

李曼曼, 丁雪东, 贺濛初, 等. 饲喂高蛋白饲料对雏鹅盲肠微生物菌群的影响 [J]. 华南农业大学学报, 2019, 40(3): 6-13.
LI Manman, DING Xuedong, HE Mengchu, et al. Effects of feeding high-protein diets on cecal microflora of goslings[J]. Journal of South China Agricultural University, 2019, 40(3): 6-13.

饲喂高蛋白饲料对雏鹅盲肠微生物菌群的影响

李曼曼, 丁雪东, 贺濛初, 王 志, 李 玉, 王希春, 冯士彬, 李锦春, 吴金节
(安徽农业大学 动物科技学院, 安徽 合肥 230036)

摘要:【目的】研究饲喂不同蛋白质质量分数的饲料对雏鹅盲肠微生物菌群结构和数量的影响。【方法】选取 1 日龄雁鹅 72 只, 随机分成 3 组: A、B 和 C 组分别饲喂质量分数为 16%、20% 和 24% 的粗蛋白。在第 14 天每组取 6 只雁鹅盲肠内容物, 进行细菌培养、分离和计数; 另每组取 3 只雁鹅盲肠内容物, 根据细菌 16S rDNA 的保守性设计引物, 采用 IlluminaHiSeq 测序平台对细菌 16S rDNA 的 V4 区基因进行测序, 根据序列进行微生物物种多样性分析。【结果】A、B 和 C 组共获得 1 066 175 条高质量的细菌 16S rDNA 序列, 3 组共有操作分类单元(OTU)数目为 1 013 个, 主成分 1(PC1)对检测到的总微生物的贡献率为 46.64%, 主成分 2(PC2)的贡献率为 16.46%。门水平上的优势菌群为放线菌门 Actinobacteria、拟杆菌 Bacteroidetes、厚壁菌门 Firmicutes、变形菌门 Proteobacteria 和疣微菌门 Verrucomicrobia 等; 科水平上的优势菌群为拟杆菌科 Bacteroidaceae、肠杆菌科 Enterobacteriaceae、毛螺菌科 Lachnospiraceae、疣微菌科 Ruminococcaceae 和理研菌科 Rikenellaceae; 属水平上的优势菌群为艾克曼菌属 *Akkermansia*、拟杆菌属 *Bacteroides*、棒状杆菌 *Corynebacterium* 和乳酸菌属 *Lactococcus*。与 A 组相比, C 组双歧杆菌 *Bifidobacterium* 的数量显著降低 ($P<0.05$), C 组大肠埃希菌 *Escherichia coli* 和沙门氏菌 *Salmonella* 数量显著升高 ($P<0.05$)。【结论】饲喂高蛋白饲料使雏鹅盲肠微生物菌群多样性和丰度发生变化, 使双歧杆菌和乳酸杆菌的数量减少, 使大肠埃希菌和沙门氏菌数量增加。

关键词: 高蛋白饲料; 雏鹅; 盲肠; 微生物菌群; 高通量测序
中图分类号: S835 文献标志码: A 文章编号: 1001-411X(2019)03-0006-08

Effects of feeding high-protein diets on cecal microflora of goslings

LI Manman, DING Xuedong, HE Mengchu, WANG Zhi, LI Yu, WANG Xichun, FENG Shibin, LI Jinchun, WU Jinjie
(College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: 【Objective】To study the effects of feeding the diets at different protein levels on the structure and number of cecal microflora in goslings. 【Method】Seventy-two one-day-old geese were randomly divided into three groups, including group A, B and C fed with diets containing 16%, 20% and 24% crude protein, respectively. On the 14th day, the cecum contents of six geese in each group were used for bacterial culture, isolation and counting. The cecal contents of other three geese in each group were taken, and primer sequences were designed according to the conservation of bacterial 16S rDNA. The V4 region genes of bacterial 16S rDNA were sequenced based on the IlluminaHiSeq sequencing platform, and microbial species diversity was analyzed based on the sequences. 【Result】A total of 1 066 175 high-quality bacterial 16S rDNA sequences were obtained from group A, B and C. The total number of operational taxonomic unit(OTU) shared by three

收稿日期: 2018-07-29 网络首发时间: 2019-04-16 09:12:00
网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20190412.1740.032.html>
作者简介: 李曼曼(1991—), 女, 硕士研究生, E-mail: 18317715009@163.com; 通信作者: 吴金节(1962—), 男, 教授, 硕士, E-mail: wjj@ahau.edu.cn
基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFD0501205); 安徽省重点研究与开发计划项目(1804a07020135); 安徽农业大学研究生创新基金项目(2018-yjs-21)

groups was 1 013, the contribution rate of principle component 1 (PC1) to total microbes was 46.64%, and the contribution rate of principle component 2 (PC2) was 16.46%. The dominant flora at the phylum level were Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria, Verrucomicrobia and etc. The dominant flora at the family level were Bacteroidaceae, Enterobacteriaceae, Lachnospiraceae, Ruminococcaceae, and Rikenellaceae. The dominant flora at the genus level were *Akkermansia*, *Bacteroides*, *Corynebacterium* and *Lactococcus*. Comparing with group A, the number of *Bifidobacteria* in group C was significantly lower ($P<0.05$), and the number of *Escherichia coli* and *Salmonella* in group C were significantly higher ($P<0.05$).

