

地衣芽孢杆菌 H2 对坏死性肠炎肉鸡生长性能及肠道菌群的影响

周梦佳^{1,2} 曾东^{1,2} 倪学勤^{1,2*} 涂腾³ 王鹤松^{1,2}

(1. 四川农业大学 动物医学院/动物微生态研究中心,成都 611130;

2. 动物疫病与人类健康四川省重点实验室,成都 611130;

3. 四川农业大学 动物科技学院/动物遗传育种研究所,成都 611130)

摘要 为研究地衣芽孢杆菌 H2 对坏死性肠炎肉鸡生长性能及肠道菌群的影响,选取 240 只 1 日龄科宝-500 肉鸡,随机分为 I 组(空白对照组)、II 组(造模组)、III 组(球虫+鱼粉组)和 IV 组(地衣芽孢杆菌防治组)。II 组、III 组和 IV 组从 14 日龄起饲喂添加 30% 鱼粉的日粮并于 15 日龄灌喂球虫,II 组和 IV 组 18~20 日龄连续灌喂产气荚膜梭菌(2.2×10^8 cfu/mL) 1 mL,其余各组灌喂同等剂量的生理盐水,试验期总共为 22 d。结果表明:坏死性肠炎的发生会显著降低肉鸡体增重升高料重比($P < 0.05$),地衣芽孢杆菌的添加能提高坏死性肠炎肉鸡体增重。DGGE 图谱聚类结果显示,肉鸡回肠内容物菌群主要聚为两簇,IV 组和 I 组聚为一簇,II 组和 III 组聚为一簇,相似性为 0.70。此外,与 II 组相比,I 组和 IV 组回肠内容物中乳杆菌属数量显著增加($P < 0.05$),I 组肠杆菌科数量显著降低($P < 0.05$),IV 组肠杆菌科数量降低且与 I 组无显著差异($P > 0.05$)。综上所述,在日粮中添加地衣芽孢杆菌能改善坏死性肠炎肉鸡生长性能,调节由坏死性肠炎导致的菌群失调。

关键词 地衣芽孢杆菌;肉鸡;坏死性肠炎;生长性能;肠道菌群

中图分类号 S831;S852.61⁺6

文章编号 1007-4333(2017)01-0055-07

文献标志码 A

Effects of *Bacillus licheniformis* H2 on the growth performance and gut microflora of broiler chickens infected with necrotic enteritis

ZHOU Mengjia^{1,2}, ZENG Dong^{1,2}, NI Xueqin^{1,2*}, TU Teng³, WANG Hesong^{1,2}

(1. Animal Microecology Institute, College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;

2. Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Chengdu 611130, China;

3. Institute of Animal Genetics and Breeding, College of Animal Science and Technology,

Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract To investigate the effects of *Bacillus licheniformis* on the growth performance and gut microflora in broiler chickens infected with necrotic enteritis (NE), a total of 240 one-day-old broilers were randomly divided into four groups: Group I (negative control), group II (NE experimental model), group III (chickens fed with diet containing 30% fishmeal and were infected with coccidiosis), group IV (NE group supplied with feed containing *B. licheniformis*). From day 14 onwards, chickens from groups II, III and IV were given a diet containing 30% fishmeal and were given with coccidian on day 15. All birds in group II and IV were fed with *C. perfringens* (2.2×10^8 CFU/mL) through oral gavage from day 18 to day 20. The trial lasted for 22 days. The results showed that: Necrotic enteritis reduced the bodyweight gain significantly and impaired feed weight ratio ($P < 0.05$); Dietary supplementation with *B. licheniformis* increased the bodyweight gain of broilers; Clustering analysis of ileum microflora by DGGE indicated two clusters were formed, and the similarity reached 0.70; Moreover, compared with group II, the amount of *Lactobacillus* spp. was significantly higher in group I and IV ($P < 0.05$), and the amount of *Enterobacteriaceae* family was significantly lower in group I ($P < 0.05$) and IV and no significant difference was found compared with group I and IV ($P > 0.05$). Therefore, dietary

收稿日期: 2016-02-26

基金项目: 四川省科技厅国际合作项目(2013HH0055)

第一作者: 周梦佳, 硕士研究生, E-mail: zhoumengjia1992@163.com

通讯作者: 倪学勤, 教授, 博士, 主要从事动物微生态研究, E-mail: xueqinni@foxmail.com

supplementation with *B. licheniformis* could improve the growth performance of broilers and adjust the imbalance of flora caused by NE.

