

# 鸡生长发育中盲肠微生物菌群结构的 PCR-DGGE 分析

李永洙<sup>1</sup> Yongquan\_Cui<sup>2</sup>

(1. 临沂大学 生命科学学院, 山东 临沂 276005; 2. 国立冈山大学 自然科学研究科, 日本 冈山 700-8530)

**摘要** 研究依莎褐蛋鸡和艾维茵肉鸡发育正常及迟缓鸡群的盲肠细菌种群结构和多样性变化。使用基于 16S rDNA 的 PCR-DGGE 技术, 结合割胶回收 DNA 进行克隆和测序, 分别对 4、6、10、16、20 和 40 周龄蛋鸡及 1、2、4、6、7 和 8 周龄肉鸡发育正常、迟缓鸡群盲肠内容物的细菌群落进行特异性引物图谱指纹和聚类分析, 鉴定特异性和共性群落。结果表明, *Lactobacillus* 属在两品种发育正常鸡群盲肠内容物细菌的相似性均高于迟缓鸡群, 两品种各周龄和发育正常、迟缓鸡群间指纹图谱平均条带数差异显著 ( $P < 0.05$ )。而 *Bacteroides* 属在发育正常鸡群盲肠内容物细菌的相似性与迟缓鸡群较为相近; 发育正常、迟缓鸡群间平均条带数差异显著 ( $P < 0.05$ )。 *Clostridium* 属在蛋鸡 20、40 周龄的平均条带数差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 但肉鸡各周龄和发育正常、迟缓鸡群间的平均条带数差异显著 ( $P < 0.05$ )。序列测序结果, *Lactobacillus* 属在蛋鸡产蛋期发育正常、迟缓鸡群均定居于 *Lactobacillus agilis*; 而育雏和育成期定居于 *Lactobacillus aviaries* 和不可培养的细菌。两品种发育正常、迟缓鸡群均定居于 *Bacteroides* 属的 *Bacteroides acidifaciens*、Uncultured bacterium, 而发育正常、迟缓蛋鸡群存在 *Clostridium* 属 Uncultured proteobacterium, 发育正常肉鸡群定居 *Shigella sonnei*, 而两品种发育迟缓鸡群均缺乏此类菌种。结果显示, 依莎褐蛋鸡和艾维茵肉鸡群各饲养阶段盲肠细菌群落差异显著, 对鸡群正常生长发育影响较大。

**关键词** 鸡; 盲肠; 菌落; 变性梯度凝胶电泳 (DGGE)

中图分类号 Q 938.15

文章编号 1007-4333(2011)04-0118-09

文献标志码 A

## Analysis of chicken cecal microbial flora the structure growth and development of PCR-DGGE

LI Yong-zhu<sup>1</sup>, Yongquan\_Cui<sup>2</sup>

(1. College of Life Science, Linyi University, Linyi 276005, China;

2. Laboratory of Animal Genetics, Okayama University, Okayama 700-8530, Japan)

**Abstract** This research is to study the effects of Normal, slow development layers and broiler on cecal bacterial population structure and diversity. To identify specific and common community members, cecal bacterial population structure and diversity in 4-, 6-, 10-, 16-, 20-, and 40-week-old commercial layers and 1-, 2-, 4-, 6-, 7-, and 8-week-old broiler chickens of Normal development, slow comparatively studied using PCR-DGGE of 16S rDNA, combined with cloning and sequencing of DNA recovered from specific and common tapping bands of PCR production with specific primers. *Lactobacillus*-specific primers and cluster analysis showed more similarity of cecal bacteria in the chicken of both varieties of Normal than in those of slow. The average band number of PCR-DGGE fingerprints of 16S rDNA from the chicken of the same variety at different weeks and Normal development, slow of age was significantly different ( $P < 0.05$ ). *Bacteroides*-specific primers and cluster analysis exhibited more common bands and closer similarity of cecal bacteria in the two varieties of Normal, slow development. The average band numbers of PCR-DGGE fingerprints of 16S rDNA from the two varieties at different weeks of age did not display significant difference ( $P > 0.05$ ), but the difference between chickens of Normal, slow development was significant ( $P < 0.05$ ). *Clostridium* specific primers and

收稿日期: 2011-02-10

基金项目: 山东省教育厅科技计划项目(J06K58); 临沂大学博士科研启动基金(BS07011); 日本学生支援机构归国外国留学生短期研究制度基金项目(JP22GR037)

第一作者: 李永洙, 副教授, 博士, 主要从事动物营养与遗传育种研究, E-mail: riyongzhu@yahoo.com.cn

cluster analysis revealed that the difference between the average fingerprint band number from the commercial layers 20- and 40-week old was not significant ( $P > 0.05$ ), but the difference between that from health and poor broiler chickens at different weeks of age was significantly different ( $P < 0.05$ ). Sequence analysis of DNA recovered from *Lactobacillus-specific* tapping bands of PCR production showed that cecal *Lactobacillus agilis* abounded in commercial layers of both Normal development, slow during laying period, *Lactobacillus aviaries* and unculturable bacteria were abundant at the brooding and rearing periods. Unculturable *Weissella* sp. and *Lactobacillus animalis* were plentiful in chickens of the two varieties of Normal, slow development. Sequence analysis of DNA recovered from *Bacteroides-specific* tapping bands of PCR production exhibited that cecal *Bacteroides acidifaciens* and uncultured bacterium were abundant in the two varieties of Normal development, slow. Sequence analysis of DNA recovered from *Clostridium* specific tapping bands of PCR production displayed that the cecum of the two varieties of Normal, slow development were plentiful of unculturable bacterium. Unculturable proteobacterium were abundant in commercial layers. *Shigella sonnei* existed in large quantities in healthy broiler chickens, but were absent in the two species of poor health. The results of this study showed that cecal bacterial community structure in chicken at different feeding stages was affected by chicken species and their health conditions.