【Conclusion】Feeding high-protein diet can change the diversity and abundance of cecal microflora in goslings, reduces the number of *bifidobacteria* and *lactobacilli*, and increases the number of *E. coli* and *Salmonella*.

Key words: high protein diet; gosling; cecum; microflora; high-throughput sequencing

动物消化道存在着数目庞大且种类丰富的微生物, 这些微生物组成的群落在动物的营养、免疫、生理和代谢等方面发挥着巨大作用^[1]。肠道菌群的多样性能够保证肠道微生物区系平衡, 维持胃肠道环境相对稳定, 促进营养物质消化吸收^[2]。家禽的大肠很短, 食糜会很快进入盲肠, 所以盲肠是微生物生存和活动的重要场所, 通过调控菌群的多样性, 能够改善家禽肠道健康, 提高生产性能。Pan 等^[3]利用高通量测序法分析家禽的肠道微生物组成及其与宿主和饮食的相互作用, 结果显示肠道微生物组成受到饮食的影响比较大。刘蓓一^[4]研究发现盲肠中微生物种类会随纤维水平的提高而增加。章学东等^[5]发现饲料中添加苜蓿草粉会导致蛋鸡肠道菌群结构及多样性发生变异。

近几年来, 养鹅业发展迅速, 但由于鹅的配合饲料短缺, 一些养殖户为追求肉鹅的快速增长, 用蛋白质含量较高的鸡、鸭饲料代替鹅饲料, 经常引发雏鹅痛风^[6]。高蛋白饲料可致雏鹅发生痛风, 而关于不同蛋白质含量的饲料对雏鹅盲肠微生物菌群的影响鲜见报道。本试验通过饲喂雏鹅蛋白质含量不同的饲料, 利用微生物培养和高通量测序的方法, 研究饲料蛋白质含量对雏鹅盲肠微生物菌群的影响, 为调控鹅的健康生长提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用雁鹅, 购自合肥市周边孵化场。

1.2 试验设计与饲养管理

试验选用体质量相近的 1 日龄雏雁鹅 72 只, 根据体质量随机分成 A、B 和 C 组, 每组 3 个重复, 每个重复 8 只鹅。A 组饲喂粗蛋白质质量分数为

16% 的基础饲料, B 组饲喂粗蛋白质质量分数为 20% 的饲料, C 组饲喂粗蛋白质质量分数为 24% 的饲料, 试验期为 14 d。

基础饲料参照鹅的营养需要^[7], 其中粗蛋白质质量分数为 16%, 在此基础上分别配制粗蛋白质质量分数为 20% 和 24% 的 2 组饲料, 这 3 种饲料的能量水平相近。饲料组成及营养水平见表 1。

试验在安徽农业大学动物科技学院动物房进行。各组试验鹅分笼饲养, 试验期间每天分别于 08:00、14:00 和 21:00 喂料。试验鹅自由采食, 自由饮水, 消毒、卫生防疫和日常管理按照规模化养禽场常规饲养方法进行。

1.3 样品采集

试验结束时, 每组随机抽取 9 只鹅, 致死后无菌采取盲肠粪便分别放置于 2 mL 无菌管中, 6 只用于细菌培养, 3 只放于液氮中保存, 用于高通量测序。

1.4 DNA 提取和 16S rDNA 基因扩增 PCR 反应

用 QIAamp DNA Microbiome Kit 试剂盒 (Qiagen) 抽提鹅盲肠内容物总基因组 DNA, 用 Nanodrop 进行 DNA 浓度检测, 采用引物 515F(5'-GTGCCAG CMGCCGCGGTAA-3') 和 806R(5'-GGACTACH VGGGTWTCTAAT-3') 扩增细菌 16S rDNA 基因 V4 区。反应条件: 94 ℃ 预变性 300 s; 94 ℃ 变性 60 s, 55 ℃ 退火 45 s, 72 ℃ 延伸 45 s, 循环 25 次; 72 ℃ 保温 600 s。

1.5 高通量测序分析

总 DNA 提取、PCR 扩增和测序由深圳华大基因科技有限公司协助完成。采用 IlluminaHiSeq (IlluminaHiSeq 2500, PE250 高通量测序技术) 对雏鹅盲肠微生物 16S rDNA 基因的 V4 区进行测序。

表 1 饲料组成与营养水平 (风干基础)
Table 1 Composition and nutrient levels of diets(Air-dry basis)

