

# 屎肠球菌对大肠杆菌感染肉鸡生长性能、血清生化指标和盲肠菌群结构的影响

曹广添<sup>1</sup>,代兵<sup>1</sup>,张玲玲<sup>1</sup>,曾新福<sup>2</sup>,杨彩梅<sup>1\*</sup>

(1. 浙江农林大学 动物科技学院,杭州 311300; 2. 浙江惠嘉生物科技股份有限公司,安吉 313300)

**摘要:**旨在研究日粮中添加屎肠球菌对大肠杆菌感染的肉鸡生长性能、血清生化指标和盲肠菌群结构的影响。将360只1日龄体重接近的白羽肉鸡随机分为4组,每组6个重复(每重复15只):阴性对照组(NC)、阳性对照组(PC)、屎肠球菌组(*E. f*)和抗生素组(Anti)。后3组肉鸡在7日龄感染大肠杆菌,试验共持续28 d。肉鸡的血清生化指标检测使用特定试剂盒,而盲肠微生物结构变化用PCR-DGGE检测。结果显示:1)14、21和28日龄时,屎肠球菌组肉鸡体重显著高于阴性和阳性对照组肉鸡( $P<0.05$ );10~14、15~21、10~28日龄屎肠球菌组肉鸡平均日增重显著高于阴性和阳性对照组肉鸡( $P<0.05$ );2)相较于阴性对照和阳性对照肉鸡,14和21日龄屎肠球菌组和抗生素组血清IgA浓度显著增加( $P<0.05$ );相较于阴性对照,10~28日龄屎肠球菌组和抗生素组血清中IgG浓度显著增加( $P<0.05$ );3)与21日龄阳性对照组肉鸡相比,屎肠球菌组血清中C3浓度显著增加( $P<0.05$ );与10、14和21日龄阴性对照肉鸡相比,其余3组肉鸡血清中溶菌酶的浓度显著增加( $P<0.05$ );4)与阳性对照组相比,饲喂屎肠球菌显著增加28日龄肉鸡盲肠微生物菌群的香农指数( $P<0.05$ )。结果提示,饲喂屎肠球菌可显著提高大肠杆菌感染肉鸡的生长性能,提高血液免疫相关指数,改变盲肠菌群多样性。

**关键词:**屎肠球菌;生长性能;血液生化指标;肠道菌群;大肠杆菌 K88;肉鸡

中图分类号:S831.5

文献标志码:A

文章编号:0366-6964(2018)05-0962-09

## Effects of *Enterococcus faecium* on the Growth Performance, Serum Biochemical Parameters and the Structure of Cecal Microflora in the *E. coli*-challenged Broilers

CAO Guang-tian<sup>1</sup>, DAI Bing<sup>1</sup>, ZHANG Ling-ling<sup>1</sup>, ZENG Xin-fu<sup>2</sup>, YANG Cai-mei<sup>1\*</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Zhejiang A & F University, Hangzhou 311300, China; 2. Zhejiang Huijia Bio-technology Co., Ltd., Anji 313300, China)

**Abstract:** The present study was conducted to investigate the effects of *Enterococcus faecium* administration on the growth performance, serum biochemical parameters and cecal microflora's structure in *E. coli*-challenged broilers. A total of 360 1-day-old White Feather chickens with the approximative body weight were randomly divided into 4 groups, six replicates (15 birds per replicate) in each group; negative control (NC), positive control (basal diet, PC), *E. faecium*-fed (*E. f*) and antibiotic-fed birds (Anti). The birds in PC, *E. f* and Anti groups were challenged with *E. coli* K88 on d 7, the whole test lasted for 28 d. And the serum levels of complement components and immunoglobulins were measured by the specific kits, while the change of cecal microbiota was determined by PCR-DGGE. Data showed that: 1) The birds in *E. f* group had significant higher body weight than that of birds in NC and PC groups on d 14, 21 and 28 ( $P<0.05$ ); The birds in *E. f* group had significant higher ADG than that of birds in NC and PC groups during d 10-14, 15-21 and 10-28 ( $P<0.05$ ). 2) The birds in *E. f* and Anti groups had significant

收稿日期:2017-08-28

基金项目:浙江省重点研发计划项目(2017C02005);浙江省“饲料研发与安全科技创新团队”项目(2011R50025)

作者简介:曹广添(1989-),男,山东临沂人,讲师,博士,主要从事益生菌的研发及农业标准化等研究,E-mail:15a1903025@cjlu.edu.cn

\*通信作者:杨彩梅,副教授,主要从事畜禽环保型饲料添加剂等研究,E-mail:yangcaimei2012@163.com

higher level of serum IgA than that of birds in NC and PC groups on d 14, 21 ( $P < 0.05$ ); Birds in E. f and Anti groups had significant higher level of serum IgG than that of birds in NC group in d 10-28 ( $P < 0.05$ ). 3) Compared with birds in PC group, birds in E. f group had significant higher C3 concentration on d 21 ( $P < 0.05$ ). The birds in PC, E. f and Anti groups had higher serum lysozyme than that of birds in NC group on d 10, 14 and 21 ( $P < 0.05$ ). 4) Compared with the birds in PC group, birds in E. f group had significant higher Shannon index of cecal microflora ( $P < 0.05$ ) on d 28. In conclusion, the dietary *Enterococcus faecium* improved the growth performance, serum immune parameters and changed the diversity of cecal intestinal microflora in the *E. coli* K88-challenged chicken.