Keywords *Bacillus licheniformis*; broiler; necrotic enteritis; growth performance; gut microflora

坏死性肠炎是由产气荚膜梭菌引起的一种在家禽业十分常见的肠道疾病,其主要发生在幼龄肉鸡中,临床症状表现为:精神抑郁,不愿挪动,羽毛凌乱且伴随着较高死亡率,给家禽业带来巨大的经济损失^[1]。目前针对鸡坏死性肠炎的防治主要是使用抗生素,然而,随着人们对食品安全,食品药物残留和抗生素耐药性关注度的不断上升,欧盟已经禁止在家禽饲料中添加非治疗性抗生素,这不可避免的会改变动物体肠道微生态,势必导致一些动物疾病更加猖獗^[2]。在家禽业,最为显著的威胁之一就是坏死性肠炎。因此,开发和使用益生菌作为潜在的抗生素替代品在近年来备受人们关注。

益生菌在肠道内的定植能有效地维持宿主主体肠道菌群平衡,增强机体免疫力^[3-4]。地衣芽孢杆菌作为一种常用微生态制剂在家禽业得到了广泛的研究和应用。有研究表明,地衣芽孢杆菌具有降低坏死性肠炎感染肉鸡促炎因子表达量,修复肠道损伤的

作用^[5],但在调节坏死性肠炎肉鸡肠道菌群以及对生产性能方面的影响尚未见报道。为此,本试验以科宝肉鸡为研究对象,采用产气荚膜梭菌虫联合感染构建坏死性肠炎模型,探讨地衣芽孢杆菌 H2 对坏死性肠炎肉鸡生长性能和肠道菌群的影响,旨在为其在防治坏死性肠炎上的应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验菌株及疫苗

地衣芽孢杆菌 H2 由四川农业大学动物微生态研究中心提供,该菌分离筛选自健康鸡肠道。产气荚膜梭菌 CVCC2030 购于中国兽医药品监察所。DLV 球虫弱毒疫苗为中国农业科学院上海兽医研究所禽病研究室研发。

1.2 试验动物及日粮

1 日龄科宝肉鸡购自于温江正大畜禽有限公司,基础日粮为玉米-豆粕型饲料,详细配方见表 1。

表 1 基础日粮成分和营养水平

Table 1 Composition and nutrient levels of basal diet

原料 Ingredient	含量 Content	营养成分 Nutrient level	含量 Content
玉米/(g/kg) Corn	51.64	粗蛋白/(g/kg) Crude protein	21.17
豆粕/(g/kg) Soybean	39.60	蛋氨酸/(g/kg) Methionine	0.49
菜籽油/(g/kg) Colza oil	4.30	钙/(g/kg) Calcium	1.07
磷酸氢钙/(g/kg) Dicalcium phosphate	1.85	总磷/(g/kg) Total phosphorous	0.71
碳酸钙/(g/kg) Limestone	1.30	代谢能/(MJ/kg) Me	14.16
D,L-蛋氨酸/(g/kg) D,L-Met	0.20		
食盐/(g/kg) Salt	0.40		
胆碱/(g/kg) Choline	0.18		
多维/(g/kg) Vitamin Premix ^①	0.03		
微量元素预混料/(g/kg) Mineral Premix ^②	0.50		
总计/(g/kg) Total	100.00		

