

微生态制剂和饲用抗生素对肉鸡盲肠 VFA 和微生物区系的影响

于卓腾, 毛胜勇, 朱伟云*

(南京农业大学动物科技学院消化道微生物研究室, 江苏 南京 210095)

摘要: 选择健康 1 日龄 AA 白羽肉仔鸡公雏 360 羽, 随机分成 A、B、C、D 4 组, A 组为对照组, B、C 组于 1~4 日龄、7~9 日龄、20~22 日龄时在饮水中分别添加益生菌和合生素, D 组在饲料中添加抗生素。于 20、27、42 日龄从每组中随机抽取 5 只肉鸡进行屠宰, 无菌采集盲肠食糜, 测定挥发性脂肪酸, 分析微生物区系。结果表明, 益生菌和合生素可提高肉鸡盲肠中总挥发性脂肪酸的含量, 增加丁酸的百分比, 提高盲肠菌群的多样性和复杂性; 而抗生素组盲肠的总挥发性脂肪酸含量降低, 菌群多样性也降低。

关键词: 肉鸡; 益生菌; 合生素; VFA; 变性梯度凝胶电泳 (DGGE)

中图分类号: Q939.92 文献标识码: A 文章编号: 1000-2030 (2007) 03-0110-05

Effects of probiotics, synbiotics and antibiotics on VFA production and bacterial community of caecal digesta of broilers

YU Zhuo-teng, MAO Sheng-yong, ZHU Wei-yun*

(Laboratory of Gastrointestinal Microbiology, College of Animal Science and Technology,
Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The effects of probiotics, synbiotics and antibiotics on volatile fatty acid (VFA) production and bacterial communities of caecal digesta of broilers were investigated. The concentration of the total volatile fatty acid (TVFA) of the two groups treated with probiotics and synbiotics increased compared with the control and the group treated with antibiotics. Probiotics significantly increased the percentage of butyric acids, and lowered the percentage of acetic acid compared with the control. Differences in bacterial community structure of broilers were determined based on the shannon's index to assess the diversity of caecal microbial populations. Broilers fed with probiotics and synbiotics showed a higher bacterial diversity compared with that of the animals fed with the control diet on days 20, 27. The concentration of the TVFA was less than the control, and antibiotics could decrease the diversity of caecal microbial populations compared with the control.

Key words: broilers; probiotics; synbiotics; VFA; denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

近年来, 随着国内外对食品安全问题的日益关注, 以及饲用抗生素的残留及耐药性菌株问题, 营养学家开始寻找安全的抗生素替代品, 其中微生态制剂以其特殊的作用机制及安全有效的特点而受得人们愈来愈多的关注。许多研究表明, 益生菌和化学益生菌可通过改善动物肠道内环境而提高动物的生产性能^[1-3]。但这些研究多集中于动物的生产性能指标及肠道内一些潜在致病菌如大肠杆菌及有益菌如乳酸菌数量的变化。由于传统培养技术的局限性以及肠道内大多为厌氧微生物, 有关益生菌对肠道总体微生物区系组成的影响知之甚少。为进一步明晰微生态制剂对肉鸡肠道微生态的影响, 本研究运用变性梯度凝胶电泳法 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 监测了在不添加抗生素的情况下微生态制剂对肉鸡肠道菌群的变化规律及挥发性脂肪酸的影响, 同时研究抗生素对肠道微生物菌群及其代谢产物的影响, 进一步为微生态制剂在生产上的应用提供理论依据。

收稿日期: 2006-01-19

基金项目: 国家重大基础计划项目 (2004CB1175004); 国家杰出青年科学基金项目 (30025034)

作者简介: 于卓腾, 博士研究生, E-mail: teng323@163.com。* 通讯作者: 朱伟云, 教授, 博士生导师, 主要从事动物消化道微生物学研究, E-mail: zhuweiyunnjau@hotmail.com。