项目 Item	组成 Component	组别 Group		
		A	B	C
原料及质量分数/% Ingredient content	玉米 Corn	46.00	42.00	36.45
	小麦次粉 Wheat midding	15.00	13.90	13.79
	米糠 Rice bran	20.00	18.53	17.06
	蛋白粉 Albumen powder	0	7.35	14.70
	玉米胚芽粕 Corn germ meal	4.00	4.00	4.00
	酒糟蛋白饲料	9.00	8.22	8.00
	Distillers dried grains with solubles			
	石粉 Stone powder	0.72	0.72	0.72
	玉米蛋白粉 Corn gluten meal	3.00	3.00	3.00
	预混料 Premix ¹⁾	2.28	2.28	2.28
	合计 Total	100.00	100.00	100.00
营养成分及质量分数/% Nutrient content	粗蛋白质 Crude protein	16.00	20.00	24.00
	钙 Ca	1.10	1.10	1.10
	有效磷 Available phosphorous	0.65	0.65	0.68
	粗纤维 Crude fiber	6.80	6.60	6.40
	粗灰分 Ash	9.00	9.00	9.10
	氯化钠 NaCl	0.50	0.50	0.50
	水分 Moisture	13.00	13.00	13.00
	蛋氨酸 DL-Methionine	0.50	0.51	0.52
代谢能/(MJ·kg ⁻¹) Metabolic energy		2.70	2.69	2.70

1) 预混料为每千克饲料提供: 维生素A 1.4×10⁵ IU, 维生素D₃ 6×10⁴ IU, 维生素E 100 IU, 维生素K₃ 28 mg, 维生素B₁ 12 mg, 维生素B₂ 62 mg, 维生素B₆ 18 mg, 维生素B₁₂ 0.12 mg, 维生素B₅ 100 mg, 维生素B₃ 3 180 mg, 维生素B₉ 11.6 mg, 维生素B₇ 1.6 mg, 胆碱 5 000 mg, Mn 900 mg, Zn 1 000 mg, Fe 1.3 g, Cu 250 mg, Se 4.5 mg, I 7 mg, 赖氨酸 25 g, w (Ca) 9%, w (P)3%, w (H₂O) 12%

1) The premix provided the following per kilogram of diet: Vitamin A 1.4×10⁵ IU, vitamin D₃ 6×10⁴ IU, vitamin E 100 IU, vitamin K₃ 28 mg, vitamin B₁ 12 mg, vitamin B₂ 62 mg, vitamin B₆ 18 mg, vitamin B₁₂ 0.12 mg, vitamin B₅ 100 mg, vitamin B₃ 3 180 mg, vitamin B₉ 11.6 mg, vitamin B₇ 1.6 mg, choline 5 000 mg, Mn 900 mg, Zn 1 000 mg, Fe 1.3 g, Cu 250 mg, Se 4.5 mg, I 7 mg, Lys 25 g, w (Ca) 9%, w (P) 3%, w (H₂O) 12%

根据样品预扩增结果, 将适当的 DNA 用于 PCR 反应, 加入 V6 引物和 PCR 主混合物。用 QIAquick PCR 纯化试剂盒 (Qiagen) 纯化 PCR 产物, 然后与末端修复混合物混合, 在 20 ℃ 条件下孵育 30 min。用 QIAquick PCR 纯化试剂盒纯化末端修复的 DNA, 然后加入 A-Tailing Mix, 在 37 ℃ 条件下孵育 30 min。合并纯化的腺苷酸 3'末端 DNA。接头和连接混合物, 在 16 ℃ 条件下孵育连接反应 12~16 h。通过运行 25 g/L 琼脂糖凝胶约 2.5~3.0 h 以选择适配器连接的 DNA 以回收目标片段。用 QIAquick 凝胶提取试剂盒 (Qiagen) 纯化凝胶验证

文库。文库测序: 使用 Agilent 2100 生物分析仪 (Agilent DNA 1000 Reagents) 确定平均分子长度, 并通过实时定量 PCR(q-PCR)(TaqMan Probe) 对文库进行定量。合格的库在 cBot 上进行放大, 以在流通池 (TruSeq PE Cluster Kit V3-cBot-HS, Illumina) 上生成群集。放大后的流动池通过 HiSeq 2500 系统 (TruSeq SBS KIT-HS V3, Illumina) 测序, 读取长度 90 bp。

1.6 盲肠细菌培养计数

用双歧杆菌 BS 培养基、乳杆菌选择性培养基 (LBS 琼脂)、麦康凯琼脂培养基分别接种 1g 盲肠

内容物, 进行双歧杆菌 *Bifidobacterium*、乳酸杆菌 *Lactobacillus*、大肠埃希菌 *Escherichia coli* 和沙门氏菌 *Salmonella* 的分离鉴定, 取出分离后的菌放入 9 mL 无菌水中, 振荡 20 min 使微生物细胞分散, 静置约 20~30 s 即成 10^{-1} 稀释液。再用 1 mL 无菌吸管吸取 10^{-1} 稀释液 1 mL 移入装有 9 mL 无菌水的试管中吹吸 3 次, 让菌液混合均匀即成 10^{-2} 稀释液。依此方法倍比稀释成 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 和 10^{-8} 等一系列稀释度的菌液供平板计数使用, 平板接种培养: 根据食品卫生标准要求或对污染情况的估计, 选择 2~3 个适宜稀释度, 分别在 10 倍递增稀释的同时, 吸取该稀释度稀释液 100 μ L 置于灭菌平皿中, 每个稀释度做 2 个平皿。在平皿注入 15 mL 凉至 46 $^{\circ}$ C 的营养琼脂培养基, 并转动平皿, 混合均匀。同时将营养琼脂培养基倾入含有 100 μ L 无菌稀释液的平皿内作空白对照。待琼脂凝固后, 翻转平板, 置 (36 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C 温箱内培养 (48 $\pm$ 2) h, 取出后计算平板内菌落数目, 乘以稀释倍数, 即得每克样品所含菌落总数。

