

# 产乳酸菌素屎肠球菌 B<sub>13</sub> 对断奶仔猪生长性能、 养分消化率、血清免疫指标及粪便 微生物菌群的影响

丁爽, 郭春华, 张正帆, 柏雪, 魏婕, 张明, 罗璠\*

(西南民族大学生命科学与技术学院, 成都 610041)

**摘要:** 旨在探讨高产乳酸菌素屎肠球菌 B<sub>13</sub> 在饲料中添加对断奶仔猪生产性能、养分消化率、血清免疫指标、粪便微生物菌群的影响。本试验选用 28 日龄生长状况良好的“杜×长×大”三元杂交仔猪(初重(7.89±1.37)kg)56 头, 以体重为区组, 分配到 4 个处理组中: A 组(抗生素组)、B 组(无抗组)、C 组(复合菌组)和 D 组(试验菌组: 屎肠球菌 B<sub>13</sub>), 试验周期 42 d。结果表明: 1) C、D 两组仔猪的全期平均日增重较 B 组均明显提高( $P<0.05$ ), 钙的表观消化率较 B 组显著提高( $P<0.05$ ); D 组血清中 IgG 抗体水平较 B 组提高 19.72% ( $P<0.05$ )。2) DGGE 结果显示, 添加屎肠球菌(D 组)对粪便中细菌多样性有影响。3) RT-PCR 结果显示, 添加益生菌(C、D 组)后仔猪粪便中乳酸菌及屎肠球菌数量较 B 组显著增加( $P<0.05$ ), 并且大肠杆菌数量具有下降趋势( $P=0.07$ )。综上表明, 在本试验条件下, 饲料中添加屎肠球菌 B<sub>13</sub> 能提高仔猪生产性能、粗蛋白及钙的消化率, 增强仔猪免疫力; 同时它还能够维持仔猪消化道菌群稳态, 遏制致病微生物的生长。

**关键词:** 屎肠球菌; 仔猪; 生长性能; 养分消化率; 血清免疫指标; 粪便菌群

中图分类号: S828.4

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2017)10-1902-10

## Effects of *Enterococcus faecium* B<sub>13</sub> Yielding Bacteriocin on Growth Performance, Nutrient Digestibility, Serum Immune Indexes and Fecal Microbiota of Weaned Piglets

DING Shuang, GUO Chun-hua, ZHANG Zheng-fan, BAI Xue, WEI Jie,  
ZHANG Ming, LUO Fan\*

(College of Life Science and Technology, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China)

**Abstract:** This study was conducted to evaluate the effects of dietary *Enterococcus faecium* B<sub>13</sub> on growth performance, nutrient digestibility, serum immune parameters and fecal microbiota in weaned piglets. A total of 56 healthy crossbred “Duroc×Landrace×Yorkshire” weaned piglets at 28 days of age with an average body weight of (7.89 ± 1.37) kg were allotted to 4 treatments: group A (antibiotic group), group B (without antibiotic group), group C (compound bacteria group), group D (test group: *Enterococcus faecium* B<sub>13</sub>), according to the complete randomized block design. The experiment lasted for 42 d. The result showed that: 1) The ADG and the apparent digestibility of Ca were improved in group C and D compared with group B ( $P<0.05$ ). The level of IgG in group D was increased by 19.72% ( $P<0.05$ ) compared with group B. 2) Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) showed that the application of *E. faecium* B<sub>13</sub> changed the bacterial community in fecal. 3) Real-time PCR results showed that, compared with

收稿日期: 2017-04-28

基金项目: 四川省应用基础项目(2014JY0080); 中央高校项目(2016NZYQN39; 2014NZYQN44)

作者简介: 丁爽(1989-), 女, 满族, 河北承德人, 硕士, 主要从事动物营养与饲料科学研究, E-mail: dsalice@163.com

\* 通信作者: 罗璠, 副教授, E-mail: luofany77@163.com

group B, the number of *Lactobacillus* and *E. faecium* were increased ( $P < 0.05$ ) and the number of *Escherichia coli* had decreasing tendency ( $P = 0.07$ ) in group C and D. Therefore, under the condition of this experiment, the dietary of *E. faecium* B<sub>13</sub> supplementation can improve the growth performance, digestibility of crude protein and calcium and enhance immune responses in weaned piglets. It can maintain the stability of digestive tract microflora of piglets and prevent the growth of pathogenic microorganisms.

**Key words:** *Enterococcus faecium*; piglets; growth performance; nutrient digestibility; serum immune indexes; fecal microbiota

由于仔猪胃肠道免疫与消化机能发育不成熟,断奶后其消化道难以立即适应液体母乳到固体饲料的转变,容易发生断奶应激,导致采食量低、腹泻、生长缓慢等现象<sup>[1]</sup>。通常,促进生长的抗生素被用来减少断奶应激及提高仔猪生长性能,但抗生素的过度使用造成致病菌的耐药性并直接威胁到人类健康<sup>[2]</sup>。因此,寻找抗生素替代品便成为现代养殖业的一个研究热点。目前的许多研究证明,益生菌及其代谢产物是最理想的替代品,其在防治疾病、提高畜禽生产性能等方面都具有积极的作用;同时它还能调节肠道微生态平衡、刺激和修复机体免疫功能,并且不会对生态环境造成污染,这使得益生菌在饲养业中的应用具有长远的发展前景<sup>[3]</sup>。而猪胃肠道微生物群落的组成可以通过饮食干预而达成,因此在饲料中添加乳酸菌已经被证明是一个适当的选择<sup>[4-5]</sup>。

屎肠球菌是动物胃肠道、口腔及阴道的正常寄生菌。在养猪生产中,屎肠球菌是一种经常被使用的菌株,目前已证明,饲喂屎肠球菌可以减少腹泻的发生率,提高生长性能和饲料转化率<sup>[5]</sup>。目前,关于屎肠球菌在仔猪中的应用研究有限,而对于屎肠球菌单株以及复合菌在仔猪中使用效果的比较研究未见报道。

