

益生菌 *Lactobacillus amylovorus* S1 对仔猪后肠菌群的影响

苏 勇 姚 文 朱伟云*

(南京农业大学消化道微生物研究室 南京 210095)

摘 要 结合 PCR/DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis, 变性梯度凝胶电泳) 和 16S rDNA 序列分析技术, 研究添加益生菌 *Lactobacillus amylovorus* S1 后仔猪从 7 至 35 日龄 (断奶后两周) 后肠菌群的变化。6 窝新生仔猪被随机分成两组: 对照组和处理组, 处理组仔猪于 7、9 和 11 日龄口服 *L. amylovorus* S1 菌液 (活菌数 5×10^9 CFU/mL), 分别于 7、14、21、24 和 35 日龄, 每窝随机屠宰一头仔猪, 收集肠道样品。比较不同日龄仔猪后肠菌群 DGGE 图谱表明, 断奶后图谱中多数高 GC 含量细菌条带消失, 至断奶后两周又逐渐出现。序列分析显示, 这些高 GC 含量细菌主要为乳酸杆菌。统计分析表明, 仔猪口服益生菌 S1 对其盲肠和结肠菌群的多样性指数无显著影响。通过比较处理组和对照组图谱发现, 处理组 14 日龄出现一特异条带, 与其匹配的序列的最相似已知菌为 *Clostridium disporicum*, 相似性为 95%, 而 35 日龄对照组有一特异优势条带, 该条带被鉴定为猪链球菌 (*Streptococcus suis*) 相似性为 99%。

关键词: PCR/DGGE; *Lactobacillus amylovorus* S1; 仔猪; 后肠; 菌群

中图分类号: S811.6 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2006)06-0961-06

正常哺乳动物后肠栖息着大量的微生物, 这些微生物及其代谢产物在营养、免疫等方面对宿主起着有益作用^[1]。近年来, 关于动物肠道微生态的研究日益受到人们重视, 一方面, 人们试图从肠道微生态角度寻求作为动物促生长剂——抗生素的替代品; 另一方面, 动物肠道被认为是人肠道研究理想的模型。益生菌是一类通过改善动物胃肠道微生物区系平衡而促进动物健康和生长的活菌制剂^[2], 目前已被广泛用于生产中, 但其应用效果的报道还很不一致, 这主要是因为人们对其作用机理的了解还不完全^[3]。随着分子生物学的迅速发展, 无需进行细菌培养的基于 16S rDNA 的 DGGE 和序列分析技术已被引入动物胃肠道菌群区系的研究中^[4,5]。已有一些研究者应用 DNA 指纹技术研究了口服益生菌后仔猪粪便菌群的变化^[6,7], 但粪便样品并不能完全代表动物体内的真实情况^[8]。

Lactobacillus amylovorus S1 菌株由本研究室分离自仔猪肠道, 已有的研究表明其具有较好的体外益生特性^[9]和生产应用效果^Δ。本试验利用 PCR/DGGE 和序列分析技术研究益生菌 S1 对仔猪后肠菌群的影响, 探索新生仔猪肠道菌群发育过程中某些与宿主健康有关的细菌及益生菌的部分作用机理。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 益生菌 S1 菌液: S1 菌株, *L. amylovorus*, 分离自仔猪消化道。将活化后的 S1 菌株接种至 MRS 液体培养基中, 37°C 下培养 12h 后, 培养液在 4°C、3000 × g 离心 10min, 弃上清, 用无菌 10% 脱脂乳液调整至原体积, 该菌液 10 倍稀释后用于动物试验。

1.1.2 主要试剂和仪器: Taq 酶、dNTP 和 PCR 产物纯化试剂盒 (上海申能博彩); pGEM-T 载体 (Promega); 引物合成和序列测定 (Invitrogen); DCode DGGE 系统、GS-800 灰度扫描仪和 Molecular Analyst 1.12 分析软件 (Bio-Rad)。

1.2 实验设计

选取江苏某猪场产期相近、胎次相似、窝仔数在 8~11 头的 6 窝初生仔猪 (杜 × 长 × 大) 随机分成两组: 处理组 (窝号 1#、2#、3#) 和对照组 (窝号 4#、5#、6#), 每窝为一个重复。于仔猪 7、9、11 日龄早晨 8:00 点, 处理组分别给每头仔猪滴灌 1、2、3mL S1 活菌制剂 (每毫升活菌数 5×10^9); 对照组分别给每头仔猪滴灌 1、2、3mL 1% 脱脂乳液。试验期间, 试验猪不进行免疫, 21 日龄断奶, 断奶前不饲喂开食料, 断奶