注:①每 kg 多维含维生素 A 50 000 IU,维生素 D₃ 10 000 IU,维生素 E 25 IU,维生素 B₁ 2 mg,维生素 B₂ 16 mg,维生素 B₆ 6 mg,维生素 B₁₂ 0.03 mg,维生素 K 35 mg,烟酸 25 mg,泛酸钙 25 mg,叶酸 0.5 mg。②每 kg 饲料微量元素含量:Fe 80.00 mg,Cu 8.00 mg,Mn 60.00 mg,Zn 40.00 mg,Se 0.15 mg,I 0.35 mg。

Note:①Multivitamines provided the following per kilogram of basal diet:VA 50 000 IU,VD₃ 10 000 IU,VE 25 IU,VB₁ 2 mg,VB₂ 16 mg,VB₆ 6 mg,VB₁₂ 0.03 mg,VK 35 mg,Nicotinic 25 mg,VB₃ 25 mg,Folic acid 0.5 mg。②Microelement premix provided the following per kilogram of basal diet:Fe (as ferrous sulfate) 80.00 mg,Cu (as copper sulfate) 8.00 mg,Mn (as manganese sulfate) 60.00 mg,Zn (as zinc sulfate) 40.00 mg,Se (as sodium selenite)0.15 mg,I (as potassium iodate) 0.35 mg。

1.3 主要试剂和仪器

E. Z. N. A.™ stool DNA isolation kit (Omega Bio-Tek, 美国); 特定菌群荧光定量相关引物 (上海英潍捷基贸易有限公司); DGGE 相关试剂 (Bio-Rad, 加拿大); SYBR Premix Ex Taq II (大连宝生物工程有限公司)。Nanodrop® ND-2000 核酸蛋白测定仪 (Wilmington, 美国); BAI 7500 Real-time PCR 仪 (Bio-Rad, 加拿大); MJ Research PCR-200 和 DGGE 仪 (Bio-Rad, 加拿大); 台式高速冷冻离心机 (Thermo electron corporation, 美国)。

1.4 试验设计及饲养管理

选取 240 只 1 日龄健康科宝-500 肉鸡, 随机分为 4 组, 分别为 I 组 (空白对照组), II 组 (造模组), III 组 (球虫 + 鱼粉组) 和 IV 组 (地衣芽孢杆菌防治组)。试验共持续 22 d, IV 组整个试验过程均饲喂添加 0.1% 地衣芽孢杆菌 H₂ 全菌液的日粮 (1.0 × 10⁹ cfu/kg)。在 14 日龄时, 除 I 组继续饲喂基础日粮外其余各组均饲喂添加了 30% 鱼粉的日粮并于 15 日龄灌喂球虫 (100 万卵囊/mL, 1 mL/只)。18~20 日龄时, II 组和 IV 组肉鸡连续灌喂 1 mL 活菌数为 2.2 × 10⁸ cfu/mL 产气荚膜梭菌, 其余各组灌喂相同剂量的生理盐水。整个试验中肉鸡自由饮水和采食, 24 h 光照。每天观察肉鸡的生长与健康情况, 记录饲料消耗量及死亡情况。

1.5 生长性能的测定

分别于 1 日龄、14 日龄和 22 日龄定时称取鸡只重量, 计算各时间段试验肉鸡的体增重 (BWG)、采食量 (FI) 和料重比 (FCR)。

1.6 细菌总 DNA 的提取扩增及 PCR-DGGE 分析

试验第 22 天, 每组随机选取 3 只肉鸡采集其回肠内容物, 采用 E. Z. N. A.™ stool DNA kit 试剂盒, 按照操作步骤提取细菌总 DNA。用 NanoDrop® ND-2000 核酸蛋白测定仪检测细菌核酸浓度及纯度。参照文献 [6] 对细菌的 16S r DNA 基因 V3 区进行扩增, 扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。然后根据倪学勤等 [7] 方法, 使用 Bio-Rad Dcode 系统对细菌进行 PCR-DGGE 凝胶电泳, 结果经硝酸银染色后用 Bio-Rad GS800 Calibrated Densitometer 扫描成像进行主成分分析 (PCA) 和聚类分析。