本研究旨在探讨一株产乳酸菌素屎肠球菌 B<sub>13</sub>替代抗生素的可行性及其对仔猪生长性能、腹泻率、表观养分消化率、血清免疫指标及粪便微生物菌群的影响,采用实时荧光定量(RT-PCR)和变性梯度凝胶电泳(DGGE)方法对粪便中微生物种群和几种代表微生物的拷贝数进行分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验菌:高产乳酸菌素屎肠球菌 B<sub>13</sub>由本实验室分离鉴定,经测定具备益生菌的潜质。试验使用屎肠球

菌 B<sub>13</sub>发酵液含屎肠球菌总数 $\geq 2 \times 10^9$  CFU · mL<sup>-1</sup>,乳酸菌素效价 $\geq 2.18 \times 10^8$  IU · mL<sup>-1</sup>。

复合菌:芯来旺Ⅲ-H高活复合益生菌粉由植物乳杆菌、嗜酸乳杆菌、屎肠球菌混合而成,乳酸菌总数 $\geq 5 \times 10^{11}$  CFU · g<sup>-1</sup>,由大帝汉克生物科技有限公司提供。

以上2种试验用菌都按照 $5 \times 10^{12}$  CFU · T<sup>-1</sup>的添加量加入到仔猪饲料中,混合均匀后进行饲喂。

抗生素组饲料配方:基础饲料+200 g · T<sup>-1</sup> 10%硫酸粘杆菌素+500 g · T<sup>-1</sup> 15%金霉素,由大帝汉克生物科技有限公司提供。

### 1.2 试验动物及试验设计

试验选用28日龄、初始平均体重为(7.89 ± 1.37)kg、生长状况良好的“杜×长×大”三元杂交仔猪56头,用随机区组设计,按体重区组,将断奶仔猪分为4个处理组:A组(抗生素组)、B组(无抗组:基础饲料)、C组(复合菌组:基础饲料+ $5 \times 10^{12}$  CFU · T<sup>-1</sup> 芯来旺Ⅲ)和D组(试验菌组:基础饲料+ $5 \times 10^{12}$  CFU · T<sup>-1</sup> 屎肠球菌 B<sub>13</sub>);每处理组4个重复,其中2个重复各3头猪(小体重区组是2母1公,大体重区组是2公1母),另外2个重复各4头猪(公母各半)。

### 1.3 饲养管理

整个试验期为42 d,预饲期2 d,仔猪自由采食和饮水。试验期间猪舍平均温度控制为第1周28℃,以后每周下降1℃;湿度为60%。生病仔猪不使用抗生素类药物,每天定时巡场,观察猪的采食和生理状况、记录仔猪腹泻情况,其他日常管理按常规饲养管理进行。

### 1.4 试验饲料及营养水平

试验各处理组所用的基础饲料相同,均购自民大农牧集团,饲料配方参照NRC(1998)配制,其组成及营养水平如表1所示。

表 1 基础饲料组成及营养水平(风干基础)

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

项目 Item	含量 Content	%
原料 Ingredient		
玉米 Corn	63.05	
豆粕(43% CP) Soybean meal	15.61	
发酵豆粕(48% CP) Fermented soybean	3.04	
膨化大豆(38% CP) Extruded soybean	3.04	
乳清粉 Dried whey	3.04	
鱼粉(60% CP) Fish meal	2.03	
奶粉 Milk powder	1.01	
豆油 Soybean oil	2.52	
葡萄糖 Glucose	2.03	
白糖 White sugar	1.01	
石粉 Limestone	0.65	
磷酸氢钙 CaHPO <sub>4</sub>	1.44	
赖氨酸盐酸盐(98%) L-Lysine-HCl	0.38	
DL-蛋氨酸(99%) DL-Methionine	0.15	
预混料 Premix <sup>1)</sup>	1.00	
合计 Total	100.00	
营养水平 Nutrient level		
消化能/(MJ·kg <sup>-1</sup> ) DE <sup>2)</sup>	13.52	
粗蛋白质 CP	16.34	
粗脂肪 EE	5.52	
粗灰分 Ash	6.36	
赖氨酸 Lys	1.40	
蛋氨酸 Met	0.54	
钙 Ca	1.24	
磷 P	1.78	

<sup>1)</sup> 预混料为每千克饲料提供: VA 12 800 IU, VD<sub>3</sub> 4 000 IU, VK<sub>3</sub> 2.6 IU, VE 52 IU, VB<sub>1</sub> 4.0 mg, VB<sub>2</sub> 10.5 mg, VB<sub>3</sub> 5.0 mg, VB<sub>12</sub> 37.5 μg, 泛酸 20.0 mg, 烟酸 40.0 mg, 生物素 36.5 μg, 胆碱 500 mg, Cu 50 mg, Fe 150 mg, Mn 50 mg, Zn 120 mg, I 0.55 mg, Se 0.4 mg。<sup>2)</sup> 消化能为计算值,其余为实测值

<sup>1)</sup> Premix provides following per kg of diet: VA 12 800 IU, VD<sub>3</sub> 4 000 IU, VK<sub>3</sub> 2.6 IU, VE 52 IU, VB<sub>1</sub> 4.0 mg, VB<sub>2</sub> 10.5 mg, VB<sub>3</sub> 5.0 mg, VB<sub>12</sub> 37.5 μg, D-pantothenic acid 20.0 mg, Niacin 40.0 mg, Biotin 36.5 μg, Choline 500 mg, Cu 50 mg, Fe 150 mg, Mn 50 mg, Zn 120 mg, I 0.55 mg, Se 0.4 mg。<sup>2)</sup> DE is calculated value and others are measured values

## 1.5 样品采集

1.5.1 饲料样的采集 以重复为单位,试验结束前连续收集 3 d 各试验组仔猪饲料,每组收集 100 g·d<sup>-1</sup>,混匀后放于密封袋中,-20℃保存待测。