基金项目: 国家 973 项目 (2004CB1175004); 国家杰出青年科学基金资助项目 (30025034)

* 通讯作者。Tel: 86-25-84395523; E-mail: zhuweiyunnjau@hotmail.com

作者简介: 苏 勇 (1979 -) 男, 江苏省海安人, 博士研究生, 主要从事消化道微生物研究。E-mail: suney7912@yahoo.com

收稿日期: 2006-02-23; 接受日期: 2006-05-08; 修回日期: 2006-06-05

Δ 董红军. 寡糖与乳酸菌益生作用体外评定及应用研究. 南京农业大学硕士论文, 南京, 2005: 60-65.

后日粮不含抗生素 其它按常规饲养管理。

1.3 样品采集

于仔猪 7、14、21、24、35 日龄时,处理组和对照组每个重复随机屠宰一头仔猪,于冰面上以无菌方式收集肠道样品, -20℃ 下保存。

1.4 样品总 DNA 的提取与 PCR 反应

参照 Zoetendal 等^[10]的方法,先用珠磨法机械破碎样品,而后用酚和氯仿/异戊醇提取其总 DNA。采用一对细菌通用引物 U968f (5'-CGCCCGGGCGCCGCCCCGGGCGGGCGGGGCACGGGGGAACGCGAAGAACCTTAC-3') 和 L1401r (5'-CGGTGTGTACAAGACCC-3') 对细菌的 16S rDNA 的 V6-V8 区片段进行 PCR 扩增^[11]。PCR 反应产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 DGGE 及图谱分析

参照 Muyzer 等^[12]的方法,对 PCR 扩增产物进行 DGGE 分析。DGGE 用 8% 聚丙烯酰胺凝胶(含丙酰胺、二丙酰胺、尿素、甲酰胺和甘油),尿素浓度梯度为 38% ~ 51%。电泳采用 Dcode DGGE 系统,首先在 200V 电压下预电泳 5 ~ 10min,随后在 85V 的固定电压下电泳 12h。电泳结束后,进行硝酸银染色^[13],凝胶显色定影后用 GS-800 灰度扫描仪扫描。DGGE 图谱用 Molecular Analyst 1.12 软件进行多样性分析。一个由已知细菌克隆组成的参考样品所形成的 DGGE 图谱作为位置校正的标准图谱,校正后每个样品的图谱经软件转化后均能产生一条密度曲线,根据密度曲线对不同样品的 DGGE 谱带进行细菌区系的 Shannon-Weaver 多样性指数(Shannon index)分析: $H = -\sum P_i \log P_i$, P_i : 某一种菌(DGGE 图谱中的一条谱带)在整个样品中的优势概率,由公式 $P_i = n_i/H$ 计算, n_i : 密度曲线上某一谱带的峰高, H : 所有峰高的和^[14]。

1.6 特殊条带的序列测定和分析

一对细菌通用引物 8f [5'-CACGGATCCAGAGTTTGA(C/T)(A/C)TGGCTCAG-3'] 和 1510r [5'-GTGAAGCTTAGGG(C/T)TACCTTGTACTT-3'] 作为 PCR 引物用于引导细菌 16S rDNA 全序列的扩增。扩增产物经 PCR 产物纯化试剂盒纯化后,插入 pGEM-T 载体并转化入 *E. coli* JM109。以 T7 (5'-ATTACGCACACTTATAGG-3') 和 SP6 (5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3') 为引物进行 PCR 反应以检测插入子的大小。插入子正确(约 1.6kb)的克隆扩增其 16S rDNA 的 V6-V8 区域并与原样品在 DGGE 胶上进行比较,寻找匹配的条带。与原样品

有匹配条带的克隆送至 Invitrogen 公司测序。序列的同源性通过互联网与 GenBank 进行比较(网址: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