1.7 数据处理

对样品进行 IlluminaMiSeq 双末端测序之后, 对微生物群落 16S rRNA 测序结果进行生物信息学分析, 获得 Clean data, 设置 30 bp 为窗口长度, 移除低于原始 read 长度 75% 的 reads, 去除接头污染 reads, 去除含 N 的 reads, 去除低复杂度 reads, 通过 Illumina 平台 (Hiseq) 进行 Paired-end 测序。使用软件 FLASH 1.2.11 进行序列拼接。利用软件 USEARCH 7.0.1090 将拼接好的 Tags 聚类为操作分类单元 (Operational taxonomic unit, OTU)。得到 OTU 代表序列后, 通过 RDP classifier 2.2 软件将 OTU 代表序列与数据库序列比对, 进行物种注释, 置信度阈值设置为 0.6, 通过 QIIME 软件和 MOTHER1.31.2 软件对 OTU 进行丰度统计, 计算 Alpha 多样性, 包括 Chao1、ACE、Shannon 和 Simpson 指数和覆盖率。根据样品 OTU 数量计算出每个样品的相对丰度, 利用丰度信息进行 Beta 多样性分析, 包括 OTU 的主成分分析 (Principle component analysis, PCA) 和样品间物种组成聚类分析, 通过 R 3.1.1 软件绘制主成分分析图, 通过 QIIME 1.80 软件, 采用迭代算法对样品进行物种聚类^[8-9]。

通过统计学的方法检验 3 组样品间微生物群落丰度的差异, 并使用伪发现率 (False discovery rate, FDR) 评估差异的显著性。从检验结果中筛选出导致 3 组样品组成差异的物种。分别在门、科和

属分类等级进行组间差异显著性分析。微生物计数结果用平均值 $\pm$ 标准误表示, 采用 SPSS 19.0 统计软件中的 ANOVA 程序进行单因素方差分析, 采用 Duncan's 法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 盲肠样品测序结果及物种多样性分析

2.1.1 序列及 OTU 统计 从 A、B、C 3 组雏鹅盲肠样品中共获得 1 066 175 条高质量的细菌 16S rDNA 序列, 每个样品随机选取的 11 846 个序列通过质量控制后可用的序列按 97% 的相似度进行 OTU 聚类。各样品的 OTU 数量见表 2。

表 2 雏鹅盲肠样品测序结果			
Table 2 Sequencing results of gosling cecal samples			
组别	样品编号	序列数	OTU 数量
Group	Sample No.	Tag number	OTU number
A	A1	111 781	602
	A2	102 142	671
	A3	108 681	691
B	B1	100 069	265
	B2	104 458	337
	B3	101 674	306
C	C1	107 051	331
	C2	111 202	353
	C3	119 030	234

在 97% 的相似度下, 得到了每个样品的 OTU 个数, 利用 Venn 图可以展示多样品共有和各自特有 OTU 数目, 根据样品间 OTU 的重叠情况。结合 OTU 所代表的物种, 可以找出不同环境中的核心微生物。A、B 和 C 组共有 OTU 数目为 1 013 个, A、B 和 C 组特有 OTU 数分别为 461、32 和 75 个, A 和 B 组共有 OTU 318 个, A 和 C 组共有 OTU 369 个, B 与 C 组共有 OTU 246 个。

2.1.2 Alpha 多样性分析 Alpha 多样性结果见表 3。各组覆盖率均大于 0.999, 说明了该测序结果已基本覆盖样本的多样性, 本试验数据具有有效性。Alpha 多样性分析显示 A 组 OTU 数量、Chao1 指数、ACE 指数均显著高于 B、C 组, B 组和 C 组间无显著差异, 说明 A 组物种多样性与 B、C 组有显著差异。

2.2 Beta 多样性分析

2.2.1 PCA 分析 PCA 分析是将多个变量通过线性变换以选出较少个数重要变量的一种多元统计分析方法。通过分析不同样品 OTU 组成可以反映

表 3 雏鹅盲肠样品微生物的 Alpha 多样性分析¹⁾

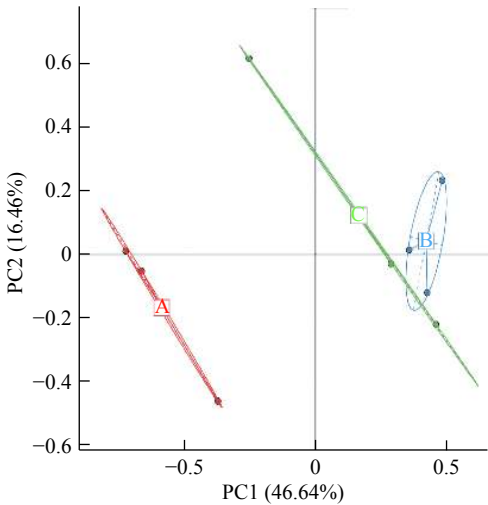
Table 3 Alpha diversity analysis of microorganisms in gosling cecal samples