1.5.2 粪样采集与处理 以重复为单位,试验结束前,采用不完全收粪法采集新鲜猪粪,连续收集 3 d,加入 10%硫酸溶液 10 mL 混合均匀,放于-20℃冰箱中冷冻保存,用以测定消化代谢指标。

在试验第 42 天晨饲后,按照微生物试验采样要求,收集新鲜的仔猪粪便,观察到仔猪开始出现排便反应,及时戴好无菌手套接住粪便,尽量采集粪便中段 3~5 cm 的样品,大约 5 g,放入无菌密封袋中,在-80℃冷冻保存,用以进行粪便菌群分析。

1.5.3 血样采集及血清制备 在试验第 42 天清晨对仔猪进行空腹采血,分别从各试验组的每个重复中挑选 2 头仔猪,合计 32 头。针对仔猪进行颈静脉采血,采血量为 10 mL·头<sup>-1</sup>,在 4 000 r·min<sup>-1</sup> 转速条件下,离心 15 min 弃下层血细胞,将上层血清迅速转移至灭菌的新 EP 管中,冻存于-20℃。

## 1.6 测定指标和方法

1.6.1 生长性能 试验期间准确记录每个重复仔猪每天的喂料量与余料量,用于计算每头仔猪不同试验阶段的平均采食量;分别于试验第 0、21 和 42 天的清晨,对试验仔猪进行空腹称重,用以计算不同试验阶段的平均日增重。根据仔猪的平均采食量和日增重计算饲料转化率。

1.6.2 腹泻率 由于仔猪腹泻主要集中在断奶后第 1 周,因此,饲喂第 1 周每天定时对试验猪舍进行巡视,观察仔猪健康状况及粪便情况,记录腹泻头数。腹泻率按如下公式计算:

各处理组仔猪腹泻率(%)=试验第 1 周各组发生腹泻的仔猪总数/试验第 1 周各组仔猪总数×100%。

试验过程中各组发生腹泻的仔猪总数=试验第 1 天各组发生腹泻的仔猪数+试验第 2 天各组发生腹泻的仔猪数+……+试验第 7 天各组发生腹泻的仔猪数。

试验中各组所用仔猪总数=试验第 1 天各组仔猪数+试验第 2 天各组仔猪数+……+试验第 7 天各组仔猪数。

1.6.3 消化代谢指标 测定消化代谢前,将粪便样品解冻后在 65℃恒温烘箱中烘至风干状态,再粉碎过 40 目。采用酸不溶性灰分(AIA)作为指示剂测定养分消化率。饲料和粪便样品中的粗蛋白质应

用凯氏定氮法测定,粗脂肪用索氏提取法测定。养分消化率计算公式:

养分表观消化率(%) = 100 - (饲料中 AIA 含量 / 粪中 AIA 含量) × (粪中养分含量 / 饲料中养分含量) × 100。

1.6.4 血清免疫指标 免疫功能指标(IgA、IgM、IgG)检测采用 ELISA 方法,所用试剂盒由 Abcam 公司生产,规格:48 孔·盒<sup>-1</sup>,样品送至成都里来生物实验室进行检测。

1.6.5 粪便中微生物的变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析 应用细菌通用引物 968F-GC 和

1401R(引物序列见表 2)扩增 16S rRNA 基因的 V6-V8 可变区片段<sup>[6]</sup>。为了防止 PCR 产物在 DGGE 过程中部分或完全解链,因此,在上游引物 5' 添加一个“GC 夹子”。反应体系:上下游引物各 1.0 μL, DNA 模板 2.0 μL, dNTP 4.0 μL, r-Taq 酶 0.4 μL, 10× Buffer 5.6 μL, 无菌水补齐至 15 μL。反应条件:94 °C 预变性 7 min; 94 °C 变性 30 s, 55.9 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环;最后 72 °C 延伸 5 min。以 2% 琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行电泳,检测扩增效果。

表 2 DGGE 所用引物

Table 2 Primers used in DGGE

引物 Primer	序列(5'-3') Sequence	参考文献 Reference
968F-GC*	AACGCGAAGAACCTTAC-GC*	
968F	AACGCGAAGAACCTTAC	[6]
1401R	CGGTGTGTACAAGACCC	

\*. GC 夹子: 5'-CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGCCCGGGGGCACCGGGGG-3'

\*. GC clamp: 5'-CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGCCCGGGGGCACCGGGGG-3'

DGGE 检测条件: 丙烯酰胺(37.5 : 1)浓度为 6.0%, 变性梯度是 35% ~ 50%, 上样量 0.50 μg (20 孔), 电泳条件 125 V、8 h (0.5×TAE 缓冲液, 60 °C 恒温)。电泳结束后, 用银染液染色 20 min 左右, 立即用凝胶成像系统拍照。

对照凝胶成像系统拍出的 DGGE 条带图, 对图谱上的特异性条带进行切胶, 回收测序。测序结果与 NCBI 数据库进行对比, 对得到同源性最高的相关序列进行分析。

1.6.6 粪便中微生物的实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 检测 采用 SYBR-RT-PCR 对仔猪粪便中的微生物进行分析<sup>[7]</sup>, 总反应体系为 15 μL: 2×SYBR Premix Ex Taq 7.5 μL, 正反向引物 0.6 μL, DNA 模板 0.6 μL, ddH<sub>2</sub>O 6.3 μL。应用各自特异性引物按照上述反应体系对样品 DNA 进行扩增, 每个样品在检测时均设 3 个重复, 结果取平均值。

Real-time PCR 所用引物如表 3 所示, 引物对 1 用于检测样品中总细菌 16S rRNA 基因拷贝数<sup>[8]</sup>, 反应条件: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 15 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 40 个循环; 72 °C 延伸