1 材料与方法

1.1 试验设计

选择健康体重基本一致的1日龄AA白羽肉仔鸡公雏360羽,随机分成4组,编号为A、B、C和D组,其中A组为对照组,B组为益生菌组(由本实验室分离自鸡肠道并研制成的复合乳酸菌,添加量为 10^8 CFU·mL⁻¹),C组为合生素组(益生菌+果寡糖为主的复合寡糖,添加量为0.02%),D组为抗生素组(杆菌肽锌+硫酸黏杆菌素,添加量为20 mg·kg⁻¹),A、B、C3组的饲料中均未添加抗生素。每组5个重复,每重复18羽。试验期为42 d。于1~4日龄、7~9日龄及20~22日龄当天早晨空腹2 h后在B、C组的饮水中分别添加益生菌和合生素。常规饲养,笼养,自由采食和饮水,24 h光照,常规消毒、免疫及保温控制。分别于20、27、42日龄从每组中随机抽取5只肉鸡进行屠宰,无菌采集盲肠食糜,-20℃保存。

1.2 日粮组成及营养水平

参照NRC肉鸡营养标准配制日粮。前期和后期日粮组成及营养水平见表1。料型均为粉料,预混料的主要组成包括维生素A、D、E、K、B等和微量元素铁、铜、锌、锰、碘、硒。

表1 试验日粮组成

Table 1 Composition of basal diets

日粮配方 Diets formula	前期 Early stage	后期 Later stage	营养水平 Nutrition level	前期 Early stage	后期 Later stage
玉米/% Corn	64.00	68.00	代谢能/kcal·kg ⁻¹ Metabolizing energy	2 863	2 840
豆粕/% Soybean meal	26.00	28.00	粗蛋白/% Crud protein	19.1	17.9
石粉/% Limestone	1.66	1.44	Ca/%	0.91	0.92
磷酸氢钙/% CaHPO ₄	1.52	1.00	有效磷/% Virtual phosphorus	0.45	0.41
预混料/% Premix	1.00	1.00	赖氨酸/% L-lysine	1.088	0.930
盐/% NaCl	0.29	0.35	蛋氨酸/% Methionine	0.506	0.400
蛋氨酸/% Methionine	0.27	0.10	苏氨酸/% Threonine	0.78	0.73
赖氨酸/% L-lysine	0.26	0.11	色氨酸/% Tryptophane	0.249	0.240
大豆磷脂/% Soy phospholipids	2.00		盐/% NaCl	0.38	0.38
秘鲁鱼粉/% Peru fish meal	3.00				

1.3 pH值和VFA的测定

采用PH-HJ90B酸度计测定pH。VFA的测定参照文献[4]的方法,用GC-14B型气相色谱仪(日本岛津公司)测定。色谱柱为Innowax 19091N-133,柱温140℃,汽化温度180℃,载气为氮气,流速:氮气20 mL·min⁻¹,氢气28 mL·min⁻¹,空气120 mL·min⁻¹。样品预处理中先配制好酸化吸附剂,按质量比30:1:20,称取无水硫酸钠、50%硫酸(体积分数)及硅藻土,混合磨匀,密封干燥保存。测定时,在试管内放置2.4 g酸化吸附剂,并加入3 mL 0.5%巴豆酸氯仿溶液,再加入样品1 mL,迅速振荡摇匀,用注射器取样1 μL瞬时注入色谱仪进行分析。

1.4 DNA提取与PCR反应

参照Zoetendal等^[5]方法,用珠磨仪(Biospec,美国)机械破碎粪样后,用酚和氯仿/异戊醇提取食糜样品总DNA,随后对细菌的16S rDNA的V6~V8区片段进行PCR反应^[6]。PCR引物为带有GC夹子的U9682GC和L1401^[7],其中GC夹子为5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGGCGG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TAC-3'。

1.5 DGGE与图谱分析

参照Muyzer等^[8]方法,对细菌16S rDNA的V6~V8可变区的扩增产物进行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),其中尿素浓度梯度为38%~51%。