1.7 Real-time PCR 定量分析

试验第 22 天, 每组随机选取 6 只肉鸡采集其回肠内容物, 采用 E. Z. N. A.™ stool DNA kit 试剂盒, 按照操作步骤提取细菌总 DNA。用 NanoDrop® ND-2000 核酸蛋白测定仪检测细菌核酸浓度及纯度。参照文献 [8] 使用 Real-time PCR 仪对回肠内容物中总细菌、肠球菌和肠杆菌等进行定量分析, 引物序列见表 2。

表 2 RT-PCR 引物序列
Table 2 List of RT-PCR primers

引物 Primers	引物序列 (5'-3') Primers sequence	参考文献 Reference
总细菌 Total bacteria	F-CGGYCCAGACTCCTACGGG R-TTACCGCGGCTGCTGGCAC	[9]
肠杆菌科 <i>Enterobacteriaceae</i> family	F-CATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGC R-CTCTACGAGACTCAAGCTTGC	[10]
乳杆菌属 <i>Lactobacillus</i> spp.	F-AGCAGTAGGGAATCTTCCA R-CACCGCTACACATGGAG	[10]
肠球菌属 <i>Enterococcus</i> spp.	F-CCCTTATTGTTAGTTGCCATCATT R-ACTCGTTGTACTTCCCATTGT	[11]
双歧杆菌属 <i>Bifidobacterium</i> spp.	F-TCGCGTCYGGTGTGAAAG R-CCACATCCAGCRTCCAC	[11]

1.8 统计分析

运用 SPSS 20.0 统计软件进行单因素方差分析,

并采用 LSD 法进行多重比较, $P < 0.05$ 作为差异显著判断标准, 结果用平均值 ± 标准误表示; 运用 NTSYS

2.10 对 PCR-DGGE 图谱经行多样性聚类分析。

2 结果与分析

2.1 地衣芽孢杆菌对坏死性肠炎肉鸡生长性能的影响

由表 3 可知,14 日龄时,各组间肉鸡采食量无

显著差异;添加地衣芽孢杆菌组肉鸡料重比显著低于其余各组且较空白对照组降低了 4.86%,体增重较空白对照组升高了 5.79%。22 日龄时,II 组体增重显著低于 I 组,料重比显著高于 I 组 ($P < 0.05$)。与 II 组相比,IV 组肉鸡体增重升高且与 I 组无显著差异 ($P > 0.05$)。

表 3 地衣芽孢杆菌 H2 对肉鸡生产性能的影响

Table 3 Effects of *Bacillus licheniformis* on growth performance of broilers

处理 Treatment	1~14 日龄 Days 1 to 14			1~22 日龄 Days 1 to 22		
	体增重/g BWG	采食量/g FI	料重比/(g/g) FCR	体增重/g BWG	采食量/g FI	料重比/(g/g) FCR
I 组 Group I	361.33±8.63 b	519.84±3.81	1.44±0.05 a	751.33±20.43 a	1125.61±12.16	1.50±0.05 b
II 组 Group II	358.42±8.23 b	521.70±4.39	1.46±0.03 a	659.00±22.19 b	1119.38±16.21	1.70±0.06 a
III 组 Group III	367.13±10.41 b	523.92±2.99	1.43±0.06 a	694.80±22.13 ab	1102.69±13.40	1.59±0.05 ab
IV 组 Group IV	382.25±4.21 a	522.25±3.85	1.37±0.03 b	711.67±15.87 ab	1129.21±17.24	1.59±0.02 ab