5 min。引物对 2 用于扩增样品中乳酸菌<sup>[9]</sup>, 反应条件: 95 °C 预变性 4 min; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 35 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 40 个循环; 72 °C 延伸 4 min。引物对 3 用于检测样品中屎肠球菌的拷贝数<sup>[10]</sup>, 反应条件: 94 °C 预变性 4 min; 35 个循环; 94 °C 变性 30 s, 52 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s; 72 °C 延伸 5 min。引物对 4 用于定量样品中大肠杆菌的拷贝数<sup>[11]</sup>, 反应条件: 95 °C 预变性 4 min; 95 °C 变性 15 s, 59 °C 退火 20 s, 共 40 个循环; 72 °C 延伸 1 min。引物对 5 用于定量样品中沙门氏菌的拷贝数<sup>[12]</sup>, 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 45 s, 60 °C 退火 35 s, 共 40 个循环; 72 °C 延伸 1 min。

## 1.7 统计分析

利用 SPSS 18.0 软件的一般线性模型 (General linear model, GLM) 对仔猪的生长性能、养分消化率、血清免疫球蛋白等指标进行单因素方差分析, Duncan 法进行差异显著性多重比较,  $P \leq 0.05$  表示差异显著,  $P \leq 0.01$  表示差异极显著。采用卡方检验对腹泻率进行分析。将 Real-time PCR 得到的肠道细菌定量数据均转化成对数形式 ( $\lg(\text{copies} \cdot \text{g}^{-1})$ ) 进行分析和比较。

表 3 Real-time PCR 引物序列

Table 3 Primers used in Real-time PCR

序号 Number	引物 Primer	序列(5'-3') Sequence	参考文献 Reference
1	Bact 1369F	CGGTGAATACGTTTCYCGG	[8]
	Pork 1492R	GGWTACCTTGTTACGACTT	
2	EF-F	GCATCCTGGGGCTGTAGTC	[9]
	EF-R	GGACCGAACTGTCTCACGAC	
3	Lac1-F	GCAGCAGTAGGGAATCTTCCA	[10]
	Lac2-R	GCATTYCACCGCTACACATG	
4	<i>E. coli</i> -F	CAATGGTGATGTCAGCGTT	[11]
	<i>E. coli</i> -R	ACACTCTGTCCGGCTTTTG	
5	Salm16S-F	CGGGGAGGAAGGTGTTGTG	[12]
	Salm16S-R	GAGCCCGGGGATTCACATC	

## 2 结果

### 2.1 益生菌对仔猪生长性能的影响

从表 4 可以看出,各组断奶仔猪初始体重差异不显著( $P>0.05$ )。试验期内各组仔猪的平均采食量、料重比无显著差异( $P>0.05$ )。就试验全期平均日增重以及试验第 2 阶段(22~42 d)平均日增重

来看,C、D 组均显著高于 B 组( $P<0.05$ )。仔猪在饲喂复合菌与试验菌后,全期平均日增重较 B 组分别提高 8.59%和 12.59%;试验第 2 阶段(22~42 d)平均日增重较 B 组分别提高 9.61%和 12.38%。试验第 1 阶段(0~21 d)各组在各项指标间差异均不显著( $P>0.05$ )。

表 4 益生菌对仔猪生长性能的影响

Table 4 Effects of probiotics on growth performance of weaned piglets

项目 Item	组别 Group				SEM	P 值 P value
	A	B	C	D		
始重/kg Initial weight	7.89	7.89	7.89	7.89	0.18	1.00
第 1 阶段 Phase I(0~21 d)						
平均日采食量/g ADFI	747	725	760	787	28.82	0.24
平均日增重/g ADG	366	346	373	386	10.48	0.37
料重比 F/G	2.04	2.09	2.04	2.04	0.03	0.99
第 2 阶段 Phase II (22~42 d)						
平均日采食量/g ADFI	1 148	1 110	1 160	1 171	43.84	0.78
平均日增重/g ADG	589 <sup>b</sup>	556 <sup>c</sup>	610 <sup>ab</sup>	625 <sup>a</sup>	15.56	0.05
料重比 F/G	1.95	1.99	1.90	1.87	0.04	0.63
全期 Overall(0~42 d)						
平均日采食量/g ADFI	947	917	960	979	35.98	0.55
平均日增重/g ADG	477 <sup>ab</sup>	453 <sup>b</sup>	492 <sup>a</sup>	510 <sup>a</sup>	12.61	0.02
料重比 F/G	1.98	2.03	1.95	1.92	0.03	0.63

同行数据后所标字母相异表示差异显著( $P\leq 0.05$ )。下表同

Different letters in the same raw means significant difference between the treatments( $P\leq 0.05$ ). The same as the following tables

### 2.2 益生菌对断奶仔猪腹泻率的影响

试验各组的腹泻率如图 1 所示, D 组 < C 组 < A 组 < B 组, 但差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

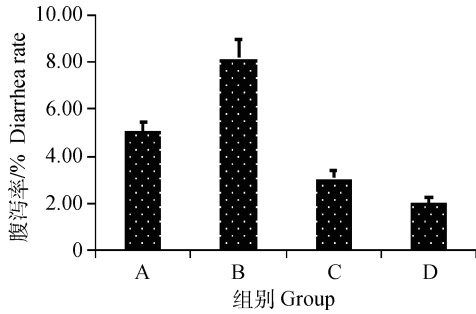
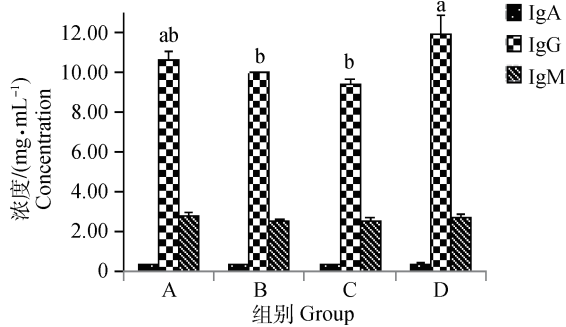