组别 Group	OTU 数量 OTU number	Chaol 指数 Chaol index	ACE 指数 ACE index	Shannon 指数 Shannon index	Simpon 指数 Simpon index	覆盖率/% Coverage rate
A	654.67±46.69a	698.25±38.89a	700.13±39.33a	3.34±0.29a	0.12±0.07a	0.99±0.00a
B	302.67±36.12b	341.69±43.91b	338.68±45.62b	2.98±0.13a	0.12±0.03a	0.99±0.00a
C	306.00±63.32b	330.09±82.27b	335.48±87.89b	2.93±0.15a	0.14±0.02a	0.99±0.00a

1) 同列数据后不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$, Duncan's 法)
1) Different lowercase letters in the same column indicated significant difference ($P<0.05$, Duncan's method)

样品的差异和距离,如果两个样品距离越近,则表示这两个样品的组成越相似。

根据各个样品 OTU 的种类及其丰度计算各个样品间的加权 UniFrac 距离,并基于此,对样品进行了 PCA 分析,结果如图 1 所示,PC1 对检测到的总微生物的代表性贡献率为 46.64%,PC2 贡献率为 16.46%。3 个组 9 个样品能够较明显分开,A 组明显与 B、C 组分开,B 组和 C 组之间也分开,说明饲喂同一蛋白质质量分数的饲料,体内微生物菌群组成相似。



坐标轴上括号中的百分数表示该主成分对样品差异的贡献率;图中圆点表示各个样品。红、蓝和绿色代表样品分属于 A、B 和 C 组

The percentage in parenthesis on the coordinate axis indicated the contribution rate of the principal component to the sample difference; The points in the figure represented each sample. Red, blue and green colors represented samples belonging to groups A, B and C respectively

图 1 雏鹅盲肠样品基于微生物 OTU 丰度的主成分分析
Fig. 1 Principal component analysis of gosling cecal samples based on OTU abundance of microorganisms

2.2.2 样品间物种组成聚类分析 由图 2 可以看出,A 组的 A1、A2、A3 共聚为一类,B 组和 C 组聚为一类。说明饲喂不同蛋白质含量的饲料,雏鹅体内微生物群落组成不同,超过营养需求蛋白质,肠道微生物群落组成聚类不明显。

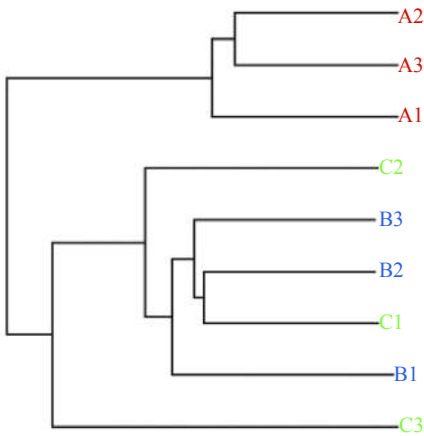


图 2 雏鹅盲肠样品聚类分析
Fig. 2 Clustering analysis of gosling cecal samples

2.3 雏鹅盲肠微生物组成及分布丰度

2.3.1 14 日龄雏鹅门水平上盲肠微生物丰度 在门水平上雏鹅盲肠微生物丰度数据见表 4。雏鹅粪便中的 9 大优势菌门分别是放线菌 Actinobacteria、拟杆菌 Bacteroidetes、厚壁菌门 Firmicutes、蓝藻门 Cyanobacteria、脱铁杆菌 Deferribacteres、广古菌门 Euryarchaeota、变形菌门 Proteobacteria、疣微菌门 Verrucomicrobia 和 TM7, 占菌群分类的 98% 以上,其余 1% 左右的为其他未被分类的菌门。A 组放线菌门、蓝藻门、脱铁杆菌门和 TM7 显著高于 B、C 组,B 组拟杆菌门显著高于 A、C 组,厚壁菌门虽差异不显著,但 A 组仍高于 B、C 组。说明饲料中添加过高水平的蛋白质可以使雏鹅盲肠微生物菌门发生变化。

2.3.2 14 日龄雏鹅科水平上盲肠微生物丰度 在科水平上雏鹅肠道微生物丰度数据见表 4。雏鹅粪便中的 9 大优势菌科分别是拟杆菌科 Bacteroidaceae、梭菌科 Clostridiaceae、脱硫弧菌科 Desulfovibrionaceae、肠杆菌科 Enterobacteriaceae、毛螺菌科 Lachnospiraceae、乳杆菌科 Lactobacillaceae、理研菌科 Rikenellaceae、疣微菌科 Ruminococcaceae 和韦荣球菌科 Veillonellaceae,其中 A 组梭菌科、肠杆菌科、疣微菌科和韦荣球菌科均显著高于 B、C 组,

表 4 雏鹅盲肠微生物在门、科和属水平的物种丰度¹⁾

Table 4 Species abundance of gosling cecal microbes at phylum, family and genus levels

