

益生性屎肠球菌 HDRsEf1 对雏鸡盲肠菌群发育的影响

龚琪¹ 曾娟娟² 石德时¹ 王喜亮¹ 王涛³ 肖宏德¹ 肖运才¹

1. 农业微生物国家重点实验室/华中农业大学动物医学院, 武汉 430070;

2. 动物营养与饲料科学湖北省重点实验室/武汉轻工大学动物科学与营养工程学院, 武汉 430023;

3. 乌鲁木齐市动物疾病控制与诊断中心, 乌鲁木齐 830063

摘要 研究益生性屎肠球菌 HDRsEf1 株和抗生素对白羽肉雏鸡科宝 500 盲肠肠道菌群发育情况的影响。采用荧光定量 PCR 检测方法, 确定该株屎肠球菌能在雏鸡盲肠中定植后, 选取 180 只新生 1 日龄白羽雏鸡科宝 500 随机分成对照组、益生菌组和抗生素(金霉素)组, 分别在 7、14、21、28、35、42 日龄无菌快速采集盲肠内容物, 用 RT-PCR 法检测盲肠中乳酸杆菌和大肠杆菌的数量, 用 DGGE 技术检测盲肠肠道菌群的变化情况。结果显示, 益生菌的添加可以显著降低雏鸡 21 日龄盲肠大肠杆菌的数量, 显著增加 42 日龄盲肠乳酸杆菌的数量。DGGE 结果显示, 雏鸡盲肠菌群从 7 日龄到 14 日龄为一个过渡期, 从 14 日龄到 42 日龄为相对稳定期。益生菌和抗生素的添加可以促进肠道菌群在过渡期更有效地完成过渡, 在稳定期维持更稳定的状态, 而抗生素的添加作用相反。

关键词 变性梯度凝胶电泳(DGGE); RT-PCR; 肠道菌群; 益生菌; 抗生素

中图分类号 S 852.61⁺¹ **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2015)01-0078-05

在畜牧业生产过程中, 利用抗生素治疗和预防疾病带来的种种弊端逐渐被人们所认识, 2006 年欧盟决定禁止使用任何抗生素作为饲料添加剂。益生菌作为一类能通过调控生物体微生态平衡进而有效促进宿主健康生长的活微生物制剂, 一直被认为是抗生素的最佳替代者之一。关于对雏鸡肠道菌群的研究已有较多^[1-3], 但是关于益生菌和抗生素对肉雏鸡盲肠菌群发育规律的影响作用还鲜有报道。本研究以屎肠球菌和金霉素为试验材料, 通过对不同日龄肉雏鸡盲肠内容物的 16SrDNA V3 区进行 PCR-DGGE 指纹图谱比较分析, 从不同角度研究益生菌制剂的部分作用机制以及日粮中添加抗生素的可能影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料与试验动物

试验材料为华中农业大学农业微生物学重点实验室专利菌株(专利号: ZL201110452087. 2)屎肠

球菌 HDRsEf1 株, 湖北华大瑞尔科技有限公司生产, 每克菌粉的活菌数 ≥ 30 亿。

试验动物为 1 日龄健康白羽肉鸡科宝 500, 购自湖北宜昌正大有限公司。

1.2 试验设计与样品采集

1) 屎肠球菌定植动物试验。选用 1 日龄健康白羽肉鸡 80 只随机分成对照组(玉米-豆粕基础日粮)和益生组(添加 300 g 屎肠球菌菌粉/1 000 kg), 每组分别在 1、3、5、7、9、11 日龄时颈静脉放血处死 5 只雏鸡, 在超净台内快速采集盲肠内容物并混合, 置 4℃ 冰箱备用。

2) 屎肠球菌和抗生素对雏鸡肠道菌群的影响试验。试验选用 1 日龄新生白羽肉鸡 180 只, 随机分成对照组(玉米-豆粕基础日粮)、益生组(添加 300 g 屎肠球菌菌粉/1 000 kg)和抗生素组(添加 50 mg 金霉素/kg)。每组 3 个重复, 每个重复 20 只鸡。试验周期为 42 d, 每组分别在 7、14、21、28、35、42 日龄时颈静脉放血处死 6 只试验鸡, 在超净台内