**Key words** laying hen; cecal; bacterial flora; denaturing gradient gel electrophoresis

家禽肠道是一个复杂而多样的生态环境,其体内微生物超过 400 种,这些微生物对宿主的正常发育和营养物质的消化吸收起着重要的作用。长期以来,微生物鉴别方法主要利用传统的培养法或是形态学法进行细菌组成即细菌分类鉴定和菌群结构的研究,这些方法存在耗时长,特异性差,灵敏度低等问题<sup>[1]</sup>,随着基于 16S rDNA 分子技术发展,更全面更深入的了解微生物菌落结构,其中 DGGE/TGGE 技术被用于检测人类<sup>[2]</sup>、猪<sup>[3]</sup>和鸡<sup>[4]</sup>等动物胃肠道主要细菌的结构和多样性,但受 DGGE 方法的限制,只能检测到样品中含量在 1% 左右的细菌<sup>[5]</sup>。目前,宿主与肠道微生物的相互作用,会对宿主的营养、生理以及免疫产生严重的影响。肠道菌群失调会间接影响机体对营养物质的消化吸收,降低机体免疫力,削弱肠道的屏障功能,影响家畜的生长和健康。家禽品种、饲养环境以及饲养方式都可能影响肠道菌群,使肠道菌群的研究很难标准化,倪学勤<sup>[6]</sup>等利用 PCR-DGGE 技术分析蛋鸡 MHC 基因与商品蛋鸡对肠道细菌种群结构的影响,结果表明不同宿主基因影响蛋鸡不同周龄、不同肠段细菌群落的结构。Lovanh<sup>[7]</sup>等运用 PCR-DGGE 技术对鸡舍中不同位置的 44 个鸡粪样品进行了分析,结果显示革兰氏阳性菌乳杆菌目、芽孢杆菌目和放线菌类在鸡粪微生物群落结构中占主导地位。但有关家禽发育正常、迟缓和日龄效应对肠道菌群的影响,未见相关报道。本试验通过改进以往 PCR-DGGE 方法,对饲养管理和饲养条件相同的依莎褐蛋鸡和艾维茵肉鸡发育正常、迟缓鸡群盲肠内容物菌群 16S rDNA

基因的 DGGE 指纹图谱比较分析,研究家禽品种对不同周龄、发育鸡群盲肠细菌种群结构和多样性的影响,针对不同鸡群盲肠正常菌群分析,旨在为研制微生态制剂提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集与处理

试验利用饲养在山东省临沂某饲养场不同养殖分场依莎褐蛋鸡和艾维茵肉鸡(饲养环境、饲料条件相同),分别在无菌的状态下取 4、6、10、16、20 和 40 周龄蛋鸡以及 1、2、4、6、7 和 8 周龄肉鸡生长发育正常、迟缓鸡群盲肠内容物,并将 5 只相同鸡群盲肠内容物均匀混合,然后按 0.2 g/管分装到 2 mL 离心管,置 -20 °C 保存备用。

### 1.2 主要试剂与仪器

Taq DNA 聚合酶及 PCR 反应缓冲液购自 Takara, Otsu, Japan Roche Diagnostics K. K. (日本); PCR 引物由 Laboratory of Animal Genetics Okayama University of Guelph 合成; DGGE 成套试剂购自 Bio-Rad 公司 (Bio-Rad Laboratories, K. K. 日本); QIAamp<sup>®</sup> DNA Stool Mini Kit 和 QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit 购自 QIAGEN 公司 (日本); TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit 购自 Biotools Laboratory Inc 公司 (日本); 银染药品和试剂购自 Thermo Fisher Scientific K. K. 公司 (Thermo Fisher Scientific K. K. 日本)。310 型 DNA 测序仪 (ABI PRISM<sup>®</sup> 310 Genetic Analyzer, Laboratory of Animal Genetics Okayama University Japan Okayama)。

### 1.3 细菌总 DNA 的提取

参照文献[8],采用 QIAamp<sup>®</sup> DNA Stool MiniKit,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 基因组总 DNA 16S rDNA 特异性扩增片段

引物设计参照文献[9-12](表 1),PCR 反应体

系(50 μL)参照文献[13]:10×缓冲液 5 μL(含 15 mmol/L MgCl<sub>2</sub>),10 mmol/μL dNTP 4 μL,10 pmol/μL 引物 1 μL,模板 DNA 1.0 μL,5 U/μL Taq DNA 聚合酶 0.5 μL,ddH<sub>2</sub>O 补足 50 μL。PCR 扩增条件见表 2。PCR 产物用 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测片段大小和浓度。