1.7 核苷酸序列的基因库登录号

本试验所测仔猪后肠细菌 16S rDNA 克隆序列及 S1 菌株 16S rDNA 序列均已被 GenBank 收录,登录号分别为: DQ318869-DQ318871, DQ318873, DQ318875, DQ256404, DQ238609, DQ238611, DQ480422, DQ487214, DQ487215, DQ238615, DQ238616 及 DQ480421。

1.8 数据处理

数据经 Excel 初步处理后,采用 SPSS10.0 统计软件对同日龄处理和对照组数据进行 t 检验。

2 结果和分析

2.1 仔猪盲肠、结肠菌群多样性

由图 1 可见,处理组和对照组仔猪盲肠菌群的多样性指数随仔猪日龄变化不大,两组间无显著差异 ($P > 0.05$);而仔猪结肠菌群的多样性指数在断奶后 3d 有下降趋势,至 35 日龄又恢复到断奶前水平,处理组菌群的多样性指数在 14 和 21 日龄较对照组有所提高,但差异不显著 ($P > 0.05$)。

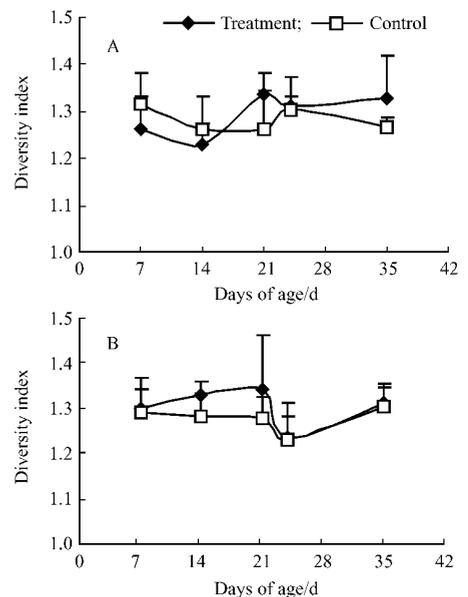


图 1 仔猪盲肠(A)和结肠(B)菌群多样性指数

Fig. 1 Diversity index of bacterial community of hindguts in piglets. A: Cecum; B: Colon.

2.2 益生菌 S1 在仔猪盲肠、结肠的存活

由图 2 的 21、24 和 35 日龄的 DGGE 图谱显示,断奶前(7、14 和 21 日龄,其中 7 和 14 日龄图谱未在图中显示),处理组和对照组仔猪盲肠和结肠样品的

DGGE 图谱中均存在与 S1 菌株相同位置的条带, 断奶后 3d, 该条带均消失, 至 35 日龄, 处理组两头仔猪样品图谱中该条带又逐渐出现。根据 DGGE 的原理, 相同位置的条带代表着相同的细菌。因此以上