电泳采用D code DGGE系统(Bio Rad,美国),首先在200 V电压下预电泳5~10 min,随后在85 V的固定电压下电泳16 h。电泳结束后进行硝酸银染色^[9],随后凝胶经密度校正仪(Bio Rad, Gs-800)扫描。

DGGE凝胶用Molecular Analyst 1.12(BioRad,美国)进行条带计数和多样性分析。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 多样性指数分析 (Shannon index): $H = - \sum P_i \log P_i$, P_i 为某一种菌 (DGGE 图谱中的 1 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 为密度曲线上某一谱带的峰高, H' 为所有峰高的和。

1.6 统计分析

数据经 Excel 2000 初步处理后, 利用 SPSS (13.0) 单因子多重比较中 Duncan's 法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 微生物制剂和饲用抗生素对肉鸡盲肠食糜 pH 值和 VFA 的影响

由图 1-a 可见, 在不同日龄时, B、C、D 组的 pH 值均低于对照组; 其中 20 日龄时, C 组的 pH 值为 5.68, 显著低于对照组 ($P < 0.05$)。

由图 1-b 可见, 在 20、27 和 42 日龄时, B、C 两组的总挥发性脂肪酸的含量都高于对照组和抗生素组, 其中抗生素组的总挥发性脂肪酸的含量低于对照组, 尤其在 20、27 日龄时最为明显。

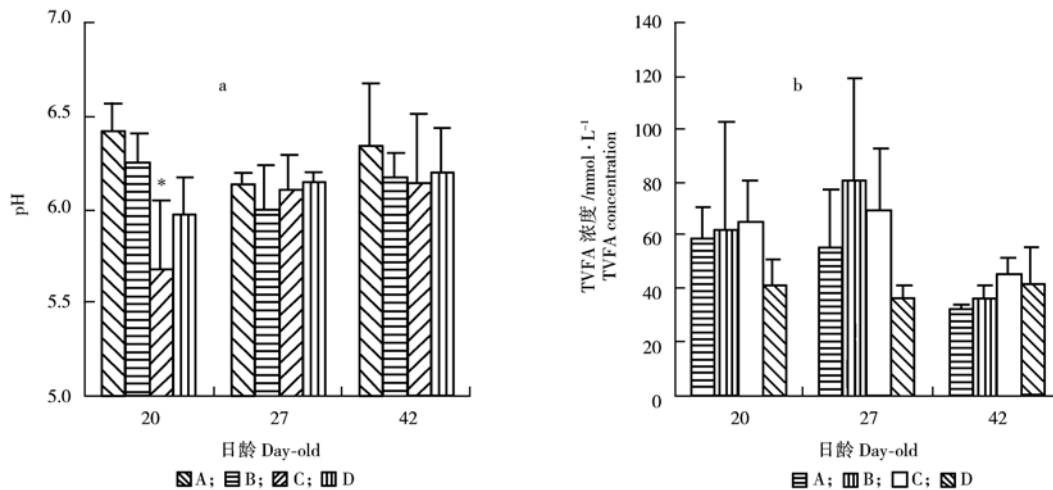


图 1 不同日龄 4 组肉鸡盲肠食糜 pH (a) 和总挥发性脂肪酸浓度 (b) 的变化

Fig.1 Variation of pH value (a) and concentration of TVFA (b) of caecal digesta of four groups at different day-old

A: 对照 CK; B: 益生菌 Probiotics; C: 合生素 Synbiotics; D: 抗生素 Antibiotics. The same as follows.