%

水平 Level	类别 Classification	组别 Group		
		A	B	C
门 Phylum	放线菌 Actinobacteria	11.97±8.13a	0.21±0.12b	2.83±3.23b
	拟杆菌 Bacteroidetes	6.01±4.61b	50.01±11.32a	26.20±18.24b
	厚壁菌门 Firmicutes	60.12±17.37a	25.70±7.21a	44.50±31.43a
	蓝藻门 Cyanobacteria	0.78±0.39 a	0.005±0.00b	0.06±0.56b
	脱铁杆菌门 Deferribacteres	0.06±0.04a	0.00±0.00b	0.00±0.00b
	广古菌门 Euryarchaeota	0.07±0.07a	0.00±0.00a	0.69±1.18a
	变形菌门 Proteobacteria	5.50±3.48a	10.59±8.03a	4.09±0.22a
	疣微菌门 Verrucomicrobia	14.73±24.32a	12.56±16.07a	21.05±17.15a
	TM7	0.11±0.08a	0.00±0.00b	0.001±0.00b
科 Family	拟杆菌科 Bacteroidaceae	57.76±7.42a	43.99±14.51a	37.72±12.31a
	梭菌科 Clostridiaceae	1.91±1.27a	0.18±0.15b	0.08±0.03b
	脱硫弧菌科 Desulfovibrionaceae	0.50±0.87a	5.54±6.46a	7.13±4.05a
	肠杆菌科 Enterobacteriaceae	6.90±5.43a	0.14±0.09b	0.06±0.03b
	毛螺菌科 Lachnospiraceae	2.01±1.39b	8.48±2.62a	9.56±3.45a
	乳杆菌科 Lactobacillaceae	0.64±0.78a	0.01±0.01a	0.05±0.05a
	理研菌科 Rikenellaceae	1.23±2.12b	6.92±3.16b	12.53±6.06a
	疣微菌科 Ruminococcaceae	11.45±2.43a	5.82±2.41b	5.39±1.01b
	韦荣球菌科 Veillonellaceae	6.55±3.75a	0.02±0.01b	0.06±0.04b
属 Genus	气球菌属 Aerococcus	1.83±1.10a	0.001±0.00b	0.29±0.44b
	拟杆菌属 Bacteroides	2.85±2.46b	29.52±6.61a	9.79±7.56b
	劳特氏菌属 Blautia	0.32±0.13b	1.33±0.65a	0.39±0.37b
	梭菌属 Clostridium	0.97±1.11b	1.57±0.66b	1.98±0.67a
	Gallicola	0.63±0.41a	0.002±0.00b	0.05±0.08b
	乳酸菌属 Lactococcus	5.91±3.48a	0.001±0.00b	0.07±0.09b
	巨单胞菌属 Megamonas	1.07±0.45a	0.00±0.00b	0.07±0.11b
	理研菌属 Rikenella	0.001±0.00b	0.47±0.35a	0.51±0.43a
	罗斯氏菌属 Rothia	3.77±2.56a	0.005±0.00b	0.07±0.09b
	小球菌属 Subdoligranulum	0.06±0.04b	0.05±0.04b	0.25±0.03a
	萨特菌属 Sutterella	0.09±0.07b	0.77±0.38a	0.21±0.25b
	Turicibacter	7.79±6.53a	1.32±2.09b	0.06±0.04b

1) 同行数据后不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$, Duncan's 法)

1) Different lowercase letters in the same row indicated significant difference ($P<0.05$, Duncan's method)

B 和 C 组的毛螺菌科显著高于 A 组, C 组的理研菌科显著高于 A、B 组。A 组的拟杆菌科和乳杆菌科大于 B、C 组, 但无显著差异; A 组脱硫弧菌科小于 B、C 组, 但无显著差异。

2.3.3 14 日龄雏鹅属水平上盲肠微生物丰度 由表 4 可知, 雏鹅盲肠粪便中的微生物在属水平上的 12 种优势菌属为气球菌属 *Aerococcus*、拟杆菌属 *Bacteroides*、劳特氏菌属 *Blautia*、梭菌属 *Clos-*

tridium、*Gallicola*、乳酸菌属 *Lactococcus*、巨单胞菌属 *Megamonas*、理研菌属 *Rikenella*、罗斯氏菌属 *Rothia*、小球菌属 *Subdoligranulum*、萨特菌属 *Sutterella* 和 *Turicibacter*。A 组的气球菌属、*Gallicola*、乳酸菌属、巨单胞菌属、罗斯氏菌属和 *Turicibacter* 显著高于 B、C 组, 理研菌属显著低于 B、C 组, C 组的梭菌属和小球菌属显著高于 A、B 组, B 组的拟杆菌属、萨特菌属和劳特氏菌属显著高于 A、C 组。

2.4 雏鹅盲肠内双歧杆菌、乳酸杆菌、大肠埃希菌和沙门氏菌数量

由表 5 可知, C 组双歧杆菌的数量显著低于 A、B 组, B 组双歧杆菌数量低于 A 组, 但无显著差

异。A、B、C 3 组乳酸杆菌的数量依次减少, 但无显著差异。C 组大肠埃希菌和沙门氏菌数量显著高于 A、B 组, B 组大肠埃希菌和沙门氏菌数量高于 A 组, 但差异不显著。

表 5 雏鹅盲肠内双歧杆菌、乳酸杆菌、大肠埃希菌和沙门氏菌数量¹⁾
Table 5 Numbers of *Bifidobacteria*, *Lactobacilli*, *Escherichia coli* and *Salmonella* in gosling cecum