**Key words:** *Enterococcus faecium*; growth performance; serum biochemical parameters; intestinal microflora; *E. coli* K88; broilers

大肠杆菌病(Colibacillosis)一直是家禽养殖的难题之一,其带来肠道疾病的同时也造成了重大经济损失<sup>[1]</sup>。在家禽生产中,使用抗生素是控制大肠杆菌感染最常用的方法<sup>[2]</sup>。然而,随着抗生素在全球范围内逐渐被取缔,益生菌作为其替代物已被发现可以提高畜禽生长性能<sup>[3-4]</sup>,增强免疫功能<sup>[5-7]</sup>和调节肠道微生物区系<sup>[8]</sup>。

尿肠球菌(*Enterococcus faecium*,简称*E. faecium*),是肠道中常见的产乳酸的菌种,作为益生菌已广泛应用于畜禽生产,美国饲料控制办公室已将其列为研究对象<sup>[9-10]</sup>。研究发现,尿肠球菌可提高畜禽的生长性能,改善健康,使用对象主要包括猪<sup>[11]</sup>、牛<sup>[12]</sup>、肉鸡<sup>[13-15]</sup>甚至鱼类<sup>[16-17]</sup>等。M. Levkut等<sup>[18]</sup>发现,饲喂尿肠球菌 EF55 对沙门氏菌感染肉鸡早期的免疫功能有调节作用。然而,很少有试验报道尿肠球菌的饲喂对大肠杆菌感染肉鸡的影响。

本研究以白羽肉鸡为试验动物,早期(7日龄)攻毒后,初步研究饲喂尿肠球菌对其生长性能、血清生化指标和盲肠菌群结构的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验动物及饲养

本试验于浙江农林大学动物实验基地(中国,杭州)选取1日龄健康状况良好的白羽肉鸡360羽(平均体重 $(49.4 \pm 1.4)$  g),随机分为4组,每组肉鸡(公母各半)6个重复(每重复15只),单笼饲养。试验期间,肉鸡自由采食和饮水。鸡舍内温度第一周维持在 $32^{\circ}\text{C}$ ,随后逐渐减低至 $25^{\circ}\text{C}$ 。基础日粮参考NRC(1994)相关营养指标配制(表1)。

试验共持续4周,第一周结束后,阳性对照组、尿肠球菌组和抗生素组肉鸡用一次性注射器口腔注

射1 mL 大肠杆菌菌液 K88( $10^8$  cfu  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>)。阴、阳性对照组肉鸡采食基础日粮,尿肠球菌组肉鸡采食添加 $10^9$  cfu  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>尿肠球菌的基础日粮,抗生素组肉鸡采食添加10 mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>硫酸粘杆菌素的基础日粮。

表1 基础日粮组成及营养水平(风干基础)

Table 1 Composition and nutrient levels of the basal experimental diet (air-dry basis) %

项目 Item	含量 Content
日粮组成 Ingredient	
玉米 Corn	61.50
豆粕 Soybean meal	27.50
鱼粉 Fish meal	5.00
豆油 Soybean oil	2.00
预混料 Premix	4.00
合计 Total	100.00
营养水平 Nutrient level	
表观代谢能/(MJ $\cdot$ kg <sup>-1</sup> ) AME	12.54
粗蛋白 CP	21.00
赖氨酸 Lys	1.22
蛋氨酸+胱氨酸 Met+Cys	0.98
钙 Ca	1.00
有机磷 AP	0.47

预混料为每千克饲粮提供:VA 1 500 IU;VD<sub>3</sub> 200 IU;VE 10 IU;VB<sub>2</sub> 3.5 mg;泛酸 10 mg;烟酸 30 mg;钴胺素 10  $\mu$ g;氯化胆碱 1 000 mg;生物素 0.15 mg;叶酸 0.5 mg;硫胺素 1.5 mg;VB<sub>6</sub> 3.0 mg;铁 80 mg;锌 40 mg;锰 60 mg;碘 0.18 mg;铜 8 mg;硒 0.15 mg

Premix supplied per kilogram of diet: vitamin A (retinyl acetate) 1 500 IU; cholecalciferol 200 IU; vitamin E (DL- $\alpha$ -tocopheryl acetate) 10 IU; riboflavin 3.5 mg; pantothenic acid 10 mg; niacin 30 mg; cobalamin 10  $\mu$ g; choline chloride 1 000 mg; biotin 0.15 mg; folic acid 0.5 mg; thiamine 1.5 mg; pyridoxine 3.0 mg; Fe 80 mg; Zn 40 mg; Mn 60 mg; I 0.18 mg; Cu 8 mg; Se 0.15 mg

## 1.2 菌种制备

尿肠球菌(HJEF005,鸡肠道分离所得)及大肠杆菌 K88 制备参照文献[19]的方法。

## 1.3 生长性能测定

在 7、10、14、21 和 28 日龄,肉鸡每只进行称重,用于计算其体重和平均日增重。

## 1.4 样品收集

在试验 10、14、21 和 28 天,每个重复随机挑选体重相近的 2 只健康状况良好的肉鸡,采用静脉割断方法进行宰杀,促凝管收集血液后离心取血清,用以检测血清生化指标。解剖并用无菌绳结扎盲肠后放入冰盒,其内容物在超净工作台内用 EP 管收集放入  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱保存用以 PCR-DGGE 检测。