结果说明, 从 7 日龄起 S1 菌株就已经是仔猪后肠中的优势菌, 而仔猪口服 S1 菌株具有有利于断奶后该菌株在仔猪后肠中重新成为优势菌的趋势。

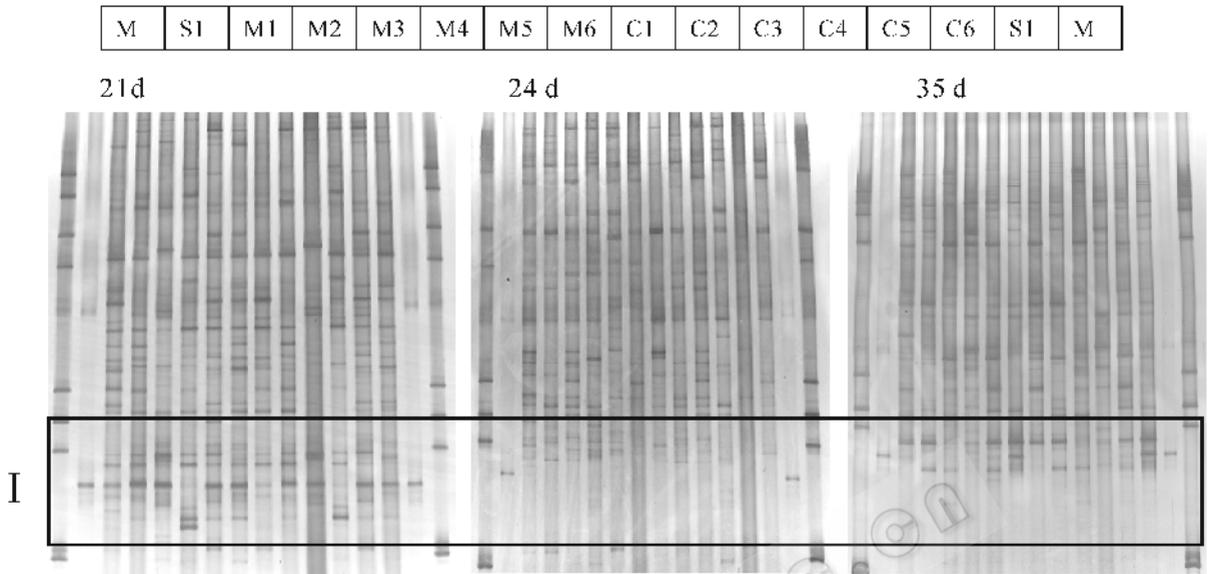


图 2 仔猪后肠细菌 DGGE 图谱

Fig.2 DGGE profiles from bacteria of hindguts in piglets. The distribution of samples on the gels is showed in the above table. M stands for Marker, S1 stands for probiotic strain S1, M1-3 and M4-6 stand for caecal samples in control and treatment groups respectively, C1-3 and C4-6 stand for colonic samples in control and treatment groups respectively. The same as follows.

2.3 高 GC 含量菌群随日龄变化

通过比较 5 个时间点的 DGGE 图谱发现, 断奶前、后图谱间有较大差异, 由图 2 方框 I 处可见, 与断奶前相比, 断奶后 3d, 仔猪后肠菌群 DGGE 图谱中高 GC 含量细菌条带多数消失, 至断奶后两周, 一些条带又逐渐出现。通过对样品细菌总 DNA 中 16S rDNA 进行克隆、测序并与 GenBank 中序列比对, 鉴定出这些消失的高 GC 含量菌主要为乳酸杆菌 (图 3 和表 1)。并且, 与 S1 菌株条带在 DGGE 图谱中有相同位置的条带被鉴定出也是 *L. amylovorus*。

2.4 处理组和对照组 DGGE 图谱差异条带的鉴定

通过比较处理组和对照组 DGGE 图谱发现, 14 日龄时, 图 4-A 方框 I 所标之条带为处理组仔猪 DGGE 图谱共有条带, 而对照组没有出现; 35 日龄

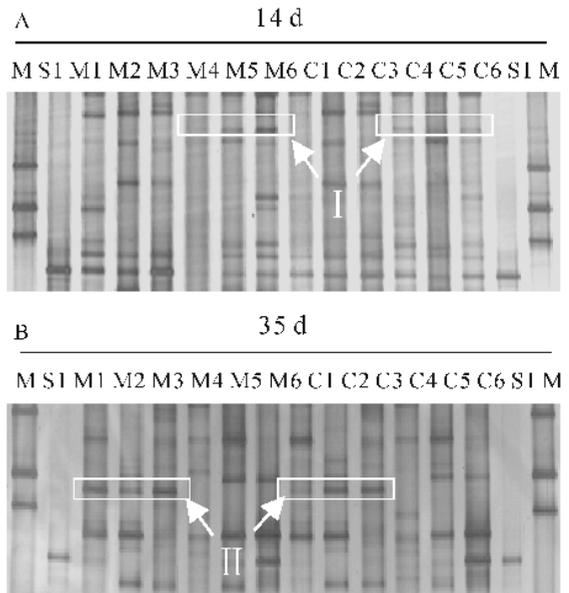


图 4 DGGE 图谱特殊条带鉴定

Fig. 4 Identification of specific bands in DGGE profiles. M. Marker.

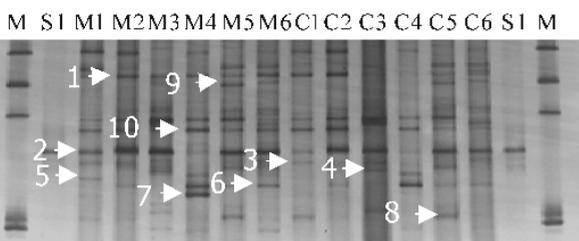


图 3 21 日龄仔猪后肠高 GC 含量菌 DGGE 图谱

Fig.3 DGGE profiles from high G + C% bacteria of hindguts in piglets on D 21. Bands numerated with arrows in gels were identified as showed in table 1. M. Marker.