表 1 特异性引物序列

Table 1 Specific sequence of primers

引物名称	引物序列
GC357f (57mer)	5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGG GGGCACGGGGGCGCTACGGGAGGCAGCAG-3'
357f (57mer)	5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'
517r (17mer)	5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'
Lactobacillus159f(20mer)[9]	5'-GGAAACAGRTGCTAATACCG-3'
677r(17mer)	5'-CACCGCTACACATGGAG-3'
Bacteroides303f(17mer)[10]	5'-GAAGGTCCCCCACATTG-3'
708r(18mer)	5'-CAATCGGAGTTCTTCGTG-3'
Bifidobacterium164f(18mer)[11]	5'-GGGTGGTAATGCCGGATG-3'
601r(21mer)	5'-TAAGCCATGGACTTTCACACC-3'
Clostridium150f (23mer) [12]	5'-AAAGGRAGATTAATACCGCATAA-3'
690r (20mer)	5'-TTCTTCTAATCTCTACGCA-3'

表 2 PCR 反应程序

Table 2 PCR reaction program

反应程序名称	预变性	变性	退火	延伸	循环	最后延伸
Touchdown	94℃ 10 min	93℃ 30 s	65℃ 30 s	72℃ 1 min	10	72℃ 1 min
		93℃ 30 s	60℃ 30 s	72℃ 1 min	10	72℃ 1 min
		93℃ 30 s	55℃ 30 s	72℃ 1 min	10	72℃ 1 min
Lactobacillus	94℃ 2 min	94℃ 30 s	61℃ 1 min	68℃ 1 min	35	68℃ 5 min
Bacteroides	94℃ 5 min	95℃ 1 min	56℃ 1 min	72℃ 45 s	35	72℃ 5 min
Bifidobacterium	94℃ 5 min	95℃ 1 min	59℃ 1 min	72℃ 45 s	35	72℃ 5 min
Clostridium	95℃ 3 min	95℃ 45 s	57℃ 45 s	72℃ 2 min	35	72℃ 3 min
Cloning	95℃ 8 min	95℃ 1 min	55℃ 1 min	72℃ 1 min	30	72℃ 8 min
ByeDye25	98℃ 2 min	96℃ 10 s	50℃ 5 s	60℃ 4 min	25	60℃ 2 min

### 1.5 基因组总 DNA 16S rDNA V<sub>3</sub> 组扩增片段变性梯度凝胶电泳

利用已获得的特异性扩增片段均为相应类群的 DNA 16S rDNA V<sub>3</sub> 组扩增片段产物,用相应的微

卫星引物(“GC 夹”的 339f 和 539r)进行 PCR 扩增。PCR 产物用 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测片段大小和浓度。参照文献[14],使用 Bio-Rad Dcode 进行 DGGE 凝胶电泳。8%的聚丙烯酰胺胶上进行分

离,变性剂梯度范围为 20%~60%(100%的变性剂包含 7 mol/L 尿素和 40%去离子甲酰胺)。电泳在恒温 60℃下 1×TAE 缓冲液中进行,电压 150 V, 12 h。电泳结束后进行 SYBRgreen I(100×)染色,用 UVI 成像系统检测照相。将 DGGE 图谱上的差异条带和共性条带分别回收,从凝胶上小心切下 DGGE 条带,放入 1.5 mL 灭菌离心管中,加入 10 μL 无菌水,在 4℃中暗处放置 12 h。用相应的微卫星引物(去掉“GC 夹”的 339f 和 539r)进行二次 PCR 扩增。PCR 产物用 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测片段大小和浓度。

**1.6 基因组总 DNA 16S rDNA V<sub>3</sub> 组扩增片段琼脂糖凝胶电泳割胶回收、纯化与载体的连接、测序**

用无菌手术刀将琼脂糖凝胶电泳割胶回收。回收产物用 Wizard PCR Prep sDNA Purification System 进行纯化,纯化产物采用 DynaExpressTA PCR Cloning Kit (TaKaRa),构建克隆文库,用 QIAamp® DNA Stool MiniKit,抽提质粒,经 PCR 和电泳确证克隆片段的正确性。将筛选后的细菌 DNA 应用 PCR 的 ByeDye25 法全域增幅。PCR 产物经处理后在 310 型 DNA 测序仪。所得结果在 GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)数据库

中进行检索,确定细菌的种类和名称,寻找亲缘关系最近的细菌或克隆。

**1.7 数据统计分析**

盲肠微生物菌群的数据分析使用分析软件 BioNumerics 3.0 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium)对 PCR-DGGE 指纹图谱进行条带计数,用 Dice 方法计算相似性指数 Cs,用 UPGMA (unweighted pair group mean average)进行聚类分析。

**2 结果与分析**

**2.1 蛋鸡和肉鸡盲肠内容物的菌群结构分析**

盲肠内容物的菌群结构分析表明, *Lactobacillus*、*Bacteroides* 特异引物扩增中 24 个样品中均得到 16S rDNA V<sub>3</sub> 区基因片段,但 *Bifidobacterium* 扩增中未获得 16S rDNA V<sub>3</sub> 区基因片段, *Clostridium* 扩增中 20、40 周龄蛋鸡和 4、6 周龄肉鸡发育迟缓群以及 1、2、8 周龄正常肉鸡群共 7 个样品中获得 16S rDNA V<sub>3</sub> 区基因片段,利用上述已得到片段 16S rDNA V<sub>3</sub> 区基因进行 PCR-DGGE 指纹图谱和聚类分析。图 1 为 *Lactobacillus* 分析结果,从分析结果中可知,尽管 2 个截然不同品种均有一些共性条带,但发育正常鸡群盲肠内容物