## 1.5 血清生化指标测定

血清中免疫球蛋白 IgA、IgE、IgM 浓度利用 ELISA 试剂盒(武汉优尔生科技股份有限公司,武汉)检测;补体 C3、C4 和溶菌酶浓度检测使用南京建成试剂盒(南京建成生物工程研究所,南京);操作步骤均参照说明书。

## 1.6 PCR-DGGE 检测

肉鸡盲肠微生物菌群(16S rRNA 的 V3 区)结构和多样性用 PCR-DGGE 检测。为减小样本的多样性,试验将每组中 12 个盲肠样品每 4 只合并为一个生物样本进行后续试验。微生物 DNA 提取采用 Mobio 试剂盒(Mo Bio, Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA),具体提取步骤参阅美国 Mobio 网站。PCR 引物采用 GC-338F (5'-ACTCCTACGG-GAGGCAGCAG-3') 和 534R (5'-ATTACCGCG-GCTGCTGG-3')。试验采用  $50\ \mu\text{L}$  反应体系:混合物包括  $10\times\text{PCR Buffer } 5\ \mu\text{L}$ , dNTP Mixture(各  $2.5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )  $4\ \mu\text{L}$ , 引物 338F( $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )  $1\ \mu\text{L}$ , 引物 534R( $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )  $1\ \mu\text{L}$ , 模板 DNA  $2.5\ \text{ng}$ , TaKaRa rTaq ( $5\ \text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )  $0.25\ \mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 补至  $50\ \mu\text{L}$ 。PCR 扩增程序:初始温度  $94^{\circ}\text{C}$  10 min, 30 个循环( $94^{\circ}\text{C}$  60 s,  $55^{\circ}\text{C}$  60 s,  $72^{\circ}\text{C}$  90 s), 最后  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。PCR 产物用 2% 凝胶琼脂进行鉴定。

DGGE 分析中聚丙烯酰胺凝胶的浓度为 8%, 变性剂梯度为 30% ~ 60% (100% 变性剂包括  $7\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  尿素和 40% (v/v) 离子甲酰胺), 电泳条件为 140 V 450 min。染色采用银染方法,用 UMAX Power Look 1000 透射扫描仪(Techville, Inc., Dallas, USA)扫描获得的 DGGE 图谱图片。最终,利用

BioEdit7.0 (Bio-Rad Canada, Mississauga, ON, Canada)、Phylip4.0 及 MEGA3.1 软件对结果进行分析。

## 1.7 统计分析

用 SPSS 16.0 软件对试验结果各处理进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),同时采用 Duncan 多重比较进行差异显著性分析,以  $P<0.05$  为判断差异显著的标准。

## 2 结果

### 2.1 尿肠球菌对感染大肠杆菌肉鸡生长性能的影响

表 2 数据显示,饲喂尿肠球菌改变了肉鸡的生长性能。21、28 日龄阴性对照组肉鸡体重显著高于阳性对照组( $P<0.05$ );14、21、28 日龄尿肠球菌组肉鸡体重显著高于阴性和阳性对照组肉鸡( $P<0.05$ );另外,大肠杆菌攻毒显著降低了阳性对照组 10~14、15~21 和 22~28 日龄肉鸡的平均日增重( $P<0.05$ )。另外,饲喂尿肠球菌显著提高了攻毒肉鸡 10~28 日龄的平均日增重( $P<0.05$ )。

### 2.2 尿肠球菌对大肠杆菌感染肉鸡血清免疫蛋白的影响

表 3 显示了肉鸡血清中免疫球蛋白的变化,10、21 和 28 日龄阳性对照肉鸡血清中 IgA 的浓度显著高于阴性对照组肉鸡( $P<0.05$ )。在 14 和 21 日龄,与阴性和阳性对照肉鸡相比,采食添加尿肠球菌和抗生素日粮显著提高了肉鸡血清中 IgA 的浓度( $P<0.05$ )。整个试验中,与阴性对照肉鸡相比,尿肠球菌组和抗生素组显著增加了肉鸡血清中 IgG 的浓度( $P<0.05$ )。与 14 和 21 日龄阳性对照肉鸡相比,饲喂尿肠球菌显著增加了血清中 IgG 的浓度( $P<0.05$ );与 10 和 28 日龄阴性对照肉鸡相比,阳性对照组和尿肠球菌组肉鸡血清中 IgM 浓度显著增加( $P<0.05$ ),而后两者间无显著性差异。以上结果说明,饲喂尿肠球菌可以显著提高肉鸡血清中免疫球蛋白的浓度。

### 2.3 尿肠球菌对大肠杆菌感染肉鸡血清补体浓度的影响

表 4 显示,在 21 日龄时,E. f 组肉鸡血清中补体 C3 的浓度显著高于阳性对照组( $0.263\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  vs.  $0.209\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $P=0.033$ );另外,28 日龄 E. f 组肉鸡血清中补体 C4 的浓度显著高于阴性对照和抗生素组( $0.162\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  vs.  $0.122, 0.118\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $P=0.01$ )。而且,饲喂尿肠球菌的肉鸡较 21 和 28 日龄抗生素组,血清中 C4 浓度有了显著提高

表 2 屎肠球菌对肉鸡体重和平均日增重的影响

Table 2 Effects of *Enterococcus faecium* on body weight and average daily gain in broilers