收稿日期: 2013-11-28

基金项目: “十二五”农村领域国家科技计划项目(2013BAD03B01-03); 湖北省科技攻关项目(2012DBA23001); “十二五”国家科技支撑计划项目(2013BAD10B03-6); 武汉市科技攻关项目(2013020501010169); 中央高校基本科研业务费专项(2013PY060)

龚琪, 硕士研究生, 研究方向: 兽医微生物与免疫学. E-mail: qigegezjj@163.com

通信作者: 肖运才, 博士, 副教授, 研究方向: 兽医微生物与免疫学. E-mail: xyc88@mail.hzau.edu.cn

快速采集盲肠内容物,将每个组的6只雏鸡内容物混合,置4℃冰箱备用。

1.3 细菌总DNA的提取

参照文献[4],采用QIAamp DNA Stool Mini Kit,按照操作手册提取细菌总DNA。用核酸浓度测定仪测定总DNA浓度,置-20℃保存备用。

1.4 RT-PCR法检测盲肠中屎肠球菌、大肠杆菌和乳酸杆菌的数量

实时荧光定量PCR所用的引物见表1。检测

屎肠球菌数量的荧光定量PCR反应条件:95℃预变性30s;95℃变性5s,60℃延伸30s,40个循环。检测大肠杆菌和乳酸杆菌数量的荧光定量PCR反应条件:95℃预变性30s;95℃变性5s,55℃退火20s,72℃延伸30s,40个循环。每次荧光定量PCR循环结束后溶解曲线从65℃逐步升到95℃。荧光定量PCR体系的最终体积控制在20μL,反应试剂均按Premix Ex Taq™试剂说明书的推荐量添加。

表1 RT-PCR引物序列和产物大小

Table 1 Primers and product size of RT-PCR

| 引物 Primers | 序列(5'-3') Primers sequence(5'-3') | 片段大小/bp Product size | 参考文献 Reference |
|--------------------------|---|-------------------------|-------------------|
| 屎肠球菌 <i>E. faecium</i> | TCTGGAGAATGATGGGGAAAG CACTTGGGACACCCGAAAA | 104 | 本文 This study |
| 大肠杆菌 <i>E. coli</i> | CCTACGGGAGGCAGCAGT CGTTTACGGCGTGGACTAC | 458 | [5] |
| 乳酸杆菌 <i>Lactobacilli</i> | GCAGCAGTAGGGAATCTTCCA GCATTYCACCGCTACACATG | 328 | [6] |

1.5 基因组特异性片段V3区的扩增

为了检测各组肠道菌群的变化情况,用引物GC341f(5'-CGCCCGGGCGCGCCCCGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGATTACCGCGGCTGCTGG-3')和519r(5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3')扩增16SrRNA的V3区片段,扩增条件是94℃预变性5min;94℃变性30s,55℃退火20s,72℃延伸30s,35个循环;最后72℃延伸10min。PCR反应体系(25μL):2×PCR mix 12.5μL,上下游引物(10pmol/L)各1μL,DNA模板2μL,ddH₂O补足至25μL。

1.6 基因组特异性片段V3区的变性梯度凝胶电泳(DGGE)

使用Bio-Rad Dcode进行DGGE凝胶电泳。变性剂梯度范围为38%~55%,100%的变性剂包含7mol/L尿素和40%去离子甲酰胺。电泳在恒温60℃条件下1×TAE缓冲液中进行,先200V预电泳10min,然后65V电压电泳16h。参照文献[7]方法用硝酸银染色,对完成显色后的凝胶拍照,再用相应软件对图谱进行分析。

1.7 数据分析

采用UPGMA进行聚类分析,以香农多样性指数 H' 表示菌群多样性的高低,SPSS18.0进行PCA分析和显著性差异分析。

2 结果与分析

2.1 益生性屎肠球菌 HDRsEfl 株在雏鸡肠道菌群定植的确定

如图1所示,随着雏鸡日龄的增加,益生菌组中雏鸡盲肠中的屎肠球菌的数量逐渐增加,到第5日龄时基本达到稳定,而对照组的屎肠球菌的数量在5日龄以后逐渐降低,说明该株屎肠球菌 HDRsEfl 可以在雏鸡盲肠内定植,并且在5日龄时就基本达到稳定。