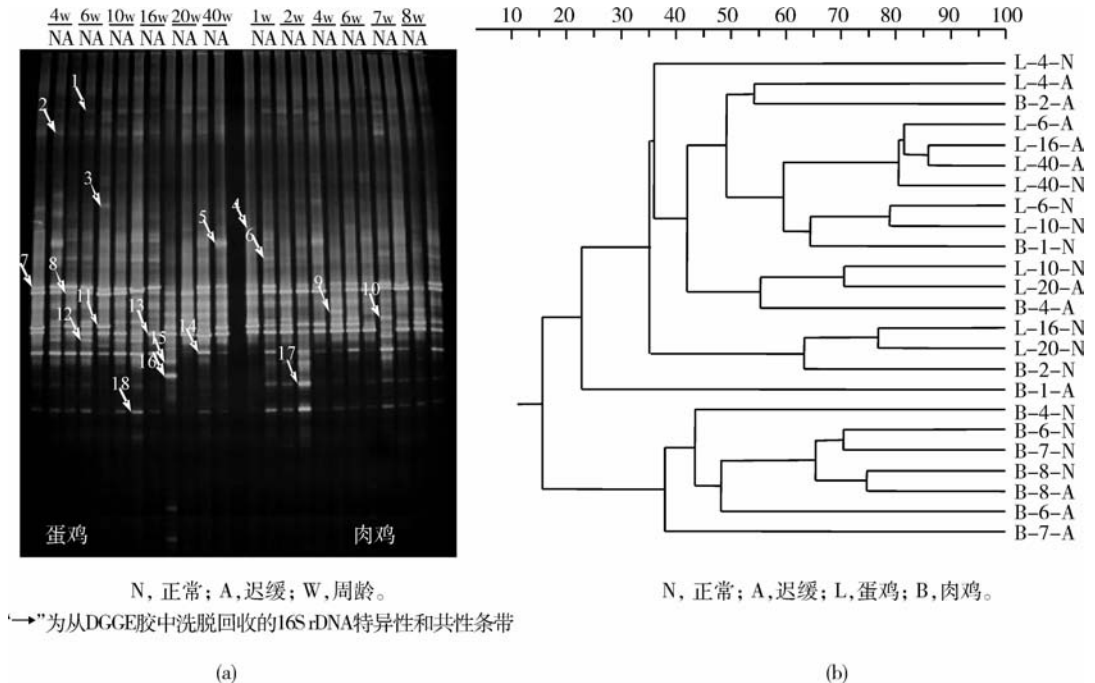
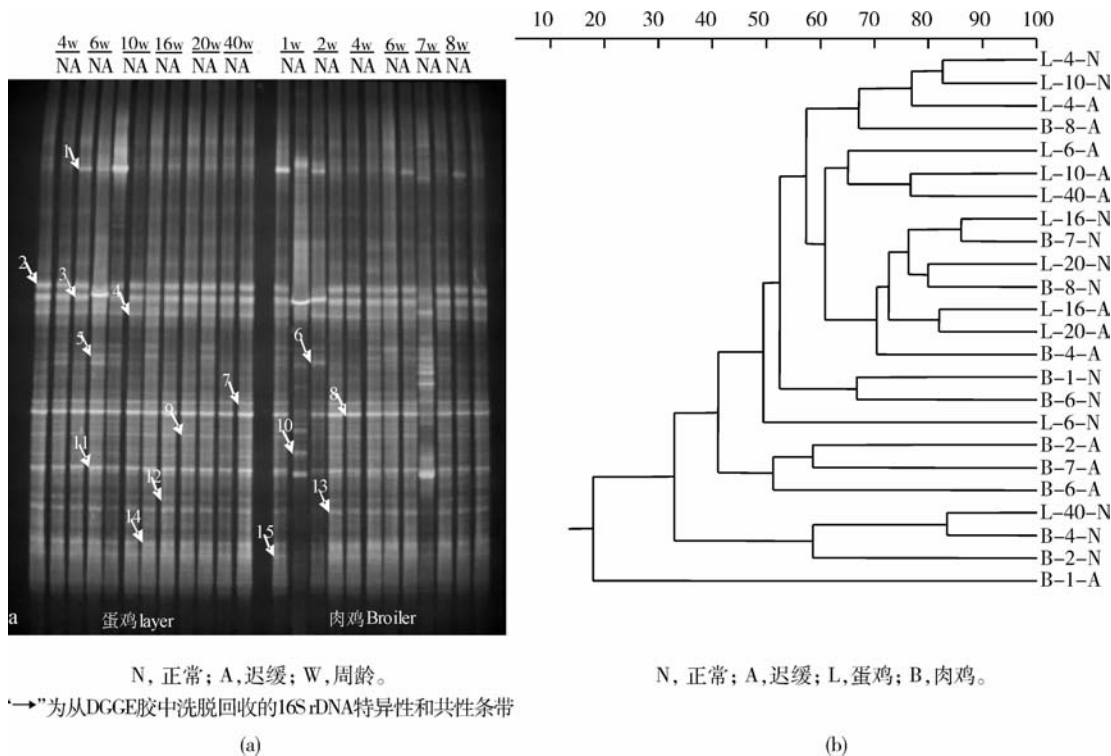


图 1 不同周龄蛋鸡和肉鸡盲肠微生物细菌 16S rDNA V<sub>3</sub> 区基因 *Lactobacillus* 特异性 PCR-DGGE 指纹图谱 (a) 和聚类分析 (b)

Fig. 1 *Lactobacillus* Specificity PCR-DGGE DNA profiles of the Caeca and dendrogram of the V3 region of 16S rDNA gene (a) of bacteria in Cecal digesta obtained at different age (b)