项目 Item	日龄/d Age	试验分组 Experimental treatment				Statistics	
		阴性对照组 NC	阳性对照组 PC	抗生素组 Anti	屎肠球菌组 E. f	标准差 SEM	P 值 P-value
体重/g	7	246.8	251.3	249.0	250.0	1.897	0.494
BW	10	325.3	314.9	325.8	328.3	2.844	0.357
	14	387.8 <sup>bc</sup>	369.9 <sup>c</sup>	398.4 <sup>ab</sup>	413.8 <sup>a</sup>	3.515	0.001
	21	730.9 <sup>c</sup>	699.3 <sup>d</sup>	764.5 <sup>b</sup>	872.0 <sup>a</sup>	9.901	0.001
	28	1 200.3 <sup>c</sup>	1 139 <sup>d</sup>	1 272 <sup>b</sup>	1 368.7 <sup>a</sup>	16.18	0.001
平均日增重/ (g · d <sup>-1</sup> )	10~14	17.45 <sup>b</sup>	16.05 <sup>c</sup>	18.05 <sup>ab</sup>	19.01 <sup>a</sup>	0.289	0.001
	15~21	48.99 <sup>b</sup>	44.7 <sup>c</sup>	49.61 <sup>b</sup>	63.04 <sup>a</sup>	1.413	0.001
ADG	22~28	65.96 <sup>ab</sup>	56.29 <sup>c</sup>	68.43 <sup>a</sup>	68.96 <sup>a</sup>	1.155	0.001
	10~28	40.89 <sup>b</sup>	37.75 <sup>b</sup>	42.45 <sup>b</sup>	48.20 <sup>a</sup>	1.138	0.006

同行数据后所标字母相异表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 所标字母相同表示差异不显著 ( $P > 0.05$ )。下表同

Different letters in the same row means significant difference between treatments ( $P < 0.05$ ), the same letter in the same row means no significant difference between treatments ( $P > 0.05$ ). The same as below

表 3 屎肠球菌对肉鸡血清中免疫球蛋白的影响

Table 3 Effects of *Enterococcus faecium* on the levels of serum immunoglobulins in broilers $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 

项目 Item	日龄/d Age	试验分组 Experimental treatment				Statistics	
		阴性对照组 NC	阳性对照组 PC	抗生素组 Anti	屎肠球菌组 E. f	标准差 SEM	P 值 P-value
免疫球蛋白 A	10	60.7 <sup>b</sup>	80.7 <sup>a</sup>	84.7 <sup>a</sup>	85.22 <sup>a</sup>	2.894	0.003
IgA	14	81.8 <sup>b</sup>	93.6 <sup>b</sup>	133.8 <sup>a</sup>	151.3 <sup>a</sup>	6.651	0.001
	21	149.8 <sup>c</sup>	195.6 <sup>b</sup>	251.6 <sup>a</sup>	253.6 <sup>a</sup>	9.994	0.001
	28	238.5 <sup>c</sup>	264.2 <sup>b</sup>	284.9 <sup>b</sup>	309.8 <sup>a</sup>	6.413	0.001
	免疫球蛋白 G	10	187.6 <sup>b</sup>	261.0 <sup>a</sup>	259.9 <sup>a</sup>	263.2 <sup>a</sup>	9.453
IgG	14	261.0 <sup>c</sup>	286.7 <sup>bc</sup>	318.4 <sup>ab</sup>	339.5 <sup>a</sup>	9.299	0.008
	21	342.2 <sup>c</sup>	372.4 <sup>bc</sup>	396.9 <sup>ab</sup>	419.7 <sup>a</sup>	9.019	0.008
	28	342.1 <sup>b</sup>	380.3 <sup>ab</sup>	404.5 <sup>a</sup>	419.1 <sup>a</sup>	9.883	0.024
	免疫球蛋白 M	10	76.0 <sup>b</sup>	95.23 <sup>a</sup>	76.8 <sup>b</sup>	103.5 <sup>a</sup>	3.525
IgM	14	108.1	113.5	107.3	114.3	4.027	0.910
	21	138.0	140.0	135.4	150.5	4.336	0.984
	28	92.8 <sup>b</sup>	122.7 <sup>a</sup>	113.3 <sup>ab</sup>	123.0 <sup>a</sup>	5.019	0.108

(0.093  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  vs. 0.069  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $P = 0.019$ ; 0.162  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  vs. 0.118  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $P = 0.010$ )。以上结果表明,肉鸡采食添加屎肠球菌日粮可以显著提高大肠杆菌攻毒肉鸡血清中补体的浓度。

10 到 21 日龄,阳性对照、抗生素组及屎肠球菌组肉鸡与阴性对照组相比,血清中溶菌酶的浓度均

有显著增加(1.429、1.684、1.673  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  vs. 1.216  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; 1.573、2.164、2.029  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  vs. 1.269  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; 2.059、2.012、1.997  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  vs. 1.548  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;  $P = 0.001$ )。而且,10~14 日龄抗生素和屎肠球菌组肉鸡较阳性对照组肉鸡,血清中溶菌酶浓度显著增加(1.684、1.673  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  vs.