图 1 各试验组断奶仔猪的腹泻率  
Fig. 1 Diarrhea rate of different groups in weaned piglets

表 5 益生菌对仔猪日粮表观养分消化率的影响

项目 Item	组别 Group				SEM	P 值 P value
	A	B	C	D		
有机物 OM	81.01	79.91	79.70	82.23	0.60	0.38
粗蛋白质 CP	75.81 <sup>a</sup>	71.10 <sup>b</sup>	73.14 <sup>ab</sup>	77.49 <sup>a</sup>	0.99	0.03
粗脂肪 EE	78.60	76.22	77.06	79.51	0.61	0.17
钙 Ca	49.65 <sup>a</sup>	39.13 <sup>b</sup>	51.27 <sup>a</sup>	54.76 <sup>a</sup>	2.28	0.02
磷 P	35.95	30.21	34.14	37.10	1.26	0.15



不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )  
The different letters means significant difference ( $P < 0.05$ )  
图 2 各试验组仔猪血清 IgA、IgG 和 IgM 含量  
Fig. 2 IgA, IgG and IgM concentrations in serum in different groups in weaned piglets

### 2.5 益生菌对仔猪粪便微生物多样性的影响

通过对 DGGE 凝胶图谱上的特异性条带进行克隆测序, 结果如图 3 所示, 条带 1、4、7、8、9 均可能是不可培养微生物 (Uncultured bacterium), 相似度达 99%。条带 2 可能是挑剔真杆菌 (*Eubacterium eligens*), 相似度为 97%。条带 3 可能是产气荚膜梭菌 (*Clostridium irregulare*), 相似度为 96%。条

### 2.3 益生菌对仔猪养分消化率的影响

如表 5 所示, 同无抗组 (B 组) 相比, 日粮添加益生菌 (A 组) 和试验菌 (D 组) 显著提高了粗蛋白质表观消化率 ( $P < 0.05$ )。A、C、D 组钙消化率显著高于 B 组 ( $P < 0.05$ )。与抗生素组 (A) 相比, D 组在有机物、粗蛋白质、粗脂肪、钙和磷表观消化率等方面差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

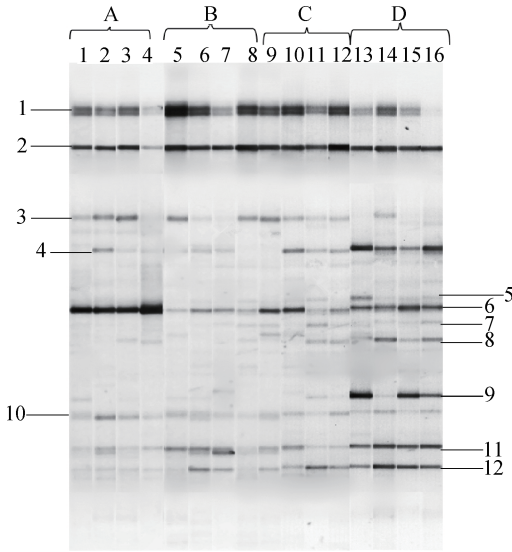
### 2.4 益生菌对仔猪免疫球蛋白的影响

由图 2 可知, 与无抗组 (B 组) 相比, 复合菌组 (C 组) 和试验菌组 (D 组) 仔猪血清 IgA 和 IgM 水平无显著差异 ( $P > 0.05$ )。各组仔猪血清 IgG 水平存在显著差异 ( $P < 0.05$ ), 其中试验菌组 (D 组) 血清 IgG 水平比无抗组 (B 组) 提高 19.72% ( $P < 0.05$ )。

带 5 可能是梭菌科细菌 (*Clostridiaceae bacterium*), 相似度为 97%。条带 6 可能是真杆菌类细菌 (*Eubacterium coprostanoligenes*), 相似度为 98%。条带 10 可能是毛螺旋菌 (*Lachnospiraceae bacterium*), 相似度为 99%。条带 11 可能是干酪乳杆菌 (*Lactobacillus reuteri*), 相似度为 97%。条带 12 可能是北里乳杆菌 (*Lactobacillus kitasatonis*), 相似度为 98%。从中我们可以看出, 试验测出的微生物条带大部分都属于不可培养微生物, 在已知的测序条带中, 产气荚膜梭菌属于致病菌, 而从图 3 中 (条带 3) 可以看出, 相对于其他组, 试验菌组 (D 组) 的该条带颜色最浅; 而乳杆菌属于有益菌, 试验菌组 (D 组) 的该条带 (条带 11、12) 颜色相对较深, 说明试验组 (D 组) 仔猪粪便中有害菌的数量减少, 有益菌的数量较高。

### 2.6 益生菌对仔猪粪便中微生物数量的影响

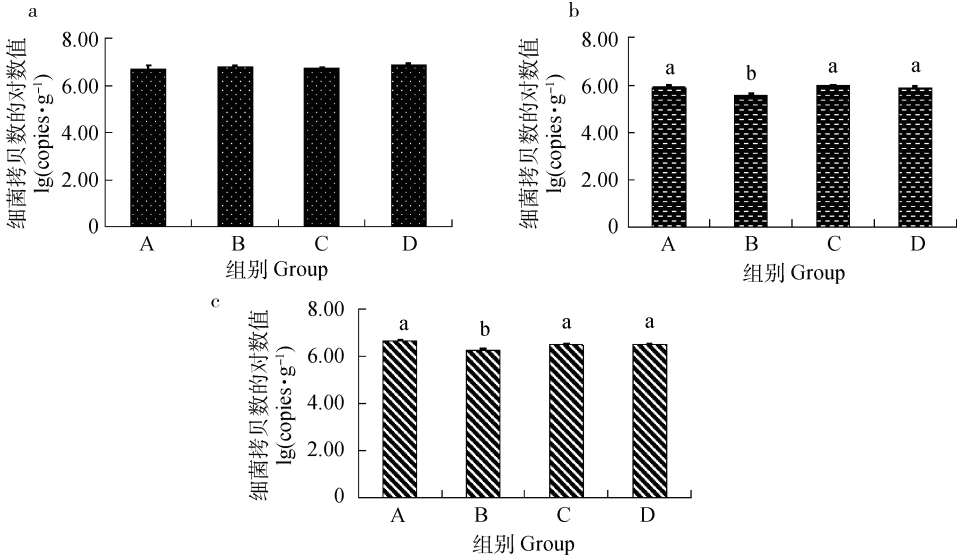
2.6.1 标准曲线的确立 以不同拷贝数的各标准品对数对 PCR 反应过程中出现荧光信号的初始循环数 (Ct) 作图, 建立各菌的标准曲线, 根据标准曲线