间细菌相似性均高于迟缓鸡群；同一品种不同周龄和发育正常、迟缓鸡群间指纹图谱平均条带数差异显著( $P < 0.05$ )。两品种雏期细菌种类均最丰富,分别为14~18和9~14条,育成期分别为11~15和9~14条,产蛋期(育肥)细菌种类比较少,分别为7~11和7~12条。图2中可知,*Bacteroides*

属在两品种均具有较多共性条带,发育正常与迟缓鸡群间盲肠内容物细菌的相似性较为相近;蛋鸡和肉鸡在不同周龄指纹图谱的平均条带数差异均不显著( $P > 0.05$ ),但发育正常和迟缓鸡群间平均条带数差异显著( $P < 0.05$ )。



N, 正常; A, 迟缓; W, 周龄。

“→”为从DGGE胶中洗脱回收的16S rDNA特异性和共性条带

N, 正常; A, 迟缓; L, 蛋鸡; B, 肉鸡。

图2 不同周龄蛋鸡和肉鸡盲肠微生物细菌16S rDNA V3区基因*Bacteroides*特异性PCR-DGGE指纹图谱(a)和聚类分析(b)

Fig. 2 *Bacteroides* Specificity PCR-DGGE DNA profiles of the Caeca and dendrogram of the V3 region of 16S rDNA gene (a) of bacteria in Ceacal digesta obtained at different age (b)

图3中可知,表示为*Clostridium*属在发育正常肉鸡群盲肠内容物细菌相似性低于迟缓鸡群,另外发育正常蛋鸡群盲肠内容物间细菌相似性高于迟缓鸡群,20、40周龄间蛋鸡平均条带数差异不显著( $P > 0.05$ ),但不同周龄以及发育正常和迟缓肉鸡群间平均条带数差异显著( $P < 0.05$ )。正常蛋鸡产蛋期细菌种类最丰富,电泳条带分别为12和14条;而育雏期和育肥期正常肉鸡群,电泳条带数分别为17~19和8条,生长期迟缓鸡群,电泳条带数11~24条。

2.2 蛋鸡和肉鸡盲肠内容物的菌群多样性分析

由图4可知,两品种发育正常和迟缓鸡群间盲肠内容物细菌组成不同,即*Lactobacillus*属菌群相

似性指数在蛋鸡育雏、育成期和产蛋期分别为65.13%~67.50%、54.17%~64.17%和36.67%~43.56%;而肉鸡育雏、生长期和育肥期分别为50.48%~53.09%、42.22%~47.79%和55.00%~56.25%。结果表明蛋鸡产蛋期的盲肠细菌影响最大,育雏期影响最小;而肉鸡生长期受盲肠内容物细菌影响最大,育肥期影响最小。*Bacteroides*属菌群相似性指数在蛋鸡育雏、育成期和产蛋期分别为41.05%~54.41%、48.68%~49.78%和55.56%~56.45%;而肉鸡育雏、生长期和育肥期分别为32.75%~48.68%、55.73%~56.86%和52.78%~60.27%。结果表明,蛋鸡6周龄的盲肠细菌影响最大,产蛋期影响最小;而肉鸡育雏期的盲肠细菌影响

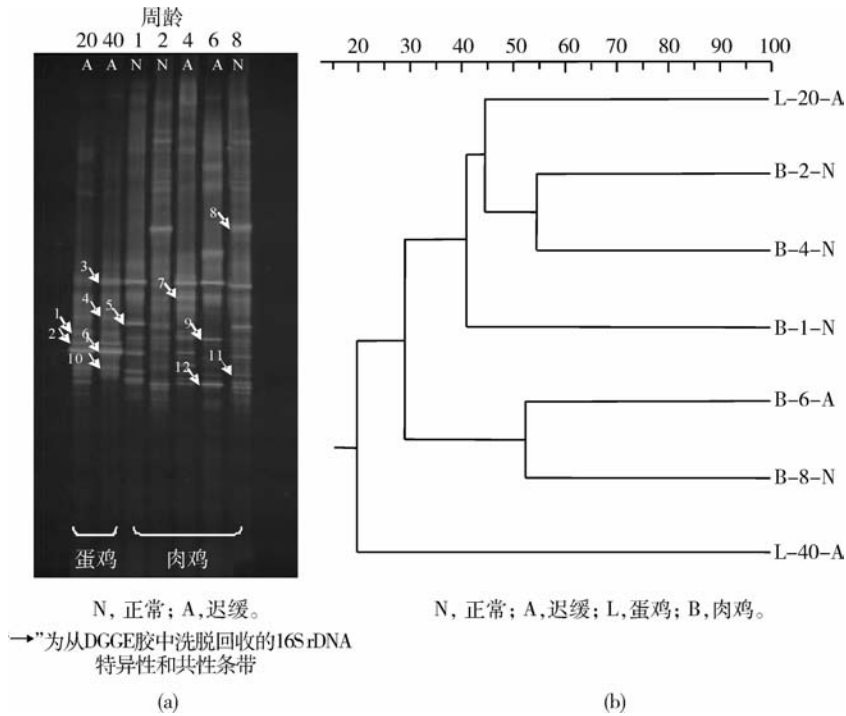


图 3 不同周龄蛋鸡和肉鸡盲肠微生物细菌 16S rDNA V3 区基因 *Clostridium* 特异性 PCR-DGGE 指纹图谱 (a) 和聚类分析 (b)