注:同列不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。下表同。

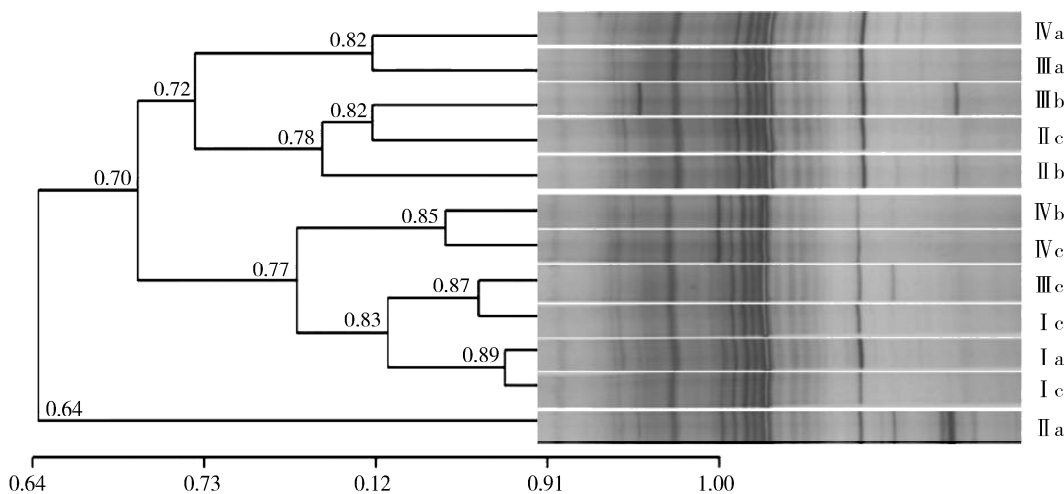
Note: In the same column, values with different small letter mean significant difference ($P < 0.05$). The same as below.

2.2 肉鸡回肠内容物细菌 16S rDNA V3 区基因片段的 PCR-DGGE 图谱聚类 and 主成分分析

在 PCR-DGGE 图谱中,条带的强弱代表是否为肠道内容物中的优势菌群,不同的条带代表不同的细菌种类,条带的数量则反映了检测样品中细菌的丰富度。由图 1 可见,4 个组的肉鸡回肠内容物样品均产生了较多的电泳条带,各组间菌群的结构

和组成存在一定差异。通过图 1 聚类可知,各组肉鸡的回肠内容物菌群主要聚为两簇,其中 IV 组和对照组 (I 组) 聚为一簇,另外 2 组聚为一簇,其中 IV 组和 I 组的最高相似性为 77% 最低为 70%,而 II 组与 I 组的最高相似性为 70% 最低为 64%。

DGGE 图谱的主成分分析结果 (图 2) 与聚类分析相一致,通过主成分分析可知,主成分因子 1



I a~I c 为 I 组肉鸡样品; II a~II c 为 II 组肉鸡样品; III a~III c 为 III 组肉鸡样品; IV a~IV c 为 IV 组肉鸡样品。

图 1 肉鸡回肠内容物细菌 16S rDNA V3 区基因片段的 PCR-DGGE 图谱聚类

Fig. 1 PCR-DGGE profiles and clustering results of 16SrDNA in V3 region from microbiota in ileum