图上部数字(1~16)分别代表各试验组中每个重复所对应的泳道;图左右两侧的数字(1~12)分别代表各试验组 DGGE 图像中出现的特异性条带

Numbers (1-16) above the profile stand for channels of replications in each group; Numbers (1-12) on the left and right sides of the profile stand for specific bands in each group

图 3 各处理组仔猪粪便微生物 V6~V8 区 DGGE 图谱  
Fig. 3 DGGE DNA profiles of the V6-V8 region of fecal bacterial flora of weaned piglets



a. 各组仔猪粪便内总菌数; b. 各组仔猪粪便内乳酸菌数; c. 各组仔猪粪便内屎肠球菌数  
a. Total bacteria in faeces of piglets; b. *Lactobacilli* in faeces of piglets; c. *Enterococcus faecium* in faeces of piglets

图 4 仔猪粪便内总菌、乳酸菌及屎肠球菌的数量变化

Fig. 4 Quantity changes of total bacteria, *Lactobacilli* and *Enterococcus faecium* in faeces of piglets

### 3 讨论

#### 3.1 益生菌对仔猪生产性能的影响

目前关于益生菌对仔猪生长性能的影响效果有不同的报道, G. R. Ross 等<sup>[13]</sup>发现, 饲料中添加淀

求得总菌、乳酸菌、屎肠球菌、大肠杆菌和沙门氏菌的标准曲线方程, 各方程的回归系数  $R^2$  值均  $> 0.99$ 。

2.6.2 粪样中总菌、乳酸菌、屎肠球菌、大肠杆菌和沙门氏菌的定量分析 根据标准曲线推算各试验组仔猪粪样中的总菌(Total bacteria)、乳酸菌(*Lactobacilli*)、屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)、大肠杆菌(*E. coli*)和沙门氏菌(*Salmonella*)的数量, 并转换成每克粪便中细菌拷贝数的对数值( $\lg(\text{copies} \cdot \text{g}^{-1})$ )来表示。

如图 4a 所示, 各试验组仔猪粪便中细菌总数无显著差异( $P > 0.05$ )。如图 4b 和 4c 所示, 饲喂益生菌组(C 组和 D 组)粪便中乳酸菌数和屎肠球菌数均显著高于无抗组(B 组,  $P < 0.05$ ), 与抗生素组无显著差异( $P > 0.05$ ), 两组之间亦无显著差异( $P > 0.05$ )。研究表明, 相比于无抗组(B 组), 饲喂益生菌组粪便大肠杆菌数有降低趋势( $P = 0.07$ ), 但与抗生素组相比无显著差异( $P > 0.05$ ), 各试验组仔猪粪便中沙门氏菌的数量变化差异不显著( $P > 0.05$ )。

粉乳杆菌和粪肠球菌可显著降低饲料采食量和改善饲料利用效率; X. Q. Wang 等<sup>[14]</sup>发现, 饲料中添加发酵乳杆菌可以显著提高平均日增重; 史自涛等<sup>[15]</sup>报道, 饲料中添加粪肠球菌对断奶仔猪的全期平均日采食量、平均日增重有显著影响, 能降低腹泻率;



本试验也得到类似结果,添加益生菌有助于提高试验组仔猪的全期平均日增重,但对腹泻率、采食量和料重比的影响不显著。但另外一些研究得到相反的结果,如辛娜等<sup>[16]</sup>研究发现,添加芽孢杆菌制剂对仔猪生长性能没有显著影响;L. J. Broom 等<sup>[17]</sup>的研究表明,添加屎肠球菌的单一菌株对仔猪日增重、日采食量和料重比无显著影响,但腹泻率明显降低。不同研究结果可能与选用菌种、配伍以及添加量的不同等因素有关。B. Gorke 等<sup>[18]</sup>研究指出,当饲喂动物处在敏感期时,饲喂益生菌能够促进生长,仔猪断奶期间其胃肠道结构和免疫系统发生显著变化,此时应用益生菌有明显的效果。S. Stavric 等<sup>[19]</sup>也指出,当动物肠道微生物区系处在不平衡状态时添加益生菌有明显效果,而在优良的饲养管理环境下,这种效果不明显。本试验还分析了复合益生菌及单一益生菌对仔猪生长性能的影响,结果显示添加单一屎肠球菌在提高全期平均日增重、采食量,降低料重比和腹泻率方面比复合益生菌的效果明显,但没有显著差异。刘辉等<sup>[20]</sup>的研究也指出,单一益生菌对平均日增重的提高效果在日龄较小的猪上体现明显。复合乳酸菌及单一乳酸菌对仔猪生长性能影响的作用效果及其机制仍需进一步研究。

### 3.2 益生菌对仔猪养分表现消化率的影响

乳酸菌能够产生多种有机酸降低肠道 pH,从而改变多种矿物质的存在状态,提高多种矿质元素特别是钙、磷等的利用率;另外乳酸菌可以定植于肠道,分泌多种酶类和小肽物质,从而有益于机体对营养物质的消化吸收。许多研究表明<sup>[21-22]</sup>,饲喂乳杆菌可以提高或改善饲料中粗蛋白质、粗脂肪以及钙、磷的表现消化率。本试验结果表明,饲喂益生菌能显著提高仔猪粗蛋白质和钙的表现消化率,相对于复合益生菌添加组,添加单一屎肠球菌对饲料粗蛋白质、有机物、粗脂肪以及钙、磷的消化率方面均表现出提高的趋势。但乳酸菌对于营养物质消化率的影响也有不同的报道。