1.429 ng · mL<sup>-1</sup>; 2.164、2.029 ng · mL<sup>-1</sup> vs. 1.573 ng · mL<sup>-1</sup>;  $P=0.001$ )。另外, 试验期间抗生素和屎肠球菌组肉鸡血清中溶菌酶的浓度均

没有显著不同。试验结果表明, 饲喂添加屎肠球菌的日粮可以显著增加肉鸡血清中溶菌酶的浓度。

表4 屎肠球菌对攻毒肉鸡血清中补体和溶菌酶的影响

Table 4 Effects of *Enterococcus faecium* on serum complement components and lysozyme in broilers

项目 Item	日龄/d Age	试验分组 Experimental treatment				Statistics	
		阴性对照组 NC	阳性对照组 PC	抗生素组 Anti	屎肠球菌组 E. f	标准差 SEM	P值 P-value
补体 3/ (mg · mL <sup>-1</sup> ) C3	10	0.067	0.071	0.073	0.088	0.003	0.122
	14	0.084	0.091	0.105	0.101	0.004	0.257
	21	0.255 <sup>a</sup>	0.209 <sup>b</sup>	0.245 <sup>a</sup>	0.263 <sup>a</sup>	0.007	0.033
	28	0.218	0.195	0.233	0.246	0.007	0.108
补体 4/ (mg · mL <sup>-1</sup> ) C4	10	0.037	0.032	0.037	0.036	0.002	0.837
	14	0.049	0.051	0.044	0.052	0.001	0.169
	21	0.073 <sup>ab</sup>	0.104 <sup>a</sup>	0.069 <sup>b</sup>	0.093 <sup>a</sup>	0.005	0.019
	28	0.122 <sup>b</sup>	0.156 <sup>a</sup>	0.118 <sup>b</sup>	0.162 <sup>a</sup>	0.006	0.010
溶菌酶/ (ng · mL <sup>-1</sup> ) Lysozyme	10	1.216 <sup>c</sup>	1.429 <sup>b</sup>	1.684 <sup>a</sup>	1.673 <sup>a</sup>	0.048	0.001
	14	1.269 <sup>c</sup>	1.573 <sup>b</sup>	2.164 <sup>a</sup>	2.029 <sup>a</sup>	0.071	0.001
	21	1.548 <sup>b</sup>	2.059 <sup>a</sup>	2.012 <sup>a</sup>	1.997 <sup>a</sup>	0.052	0.001
	28	2.019	1.988	2.246	2.157	0.281	0.095

#### 2.4 屎肠球菌对大肠杆菌感染肉鸡盲肠微生物菌群的影响

表5和图1显示, 28日龄攻毒肉鸡盲肠微生物的多样性指数。与阳性对照组相比, 饲喂屎肠球菌

显著增加28日龄肉鸡盲肠微生物菌群的香农指数。聚类分析显示, 屎肠球菌组肉鸡盲肠微生物菌群稳定分布(图2)。与阴性对照组相比, 屎肠球菌组肉鸡盲肠菌群有显著变化。

表5 肉鸡盲肠微生物菌群 PCR-DGGE 多样性指数

Table 5 Diversity index of cecal microflora community based on the PCR-DGGE DNA fingerprinting

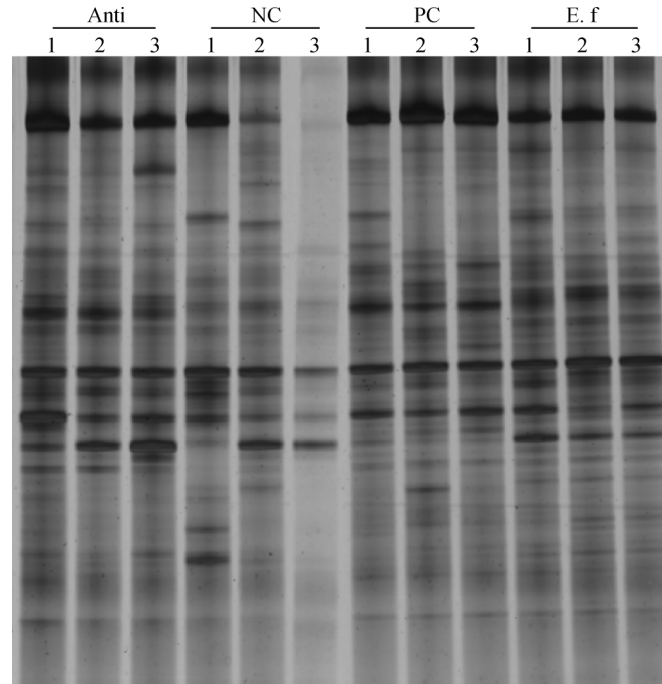
项目 Item	日龄/d Age	试验分组 Experimental treatment				Statistics	
		阴性对照组 NC	阳性对照组 PC	抗生素组 Anti	屎肠球菌组 E. f	标准差 SEM	P值 P-value
条带数量(N) Number of bands	28	31 <sup>b</sup>	25 <sup>d</sup>	28 <sup>bc</sup>	35 <sup>a</sup>	1.209	0.011
香农指数(N) Shannon	28	3.033 <sup>a</sup>	2.507 <sup>b</sup>	2.600 <sup>b</sup>	3.170 <sup>a</sup>	0.109	0.085