表 1 高 GC 含量细菌的鉴定

Table 1 Identification of high G + C mol% bacteria of hindguts in piglets

| No. | Closest known species found in the GenBank database | Length (bp) | Sequence accession numbers | Percentage of similarity |
|-----|---|-------------|----------------------------|--------------------------|
| 1 | <i>Lactobacillus vaginalis</i> | 1502 | DQ318870 | 99% |
| 2 | <i>Lactobacillus amylovorus</i> | 1501 | DQ487214 | 99% |
| 3 | <i>Lactobacillus johnsonii</i> | 1538 | DQ238616 | 99% |
| 4 | <i>Lactobacillus amylovorus</i> | 1501 | DQ318869 | 99% |
| 5 | <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. | 1522 | DQ318871 | 98% |
| 6 | <i>Lactobacillus pontis</i> | 1521 | DQ318875 | 99% |
| 7 | <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. | 1290 | DQ480422 | 97% |
| 8 | <i>Lactobacillus amylovorus</i> | 1501 | DQ318873 | 97% |
| 9 | <i>Ruminococcus obeum</i> | 1501 | DQ238615 | 96% |
| 10 | <i>Lactobacillus reuteri</i> | 1525 | DQ487215 | 99% |

时,图 4-B 方框 II 所标条带为对照组仔猪 DGGE 图谱共有条带,而未在处理组出现。图中虽然还有其它一些差异条带,但只有这两条条带是同组 3 头仔猪都出现或消失。克隆、测序分析表明,与 14 日龄处理组出现的条带相匹配最相似的菌属于 *Clostridium disporicum* (DQ238611) 相似性为 95%;而与 35 日龄对照组的特异条带相匹配的最相似细菌为 *Streptococcus suis* (DQ256404) 相似性为 99%。

2.5 白痢、腹泻仔猪的菌群变化

试验过程中,对照组有一头仔猪(21d, 3#)发生白痢,一头仔猪(35d, 2#)发生腹泻,通过与同日龄其它健康仔猪结肠菌群 DGGE 图谱对比,发现其结肠菌群中某些优势条带消失,其中一个优势条带在其它健康仔猪图谱中均存在(图 5 箭头 III 所标),该条带被鉴定为 *C. glycolicum* (DQ238609, 97%)。对其图谱进行分析表明,菌群多样性指数分别是 1.14 和 1.27,明显低于同日龄健康仔猪的。

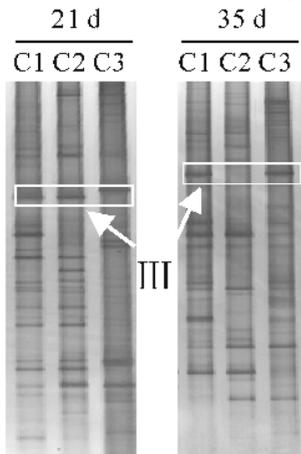


图 5 白痢、腹泻与健康仔猪的菌群 DGGE 图谱比较

Fig. 5 Comparison of DGGE profiles between healthy and diarrheal piglets.

3 讨论

本试验主要目的是研究 *L. amylovorus* S1 对仔猪后肠菌群的影响。一般认为,益生菌主要通过改善动物胃肠道菌群区系平衡而对宿主发挥有益作用,而菌群多样性指数是反映菌群区系平衡的一个重要指标,通常该数值越高,菌群区系平衡就越难被破坏。本研究中,仔猪 7 日龄时,这一指标数值达到 1.30 左右,与国外研究结果相比该指数处于较高水平^[14],这说明在口服 S1 菌液前本试验中的仔猪后肠菌群就处于较平衡的状态;本研究还发现腹泻和白痢仔猪后肠菌群发生很大变化,这一指标也显著下降,而腹泻、白痢的发生是质变过程,因此健康和发病仔猪之间存在较大差异。口服 *L. amylovorus* S1 对仔猪后肠菌群多样性指数无显著影响可能与上述原因有关,而国际上相关研究报道的结果也多为不显著^[14~16]。通过比较两组间的 DGGE 图谱发现,14 日龄,处理组仔猪后肠出现一与 *C. disporicum* 最相似的细菌,梭菌是仔猪后肠的优势菌,多数梭菌能代谢产生丁酸,对宿主后肠的健康起有益作用^[17]。同时,本研究还从健康仔猪后肠中鉴定出一优势菌——*C. glycolicum*,该菌存在于所有健康仔猪,而当仔猪发生腹泻、白痢时,该菌从优势菌群中消失,因此提示该菌可能对宿主健康有益,但是该菌是否与仔猪健康有关还有待进一步研究。35 日龄,对照组仔猪后肠出现一优势菌——猪链球菌。该菌是一种能够感染猪和人的致病菌,其中猪链球菌血清 2 型已成为我国当前人兽共患病一种重要的新病原菌。2005 年,我国四川省发生猪链球菌感染人事件,造成多人死亡,引起兽医界和医学界的高度重视。本研究说明该菌正常存在于猪场,但是否是