### 3.3 益生菌对仔猪免疫指标的影响

近年来,益生菌对免疫系统的影响受到研究者的广泛关注,大多数的研究证明,添加益生菌对白细胞、红细胞、血红蛋白及淋巴细胞含量影响不明显<sup>[23]</sup>,但在饲料中添加益生菌能够提高血清中免疫球蛋白的含量,从而改善动物机体的免疫机能。血清免疫球蛋白是体液免疫系统的主要成分,IgM 是免疫反应最初阶段产生的抗体,然而 IgG 是体液免

疫反应的主要抗体,能够阻止相应抗原穿透黏膜进入组织中。IgA 是黏膜免疫的主要抗体,其主要功能是在非特异性免疫防护机制的协助下减少病原菌。L. Zhang 等<sup>[24]</sup>认为,添加鼠李糖乳杆菌可以提高血液中 IgA 的水平;H. F. Yu 等<sup>[25]</sup>则指出,在饲料中添加发酵乳杆菌可以增加仔猪血液中 IgG 的水平。本研究结果显示,较对照组添加复合益生菌对血液中免疫球蛋白水平无显著影响,但添加单一屎肠球菌血液中 IgG 水平显著提高。

### 3.4 益生菌对仔猪肠道微生态平衡的影响

近年来,肠道微生物成为生物领域的研究热点,人们发现肠道微生物菌群对许多疾病的发生、宿主免疫防御系统的发展以及养分的吸收和代谢等都起着重要的作用,通过对粪便微生物的分析,可以间接反映肠道内的微生物生态环境。许多研究采用活菌计数的方法分析了饲喂益生菌后,粪便中微生物的组成,结果显示,大肠杆菌的数量出现明显下降,乳杆菌数量无显著差异<sup>[26]</sup>。但采用活菌计数法多数只是从科或属的水平上粗略区分微生物,不能精确反映粪便中微生物的组成。许多分子方法,例如 RT-PCT、DGGE 及 ITS 测序等技术已经成为微生物区系分析的主要手段,借助这些分子手段可以对粪便微生物进行定性及定量的分析。通过 DGGE 方法对粪便微生物的研究发现,DGGE 图谱中许多条带是不可培养微生物,一般是属于厚壁菌门,厚壁菌如梭菌亚群是动物粪便中主要的菌群,一般图谱中出现的差异条带主要表现在挑剔真杆菌类,例如 *Faecalibacterium prausnitzii* 和 *Ruminococcus obeum* 等;而肠道中乳酸菌的优势条带一般都是乳酸杆菌属<sup>[27]</sup>。P. H. Li 等<sup>[28]</sup>采用 DGGE 技术对饲喂屎肠球菌的断奶仔猪末端肠道中微生物的研究也得到一致结果。本研究得到的结果也与以上研究结果相似,4 个组均有真杆菌条带,且差异明显,同时也检测到不同乳杆菌的出现。

DGGE 图谱仅能反映菌种之间的相对数量关系,但并不准确,因此结合 qPCR 技术可以确定各种菌群在粪便中的数量关系。Y. L. Hu 等<sup>[6]</sup>的研究指出,添加新霉素或屎肠球菌能显著增加乳杆菌的数量,但对粪便中的总菌没显著影响,其他的研究也发现,添加屎肠球菌或粪肠球菌饲喂猪,可以增加粪便中乳酸菌的含量,同时还可以减少其他细菌,如梭状芽孢杆菌和大肠杆菌的数量<sup>[29]</sup>。本试验采用绝对荧光定量方法发现,仔猪粪便中总菌无显著差异,



乳酸菌及尿肠球菌数量较对照组显著提高,大肠杆菌数量有下降趋势。饲喂复合益生菌与单一尿肠球菌对仔猪粪便微生物数量的影响无显著差异。

#### 4 结 论

在本试验条件下,益生菌组(C组和D组)在日增重和IgG水平都显著高于无抗组(B组),试验菌组(D组)在养分消化率和粪便中乳酸菌和尿肠球菌的含量显著高于无抗组(B组)。试验菌组(D组)在腹泻率、养分消化率和粪便中有益菌群数量上均略优于抗生素组(A组),但差异不明显。

#### 参考文献(References):

- [1] SHEN Y B, PIAO X S, KIM S W, et al. Effects of yeast culture supplementation on growth performance, intestinal health, and immune response of nursery pigs[J]. *J Anim Sci*, 2009, 87(8): 2614-2624.
- [2] GONG J, YIN F, HOU Y, et al. Review: Chinese herbs as alternatives to antibiotics in feed for swine and poultry production: potential and challenges in application[J]. *Can J Anim Sci*, 2017, 94(2): 223-241.
- [3] BÜSING K, ZEYNER A. Effects of oral *Enterococcus faecium* strain DSM 10663 NCIMB 10415 on diarrhoea patterns and performance of sucking piglets[J]. *Benef Microbes*, 2015, 6(1): 41-44.
- [4] NILSEN T, NES I F, HOLO H. Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(5): 2975-2984.
- [5] BEDNORZ C, GUENTHER S, OELGESCHLÄGER K, et al. Feeding the probiotic enterococcus faecium strain NCIMB 10415 to piglets specifically reduces the number of *Escherichia coli* pathotypes that adhere to the gut mucosa[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79(24): 7896-7904.
- [6] HU Y L, DUN Y H, LI S N, et al. Dietary *Enterococcus faecalis* LAB31 improves growth performance, reduces diarrhea, and increases fecal lactobacillus number of weaned piglets[J]. *PLoS One*, 2015, 10(1): e0116635.
- [7] FU C J, CARTER J N, LI Y, et al. Comparison of agar plate and real-time PCR on enumeration of *Lactobacillus*, *Clostridium perfringens* and total anaerobic bacteria in dog faeces[J]. *Lett Appl Microbiol*, 2006, 42(5): 490-494.