由图 2 可见, 在 20 日龄时, 与对照组 (A) 相比, B 组乙酸百分比显著降低 ($P < 0.05$), 而丁酸百分比显著增加 ($P < 0.05$), C 组的丁酸百分比也升高; 与抗生素组 (D) 相比, B 组乙酸百分比显著降低 ($P < 0.05$), B、C 两组的丁酸百分比均升高。在 27 日龄时, 与对照组相比, B、C 两组的乙酸百分比均降低, 而 B 组的丁酸百分比高于对照组; 与抗生素组相比, B、C 两组的乙酸百分比均降低, 而

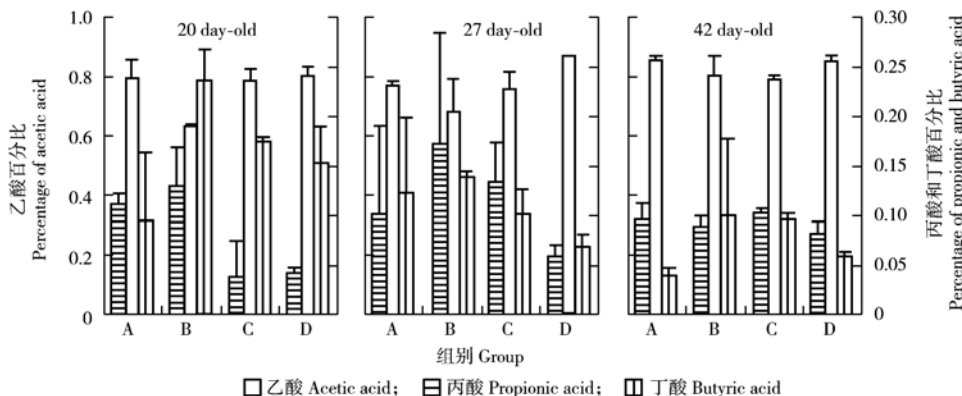


图 2 不同日龄时 4 组肉鸡盲肠乙酸、丙酸、丁酸的百分含量

Fig.2 Acetic, propionic and butyric acids proportions of the caecal contents of four groups at different day-old

丁酸百分比升高。42 日龄时，与抗生素组相比，B、C 两组的乙酸百分比降低，而丁酸百分比升高。

2.2 微生态制剂和饲用抗生素对肉鸡盲肠菌群多样性的影响

肉鸡盲肠食糜细菌的 DGGE 图谱上的泳带反映了食糜中的优势菌群，泳带数量和位置的复杂性说明了菌群的多样性。由图谱（图 3）可以看出，27 日龄时，B、C 组的谱带数明显多于对照组和抗生素组，而且抗生素的谱带数明显少于对照组。

通过计算机软件分析条带数可见（图 4-a），在 20 和 27 日龄时，B 组和 C 组的 DGGE 图谱条带数都高于 A 组和 D 组，尤其在 27 日龄时，C 组的 DGGE 图谱条带数比对照组和抗生素组都显著增加（ $P < 0.05$ ）。D 组的条带数最少，在 27 日龄时，D 组的条带数明显少于 A、B、C 组。

由图 4-b 可以看出，20 和 27 日龄时，B 组和 C 组的 DGGE 条带图谱的多样性均高于 A 组和 D 组；其中 20 日龄时 C 组 DGGE 条带图谱的多样性比 A 组显著增加（ $P < 0.05$ ）；27 日龄时 C 组 DGGE 条带图谱的多样性与 A 组和 D 组相比均显著增加（ $P < 0.05$ ）。D 组的菌群多样性最低，在 20、27 日龄时，D 组的多样性都明显低于对照组。

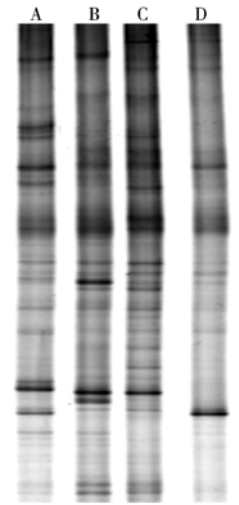


图 3 27 日龄肉鸡盲肠微生物区系的 DGGE 图谱
Fig. 3 DGGE profile of caecal contents of broilers on 27 day-old