组别 Group	双歧杆菌/($\times 10^7$ mL ⁻¹) <i>Bifidobacteria</i>	乳酸杆菌/($\times 10^7$ mL ⁻¹) <i>Lactobacilli</i>	大肠埃希菌/($\times 10^4$ mL ⁻¹) <i>Escherichia coli</i>	沙门氏菌/($\times 10^3$ mL ⁻¹) <i>Salmonella</i>
A	31.38±21.52a	10.15±3.42a	4.13±0.92c	2.60±1.59b
B	20.58±13.03a	5.95±2.01a	6.58±3.83b	5.39±4.74b
C	10.82±8.11b	5.20±2.61a	13.95±3.93a	15.50±7.60a

1) 同列数据后不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$, Duncan's 法)
1) Different lowercase letters in the same column indicated significant difference ($P<0.05$, Duncan's method)

3 讨论与结论

3.1 饲料蛋白质含量对 14 日龄雏鹅盲肠微生物群落多样性的影响

近年来, 高通量测序技术被广泛应用于各个领域, 张莉力等^[10]利用高通量测序技术比较散养和笼养 2 种饲养方式下 12、18 周龄大骨鸡盲肠微生物组成差异, 肖英平等^[11]采用高通量测序技术分析饲料中添加丁酸梭菌对肉鸡盲肠菌群结构的影响。本试验从 A、B、C 3 组 14 日龄雏鹅盲肠样品中共获得 1 066 175 条高质量的细菌 16S rDNA 序列, 每个样品随机选取的 11 846 个序列通过质量控制后可用的序列按 97% 的相似度进行 OTU 聚类, 基于 OTUs 的注释结果显示, 9 个样品合并的总体样品共获得 1 031 个 OTU。比较各组 Alpha 多样性指数, 各组覆盖率均大于 0.99, 说明该测序结果已基本覆盖样本的多样性, 本试验数据具有有效性。Alpha 多样性分析中, Chaol 指数、ACE 指数、Shannon 指数随着饲料中蛋白质含量的增加而增加, Simpon 指数随着饲料中蛋白质含量的增加而减少。这说明随着饲料中蛋白质含量的增加, 雏鹅盲肠内微生物群落多样性在减少, 这与 Mu 等^[12]的研究结果一致。

3.2 饲料蛋白质含量对 14 日龄雏鹅盲肠微生物群落结构的影响

通过高通量测序技术发现, 在门水平上的优势菌门为放线菌、拟杆菌、厚壁菌门、变形菌门、疣微菌门等。其中, A 组放线菌门和 TM7 的物种丰度显著高于 B、C 组, B 组拟杆菌门的物种丰度显著高于 A、C 组。Norouzi 等^[13]认为放线菌具有抗多种耐药 (MDR) 病原体生物活性, 是一种潜在的益生菌。

本试验 A 组放线菌门的物种丰度大于 B、C 组, 说明高蛋白饲料降低了有益菌丰度; 拟杆菌门包括三大类细菌, 即拟杆菌纲、黄杆菌纲和鞘脂杆菌纲, 很多拟杆菌纲的种类生活在人或者动物的肠道中, 有些时候成为病原菌。从本试验结果可以看出, 饲喂蛋白质质量分数为 20% 的饲料可使拟杆菌门细菌丰度增加; TM7 被称为微生物暗物质, 许多作用机制还尚不明确^[14], 有试验证明, TM7 存在时, 巨噬细胞中的 TNF- α 诱导受到抑制, 从而抑制了体内的免疫作用^[15]。本试验 A 组 TM7 显著高于 B、C 组, 这可能与 TM7 的免疫抑制作用有关。厚壁菌门也是肠道内的有益菌门, 虽然各组差异不显著, 但 A 组仍高于 B、C 组。

在科水平上的优势菌群主要是拟杆菌科、梭菌科、脱硫弧菌科、肠杆菌科、毛螺菌科、乳杆菌科、理研菌科、疣微菌科和韦荣球菌科, 其中 A 组梭菌科、肠杆菌科、疣微菌科和韦荣球菌科物种丰度均显著高于 B、C 组, 说明在正常饲养条件下, 梭菌科、肠杆菌科、疣微菌科和韦荣球菌科在雏鹅盲肠内发挥着重要作用。有研究显示, 草食动物肠道内的毛螺旋科、纤维杆菌属等细菌与其食草特性相关^[16], 毛螺旋科菌群的主要作用是降解植物饲料细胞壁中的果胶、果糖、纤维二糖等, 产生挥发性脂肪酸 (乙酸、丙酸、丁酸等), 为动物及肠道微生物提供能量, 还有部分毛螺菌科属于真菌性致病菌。本试验 B 组和 C 组的毛螺菌科丰度显著高于 A 组, 各组饲料中纤维素水平相同, 表明饲喂高蛋白饲料增加了盲肠内真菌性致病菌的数量, 从而增加发生疾病的概率。

雏鹅盲肠粪便粪中的微生物在属水平上的优势菌为阿克曼菌属、拟杆菌属、棒状杆菌、乳酸菌属。本试验 A 组的气球菌属、*Gallicola*、乳酸菌属、

巨单胞菌属、罗斯氏菌属和 *Turicibacter* 的丰度显著高于 B、C 组, 这与本试验细菌培养计数结果相一致, 进一步表明饲喂高蛋白饲料可以使雏鹅盲肠内的乳酸杆菌数量降低; 同时, 使气球菌属、*Gallicola*、巨单胞菌属、罗斯氏菌属和 *Turicibacter* 等有益菌属的丰度减少。