Fig. 3 *Clostridium* Specificity PCR-DGGE DNA profiles of the Caeca and dendrogram of the V3 region of 16S rDNA gene (a) of bacteria in Ceecal digesta obtained at different age (b)

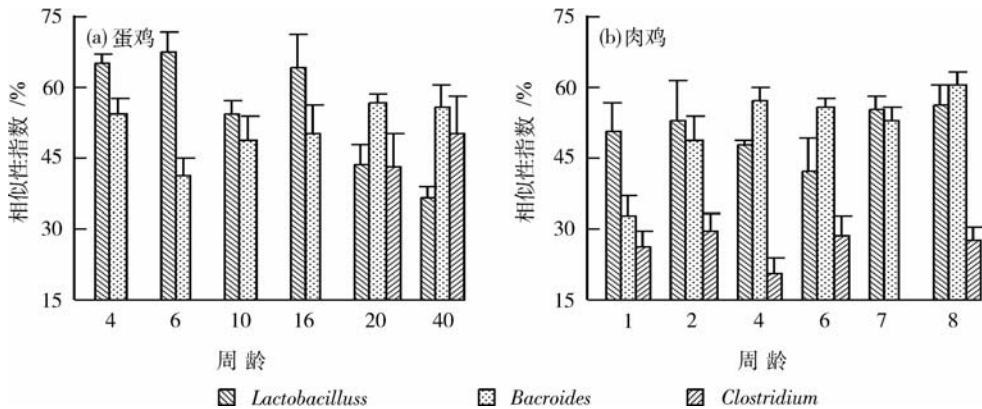


图 4 盲肠微生物 DNA-DGGE 的相似性指数分析

Fig. 4 Similarity profiles of the cae ca

最大,8 周龄影响最小。*Clostridium* 属菌群相似性指数在蛋鸡产蛋期为 42.86%~50.00% 均高于 40%,而肉鸡育雏和生长期分别为 26.32%~29.41%和 20.83%~28.76%均低于 30%。

2.3 蛋鸡和肉鸡盲肠内容物的特异性菌群和共性菌群分析

图 1~3 中箭头所指的指纹图谱中分别割胶回

收测序结果见表 3。*Lactobacillus* 属在产蛋期发育正常、迟缓蛋鸡群均大量定居 *Lactobacillus agilis*; 而育雏和育成期大量定居 *Lactobacillus aviaries*、Uncultured bacterium (第 8 条带)。Uncultured *Weissella* sp、*Lactobacillus animalis* 在 2 个品种发育正常、迟缓鸡群均大量存在。另外,20、40 周龄迟缓蛋鸡群和 1、2、8 周龄正常和 4、6 周龄迟缓肉鸡群

表3 PCR-DGGE 共性条带和特异性条带的基因片段序列的比对结果

Table 3 Comparison of genomic sequences in common bands and special bands by sequencing and BLAST analysis

条带	相近菌种	碱基数/bp	相似率/%	GenBank 登记号
乳酸菌属特异性 PCR-DGGE( <i>Lactobacillus</i> Specific PCR-DGG)				
1	Uncultured bacterium	710	98	FJ836331
2	<i>Lactobacillus gasseri</i>	684	95	GU417927
3	未测出	—	—	—
4	<i>Lactobacillus amylovorus</i>	543	99	HQ384286
5	Uncultured bacterium	747	100	HM575083
6	Uncultured bacterium	223	99	HQ314997
7	<i>Weissella. Cibaria</i>	560	100	GU369787
8	Uncultured <i>Weissella</i> sp.	198	93	AB536789
9	<i>Lactobacillus agilis</i>	508	98	AB300519
10	<i>Lactobacillus salivarius</i>	534	99	HQ384292
11	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	966	100	GU344709
12	<i>Lactobacillus aviaries subsp</i>	691	99	AB289044
13	<i>Lactobacillus animalis</i>	1 360	99	HQ293062
14	Uncultured bacterium	187	90	GU578810
15	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	747	99	HQ384294
16	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	1 471	100	HM162410
17	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	192	94	EF015468
18	Uncultured bacterium	702	99	FJ834503
杆菌特异性 PCR-DGGE( <i>Bacteroides</i> Specific PCR_DGGE)				
1	Uncultured bacterium	571	97	EU506108
2	Uncultured bacterium	781	95	HQ321794
3	Uncultured bacterium	545	98	HQ320782
4	未测出	—	—	—
5	Uncultured bacterium	547	98	AY668237
6	未测出	—	—	—
7	Uncultured bacterium	700	94	FJ557165
8	<i>Bacteroides acidifaciens</i>	1 490	99	AB510696
9	Uncultured <i>Bacteroidales</i> bacterium	461	90	HM079683
10	<i>Bacteroides helcogenes</i>	1 473	92	AB510707
11	Uncultured bacterium	499	95	AJ419037
12	<i>Bacteroides ovatus</i>	1 459	91	AB510705
13	Uncultured bacterium	699	94	HQ321414
14	Uncultured <i>Bacteroidales</i> bacterium	805	91	MH104791
15	未测出	—	—	—
梭菌属特异性 PCR-DGGE ( <i>Clostridium</i> Specific PCR_DGGE)				
1	Uncultured proteobacterium	636	92	EF697608
2	<i>Erwinia</i> sp. 728MF	722	100	DQ904614
3	Uncultured bacterium	1 407	100	FJ683891
4	Uncultured bacterium	745	99	FJ163926
5	<i>Shigella sonnei</i>	1 224	100	HQ407271
6	Uncultured <i>Escherichia</i> sp.	717	99	DQ856885
7	Uncultured bacterium	1 515	98	AB506188
8	Uncultured bacterium	877	100	GU171201
9	Uncultured bacterium	884	100	GU060393
10	<i>Clostridium sartagoforme</i>	1 420	100	FJ384380
11	<i>Clostridium</i> sp. CM-C81	1 420	100	EU869238
12	Swine fecal bacterium RF3E-Xyl6	1 431	100	FJ753844