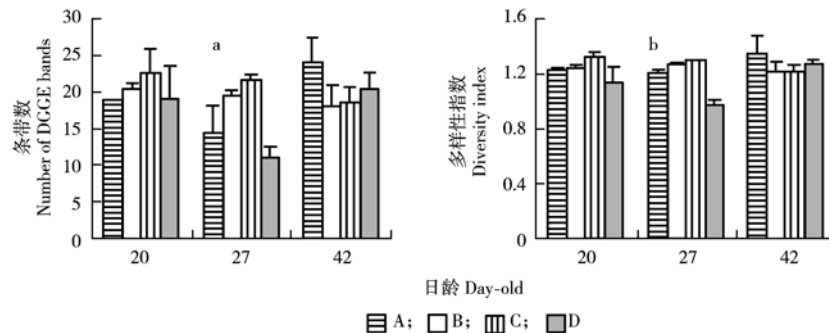


图 4 不同日龄各组盲肠细菌条带数 (a) 和多样性 (b) 比较

Fig. 4 Number of DGGE bands (a) and diversity of bacteria (b) of four groups at different day-old

3 讨论

肉鸡后肠中栖息着大量的微生物，这些微生物可发酵前肠中未能被消化的饲料组分，如纤维素等产生挥发性脂肪酸，包括乙酸、丙酸及丁酸等，这些短链脂肪酸对动物肠道健康发挥重要作用^[10]。本研究发现，益生菌和合生素可提高肉鸡盲肠中总挥发性脂肪酸的浓度，降低盲肠 pH 值。Jin 等^[11]研究表明，肉鸡在 10、20 日龄添加乳酸菌后，盲肠 VFA 显著升高，pH 值显著降低。低 pH 可以抑制大肠杆菌和沙门氏菌等病原菌的增殖，因而益生菌和合生素可通过降低肠道 pH 值来发挥其益生作用。本研究同时发现，抗生素组的总挥发性脂肪酸低于对照组，这可能是由于抗生素在抑制病原菌的同时也抑制了部分有益菌的增殖，因而其代谢产物挥发性脂肪酸等也随之减少。

有研究表明，丁酸是结肠黏膜细胞的主要能量来源^[12]，具有促进黏膜细胞增殖的效应。本试验发现，益生菌组在 20 日龄时盲肠丁酸浓度显著升高，乙酸浓度显著下降，因此本研究所用益生菌及合生素具有促进肠上皮细胞发育及维持肠道健康的效应。一般情况下，肠道中乙酸是浓度最高的一种脂肪酸，它可经丁酰 CoA: 乙酰 CoA 转移酶作用转化成丁酸，因此可能是肠道生成丁酸的主要途径^[13]。本研究发现丁酸比例上升的同时乙酸的比例下降，因此可能存在明显的乙酸转化为丁酸的过程。有关添加益生菌后丁酸浓度升高的另一个原因可能与本研究中所使用的益生菌株有关。Duncan 等^[14]报道，双歧杆菌可促进乳酸向丁酸转化。苏勇等^[15]在研究外源乳酸菌对仔猪肠道微生物发酵时也发现，外源乳酸

菌可促进仔猪结肠丁酸的产生。而在本研究中,所用益生菌株均为乳酸菌,经体外研究表明,从鸡肠道分离的这些乳酸菌具有较强的产乳酸能力^[16],因而据上述报道,其可能具有促进肠道内乳酸向丁酸转化的作用机制。

益生菌主要通过维持消化道内有益菌群的数量,以及改变微生物的代谢等来影响肉鸡生产性能。合生素是益生菌和化学益生菌的合剂,它既能增强益生菌进入肠道上部的存活和肠道下部的定植,又可选择性刺激一种或几种有益菌的增殖^[17]。Jin 等^[11]发现,肉仔鸡在 10、20 日龄饲喂 0.05% 乳酸杆菌混合物后,盲肠大肠杆菌数显著降低。有研究表明,寡糖进入肠道后,不能被病原菌如大肠杆菌和沙门氏菌利用,只能被有益微生物如乳酸杆菌、双歧杆菌分解利用,促进有益菌大量繁殖^[18]。本试验研究发现,在 20 日龄和 27 日龄时,添加益生菌和合生素组的 DGGE 图谱的条带数和多样性均显著增加,说明益生菌和合生素可促进肉鸡肠道内菌群的增殖。与添加抗生素相比,添加益生菌和合生素组盲肠的细菌区系变得更加复杂和多样化,这进一步说明肠道中部分细菌可能受到抗生素的抑杀作用而减少或消失。