### 3 讨论

#### 3.1 饲喂屎肠球菌对大肠杆菌感染肉鸡生长性能的影响

近年来, 抗生素在家畜养殖方面的应用逐渐被取缔, 而其替代品则引起了研究者的兴趣。我们都

知道, 大肠杆菌是禽类生长的慢性应激源<sup>[20]</sup>, 且第一周往往是大肠杆菌感染的最脆弱时期<sup>[21]</sup>。本研究结果表明, 与阴性对照相比, 阳性对照组肉鸡的体重和平均日增重显著减少。M. E. Cook<sup>[22]</sup>发现, 动物攻毒会减少营养物质进而影响生长性能, 主要表现在防御过程中营养物质的吸收减少。K. Taka-

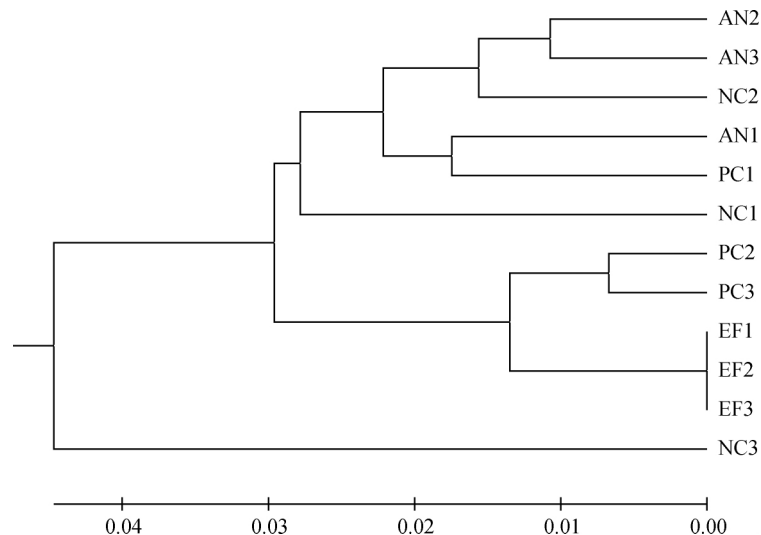


NC、PC、Anti 和 E. f 分别代表阴性对照组、阳性对照组、抗生素组和屎肠球菌组; NC 1、2、3 分别代表阴性对照组 3 个肉鸡盲肠生物样本, PC、Anti 和 E. f 同 NC。下同

NC represents negative control birds, PC represents positive control birds, E. f represents *E. faecium*-fed birds, Anti represents antibiotic-fed birds; NC 1, 2, 3 represent the cecal samples of birds in negative control group, which is same with PC, Anti and E. f. The same as below

图 1 肉鸡盲肠微生物 16S rRNA V3 区的 PCR-DGGE 图

Fig. 1 PCR-DGGE DNA fingerprinting of the V3 region of 16S rRNA of cecal microbiota of broilers



AN、NC、PC、EF 分别代表抗生素组、阴性对照组、阳性对照组和屎肠球菌组

AN, NC, PC, EF represent the antibiotic-fed birds, negative control, positive control and *E. faecium*-fed birds groups, respectively

图 2 肉鸡盲肠微生物样本 PCR-DGGE 聚类图

Fig. 2 Cluster analysis based on DGGE profiles from broiler cecal samples

hashi 等<sup>[23]</sup>报道称,注射免疫炎性因子(如 LPS)不仅降低动物的免疫反应,同时也会导致生长的减慢。

屎肠球菌已作为益生菌用以治疗动物和人类肠炎疾病很长时间<sup>[24]</sup>。当前试验显示,饲喂屎肠球菌可以

显著提高大肠杆菌攻毒后肉鸡的体重和平均日增重。A. B. M. R. Bostami 等<sup>[25]</sup> 研究显示,肉鸡采食添加含有屎肠球菌的益生菌,平均日增重和日采食量有显著提高,且料重比显著减低。K. C. Mountzouris 等<sup>[4]</sup> 认为,屎肠球菌显著提高肉鸡生长性能的作用机理是其对肠道形态的有益作用。此前的研究结果显示,屎肠球菌对大肠杆菌感染的肉鸡肠道形态的发育很有益,尤其是对绒毛高度和隐窝深度<sup>[19]</sup>。但 P. A. Barrow<sup>[26]</sup> 推测,肠道微生物和营养物质的互作也有可能是其促进机体生长发育的主要原因。A. Zheng 等<sup>[27]</sup> 则对采食了屎肠球菌肉鸡的肝蛋白质组学进行了分析,认为其很有可能通过改变肉鸡的营养物质分配来促进机体的最佳养分利用。