中均定居 *Uncultured bacterium* (第 12 条带)。*Clostridium* 属在 2 个品种发育正常、迟缓鸡群均大量定居 *Uncultured bacterium* (第 3 条带); 其中蛋鸡中定居 *Uncultured proteobacterium* (第 1 条带), 而肉鸡群定居 *Uncultured bacterium* (第 9 条带); 正常肉鸡群中大量定居 *Shigella sonnei* (第 5 条带), 而 2 个品种迟缓鸡群均缺乏此类菌种。*Bacteroides* 属测序结果中, 两品种发育正常、迟缓鸡群均大量定居 *Bacteroides acidifaciens*、*Uncultured bacterium*。在 45 个测序结果中, 与 GenBank 数据库中微生物的同源性绝大多数都大于 98%, 有的同源性甚至达到了 100%。但是 *Lactobacillus* 属条带 8 和 14 与已鉴定物的相似性仅为 93% 和 90%, 而与之亲缘关系最近的已鉴定的微生物的同源性仅为 90% 和 84%; 条带 2 和 17 与已鉴定的菌中相似性仅为 95% 和 94%, 而同源性仅为 91% 和 89%。*Bacteroides* 属条带 7、9、13、14 与数据库中与之同源性最高的不可培养微生物相最近的已鉴定微生物同源性仅为 94%、90%、94% 和 91%, 而同源性仅为 90%、85%、91% 和 87%; 条带 10 和 12 与已鉴定的菌中相似性仅为 92% 和 91%, 而同源性仅为 86%、83%。*Clostridium* 属条带 1 与数据库中与之同源性最高的不可培养微生物相最近的已鉴定微生物同源性仅为 92%, 而同源性仅为 86%。

### 3 讨论

#### 3.1 宿主生长因素对盲肠菌群的组成影响

家禽的生长发育受遗传、营养、饲养管理和疾病等因素的影响, 许多疾病会导致饲料利用效率下降, 使之正常发育受阻。肠道微生物可通过影响养分的利用和胃肠道系统的发育来影响宿主的营养、健康和生长性能。依赖于肠道微生物菌群的组成和活性, 会对宿主的健康和生长产生积极或消极的影响。对人类<sup>[1]</sup>、猪<sup>[2]</sup>和鸡<sup>[3]</sup>等的研究结果均证实不同个体肠道菌群指纹图谱有差异, 即使是饲养于相同环境, 饲喂相同饲料, 相互接触的同龄肉鸡, 都会表现出不同的带谱<sup>[15]</sup>, 说明宿主因素对肠道菌群的组成影响很大。本试验结果也证明不同宿主、不同周龄发育正常鸡群对盲肠细菌的影响存在差异。*Lactobacillus*、*Clostridium* 特异引物 PCR-DGGE 指纹图谱和聚类结果说明, 不同宿主间均具有一些共性条带存在, 但发育正常鸡群盲肠内容物间细菌的相似性均高于迟缓鸡群。而 *Bacteroides* 指纹图

谱和聚类结果, 两品种具有较多的共性条带, 正常鸡群盲肠内容物间细菌的相似性与迟缓鸡群比较相近, 其原因尚不清楚, 有待于研究。

#### 3.2 宿主日龄因素对盲肠菌群的组成影响

光冈知足<sup>[16]</sup>等对盲肠内的正常菌群和优势菌群进行过研究。研究证明, 正常情况下, 成年鸡肠道内正常菌群是处于生态平衡状况, 肠道内各菌类间也有稳定的比例关系, 这种生态平衡能抑制外界病原菌的入侵。新生雏鸡 4 日龄后卵黄抗体逐渐消失, 肠内细菌群尚未形成稳定的区系、可能是造成 9~21 日龄雏鸡消化道疾病高发期的原因。因而, 尽早确立肠道优势菌群的优势地位, 建立平衡的肠道菌群, 是预防雏鸡消化道疾病的重要条件。本试验中蛋鸡和肉鸡不同饲养阶段对盲肠细菌群落的影响均存在年龄(周龄)效应。*Lactobacillus* 属菌群在蛋鸡产蛋期对盲肠细菌的影响最大, 育雏期影响最小; 而肉鸡的生长期对盲肠细菌的影响最大, 育肥期影响最小。*Bacteroides* 属菌群在蛋鸡 6 周龄对盲肠细菌的影响最大, 产蛋期影响最小; 而肉鸡的育雏期对肠道细菌的影响最大, 8 周龄影响最小。*Clostridium* 属菌群在商品蛋鸡的产蛋期均高于 40%, 而肉鸡的育雏和生长期均低于 30%。

