

屎腸球菌應用在養殖上的新觀念與趨勢

前言

健康禽畜的胃腸道內寄居著種類繁多的微生物，這些微生物稱為腸道菌群。目前研究得知，這些腸道菌群至少有 400 多種，每克糞便中的菌數量可達一兆以上，大致上分為類桿菌、乳桿菌、大腸桿菌和腸球菌等，它們按一定的生存原則，彼此制約或互相依存來形成生態平衡，它們的平衡影響著宿主的健康。其中，腸球菌(Enterococci)是應用最為廣泛的乳酸菌種類之一(Patterson and Burkholder, 2003)，分別被簡稱為 E 菌或 F 菌的糞腸球菌(*Enterococcus faecalis*)及屎腸球菌(*Enterococcus faecium*)在禽畜使用益生菌種類中最為普遍，因為兩種都為禽畜腸道正常菌群中的常駐菌，外觀為球菌，又能產生乳酸或是抑菌物質，被歸類為乳酸球菌，其特性可壓制著腸道潛伏性病原菌的生長，藉此協助維持腸道菌群正常生態，故經常作為動物飼料添加的益生菌，及幼禽畜的腸道保健與預防疾病上的應用。

屎腸球菌是一種革蘭氏陽性菌，外觀為橢圓球狀，生長代謝速度快，繁殖力強，某些屎腸球菌通過消化道考驗的能力佳，且對腸道上皮細胞吸附力強，將食糜中的碳水化合物發酵代謝產生有機酸或是抑菌物質，藉由細菌間的拮抗作用、競爭排除或調節免疫來改善菌相的平衡(Wageha et al., 2008)，可有效抑制腸道病原菌，維護宿主腸道健康。在禽畜改善經濟性狀上，屎腸球菌可經由改變宿主的腸道菌相，改善了肉雞、蛋雞的腸道結構與飼料效率，而仔豬則是發現可增加對葡萄糖等營養的吸收能力或減緩下痢情況(Lodemann et al., 2006; Sami et al., 2007; Underdahl et al., 1982)。

也因為有如此特殊的特性，這類的乳酸球菌廣泛地被量產與應用在各個產業，但由於腸球菌所含的抗藥性及致病性的基因已被分析出來，歐盟國家因此對於使用腸球菌即有新的規範，本文就以本公司分離的屎腸球菌 EF08 所做的研究來說明這些新規範，並證明它與其它乳酸菌並用可產生的協同好處。

屎腸球菌 EF08 的協同效益(synergistic effects)

所謂的協同效應，就是不同菌株或菌種利用不同的生理特性或產生不同的代謝產物，彼此之間或與原有腸道的有益菌互利共生，達到功能性的加乘，使宿主健康得到最大的助益。早在 1990 年，Famularo 學者就提出使用單株菌僅能使腸道環境產生微小幅度的變化，而 Champman et al (2011)則提出多株益生菌的混合，其改善腸道功能、下痢、過敏症狀、免疫機能與呼吸道感染的能力均較單株菌優異。在此就以屎腸球菌 EF08 幫助減緩下痢乳酸菌 LAP5、調節免疫乳酸菌 LP28 等兩株功能性提高其益生特性，加以說明：

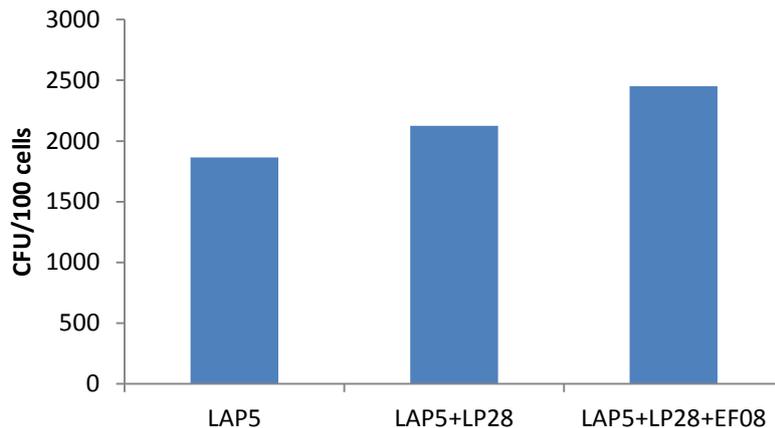


圖 1. 單株菌與複合菌對腸道吸附的差異

腸道為動物最大的免疫器官，腸道內層中有許多的淋巴結與淋巴細胞，攸關著宿主整個免疫調節，腸道的微生物更因此與宿主存在著共生的關係，腸道菌通常經由吸附到腸道細胞後，進入腸道內層產生一連串的免疫反應，故益生菌株是否具有吸附腸道上皮細胞的能力，對其發揮調節免疫力是非常重要的機制。圖 1 顯示，複合菌(LAP5+LP28+EF08)對腸細胞的吸附力較單株菌(LAP5)提升了 30%左右，跟有些研究發現複合菌株可以提升其中某些菌吸附腸道能力的結論相同 (Collado *et al.*, 2007; Ouwehand *et al.*, 2000)。比較三種組合的吸附數量，EF08 的添加有助於乳酸菌在腸道吸附的數量，推論可能是利用不同代謝產物來增加其中某些菌的吸附，進而達到調節腸道免疫與抵禦腸內病菌的侵入。