### 3.2 屎肠球菌对大肠杆菌感染肉鸡血清生化指标的影响

研究发现,益生菌也可增加肠黏膜抗炎和促炎因子的浓度<sup>[13]</sup>。I. Ahmad<sup>[28]</sup> 证实,益生菌可能通过增加抗体 IgM 和 IgG 的产生来提高机体的免疫功能。此前的试验发现,饲喂屎肠球菌可以显著提高早期肉鸡回肠黏膜 IL-4、TNF- $\alpha$  和 S-IgA 的浓度<sup>[19]</sup>。本试验结果表明,与阳性和阴性对照组肉鸡相比,屎肠球菌组肉鸡显著增加了血清中 IgA 浓度(14~28 日龄);另一方面,21 日龄屎肠球菌组肉鸡血清中 C3 浓度显著高于阳性对照,28 日龄 C4 浓度显著高于阴性对照。以上结果表明,大肠杆菌 K88 或屎肠球菌促进了血清中 IgA 和 IgG 的分泌,与 R. R. Kulkarni 等<sup>[29]</sup> 的研究结果相似。大量试验结果也表明,益生菌可以促进肉鸡机体的免疫反应<sup>[7,14,30]</sup>。但 K. C. Mountzouris 等<sup>[6]</sup> 发现,多种益生菌(包括肠球菌)的饲喂对肉鸡血浆中免疫球蛋白的浓度没有显著作用。M. Levkut 等<sup>[18]</sup> 试验则发现,屎肠球菌 EF 55 对沙门氏菌攻毒肉鸡的外周血中淋巴细胞亚群(CD4、CD8、CD4 和 IgM)数量没有明显的影响。还需后续试验进一步探究屎肠球菌如何增加感染大肠杆菌肉鸡血清中免疫蛋白的浓度。

### 3.3 屎肠球菌对大肠杆菌感染肉鸡盲肠菌群结构的影响

本试验发现,攻毒肉鸡采食添加屎肠球菌日粮后,盲肠微生物的种类有显著增加。J. W. Park 等<sup>[31]</sup> 发现,蛋鸡饲喂屎肠球菌后,粪便中大肠杆菌的数量有显著的减少;粪便中菌群的变化伴随着体内营养物质吸收能力的提高和粪便中氨气含量的降

低。但 M. M. Gheisar 等<sup>[32]</sup> 试验结果却显示,采食添加屎肠球菌日粮的肉鸡粪便中大肠杆菌和乳酸菌的数量没有发生显著变化。此前的试验结果发现,屎肠球菌增加了肉鸡盲肠中有益微生物乳酸菌和双歧杆菌的数量,减少了大肠杆菌的数量,与其他试验结果类似<sup>[10,19,33]</sup>。综上所述,屎肠球菌是通过增加肉鸡肠道中有益菌的种类,减少有害菌的数量来调节微生物菌群的种类和多样性。

## 4 结 论

日粮中添加屎肠球菌提高了大肠杆菌感染肉鸡的生长性能,提高了免疫相关指数,改善了盲肠内菌群结构的多样性;肉鸡饲喂屎肠球菌相较于抗生素组,整个试验周期平均日增重显著增加,试验末血清中 IgA 浓度有显著提高,盲肠中菌群的多样性和丰度均有显著增加。

## 参考文献(References):

- [1] ALONSO M Z, PADOLA N L, PARMA A E, et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* contamination at different stages of the chicken slaughtering process [J]. *Poult Sci*, 2011, 90(11): 2638-2641.
- [2] BARNES H J, VAILLANCOURT J P, GROSS W B, et al. Colibacillosis [M]//SAIF Y M. Diseases of poultry. 11th Ed. Ames, IA: Iowa State Press, 2003: 631-656
- [3] SAMLI H E, SENKOYLU N, KOC F, et al. Effects of *Enterococcus faecium* and dried whey on broiler performance, gut histomorphology and intestinal microbiota [J]. *Arch Anim Nutr*, 2007, 61(1): 42-49.
- [4] MOUNTZOURIS K C, TSISTSIKOS P, KALAMARA E, et al. Evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* strains in promoting broiler performance and modulating cecal microflora composition and metabolic activities [J]. *Poult Sci*, 2007, 86(2): 309-317.
- [5] HUANG M K, CHOI Y J, HOUDE R, et al. Effects of *Lactobacilli* and an acidophilic fungus on the production performance and immune responses in broiler chickens [J]. *Poult Sci*, 2004, 83(5): 788-795.
- [6] MOUNTZOURIS K C, TSITSIKOS P, PALAMIDI I, et al. Effects of probiotic inclusion levels in broiler nutrition on growth performance, nutrient digestibility, plasma immunoglobulins, and cecal microflora compo-