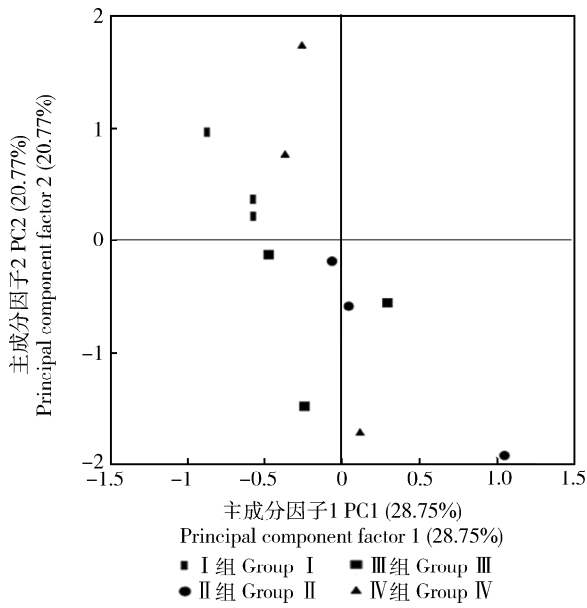


图 2 PCR-DGGE 图谱的主成分分析

Fig. 2 PCA analysis of DGGE profiles

(PC1)的贡献率为 28.75%，主成分因子 2(PC2)的贡献率为 20.77%。PC2 明显地将样品分为 2 个部分，I 组和 IV 组样品主要集中在图的左上方，II 组和 III 组主要分布在图的下方且 II 组样品与其余组距离较远主要分布在图的右下方，说明 II 组肉鸡的回肠内容物菌群结构与其余组差异较大。

2.3 地衣芽孢杆菌 H2 对坏死性肠炎肉鸡回肠特定菌群的影响

由表 4 可知，22 日龄时，乳杆菌属和肠杆菌科等为肉鸡回肠内容物菌群中的优势菌群，其数量均达到了 10^9 cfu/g 以上。各组在总细菌数量上无显著差异($P>0.05$)。与 II 组相比，I 组和 IV 组乳杆菌属数量显著上升($P<0.05$)，I 组肠杆菌科数量显著降低($P<0.05$)，IV 组肠杆菌科数量降低且与 I 组无显著差异($P>0.05$)。I 组和 IV 组肠球菌属和双歧杆菌属数量均高于 II 组，但差异不显著。

表 4 地衣芽孢杆菌 H2 对坏死性肠炎肉鸡回肠特定菌群的影响

Table 4 Effects of *Bacillus licheniformis* on ileum specific flora of broilers

处理 Treatment	I 组 Group I	II 组 Group II	III 组 Group III	IV 组 Group IV
总细菌 Total bacteria	9.69±0.31	9.68±0.49	9.56±0.22	9.80±0.44
乳杆菌属 <i>Lactobacillus</i> spp.	9.29±0.47 a	8.55±0.39 b	8.97±0.30 ab	9.15±0.53 a
肠杆菌科 <i>Enterobacteriaceae</i> family	8.59±0.34 b	9.38±0.37 a	9.30±0.65 a	9.10±0.56 ab
肠球菌属 <i>Enterococcus</i> spp.	8.56±0.31	8.37±0.52	8.51±0.29	8.78±0.44
双歧杆菌属 <i>Bifidobacterium</i> spp.	7.15±0.29	7.04±0.53	7.10±0.19	7.28±0.38

3 讨论

3.1 地衣芽孢杆菌 H2 对坏死性肠炎肉鸡生长性能的影响

随着抗生素的限用和禁用，坏死性肠炎已成为家禽业最为严重的疾病之一，每年给家禽业造成超过 2 亿美元的损失^[12]。相关报道表明，产气荚膜梭菌感染所引发的坏死性肠炎可以导致肉鸡肠道粘膜的受损从而影响饲料的吸收和利用，降低肉鸡的生长性能^[13-14]。本试验与前人^[13]研究结论相一致，与空白对照组相比，坏死性肠炎造模组料重比显著增加，说明坏死性肠炎能导致肉鸡生长性能下降。Liu 等^[15]的研究表明，在饮水中添加地衣芽孢杆菌能有效地提高肉鸡的生长性能。本试验中，地衣芽孢杆

菌 H2 的添加能显著升高坏死性肠炎肉鸡的体增重，降低料重比，改善坏死性肠炎导致的生长性能下降。

3.2 PCR-DGGE 图谱的聚类 and 主成分分析

图谱聚类分析与主成分分析结果显示，同一组样品的相似性较高，组间相似较低，这与 Collier 等^[16]的结果相一致。Feng 等^[17]利用 PCR-DGGE 技术采用主成分分析方法对坏死性肠炎肉鸡回肠菌群结构进行分析，结果表明健康肉鸡与坏死性肠炎感染肉鸡的回肠菌群存在较大差异。本试验中，造模组肉鸡回肠菌群与空白对照组相似性较低，说明坏死性肠炎能影响肉鸡回肠正常的菌群结构。地衣芽孢杆菌防治组肉鸡回肠菌群与空白组的相似性较高，说明添加地衣芽孢杆菌能有效的改善坏死性肠