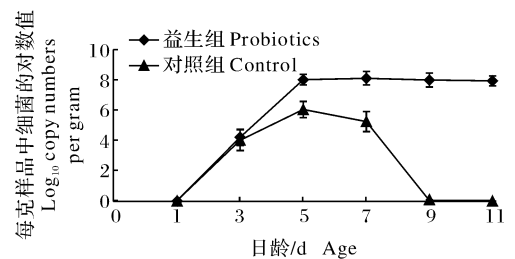


图1 雏鸡盲肠中屎肠球菌数量的检测

Fig. 1 Detection of total *E. faecium* populations in little broiler cecum

2.2 大肠杆菌和乳酸杆菌数量的检测

由表2可见,饲料中添加屎肠球菌 HDRsEfl 和抗生素可以显著减少21日龄时雏鸡盲肠中大肠杆菌的数量($P < 0.05$),而在42日龄时益生菌组和

抗生素组中的大肠杆菌的数量都有所下降,但差异不明显。同时,饲料中添加屎肠球菌 HDRsEF1 可以显著增加雏鸡盲肠中乳酸杆菌的数量,在 42 日龄时益生菌组与对照组和抗生素相比差异显著 ($P < 0.05$),在 21 日龄时差异不显著。

2.3 DGGE 图谱的分析与处理

1)DGGE 图谱的聚类分析结果。聚类分析结果(图 2)主要有 2 个分支,7 日龄雏鸡盲肠微生物菌群与其他日龄的距离较远,而从 14 日龄到 42 日龄微生物菌群比较稳定,说明从 7 日龄到 14 日龄时微生物菌群产生了明显的变化。

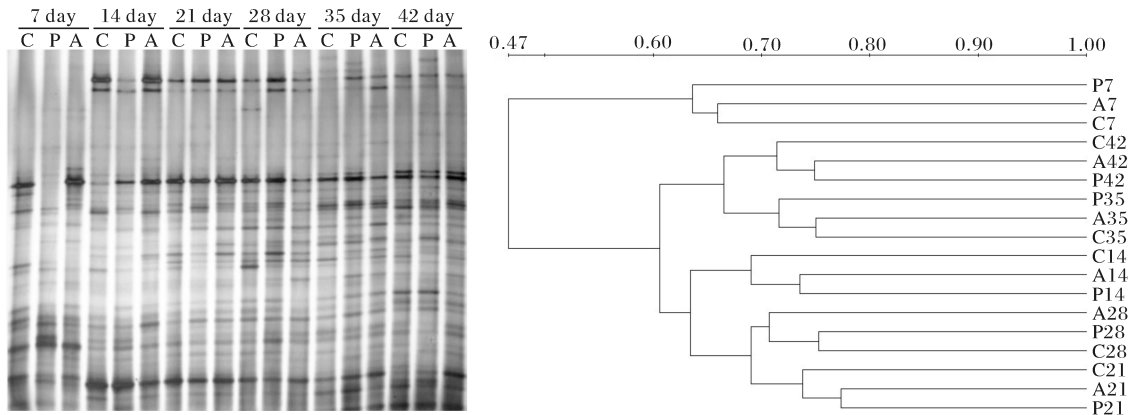
2)DGGE 图谱的相似性和多样性分析结果。抗生素的添加会降低肠道菌群的稳定性。

表 2 不同处理组肉鸡盲肠内容物中大肠杆菌和乳酸杆菌对数值的比较¹⁾

Table 2 Comparison of total *E. coli* and *Lactobacilli* populations in chicken cecum contents between different groups

| 日龄 Age | 细菌种类 Bacteria species | 对照组 Control | 益生菌组 Probiotics | 抗生素组 Antibiotics |
|-----------|--------------------------|----------------|--------------------|---------------------|
| 21 | 大肠杆菌 <i>E. coli</i> | 8.32±0.27 b | 7.44±0.33 a | 7.23±0.36 a |
| | 乳酸杆菌 <i>Lactobacilli</i> | 7.53±0.13 | 8.05±0.19 | 7.41±0.28 |
| 42 | 大肠杆菌 <i>E. coli</i> | 8.08±0.27 | 7.77±0.15 | 7.57±0.15 |
| | 乳酸杆菌 <i>Lactobacilli</i> | 7.39±0.28 b | 8.35±0.13 a | 7.16±0.38 b |

1)表中标不同小写字母表明差异显著($P < 0.05$)。Values with different small letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$).