感染人类的 2 型猪链球菌还有待进一步研究。

乳酸杆菌是仔猪肠道中的优势菌群^[18],它们不仅对维持宿主肠道功能和健康有益,而且还有抑制潜在病原菌的作用^[19]。本研究利用 DGGE 和序列分析技术发现,哺乳阶段仔猪后肠中乳酸杆菌的种类很多,但断奶后大多数种类消失,至断奶后两周还未能恢复到断奶前的水平,这很有可能是仔猪断奶后易发生腹泻的一个重要原因。一般认为,动物肠道菌群发育不完善或菌群变化较剧烈时是添加益生菌的最佳时间,本试验采用 7、9、11 日龄给仔猪灌喂益生菌 S1,一方面,考虑到此时仔猪肠道菌群发育还不完善,易受外来因素影响,另外一方面,考虑到在我国仔猪生产中多采用 7 日龄添加开食料。根据 DGGE 的原理,同种细菌在 DGGE 图谱的相同位置的条带,因此, DGGE 指纹技术也可用于对目标菌株的示踪^[6,20]。本研究发现,哺乳阶段 *L. amylovorus* S1 菌株确实在仔猪肠道中自然存在,而断奶后该菌在 DGGE 图谱中消失,但 35 日龄时,处理组仔猪后肠菌群图谱早于对照组重新出现该菌条带,这说明虽然断奶后对照组和处理组仔猪后肠中该菌在总菌群中的比例下降而未在 DGGE 图谱中出现条带。Zoetendal 等^[10]研究表明,只有样品菌群中的较优势菌才能在 DGGE 图谱中出现条带,因此,处理组该菌的数量可能明显高于对照组。

综上所述,断奶后,仔猪后肠菌群发生较大变化,主要表现为高 GC 含量细菌(主要为乳酸杆菌)的消失;口服益生菌 *L. amylovorus* S1 对仔猪后肠菌群区系多样性影响不明显,但促进了某些菌如 *C. disporicum* 的增殖,而减少了猪链球菌的数量,但是这些菌是否直接与仔猪健康相关还有待于进一步深入的研究。