炎肉鸡肠道菌群结构。

3.3 地衣芽孢杆菌 H2 对坏死性肠炎肉鸡回肠特定菌群的影响

在国外,使用益生菌来防治肉鸡坏死性肠炎已处于养殖试验阶段^[18-19]。益生菌在进入动物体内后能通过产生抑制性物质(如短链脂肪酸)来降低肠道 pH 从而抑制肠道内某些潜在致病菌的生长,维持宿主肠道菌群平衡^[20]。在动物胃肠道内,乳杆菌属可以通过提高肠道淀粉酶的活性进而影响膳食营养的消化和吸收^[21]。双歧杆菌属被视为动物体内重要的益生菌,在动物体内,双歧杆菌能通过代谢产生乙酸、丙酸、丁酸等短链脂肪酸来降低肠道 pH,抑制腐败及有害细菌的生长繁殖^[22]。肠杆菌科的增加常常发生在患有肠道疾病的动物体中^[8]。本试验结果显示,与健康肉鸡相比,坏死性肠炎肉鸡肠道菌群中乳杆菌属数量显著降低,肠杆菌科数量显著升高。地衣芽孢杆菌防治组肉鸡肠道菌群中乳杆菌属数量与造模组相比显著升高,肠杆菌科和双歧杆菌属数量趋于正常水平。说明地衣芽孢杆菌 H2 能有效地调节坏死性肠炎肉鸡的肠道菌群,对防治肉鸡坏死性肠炎具有促进作用。

综合以上结果,肉鸡感染坏死性肠炎会造成生长性能下降和肠道菌群的紊乱,在日粮中添加地衣芽孢杆菌 H2 能改善坏死性肠炎肉鸡的生长性能,调节由坏死性肠炎导致的菌群失调,对肉鸡坏死性肠炎的发生具有一定的防治作用,地衣芽孢杆菌 H2 防治坏死性肠炎的作用机制仍然有待进一步研究。

参考文献 References

[1] Kaldhusdal M, Lovland A. The economical impact of *Clostridium perfringens* is greater than anticipated[J]. *World Poult*, 2000, 16(8): 50-51

[2] Torok V A, Allison G E, Percy N J, Keller K O, Hughes R J. Influence of antimicrobial feed additives on broiler commensal posthatch gut microbiota development and performance[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(10): 3380-3390

[3] 沈雪娇,易丹,倪学勤,曾东,雷明霞,卞正容. 乳酸杆菌和囊素三肽对肉鸡生产性能,血清生化指标及免疫功能的影响[J]. *中国农业大学学报*, 2014, 19(1): 125-130

Shen X J, Yi D, Ni X Q, Zeng D, Lei M X, Bian Z R. Effects of *Lactobacilli* and bursin on the growth performance, serum biochemical parameters and immune responses of broilers[J].

Journal of China Agricultural University, 2014, 19(1): 125-130 (in Chinese)