超級細菌的產生

雖然屎腸球菌在人用保健或動物益生菌的應用行之有年，並且使用範圍非常廣泛，但因腸球菌引起院內感染病例頻傳，腸球菌的耐藥性導致無藥物可醫治的「超級細菌」的產生，引起醫療上的瓶頸，故近十年對腸球菌的研究紛紛轉向菌株的安全性評估，包括糞腸球菌(*E. faecalis*)與屎腸球菌耐藥性與致病因子的研究，使用益生菌歷史悠久的國家-歐盟於 2012 年禁止糞腸球菌在人用與動物益生菌的使用，故屬於腸球菌的益生菌僅剩下屎腸球菌，通常會導致疾病或感染的球菌有二點特徵，包括含有 IS16、Esp、hyl-like 等基因與抗藥性，下列先針對上述的致病基因說明：

1. IS16 (hospital associated strain marker)

此因子可讓腸球菌與抗藥性因子 Tn1547 產生置換作用，讓腸球菌產生抗藥性。例如具有抗萬古黴素(vancomycin)的糞腸球菌就是帶有這因子，所以才帶有抗藥性。

2. Esp (pathogenicity island (PAI) marker)

Esp 為一種屎腸球菌菌體表面的大分子蛋白質，在動物試驗中，證實 Esp 存在與心膜炎(endocarditis)及泌尿道感染有關，並且也在對安匹西林(Ampicillin)與萬古黴素(vancomycin)等抗生素產生耐藥性的屎腸球菌也會發現這因子的存在。

3. *hyl*-like gene:

該基因常發現在造成院內感染分離出的屎腸球菌，*hyl* 基因存在可幫助屎腸球菌在腸道的吸附力(Arias *et al.*, 2009)，並且在小鼠實驗也證實它會增加鼠類腹膜炎(peritonitis)的致死力。

安全性評估

歐盟認為做為動物用益生菌的屎腸球菌，除了必須不能帶有上述的特徵外，還必須對安匹西林(Ampicillin)不具敏感性，才可作為動物益生菌，故明文規定了用在動物養殖的屎腸球菌必須測定對安匹西林的敏感性，若 MIC>2 mg/L 則不允許使用(EFSA, 2012)。下列將以屎腸球菌 EF08 與其他院內感染的屎腸球菌菌株比較，加以說明：

1. 抗安匹西林(Ampicillin)試驗

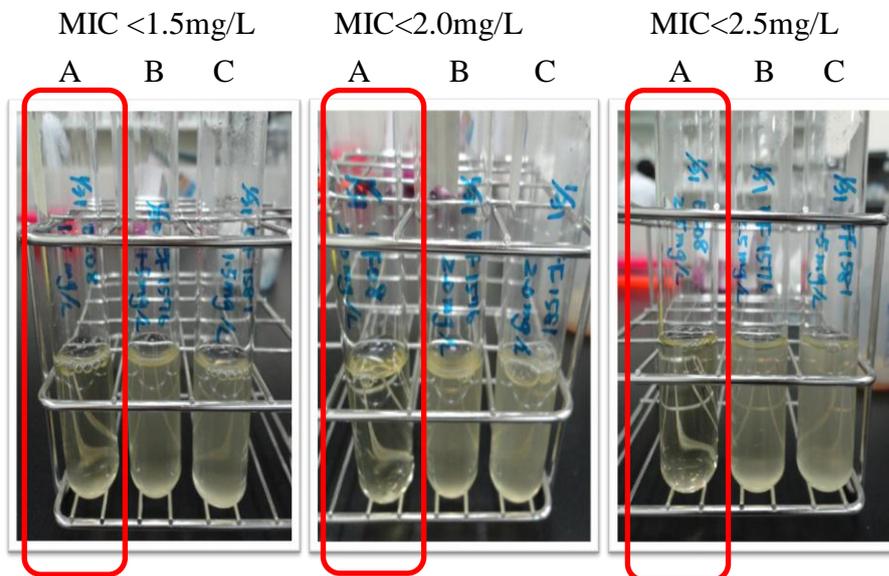


圖 1. 三株屎腸球菌對安匹西林(Ampicillin)的敏感性

圖 1 為屎腸球菌 EF08(A 框線處)與從臨床分離的病原菌屎腸球菌 1576 (B)與 1581 (C)兩株菌在 MIC 不同濃度下培養的情形。如圖 1 所示，屎腸球菌 EF08 的培養液為澄清，表示無法生長，其他造成院內感染的 *E. faecium* 1576、1581 培養液為混濁，顯示對不同濃度的 Ampicillin 可產生抗性，因此證明屎腸球菌 EF08 符合 EFSA 所公布的抗藥性的測試。