参 考 文 献

- [1] Savage DC. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol*, 1977, **31**: 107 - 133.
- [2] Fuller R. A review: probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol*, 1989, **66**: 365 - 378.
- [3] Simon O, Jadamus A, Vahjen W. Probiotic feed additives-effectiveness and expected modes of action. *J Anim Feed Sci*, 2001, suppl. **1**: 51 - 57.
- [4] Simpson JM, McCracken VJ, White BA, et al. Application of denaturing gradient gel electrophoresis for the analysis of the porcine gastrointestinal microbiota. *J Microbiol Meth*, 1999, **36**: 167 - 179.
- [5] Zhu WY, Williams BA, Akkermans ADL. Development of the microbial community in weaning piglets. *Reprod Nutr Dev*, 2000, **40**: 180.
- [6] Simpson JM, McCracken VJ, Gaskins HR, et al. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA amplicons to monitor changes in fecal bacterial populations of weaning pigs after introduction of *Lactobacillus reuteri* strain MM53. *Appl Environ Microb*, 2000, **66**: 4705 - 4714.
- [7] Walter JG, Tannock A, Tilsala - Timisjarvi S, et al. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Appl Environ Microb*, 2000, **66**: 297 - 303.
- [8] Zoetendal EG, von Wright A, Vilponen-Salmela T, et al. Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Appl Environ Microb*, 2002, **68**: 3401 - 3407.
- [9] 吴慧芬, 毛胜勇, 姚文, 等. 猪源乳酸菌产乳酸及其抑菌特性研究. *微生物学通报*, 2005, **1**: 79 - 84.
- [10] Zoetendal EG, Akkermans ADL, De Vos WM. Temperature gradient gel electrophoresis analysis from human fecal samples reveals stable and host specific communities of active bacteria. *Appl Environ Microb*, 1998, **64**: 3854 - 3859.
- [11] Nübel U, Engelen B, Felske A, et al. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J Bacteriol*, 1996, **178**: 5636 - 5643.
- [12] Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes encoding for 16S rRNA. *Appl Environ Microb*, 1993, **59**: 695 - 700.
- [13] Sanguinetti CJ, Dias Neto D, Simpson AJG. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, 1994, **17**: 915 - 919.
- [14] Konstantinov SR, Zhu WY, Williams BA, et al. Effect of fermentable carbohydrates on piglet faecal bacterial communities as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA. *FEMS Microbiol Ecol*, 2003, **43**: 225 - 235.
- [15] McCracken VJ, Simpson JM, Mackie RI, et al. Molecular ecological analysis of dietary and antibiotic-induced alterations of the mouse intestinal microbiota. *J Nutr*, 2001, **131**(6): 1862 - 1870.
- [16] Konstantinov SR, Awati A, Smidt H, et al. Specific response of a novel and abundant *Lactobacillus amylovorus*-like phylotype to dietary prebiotics in the guts of weaning piglets. *Appl Environ Microb*, 2004, **70**: 3821 - 3830.
- [17] Pryde SE, Duncan SH, Hold GL, et al. The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiol Lett*, 2002, **217**: 133 - 139.
- [18] Bateup J, Dobbins S, Munro K, et al. Molecular analysis of the composition of *Lactobacillus* populations inhabiting the stomach and caecum of pigs. *Microb Ecol Health Dis*, 1998, **10**: 95 - 102.
- [19] Henriksson A, Andre' L, Conway P. Distribution of Lactobacilli in the porcine gastrointestinal tract. *FEMS Microbiol Ecol*, 1995, **16**: 55 - 60.
- [20] Ercolini D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *J Microbiol Meth*, 2004, **56**: 297 - 314.

Changes of bacterial flora from hindguts of piglets after oral administration of *Lactobacillus amylovorus* S1 as a probiotic strain

SU Yong, YAO Wen, ZHU Wei-yun*

(Laboratory of Gastrointestinal Microbiology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Changes of bacterial flora from hindguts of piglets from 7 to 35 days of age (two weeks after weaning) were studied after oral administration of *L. amylovorus* S1, using molecular techniques based on 16S rDNA gene. Six litters of neonatal piglets were divided randomly into control group and treatment group. At 7, 9, 11 days of age, piglets in treatment group received 1, 2 and 3 mL preparation of S1 (5×10^9 CFU/mL) through oral administration, respectively. On D 7, 14, 21, 24 and 35, one piglet from each litter was slaughtered and samples of hindguts were collected for analysis. The results showed that high G + C mol% bacteria in hindguts of piglets disappeared after weaning and restored gradually two weeks later. Sequencing analysis indicated that most of these high G + C mol% bacteria belonged to *Lactobacillus* spp.. Statistical analysis showed that treatment with S1 had no marked effect on diversity index of predominant bacteria from hindguts in piglets. By comparing the bands in DGGE profiles between two groups, a specific band in treatment group was found in profiles from piglets at 14 days of age, sequence matched with that showed 95% similarity to *Clostridium disporicum*. At 35 days of age, another specific band appeared in control group, which was identified to be *Streptococcus suis* (99%).

Keywords: PCR/DGGE; *Lactobacillus amylovorus* S1; Piglet; Hindgut; Bacterial community

Foundation item: National Basic Research Program of China (2004CB1175004); National Natural Science Foundation of China (30005005)

* Corresponding author. Tel: 86-25-84395523; E-mail: zhuweiyunnjau@hotmail.com

Received 23 February 2006/Accepted 8 May 2006/Revised 5 June 2006