3.3 饲料蛋白质含量对 14 日龄雏鹅盲肠双歧杆菌、乳酸杆菌、大肠埃希菌和沙门氏菌数量的影响

本研究发现饲喂高蛋白质饲料可使雏鹅盲肠内的双歧杆菌和乳酸杆菌数量减少, 而大肠埃希菌和沙门氏菌数量增加, 说明饲喂高蛋白饲料可使雏鹅盲肠内微生物发生变化。有研究表明, 双歧杆菌定植在动物肠道中能起到生物屏障、营养、免疫增强作用, 并改善胃肠道功能^[17], 乳酸杆菌可通过产生抗菌物质如乳酸、过氧化氢和细菌素, 或者通过竞争营养或肠道黏附位点来抑制致病菌, 通过诱导黏附素的分泌或阻止细胞凋亡而增强肠道的屏障功能, 从而保护肠道^[18]。大肠埃希菌和沙门氏菌是禽类肠道常见的致病菌^[19]。

3.4 结论

饲喂高蛋白饲料使雏鹅盲肠微生物菌群多样性发生变化, 菌群丰度降低; 同时, 饲喂高蛋白饲料可以使雏鹅盲肠内双歧杆菌和乳酸杆菌等有益菌数量减少, 大肠埃希菌和沙门氏菌数量增加。

参考文献:

[1] TILG H, MOSCHEN A R. Microbiota and diabetes: An evolving relationship[J]. *Gut*, 2014, 63(9): 1513-1521.

[2] DICKS L M T, GELDENHUYS J, MIKKELSEN L S, et al. Our gut microbiota: A long walk to homeostasis[J]. *Benef Microbes*, 2018, 9(1): 3-20.

[3] PAN D, YU Z. Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet[J]. *Gut Microbes*, 2014, 5(1): 108-119.

[4] 刘蓓一. 扬州鹅肠道微生物多样性及其受饲料纤维水平的调控研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2012.

[5] 章学东, 钱定海, 吴丽娟, 等. 日粮中添加苜蓿草粉对蛋鸡生产性能、蛋品质和免疫功能的影响 [J]. *中国家禽*, 2008, 30(16): 40-41.

[6] 李曼曼, 丁雪东, 荣雪路, 等. 一起皖西白鹅内脏型合并关节型痛风的病例报告 [J]. *畜牧与兽医*, 2018, 50(4): 120-123.

[7] 刘五岳. 鹅的饲养标准 [J]. *畜禽业*, 2003(10): 11.

[8] DRAY S, DUFOUR A B. The ade4 package: Implementing the duality diagram for ecologists[J]. *J Stat Softw*, 2007, 22(4): 1-20.

[9] WHITE J R, NAGARAJAN N, POP M. Statistical methods for detecting differentially abundant features in clinical metagenomic samples[J]. *PLoS Comput Biol*, 2009, 5(4): e1000352.

[10] 张莉力, 肖海蒂, 刘黎莹, 等. 高通量测序技术分析大骨鸡盲肠微生物组成 [J]. *中国家禽*, 2017, 39(4): 22-27.

[11] 肖英平, 杨彩梅, 代兵, 等. 基于高通量测序的丁酸梭菌对肉鸡盲肠菌群结构的影响 [J]. *浙江农业学报*, 2017, 29(3): 373-379.

[12] MU C, YANG Y, LUO Z, et al. Temporal microbiota changes of high-protein diet intake in a rat model[J]. *Anaerobe*, 2017, 47: 218-225.

[13] NOROUZI H, DANESH A, MOHSENI M. Marine actinomycetes with probiotic potential and bioactivity against multi-drug resistant bacteria[J]. *Int J Mol Cell Med*, 2018, 7(1): 44-52.

[14] KOHL K D. Diversity and function of the avian gut microbiota[J]. *J Comp Physiol B*, 2012, 182(5): 591-602.

[15] HE X, MCLEAN J S, EDLUND A, et al. Cultivation of a human-associated TM7 phylotype reveals a reduced genome and epibiotic parasitic lifestyle[J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(1): 244.

[16] DALY K, PROUDMAN C J, DUNCAN S H, et al. Alterations in microbiota and fermentation products in equine large intestine in response to dietary variation and intestinal disease[J]. *Brit J Nutr*, 2012, 107(7): 989-995.

[17] SANZ Y, NADAL I, S NCHEZ E. Probiotics as drugs against human gastrointestinal infections[J]. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*, 2007, 2(2): 148-156.

[18] 章文明, 汪海峰, 刘建新. 乳酸杆菌益生作用机制的研究进展 [J]. *动物营养学报*, 2012, 24(3): 389-396.

[19] SALVAT G, GUYOT M, PROTINO J. Monitoring *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in traditional free-range ‘Label Rouge’ broiler production: A 23-year survey programme [J]. *J Appl Microbiol*, 2016, 122(1): 248-256.

【责任编辑 庄 延】