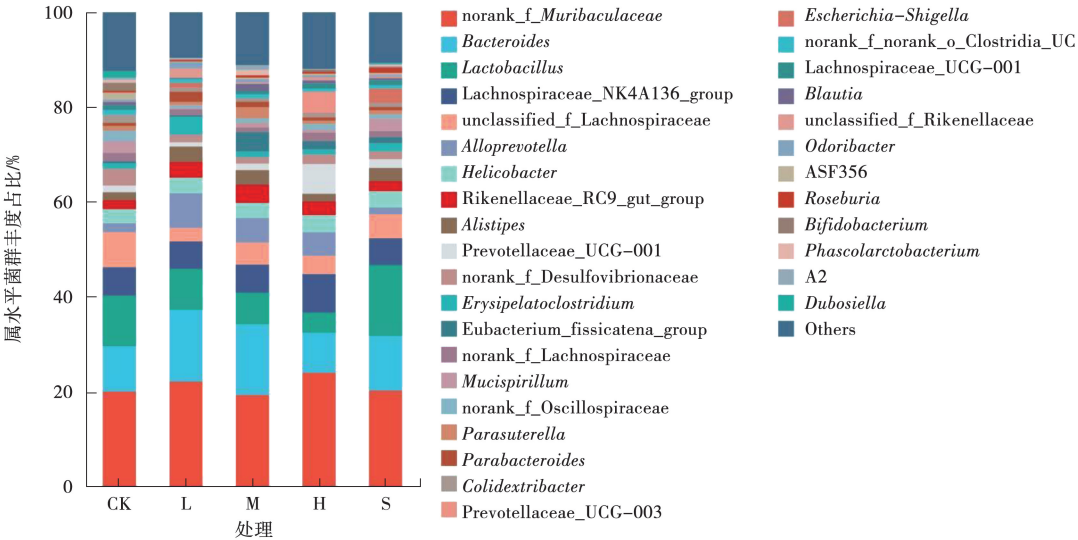


图 4 各试验组小鼠肠道细菌在属水平的菌群丰度

表 6 各组小鼠肠道细菌在属水平的菌群差异性比较

菌属	菌群丰度占比/%				
	CK	L	M	H	S
未分类的 <i>Muribaculaceae</i> 属(norank_f_Muribaculaceae)	19.95	22.07	19.22	23.93	20.18
拟杆菌属( <i>Bacteroides</i> )	9.58	15.15	14.96	08.45	11.50
乳杆菌属( <i>Lactobacillus</i> )	10.75	8.32	6.68	4.37	15.01
毛螺菌科 NK4A136 组( <i>Lachnospiraceae</i> _NK4A136_group)	5.98	5.80	5.90	8.12	5.63
未分类的毛螺菌科(unclassified_f_Lachnospiraceae)	7.49	2.83	4.65	3.84	5.06
拟普雷沃氏菌属( <i>Alloprevotella</i> )	3.07	7.33	5.21	5.01	1.44
理研菌科 RC9 肠群( <i>Rikenellaceae</i> _RC9_gut_group)	2.68	3.30	3.80	2.87	2.08
另枝杆菌( <i>Alistipes</i> )	1.67	3.24	3.09	1.61	2.81
其他	4.02	2.93	2.93	2.85	2.88

3 讨论

规模化养殖场中,封闭的饮水线中存在着大量的大肠杆菌、沙门氏菌、弯曲杆菌等病原微生物,这些微生物会对动物的健康成长产生巨大威胁<sup>[7,18]</sup>。恒净酸、速可净和栏舍康等酸化剂的加入可将饮水的 pH 降至 3.5~4.1,其中,恒净酸在 1:20 000 倍稀释时 pH 能达到 3.54(纯水条件下),可有效减少大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、粪白色念珠菌等有害微生物在饮水中

的数量,这与何纪垠等<sup>[19]</sup>的实验结果相一致。此外,恒净酸在常温条件下对 ASFV 均有良好的杀灭效果,1:640 浓度下作用 5 min 可完全灭活  $1.0\times 10^3$  TCID<sub>50</sub>·mL<sup>-1</sup> 的 ASFV,可作为防控 ASF 的有效消毒剂。因此,恒净酸不仅可以用于动物饮水的消毒,也可以用于养殖场设备、车辆、地面等的消毒<sup>[20]</sup>。

恒净酸有效成分为枸橼酸、苹果酸、氨基磺酸、甲酸等,均为食品级有机酸。研究结果也表明

恒净酸属于无毒级物质,且对细胞的安全浓度为1:640或更低浓度。因此,恒净酸在用于动物饮水的消毒时,安全性高,刺激性极小,且猪只长期饮用不会伤其肠胃;在用于养殖场设备、车辆、地面等的消毒时,不会残留有毒有害物质,不着色、不过敏、不水肿。此外,恒净酸组方为复方有机酸并且采用了独特的缓冲增效组方,1:1 000倍稀释就可达到非常好的杀菌效果,可有效降低使用成本。