C:对照组 Control; P:益生菌组 Probiotics; A:抗生素组 Antibiotics.

图 2 不同日龄雏鸡盲肠微生物 V3 区 DGGE 图谱与聚类分析

Fig. 2 DGGE DNA profiles and UPGMA of the V3 region of cecal bacterial flora in broilers at the different age

表 3 各处理组在相邻周龄之间 DGGE 图谱的相似度指数¹⁾

Table 3 Similarity index of DGGE profiles between adjacent week of treatment groups

| 处理组 Treatment group | 相邻周龄的相似度 Similarity index between adjacent week | | | | |
|------------------------|---|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | 7~14 | 14~21 | 21~28 | 28~35 | 35~42 |
| 对照组 Control | 52.8±0.60 b | 71.2±0.66 c | 68.2±0.82 b | 62.4±2.12 b | 63.8±0.61 b |
| 益生菌组 Probiotics | 41.8±1.81 a | 73.9±0.73 a | 73.0±0.73 a | 66.6±0.71 a | 68.7±0.57 a |
| 抗生素组 Antibiotics | 55.9±1.78 b | 66.8±1.00 b | 66.8±1.00 b | 61.9±1.52 b | 65.1±0.36 b |

1)同列数据后标不同小写字母者差异显著($P < 0.05$)。In the same column, values with different small letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$).

由图 3 可见,3 个不同处理组的雏鸡盲肠微生物菌群的多样性指数随日龄的增加均逐渐增大,各

通过比较各处理组雏鸡在 7 日龄和 14 日龄、14 日龄和 21 日龄、21 日龄和 28 日龄、28 日龄和 35 日龄以及 35 日龄和 42 日龄的盲肠微生物菌群之间的相似性,来评价肠道菌群的稳定程度,相似度越高则说明肠道菌群的变化越小,稳定度越高。由表 3 可以看出,除了 7 日龄与 14 日龄,益生菌组的其他相邻日龄之间的相似度指数均高于对照组和抗生素组,并且差异显著($P < 0.05$),说明在 14 日龄以后,益生菌组的肠道菌群相对于另外 2 组维持在比较稳定的状态。在 3 个处理组中,抗生素组在 14 到 35 日龄时的相似性指数均低于对照组和抗生素组,说明

抗生素的添加会降低肠道菌群的稳定性。

组之间的差异不显著,说明益生菌和抗生素的添加并不会影响肠道菌群的多样性指数。

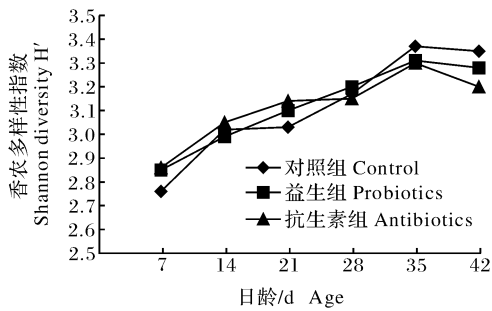


图3 盲肠微生物菌群的多样性分析

Fig. 3 The diversity analysis of cecal bacterial flora

3) DGGE 图谱的主成分分析。对 DGGE 图谱的主成分分析结果与聚类分析的结果一致,如图 4 所示。7 日龄样品与其他日龄样品的距离较远,位于矩形方框的下部,说明 7 日龄盲肠菌群与其他日龄的差异较大。而 14、28 日龄和 35、42 日龄分居矩形方框上部的左右侧。