2. 含致病因子分析

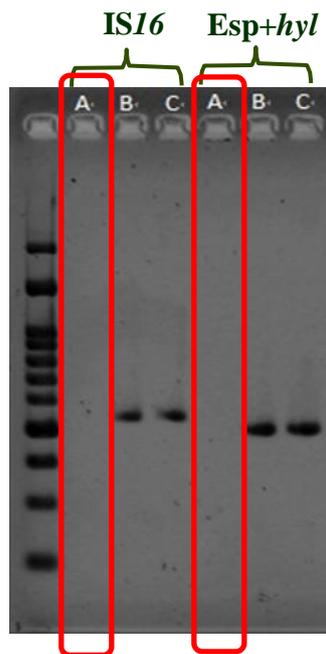


圖 2. 三株屎腸球菌利用分子檢測技術分析致病因子的存在

圖 2 為以分子鑑定技術分析屎腸球菌 EF08(A 框線處)與從臨床分離的病原菌屎腸球菌 1576 (B) 與 1581(C)共三株菌是否存有 IS16、Esp 與 hyl-like 等三種致病基因，結果顯示，EF08 菌株沒有存在上述三種致病因子，可視為安全的屎腸球菌。

綜上所述，益生菌株無法只靠一株菌的力量或是單個功能性的影響而呈現出效益，必須兼顧產生抗菌物質與競爭排除等功能，方能達到保護動物健康的目的，也意指動物益生菌必須兼顧多重功能性，且在使用前應該詳細評估菌株的組合與使用(Kosin and Rakshit, 2006)，添加 EF08 有助於防治下痢乳酸菌 LAP5 與免疫調節功能 LP28 吸附在腸道中，有利於發揮其益生功能。

並且使用在動物飼養上的屎腸球菌，先得要確認是否對安匹西林的敏感性(<2mg/L)，及不含 IS16、Esp 與 hyl-like gene 等三種致病因子，才能確認屎腸球菌的安全性，方能做為動物益生菌使用，而屎腸球菌 EF08 通過耐藥性與致病因子的測定，實屬安全無虞益生菌。

以專業乳酸菌開發製造著名的生合生物公司，獨創 SYNTEK® thorough 菌種優化技術，以不同功能性篩選平台，從 2000 多株挑出具免疫調節、定殖與抑菌能力佳的乳酸菌，再根據不同菌株不同組合的協同作用試驗，篩選來自台灣健康豬隻腸道、獲得專利功能確效的禽畜專屬嗜酸乳桿菌 LAP5 及植物乳桿菌 LP28 與屎腸球菌 EF08 等三株不同功能，並具有更好協同作用的乳酸菌，組合成芯來旺動物益生菌產品，經動物試驗確認，具有防止害菌侵入、減緩動物下痢與維持禽畜健康腸道的機能，並發表國際文獻。

參考文獻:

- Arias, C. A., D. Panesso, K. V. Singh, L. B. Rice, and B. E. Murray. 2009. Cotransfer of antibiotic resistance genes and a hylEfm-containing virulence plasmid in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:4240-4246.
- Collado, M. C., J. Meriluoto, and S. Salminen. 2007. Development of New Probiotics by strain combinations is it possible to improve the adhesion to intestinal mucus? *J. Dairy Sci.* 6:2710-2716.
- EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). 2012. Guidance on the safety assessment of *Enterococcus faecium* in animal nutrition. *EFSA Journal.* 10:2682.
- Patterson, J. A., and K. Burkholder. 2003. Application of prebiotic and probiotic in poultry production. *Poul. Sci.* 82:627-631.
- Wegeha, A., K. Ghareeb, and J. Böhm. 2008. Intestinal structure and function of broiler chickens on diets supplemented with a symbiotic containing *Enterococcus faecium* and oligosaccharides.
- Lodeman, U., K. Hübener, N. Jansen, and H. Martens. 2006. Effects of *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 as probiotic supplement on intestinal transport and barrier function of piglets. *Arch. Anim. Nutr.* 60:35-48.
- Underdahl, N. R., A. Torees-Medina, and A. R. Dosten. 1982. Effect of *Streptococcus faecium* C-68 in control of *Escherichia coli*-induced diarrhea in gnotobiotic pigs. *Am. J. Vet. Res.* 43:2227-2232.
- Samli, H. E., N. Senkoylu, F. Koc, M. Kanter, and A. Aagma. 2007. Effects of *Enterococcus faecium* and dried whey on broiler performance, gut histomprphology and microbiota. *Arch. Anim. Nutr.* 61:42-49.