恒净酸和速可净都能增加小鼠肠道拟杆菌门菌群的丰度,拟杆菌菌群则是一类参与糖类代谢与运输的菌群,为宿主提供能量,进而促进宿主的生长<sup>[21]</sup>。恒净酸和速可净还能有效改变小鼠肠道菌群组成,如增加了 *Lachnospiraceae\_NK4A136\_group*、*norank\_f\_Muribaculaceae* 等益生菌的丰度,这不仅可以提高机体免疫能力,还能够改变肠道消化酶活性,促进营养物质吸收<sup>[21-22]</sup>。这也验证了前人的结论,酸化剂添加到动物饮水中不但能对饮水进行消毒从而防止通过饮水传播疾病,而且通过饮水摄入动物体内的酸化剂还会对动物产生很好的生物效能<sup>[9-10]</sup>。此外,酸化剂具有降低胃肠道 pH 的作用,有利于有益菌的生长<sup>[23]</sup>,这为酸化剂与不同益生菌组合使用奠定了理论基础,但益生菌种类繁多,优化益生菌与酸化剂配合使用方案值得深入探究。

## 4 结论

由枸橼酸、苹果酸、氨基磺酸、甲酸等制成恒净酸在  $0.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度时对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、粪白色念珠菌均具有快速、完全杀灭效果。 $1.56\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度的恒净酸对非洲猪瘟病毒作用 5 min 后可达到完全杀灭效果。恒净酸属实际无毒级物质,对皮肤无刺激,无致突变作用;对细胞的安全浓度为  $\leq 1.56\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,细胞存活率高于 75%,且形态正常。此外,恒净酸可以提高肠道中拟杆菌门的丰度,改善肠道菌群,提升免疫力。总的来说,恒净酸对环境中病毒有很好的灭活作用,可以在集约化、规模化养殖厂中进行应用。

## 参考文献:

- [1] 林冬梅,高计会,唐茂妍.饮水酸化剂在畜禽生产中的应用[J].中国家禽,2019,41(10):71-73.
- [2] 李其松,吴春阳,吴玉龙,等.猪场饮水生物安全浅析[J].猪

业科学,2020,37(9):84-86.

- [3] 杨有福,李想,毕小娟.非洲猪瘟新阶段下的猪场水环境防控[J].今日养猪业,2020(3):66-68.
- [4] 游武进.大型养殖场水线管理[J].今日养猪业,2023(1):55-56.
- [5] 黄明.畜禽养殖场的饮水消毒[J].水禽世界,2015(1):46-47.
- [6] 梁娜,梁思嘉,冯芳.不同消毒剂对肉鸡水线消毒效果对比实验[J].今日畜牧兽医,2017(7):10.
- [7] 赵学峰,王然,刘晓辉,等.酸化剂在猪生产中的应用[J].中国动物保健,2021,23(5):70-71.
- [8] 丑有财,蒋国政.酸化剂在动物饮水中的应用价值[J].黑龙江畜牧兽医,2014(12):53-54.
- [9] 柴倩,张瑞芳,冯泽伟,等.酸化剂对猪、鸡肠道健康影响的研究进展[J].饲料研究,2023,46(13):150-154.
- [10] 王鑫源,张莹,董晓雪,等.酸化剂在猪生产中的应用研究进展[J].今日畜牧兽医,2023,39(5):76-78.
- [11] 任方奎,张桂芝,张燕平,等.液体酸化剂的评估及其对肉鸡生长性能的影响[J].饲料研究,2021,44(1):49-52.
- [12] 于睿,胡颖,黎明,等.饮水型酸化剂对蛋鸡生产性能·蛋品质及输卵管健康的影响[J].安徽农业科学,2021,49(7):92-96.
- [13] 国家质量监督检验检疫总局.一次性使用卫生用品卫生标准:GB 15979—2002[S].北京:中国标准出版社,2002.
- [14] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会.食品安全国家标准急性经口毒性试验:GB 15193.3—2014[S].北京:中国标准出版社,2015.
- [15] 曾献春,朱雅琴,王明明,等.干酪乳杆菌对便秘小鼠肠道菌群的影响[J].食品与发酵工业,2022,48(6):64-70.
- [16] 李建华,赵良友,张娜,等.白桦茸不同提取物对小鼠急性毒性实验研究[J].长春中医药大学学报,2021,37(1):71-75.
- [17] 张楠,李武,彭慧娟,等.吸水链霉菌多糖的纯化鉴定及其性质[J].核农学报,2017,31(12):2367-2376.
- [18] 张斌,瞿涛.规模化养猪场保育猪管理技术[J].畜禽业,2023,34(8):57-59.
- [19] 何纪垠,邹新华,张增玉,等.饮水中添加酸化剂对产蛋后期蛋鸡产蛋性能、血清生化指标及抗氧化能力的影响[J].饲料研究,2023,46(9):42-46.
- [20] 祁梦南,潘力,孙元,等.抗低温消毒剂“抗冻消-30”对非洲猪瘟病毒的杀灭效果[J].中国预防兽医学报,2021,43(9):972,977,1007.
- [21] 张凯军,姜鹏飞,王军,等.不同温度对中华绒螯蟹生长及肠道微生物菌群的影响[J].上海海洋大学学报,2022,31(2):384-393.
- [22] 姬妍茹,张正海,杨庆丽,等.黑菊芋多糖的润肠通便和调节肠道菌群作用[J].现代食品科技,2022,38(7):33-39.
- [23] 金旭,吴琼,李祯,等.益生菌与酸化剂联用对肉鸡生长性能、抗氧化能力和肠道健康的影响[J/OL].动物营养学报,2023,35(12):1-12(2023-10-13)[2023-10-30].<https://link.cnki.net/urlid/11.5461.S.20231013.1357.020>.