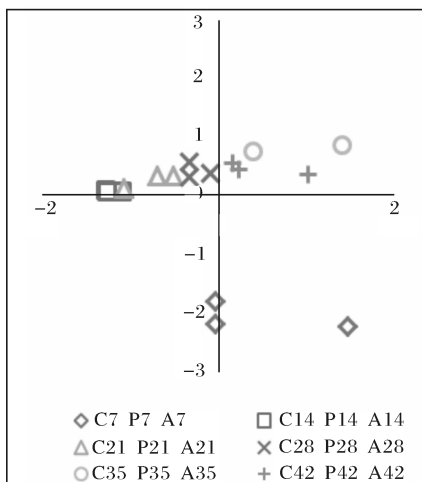


图4 DGGE 图谱的主成分分析

Fig. 4 PCA analysis of DGGE profiles

3 讨论

3.1 屎肠球菌在雏鸡盲肠菌群的定植

益生菌在肠道内的粘附定植是其发挥生理作用的前提和基础^[8]。本文用 RT-PCR 技术来检测屎肠球菌 HDRsEfl 在盲肠的定植情况,检测的结果显示对照组在 3 日龄到 7 日龄时屎肠球菌的数量大致相同,Lu 等^[9]利用分子生物学的方法研究发现,在肉鸡 3 日龄和 7 日龄的盲肠菌群中检测到的屎肠球菌拷贝数一样,与本研究对照组的检测结果一致。而益生菌组中的屎肠球菌的数量随着饲喂时间的增加而逐渐升高,在雏鸡 5 日龄时数量就基本达到稳定,说明该屎肠球菌 HDRsEfl 与雏鸡的盲

肠粘膜的粘附性好,可以在盲肠稳定存活。

3.2 益生性屎肠球菌和抗生素对雏鸡盲肠大肠杆菌和乳酸杆菌数量的影响

益生菌进入动物胃肠道后,可以通过产生抑菌物质^[10]或者产酸^[11]来抑制某些潜在有害菌和对酸性敏感的病原菌的生长,维持肠道菌群的平衡。本研究利用不需培养计数的 RT-PCR 的分子生物学方法定量检测了肠道细菌的数量,发现益生菌的添加可以显著降低大肠杆菌的数量,增加乳酸杆菌的数量。但是该方法相当于传统的细菌计数法,不但省时省力,且能有效提高检测的灵敏度,实现快速定量检测。通过比较益生菌组和抗生素组发现,日粮中添加抗生素,在抑制大肠杆菌数量生长的同时也抑制了乳酸杆菌的生长,而益生菌的添加则会促进乳酸杆菌的生长,从这一点来看益生菌组的效果要优于抗生素组。

3.3 PCR-DGGE 指纹图谱的分析

PCR-DGGE 聚类分析的结果和主成分分析的结果一致,益生性屎肠球菌和金霉素的添加并不会影响雏鸡盲肠微生物菌群的正常发育。Lu 等^[9]研究发现肉鸡在 3~7 日龄、14~28 日龄及 49 日龄时的盲肠肠道菌群结构有明显的差异。从本研究的聚类分析和主成分分析结果可以看出,早期肉雏鸡盲肠菌群在 7 日龄时与在 14~42 日龄时的差异较大,说明早期雏鸡盲肠菌群从 7 日龄到 14 日龄为一个过渡期,从 14 日龄到 42 日龄为一个相对稳定期,两者研究结果基本一致。该结果提示,如果在肉雏鸡 7 日龄之前饲喂有利于盲肠肠道菌群健康生长的益生菌或某种物质,将有利于雏鸡盲肠菌群更有效地达到稳定状态,能减少盲肠菌群在过渡时期给肉雏鸡带来的各种应激反应。

通过比较各处理组相邻周龄之间的 PCR-DGGE 指纹图谱的相似性指数可以看出,益生菌组在 7~14 日龄时最低,而在之后均高于对照组和抗生素组,说明在肉雏鸡盲肠微生物菌群的发育过程中,益生菌的添加能更有效地促进肠道微生物菌群进入到稳定状态并且维持稳定。而抗生素组的相似性指数在过渡期 7~14 日龄要高于其他 2 组,在之后的稳定期 14~35 日龄内要低于其他 2 组,说明抗生素金霉素的添加并没有有效促进盲肠微生物菌群进入到稳定状态,反而抑制了微生物菌群进入和维持稳态。