#### 3.3 盲肠菌群间互作用对宿主的影响

Ley R<sup>[17]</sup>等有研究证明宿主基因型可影响肠道主要正常菌群, 宿主因素决定细菌在不同个体中的定植能力, 肠内正常菌群平衡是相对的。饲料种类、抗菌药物、疾病、气候变化以及日龄等因素, 均可影响菌群数量和种类的变动, 研究比较雏鸡、育成鸡和成年鸡肠道后段菌群变化, 发现雏鸡随日龄增长双歧杆菌与大肠杆菌明显增加, 肠球菌和厌氧弯曲杆菌逐渐减少, 乳杆菌、消化球菌、类杆菌、葡萄球菌和芽胞杆菌的变化不大。本试验测序的盲肠优势菌群与前者研究结果相似, 但本试验无法鉴定双歧杆菌 (*Bifidobacterium*)。原因尚不清楚, 还有待深入研究。另外, 倪学勤<sup>[18]</sup>等研究证明蛋鸡消化道前段的优势细菌三得利乳杆菌、索氏梭菌和大肠杆菌等在盲肠中没有相应条带, 说明它们在盲肠中的含量比较少或不能在盲肠定植。蛋鸡年龄也会影响肠道菌群的多样性。*Lactobacillus*、*Clostridium* 属菌群盲肠内的特异性条带很多, *Bacteroides* 属菌群共性条带很多, 而测序结果也证实大多数是至今尚不可培养的细菌。至于本研究发现 *Lactobacillus johnsonii* (第 15 条带) 未出现指纹图谱的 20、40 周



龄蛋鸡和4、6周龄发育迟缓肉鸡群以及1、2、8周龄正常肉鸡群共7个样品与*Clostridium*属*Shigella sonnei*(第5条带)间菌种互作作用以及其菌种对家禽生长发育作用,提取菌种后需要进一步验证。

#### 4 结 论

利用PCR-DGGE指纹图谱技术分析发育正常和迟缓的蛋鸡、肉鸡的盲肠部位决定菌群结构和多样性。该研究结果对特异引物定向分离培养蛋鸡、肉鸡盲肠优势细菌,调控盲肠菌群平衡,提高家禽生长发育以及生产性能提供科学依据,为家禽微生物制剂的研究开辟了一条更为有效的途径。

致谢 对Nishino naoki教授及Chao Wang博士在本研究工作中给予的支持与帮助表示感谢。

#### 参 考 文 献

- [1] Mothershed E A, Whitney A M. Nucleic acid-based methods for the detection of bacterial pathogens present and future considerations for the clinical laboratory[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2006, 363: 206-220
- [2] Nadal I, Donant E, Ribes-Koninckx C, et al. Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with coeliac disease[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2007, 56: 1669-1674
- [3] Konstantinovs, Zhu W Y, Williamsba, et al. Effect of fermentable carbohydrates on piglet faecal bacterial communities as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA [J]. *Fems microbiol Ecol*, 2002, 43: 225-235
- [4] Van Der Wielen P W J J, Keuzenkamp D A, Lipmanlja, et al. Spatial and temporal variation of the intestinal bacterial community in commercially raised broiler chickens during growth[J]. *Microbiol*, 2002, 44: 286-293
- [5] Ana Belén Flórez, Baltasar Mayo, et al. PCR-DGGE as a tool for characterizing dominant microbial populations in the Spanish blue-veined Cabrales cheese[J]. *International Dairy Journal*, 2006, 16: 1205-1206
- [6] 倪学勤, Joshua Gong, Hai Yu, et al. PCR-DGGE技术分析蛋鸡MHC基因对肠道细菌种群结构的影响[J]. *中国农业科学*, 2009, 42(7): 2564-2571
- [7] Lovanh N, Cook K, Rothrock M, et al. Spatial shifts in microbial population structure within poultry litter associated with physicochemical properties[J]. *Poultry Science*, 2007, 86: 1840-1849
- [8] Sakai M, Matsuka A, Komura T, et al. Application of a new PCR primer for terminal restriction fragment length polymorphism analysis of the bacterial communities in plant root[J]. *Microbiol Methods*, 2004, 59: 81-89
- [9] Hans G H J Heilig, Erwin G Zoetendal, Elaine E Vaughan, et al. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(1): 114-123
- [10] Sabine Bartosch, Alemu Fite, George T Macfarlane, et al. Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(6): 3575-3581
- [11] Hopkins M J, Macfarlane G T, Furrie E, et al. Characterisation of intestinal bacteria in infant stools using real-time PCR and northern hybridisation analyses [J]. *Fems Microbiology Ecology*, 2005, 54: 77-85
- [12] Chun-Hsiung Hunga, Chin-Hung Chenga, et al. Application of *Clostridium*-specific PCR primers on the analysis of dark fermentation hydrogen-producing bacterial community [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2008, 33: 1586-1592
- [13] Matsuka A, Sakai M, Kanazawa S. Application of T-RFLP analysis for bacterial community structure of colonies grown on agar plates[J]. *Agric Kyushu Univ*, 2003, 48: 107-112
- [14] Sakai J S, Kleckner N, Yang X et al. Tn transpososome assembly involves a folded intermediate that must be unfolded for target capture and strand transfer[J]. *EMBO J*, 2000, 19: 776-785
- [15] Van der wielen P W J J, Keuzenkamp D, lipmanlja A, et al. Spatial and temporal variation of the intestinal bacterial community in commercially raised broiler chickens during growth[J]. *Microb Ecol*, 2002, 44: 286-293
- [16] 光岡知足. 腸内フローラ・宿主・細菌間の相互作用[M]. 东京:学会出版センター, 2004
- [17] Ley R E, Peterson D A, Gordon J I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine[J]. *Cell*, 2006, 124: 837-848
- [18] 倪学勤, Joshua Gong, Hai Yu, 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

(责任编辑: 苏燕)