- sition[J]. *Poult Sci*, 2010, 89(1): 58-67.
- [7] YANG C M, CAO G T, FERKET P R, et al. Effects of probiotic, *Clostridium butyricum*, on growth performance, immune function, and cecal microflora in broiler chickens [J]. *Poult Sci*, 2012, 91(9): 2121-2129.
- [8] KONG Q, HE G Q, JIA J L, et al. Oral administration of *Clostridium butyricum* for modulating gastrointestinal microflora in mice [J]. *Curr Microbiol*, 2011, 62(2): 512-517.
- [9] EMMANUEL D G V, JAFARI A, BEAUCHEMIN K A, et al. Feeding live cultures of *Enterococcus faecium* and *Saccharomyces cerevisiae* induces an inflammatory response in feedlot steers [J]. *J Anim Sci*, 2007, 85(1): 233-239.
- [10] LUO J J, ZHENG A J, MENG K, et al. Proteome changes in the intestinal mucosa of broiler (*Gallus gallus*) activated by probiotic *Enterococcus faecium* [J]. *J Proteomics*, 2013, 91: 226-241.
- [11] MACHA M, TARAS D, VAHJEN W, et al. Specific enumeration of the probiotic strain *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 in the intestinal tract and in faeces of piglets and sows [J]. *Arch Anim Nutr*, 2004, 58(6): 443-452.
- [12] FLEIGE S, PREIBINGER W, MEYER H H D, et al. The immunomodulatory effect of lactulose on *Enterococcus faecium* fed preruminant calves [J]. *J Anim Sci*, 2009, 87(5): 1731-1738.
- [13] CHICHLAWSKI M, CROOM W J, EDENS F W, et al. Microarchitecture and spatial relationship between bacteria and ileal, cecal, and colonic epithelium in chicks fed a direct-fed microbial, PrimaLac, and salinomycin [J]. *Poult Sci*, 2007, 86(6): 1121-1132.
- [14] CAPCAROVA M, WEIS J, HMRNCAR C, et al. Effect of *Lactobacillus fermentum* and *Enterococcus faecium* strains on internal milieu, antioxidant status and body weight of broiler chickens [J]. *J Anim Physiol Anim Nutr*, 2010, 94(5): e215-e224.
- [15] AWAD W, GHAREEB K, BOHM J. Intestinal structure and function of broiler chickens on diets supplemented with a synbiotic containing *Enterococcus faecium* and oligosaccharides [J]. *Int J Mol Sci*, 2008, 9(11): 2205-2216.
- [16] KIM Y, KIM E Y, CHOI S Y, et al. Effect of a Probiotic Strain, *Enterococcus faecium*, on the immune responses of Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2012, 22(4): 526-529.
- [17] SUN Y Z, YANG H L, MA R L, et al. Culture-independent characterization of the autochthonous gut microbiota of grouper *Epinephelus coioides* following the administration of probiotic *Enterococcus faecium* [J]. *Aquacult Int*, 2012, 20(4): 791-801.
- [18] LEVKUT M, REVAJOVÁ V, LAUKOVÁ A, et al. Leukocytic responses and intestinal mucin dynamics of broilers protected with *Enterococcus faecium* EF55 and challenged with *Salmonella Enteritidis* [J]. *Res Vet Sci*, 2012, 93(1): 195-201.
- [19] CAO G T, ZENG X F, CHEN A G, et al. Effects of a probiotic, *Enterococcus faecium*, on growth performance, intestinal morphology, immune response, and cecal microflora in broiler chickens challenged with *Escherichia coli* K88 [J]. *Poult Sci*, 2013, 92(11): 2949-2955.
- [20] BUTLER E J, CURTIS M J, HARRY E G. *Escherichia coli* endotoxin as a stressor in the domestic fowl [J]. *Res Vet Sci*, 1977, 23(1): 20-23.
- [21] GOREN E. Observations on experimental infection of chicks with *Escherichia coli* [J]. *Avian Pathol*, 1978, 7(2): 213-224.
- [22] COOK M E. Triennial growth symposium: A review of science leading to host-targeted antibody strategies for preventing growth depression due to microbial colonization [J]. *J Anim Sci*, 2011, 89(7): 1981-1990.
- [23] TAKAHASHI K, YODOGAWA S, AKIBA Y, et al. Effect of dietary protein concentration on responses to *Escherichia coli* endotoxin in broiler chickens [J]. *Br J Nutr*, 1995, 74(2): 173-182.
- [24] BELLOMO G, MANGIAGLE A, NICASTRO L, et al. A controlled double-blind study of SF68 strain as a new biological preparation for the treatment of diarrhoea in pediatrics [J]. *Curr Ther Res*, 1980, 28(6): 927-936.
- [25] BOSTAMI A B M R, ISLAM M M, AHMED S T, et al. Effect of beneficial microorganisms on growth performance, mortality and intestinal microflora in broilers [J]. *Global J Microbiol Res*, 2015, 3(2): 126-133.
- [26] BARROW P A. Probiotics for chickens [M]// Fuller R. Probiotics: The scientific basis. London: Chapman and Hall, 1992: 255-257.
- [27] ZHENG A, LUO J, MENG K, et al. Probiotic (*Enterococcus faecium*) induced responses of the hepatic proteome improves metabolic efficiency of broiler chickens (*Gallus gallus*) [J]. *BMC genomics*, 2016, 17: 89.



- [28] AHMAD I. Effect of probiotics on broilers performance[J]. *Int J Poult Sci*, 2006, 5(6): 593-597.
- [29] KULKARNI R R, PARREIRA V R, SHARIF S, et al. Immunization of broiler chickens against *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis[J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2007, 14(9): 1070-1077.
- [30] 靳二辉, 陈耀星, 王 群, 等. 芽孢杆菌类益生菌对肉鸡血细胞及免疫器官组织结构的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2013, 44(5): 778-787.
- JIN E H, CHEN Y X, WANG Q, et al. Effect of the bacillus probiotics on blood cells and structure of immune organs in broilers [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2013, 44(5): 778-787. (in Chinese)
- [31] PARK J W, JEONG J S, LEE S I, et al. Effect of dietary supplementation with a probiotic (*Enterococcus faecium*) on production performance, excreta microflora, ammonia emission, and nutrient utilization in ISA brown laying hens[J]. *Poult Sci*, 2016, 95(12): 2829-2835.
- [32] GHEISAR M M, HOSSEINDOUST A, KIM I H, et al. Effects of dietary *Enterococcus faecium* on growth performance, carcass characteristics, faecal microbiota, and blood profile in broilers[J]. *Veterin Med*, 2016, 61(1): 28-34.
- [33] CHEN K, GAO J, LI J X, et al. Effects of probiotics and antibiotics on diversity and structure of intestinal microflora in broiler chickens[J]. *Afr J Microbol Res*, 2012, 6(37): 6612-6617.

(编辑 郭云雁)