参 考 文 献

- [1] 王晓霞,易中华,计成,等.果寡糖和枯草芽孢杆菌对肉鸡肠道菌群数量、发酵粪中氨气和硫化氢散发量及营养素利用率的影响[J].畜牧兽医学报,2006,37(4):337-341.
- [2] 倪学勤,GONG J,YU H,等.采用PCR-DGGE技术分析蛋鸡肠道细菌种群结构及多样性[J].畜牧兽医学报,2008,39(7):955-961.
- [3] 朱振,徐琪,赵文明,等.日粮添加微生态制剂对樱桃谷鸭肉质、肠道菌群及其舍内NH₃浓度的影响[J].中国家禽,2012,34(9):29-32.
- [4] LI M,GONG J,COTRILL M,et al. Evaluation of QIAamp DNA mini stool kit for microbial ecological studies[J]. J Microbiol Methods,2003,54:13-20.
- [5] CHIANG Y C,YANY C Y,LI C,et al. Identification of *Bacillus* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp. and *Vibrio* spp. with 16S ribosomal DNA-based oligonucleotide array hybridization[J]. Int J Food Microbiol, 2006, 107:131-137.
- [6] WALTER J,HERTEL C,TANNOCK G W,et al. Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using groupspecific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67:2578-2585.
- [7] ORSOUW N J,LI D Z,VIJG J. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) increases resolution and information of *Alu*-directed interrepeat PCR [J]. Molecular and Cellular Probes,1997,11:95-101.
- [8] 王斌.高粘附性能乳杆菌的筛选及其对肠上皮效果粘附机制的初步研究[D].重庆:第三军医大学图书馆,2005.
- [9] LU J R,LDRIS U,HARMON B,et al. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of thematuring broiler chicken[J]. Appl Environ Microbiol,2003,11:6816-6824.
- [10] JOSEP B R, MONICA V, MIREIA P, et al. Probiotic bacteria produce conjugated linoleic acid locally in the gut that targets macrophage PPAR γ to suppress colitis[J]. PLoS One.2012,7(2):e31238.
- [11] ALAKOMI H L,SKYTITA E,SAARELA M,et al. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane[J]. Appl Environ Microbiol, 2000,66(5):2001-2005.

Effects of *Enterococcus faecium* HDRsEf1 on development of cecal bacterial flora in broilers

GONG Qi¹ ZENG Juan-juan² SHI De-shi¹ WANG Xi-liang¹
WANG Tao³ XIAO Hong-de¹ XIAO Yun-cai¹

1. State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;
2. Hubei Key Laboratory of Animal Nutrition and Feed Science/School of Animal Science and Nutritional Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China;
3. Urumqi City Center of Animal Disease Control and Diagnosis, Urumqi 830063, China

Abstract This trail was conducted to investigate the effects of probiotics *E. faecium* and Aureomycin on the development of cecal bacterial flora in broilers. One hundred and eighty newborn broilers were randomly divided into control, probiotics and antibiotics groups. The digesta in cecal were sampled sterilely and rapidly from the broilers at the age of 7, 14, 21, 28, 35 and 42 d respectively. RT-PCR was used to quantify the number of *Escherichia coli* and *Lactobacilli*. DGGE was used to estimated the changes of cecal bacterial flora. The results showed that addition of probiotics could reduce the number of *E. coli* at the age of 21 d and increase the number of *Lactobacilli* at the age of 42 d significantly ($P < 0.05$). The DGGE profiles showed that it's a transitional period from 7 d to 14 d, and a relatively stable period from 14 d to 42 d for the cecal bacterial flora. However, compared with the antibiotics, the addition of probiotics could help cecal bacterial flora to get through the transitional period more efficiently and keep more steady in the relatively stable period.

Key words DGGE; RT-PCR; bacterial flora; probiotics; antibiotics

(责任编辑:边书京)