本研究发现,在饲养后期各组的 VFA 和菌群多样性无显著差异,这可能与肉鸡的微生物区系的形成有关,相对前期而言,饲养后期肉鸡的肠道微生态环境已基本稳定,因此,添加的外源物质对其作用效果甚微,该结果也提示在肉鸡前期时使用微生态制剂可能效果更佳。

参考文献:

- [1] Plummer S F, Garaiova I, Sarvotham T, et al. Effects of probiotics on the composition of the intestinal microbiota following antibiotic therapy [J]. *Int J Antimicrob Agri*, 2005, 26: 69-74
- [2] Rastall R A, Maitin V. Probiotics and synbiotics: towards the next generation [J]. *Curr Opin Biotech*, 2002, 13: 490-496
- [3] 冯国华, 梁雪霞. 益生菌、寡聚糖在肉鸡生产中对抗生素替代能力的研究 [J]. *粮食与饲料工业*, 2000(8): 30-31
- [4] 秦为琳. 应用气相色谱测定挥发性脂肪酸方法的研究进展 [J]. *南京农学院学报*, 1982(5): 110-116
- [5] Zoetendal E G, Akkermans A D L, de Vos W M. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64: 3854-3859
- [6] 朱伟云, 姚文, 毛胜勇. 变性梯度凝胶电泳法研究断奶仔猪粪样细菌区系变化 [J]. *微生物学报*, 2003, 43(4): 503-508
- [7] 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]. *J Bacteriol*, 1996, 178: 5636-5643
- [8] Muyzer G, de Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rDNA [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59: 695-700
- [9] Sanguinetti C J, Dias Neto D, Simpson A J G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels [J]. *Bio Techniq*, 1994, 17: 915-919
- [10] Lan Y, Williams B A, Tamminga S, et al. *In vitro* fermentation kinetics of some non-digestible carbohydrates by the caecal microbial community of broilers [J]. *Anim Feed Sci Technol*, 2005, 123/124: 687-702
- [11] Jin L Z, Ho Y W, Abdullah N, et al. Effects of adherent *Lactobacillus* cultures on growth, weight of organs and intestinal microflora and volatile fatty acids in broilers [J]. *Anim Feed Sci Technol*, 1998, 70: 197-209
- [12] Pryde S E, Duncan S H, Hold G L, et al. The microbiology of butyrate formation in the human colon [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2002, 217: 133-139
- [13] Louis P, Duncan S H, McCrae S I, et al. Restricted distribution of the butyrate kinase pathway among butyrate-producing bacteria from the human colon [J]. *J Bacteriol*, 2004, 186: 2099-2106
- [14] Duncan S H, Louis P, Flint H J. Lactate utilizing bacteria, isolated from human faeces, that produce butyrate as a major fermentation product [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70: 5810-5817
- [15] 苏勇, 姚文, 黄瑞华, 等. 芽孢乳杆菌 S1 对断奶前、后仔猪肠道乳酸菌和大肠杆菌及 VFA 含量变化的影响 [J]. *福建农林大学学报*, 2006(1): 73-76
- [16] 于卓腾, 毛胜勇, 朱伟云. 鸡肠黏膜乳酸菌的抗菌能力及其对抗菌素的药敏特性 [J]. *华中农业大学学报*, 2005, 24(4): 376-379
- [17] Rastall R A, Gibson G R, Gill H S, et al. Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: an overview of enabling science and potential applications [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2005, 52: 145-152
- [18] Fernandez F, Hinton M, Gils B V. Evaluation of the effect of mannan-oligosaccharides on the competitive exclusion of *Salmonella enteritidis* colonization in broiler chicks [J]. *Avian Pathol*, 2000, 29: 575-581