## Antibacterial Efficacy of Hengjingsuan and Its Impact on Intestinal Flora in Mice

LIU Qijun<sup>1</sup>, ZHANG Zhiyang<sup>1</sup>, XU Kuan<sup>2</sup>, ZHANG Yue<sup>2</sup>, ZHANG Nan<sup>2</sup>

(1. Sichuan Hengtong Animal Health Biotech Co., Ltd., Neijiang 641100, China; 2. College of Life Sciences, Neijiang Normal University, Neijiang 641100, China)

**Abstract:** To observe the bactericidal efficacy of Hengjingsuan mainly composed of citric acid, malic acid, sulfamic acid and formic acid and its impact on the intestinal microbiota in mice. Suspension quantitative bactericidal test was used to evaluate the bactericidal efficacy of Hengjingsuan on *Escherichia coli* 8099, *Candida albicans* ATCC 10231, *Staphylococcus aureus* CMCC(B) 26003, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 and African Swine Fever Virus (ASFV). The acute toxicity test of Hengjingsuan in mice was carried out by 14 days maximum dose method and the safe concentration of Hengjingsuan was determined by observing the effect of disinfectant on cell morphology of HEK293T cells and calculating the cell activity. The effect on community structure diversity of intestinal bacteria was analyzed by using high-throughput sequencing technology. The results showed that Hengjingsuan solution at the concentration of  $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  could kill *E. coli* 8099, *C. Albicans* ATCC 10231, *S. aureus* CMCC(B) 26003, *P. aeruginosa* ATCC 15442 effectively within 2 minutes, and it could kill ASFV effectively at  $1.56 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  within 5 minutes. Hengjingsuan was an actual non-toxic substance, and its safe concentration for the cell was  $\leq 1.56 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . Compared with normal group, the abundance of bacteroidetes significantly increased in mice treated with Hengjingsuan, meanwhile the abundance ratio of bacteroidetes to Firmicutes also increased. Therefore, Hengjingsuan was a new type of disinfectant, which was safe, non-irritating and had great bactericidal efficacy on target pathogenic microorganism.

**Keywords:** Hengjingsuan; bactericidal efficacy; intestinal flora

(上接第 22 页)

## Control Efficacy of 42% S-Metolachlor•Asoxaflutole•Atrazine Suspoemulsion on Annual Weeds in Maize Field

GUO Xiaotong<sup>1</sup>, WANG Yu<sup>1</sup>, LUO Chan<sup>1</sup>, CONG Keqiang<sup>1</sup>, WEI Xiangfeng<sup>2</sup>, GUO Yulian<sup>1</sup>

(1. Institute of Plant Protection, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China; 2. Zhaodong Agricultural Technology Extension Center, Zhaodong 151100, China)

**Abstract:** In order to confirm the control efficacy and safety of the soil-sealed herbicide 42% S-metolachlor•isoxaflutole•atrazine suspoemulsion against weeds in maize field under different doses, a field efficacy trial was designed using randomized block method. The results showed that it had good effects on the main weeds of maize field, including *Echinochloa crusgalli* (L.) P. Beauv., *Chenopodium album* L., *Persicaria bungeana* (Turcz.) Nakai ex T. Mori and *Abutilon theophrasti* Medikus when 42% S-metolachlor•isoxaflutole•atrazine suspoemulsion were used  $1\ 890 - 2\ 205 \text{ g} \cdot \text{ha}^{-1}$  by pre-emergence treatment. The plant control efficacy and fresh weight control efficacy on the total weed were  $86.8\% - 95.0\%$  and  $88.9\% - 96.5\%$  respectively. At 20 days, 40 days and tasseling stage after each dose treatment, there was no phytotoxicity to maize, and no effect on other non-target organisms. According to the results of yield measurement, the yield of each treatment was significantly increased compared with the blank control, and the incremental production rates were  $74.4\% - 81.4\%$ . The results indicated that the soil-sealing herbicide 42% S-metolachlor•isoxaflutole•atrazine suspoemulsion was safe to maize and had the good control effect on weeds. For the control of annual weeds in maize fields, the appropriate dosage is  $4\ 500 - 5\ 250 \text{ mL} \cdot \text{ha}^{-1}$  (the effective component of  $1\ 890 - 2\ 205 \text{ g} \cdot \text{ha}^{-1}$ ).

**Keywords:** maize; S-metolachlor•isoxaflutole•atrazine suspoemulsion; herbicide; weed control efficacy; yield