- [4] Filteau M, Matamoros S, Savard P, Roy D. Molecular monitoring of fecal microbiota in healthy adults following probiotic yogurt intake[J]. *Pharma Nutrition*, 2013, 1(4): 123-129
- [5] 倪学勤,刘丽达,曾东,李洁萍,魏豪,彭艺榕,周梦佳. 地衣芽孢杆菌对坏死性肠炎雏鸡回肠组织及细胞因子的影响[J]. *中国兽医科学*, 2013, 43(10): 1079-1084
- Ni X Q, Liu L D, Zeng D, Li J P, Wei H, Peng Z R, Zhou M J. Effect of *Bacillus licheniformis* on ileal tissue and cytokines in chicken with necrotic enteritis[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2013, 43(10): 1079-1084 (in Chinese)
- [6] Walter J, Hertel C, Tannock G W, Lis C M, Munro K, Hammes W P. Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(6): 2578-2585
- [7] 倪学勤,曾东,周小秋. 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
- Ni X Q, Zeng D, Zhou X Q. The bacterial community and diversity in the layer gastrointestinal tract: From crop to cecum analyzed by PCR-DGGE [J]. *Animal Husbandry and Veterinary Science*, 2008, 39(7): 955-961 (in Chinese)
- [8] 王剑,王强,曾东,牛李丽,简平,张艳,倪学勤. 健康和腹泻川金丝猴粪样菌群比较分析[J]. *中国兽医学报*, 2015, 35(8): 1232-1238
- Wang J, Wang Q, Zeng D, Niu L L, Jian P, Zhang Y, Ni X Q. Comparison of fecal microbiota from healthy and diarrhea *Rhinopithecus roxellana* [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2015, 35(8): 1232-1238 (in Chinese)
- [9] Lee D H, Zo Y G, Kim S J. Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(9): 3112-3120
- [10] Heilig H G H J, Zoetendal E G, Vaughan E E, Marteau P, Akkermans A D L, Vos W M. 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
- [11] Rinttilä T, Kassinen A, Malinen E, Korgius L, Palva A. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, 97(6): 1166-1177
- [12] McReynolds J L, Byrd J A, Anderson R C, Moore R W, Edrington T S, Genovese K J, Poole T L, Kubena L F, Nisbet D J. Evaluation of immunosuppressants and dietary mechanisms in an experimental disease model for necrotic enteritis[J].

- Poultry Science*, 2004, 83(12): 1948-1952
- [13] Dahiya J, Hoehler D, Van Kessel A G, Drew M D. Dietary encapsulated glycine influences *Clostridium perfringens* and *Lactobacilli* growth in the gastrointestinal tract of broiler chickens[J]. *The Journal of Nutrition* 2007, 137: 1408-1414
- [14] Liu D, Guo Y, Wang Z, Yuan J, Moore R W, Edrington T S. Exogenous lysozyme influences *Clostridium perfringens* colonization and intestinal barrier function in broiler chickens [J]. *Avian Pathology*, 2010, 39: 17-24
- [15] Liu X, Yan H, Lv L, Xu Q Q, Yin C H, Zhang K Y, Wang P, Hu J Y. Growth performance and meat quality of broiler chickens supplemented with *Bacillus licheniformis* in drinking water[J]. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2012, 25(5): 682
- [16] Collier C T, Hofacre C L, Payne A M, Anderson D B, Kaiser P, Mackie R I, Gaskins H R. Coccidia-induced mucogenesis promotes the onset of necrotic enteritis by supporting *Clostridium perfringens* growth[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2008, 122(1): 104-115
- [17] Feng Y, Gong J, Yu H, Jin Y, Zhu J, Han Y. Identification of changes in the composition of ideal bacterial microbiota of broiler chickens infected with *Clostridium perfringens* [J]. *Veterinary Microbiology*, 2010, 140(1): 116-121
- [18] Jayaraman S, Thangavel G, Kurian H, Mani R, Mukkalil R, Chirakkal H. *Bacillus subtilis* PB6 improves intestinal health of broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis[J]. *Poultry Science*, 2013, 92(2): 370-374
- [19] LaRagione R M, Woodward M J. Competitive exclusion by *Bacillus subtilis* spores of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and *Clostridium perfringens* in young chickens[J]. *Veterinary Microbiology*, 2003, 94(3): 245-256
- [20] Tannock G W. Modification of the normal microbiota by diet, stress, antimicrobial agents, and probiotics[J]. *Gastrointestinal Microbiology*, 1997(2): 434-465
- [21] Jin L Z, Ho Y W, Abdullah N, Jalaludin S. Digestive and bacterial enzyme activities in broilers fed diets supplemented with *Lactobacillus* cultures[J]. *Poultry Science*, 2000, 79(6): 886-891
- [22] Servin A L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2004, 28(4): 405-440

责任编辑：苏燕