- [8] SU Y, YAO W, PEREZ-GUTIERREZ O N, et al. 16S ribosomal RNA-based methods to monitor changes in the hindgut bacterial community of piglets after oral administration of *Lactobacillus sobrius* S1[J]. *Anaerobe*, 2008, 14(2): 78-86.
- [9] KHAFIPOUR E, LI S C, PLAIZIER J C, et al. Ruminal microbiome composition determined using two nutritional models of subacute ruminal acidosis[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(22): 7115-7124.
- [10] WOODFORD N, TYSALL L, AUCKLAND C, et al. Detection of oxazolidinone-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains by real-time PCR and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis[J]. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(11): 4298-4300.
- [11] SRINIVASAN S, ASLAN A, XAGORARAKI I, et al. *Escherichia coli*, *enterococci*, and *Bacteroides thetaiotaomicron* qPCR signals through wastewater and septage treatment[J]. *Water Res*, 2011, 45(8): 2561-2572.
- [12] FEY A, EICHLER S, FLAVIER S, et al. Establishment of a real-time PCR-based approach for accurate quantification of bacterial RNA Targets in water, using salmonella as a model organism[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(6): 3618-3623.
- [13] ROSS G R, GUSILS C, OLISZEWSKI R, et al. Effects of probiotic administration in swine[J]. *J Biosci Bioeng*, 2010, 109(6): 545-549.
- [14] WANG X Q, YANG F, LIU C, et al. Dietary supplementation with the probiotic *Lactobacillus fermentum* I5007 and the antibiotic aureomycin differentially affects the small intestinal proteomes of weanling piglets[J]. *J Nutr*, 2012, 142(1): 7-13.
- [15] 史自涛,姚焰础,江山,等.粪肠球菌替代抗生素对断奶仔猪生长性能、腹泻率、血液生化指标和免疫器官的影响[J]. *动物营养学报*, 2015, 27(6): 1832-1840.
- SHI Z T, YAO Y C, JIANG S, et al. Effects of *Enterococcus faecalis* substitute for antibiotic on growth performance, diarrhea rate, blood biochemical parameters and immune organs of weaner piglets[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2015, 27(6): 1832-1840. (in Chinese)
- [16] 辛娜,张乃锋,刁其玉,等.芽孢杆菌制剂对断奶仔猪生长性能、胃肠道发育的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2012, 43(6): 901-908.
- XIN N, ZHANG N F, DIAO Q Y, et al. Effect of

- bacillus preparation on growth performance and gastrointestinal development of weaned piglets[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2012, 43(6): 901-908. (in Chinese)
- [17] BROOM L J, MILLER H M, KERR K G, et al. Effects of zinc oxide and *Enterococcus faecium* SF68 dietary supplementation on the performance, intestinal microbiota and immune status of weaned piglets [J]. *Res Vet Sci*, 2006, 80(1): 45-54.
- [18] GÖRKE B, LIEBLER-TENORIO E. Probiotics: is there a scientific basis for their effects? [J]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 2001, 108(6): 249-251.
- [19] STAVRIC S, KORNEGAY E T. Microbial probiotics for pigs and poultry [M]//WALLACE R J, CHESSON A. *Biotechnology in Animal Feeds and Animal Feeding*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, 1995: 205-231.
- [20] 刘辉, 季海峰, 王四新, 等. 益生菌对生长猪生长性能、粪便微生物数量、养分表观消化率和血清免疫指标的影响[J]. *动物营养学报*, 2015, 27(3): 829-837.
- LIU H, JI H F, WANG S X, et al. Effects of probiotics on growth performance, faecal microflora number, nutrient apparent digestibility and serum immune indices of growing pigs[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2015, 27(3): 829-837. (in Chinese)
- [21] 王志祥, 乔家运, 王自恒, 等. 乳酸杆菌对断奶仔猪生长性能、养分表观消化率和消化酶活性的影响[J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2006, 34(4): 23-27.
- WANG Z X, QIAO J Y, WANG Z H, et al. Effect of *Lactobacillus* on growth performance, nutrient digestibility and digestive enzyme activities of weaned piglets[J]. *Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry: Natural Science Edition*, 2006, 34(4): 23-27. (in Chinese)
- [22] 周盟, 张乃锋, 董晓丽, 等. 益生菌对断奶仔猪生长性能、免疫器官指数及胃肠道 pH 的影响[J]. *动物营养学报*, 2014, 26(2): 445-452.
- ZHOU M, ZHANG N F, DONG X L, et al. Effects of probiotics on growth performance, immune organ indexes and gastrointestinal pH of weaner piglets[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2014, 26(2): 445-452. (in Chinese)
- [23] YANG F J, HOU C L, ZENG X F, et al. The use of lactic acid bacteria as a probiotic in swine diets[J]. *Pathogens*, 2015, 4(1): 34-45.
- [24] ZHANG L, XU Y Q, LIU H Y, et al. Evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* GG using an *Escherichia coli* K88 model of piglet diarrhoea: effects on diarrhoea incidence, faecal microflora and immune responses [J]. *Vet Microbiol*, 2010, 141(1-2): 142-148.
- [25] YU H F, WANG A N, LI X J, et al. Effect of viable *Lactobacillus fermentum* on the growth performance, nutrient digestibility and immunity of weaned pigs [J]. *J Anim Feed Sci*, 2008, 17(1): 61-69.
- [26] LE BON M, DAVIES H E, GLYNN C, et al. Influence of probiotics on gut health in the weaned pig[J]. *Livest Sci*, 2010, 133(1-3): 179-181.
- [27] PLUSKE J R. Feed-and feed additives-related aspects of gut health and development in weanling pigs[J]. *J Anim Sci Biotechnol*, 2013, 4: 1.
- [28] LI P H, NIU Q, WEI Q T, et al. Microbial shifts in the porcine distal gut in response to diets supplemented with *Enterococcus Faecalis* as alternatives to antibiotics[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 41395.
- [29] YAN L, KIM I H. Effect of probiotics supplementation in diets with different nutrient densities on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics, faecal microbial population and faecal noxious gas content in growing pigs [J]. *J Appl Anim Res*, 2013, 41(1): 23-28.

(编辑 郭云雁)