

DOI: 10.12101/j.issn.1004-390X(n).202008071

长期相对高、低环境温度对肉鸡回肠 微生物多样性的影响*

沈丽艳¹, 杨玉婷¹, 高欢¹, 冉津铭², 张春勇¹, 安清聪¹, 曹振辉^{1**}, 潘洪彬^{1**}

(1. 云南农业大学, 云南省动物营养与饲料重点实验室, 云南 昆明 650201;

2. 达州职业技术学院 经济管理系, 四川 达州 635000)

摘要:【目的】探究长期相对高、低温度环境对肉鸡回肠微生物多样性的影响。【方法】选取 300 只 1 日龄艾维肉仔鸡, 随机均分为 3 组, 分别设为高温组 (36.5 °C, HI 组)、对照组 (33.5 °C, CI 组) 和低温组 (30.5 °C, LI 组), 温度随日龄平行递减, 每天各组间温差均为 3 °C, 其他饲养条件一致, 至 42 d 分别降至 22 °C、19 °C 和 16 °C; 每组随机选取 12 只肉鸡屠宰, 采集回肠食糜, 进行 16S rRNA 测序分析。【结果】(1) 与 CI 组相比, HI 和 LI 组 Shannon 和 Simpson 指数显著升高 ($P<0.05$)。 (2) 门水平上, HI 组回肠的厚壁菌门、蓝细菌/叶绿体的丰度、厚壁菌门/拟杆菌门 (F/B) 比值显著高于 CI 组, 拟杆菌门丰度则显著降低 ($P<0.05$); 属水平上, HI 组回肠的乳酸菌属、曲霉菌属的丰度显著高于 CI 组, LI 组回肠的梭菌属 *XI*、志贺氏大肠杆菌属的丰度显著低于 CI 组 ($P<0.05$)。 (3) 转录机制信号通路在 CI 组显著富集; DNA 修复和重组蛋白等 18 个信号通路在 HI 组显著富集; 乙醛酸和二羧酸代谢等 14 个信号通路在 LI 组显著富集。 (4) CI 组梭菌属 *XVIII* 与转录机制通路呈正相关, HI 组乳酸菌属与磷酸转移酶系统通路呈正相关, LI 组潘多拉菌属与乙醛酸和二羧酸代谢通路呈正相关。【结论】长期相对低温环境使肉鸡回肠微生物多样性增加, F/B 比值、梭菌属 *XI*、志贺氏大肠杆菌属丰度降低; 长期相对高温环境使肉鸡回肠微生物多样性增加, F/B 比值降低、乳酸菌属和曲霉菌属的丰度增加, 为肉鸡健康养殖提供了理论依据。

关键词: 环境温度; 肉鸡; 回肠; 微生物多样性

中图分类号: S 831.1

文献标志码: A

文章编号: 1004-390X (2021) 04-0598-10

Effect of Long-term Relative High and Low Environmental Temperatures on the Microbial Diversity of Ileum in Broilers

SHEN Liyan¹, YANG Yuting¹, GAO Huan¹, RAN Jinming², ZHANG Chunyong¹,
AN Qingcong¹, CAO Zhenhui¹, PAN Hongbin¹

(1. Animal Nutrition and Feed Laboratory of Yunnan Province, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. Department of Economic Management, Dazhou Vocational and Technical College, Dazhou 635000, China)

Abstract: [Purpose] To explore the effects of long-term relative high and low environmental temperature on the ileum microbial diversity in broilers. [Method] Three hundred one-day-old Avian broilers were randomly divided into three groups: high temperature group (36.5 °C, HI), control group (33.5 °C, CI) and low temperature group (30.5 °C, LI). The temperature was decreased as a parallel,

收稿日期: 2020-08-31

修回日期: 2021-02-27

网络首发时间: 2021-08-19 14:48:40

*基金项目: 十三五国家重点研发计划 (2016YFD0500500)。

作者简介: 沈丽艳 (1997—), 女, 云南临沧人, 在读硕士研究生, 主要从事单胃动物营养研究。

E-mail: 3161473298@qq.com

**通信作者 Corresponding authors: 曹振辉, (1977—), 男, 辽宁灯塔人, 博士, 副教授, 主要从事单胃动物营养研究。E-mail: 80003066@qq.com; 潘洪彬 (1974—), 男, 吉林松原人, 博士, 副教授, 主要从事单胃动物营养研究。E-mail: ynsdyz@163.com

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20210818.1642.001.html>



and the temperature difference among each group was 3 °C. Other feeding conditions were the same, and 12 broilers in each group were slaughtered at 22 °C, 19 °C and 16 °C on the 42th day. Ileum chyme was collected to 16S rRNA gene sequencing analysis. [Result] (1) Compared with CI group, Shannon and Simpson index in HI and LI groups were significantly higher ($P<0.05$). (2) At the phylum level, the abundance of Firmicutes, Cyanobacteria/Chloroplast and the ratio of Firmicutes to Bacteroides (F/B) in the ileum of the HI group were significantly higher than those of the CI group, while the abundance of Bacteroides was significantly lower than that of the CI group ($P<0.05$); At the genus level, the abundance of *Lactobacillus* and *Turicibacter* in ileum HI group was significantly higher than that in CI group, while the abundance of *Clostridium XI* and *Escherichia/Shigella* in ileum in LI group was significantly lower than that in CI group ($P<0.05$). (3) Transcription machinery signal transduction pathway was significantly enriched in CI group. Eighteen signal pathways such as DNA repair and recombination proteins were significantly enriched in HI group. Fourteen signal pathways such as glyoxylate and dicarboxylate metabolism were significantly enriched in LI group. (4) There was a positive correlation between *Clostridium XVIII* and transcription machinery pathway in CI group, *Lactobacillus* and phosphotransferase system pathway in HI group, and *Pandoraea* and glyoxylate and dicarboxylate metabolism pathway in LI group. [Conclusion] The results showed that the ileum microbial diversity of broilers increased in long-term relatively low temperature environment, while the ratio of F/B, *Clostridium XI* and *Escherichia/Shigella* decreased in long-term relatively low temperature environment, while in long-term relatively high temperature environment, the ileum microbial diversity increased, the ratio of F/B decreased, and the abundance of *Lactobacillus* and *Turicibacter* increased, which provided a theoretical basis for healthy breeding of broilers.

Keywords: environmental temperature; broilers; ileum; microbial diversity

中国是家禽养殖大国, 肉鸡产业是中国畜牧业中现代化、规模化、集约化、组织化和市场化程度最高的产业之一^[1]。环境温度是影响肉鸡生长发育的因素之一, 据报道, 热应激降低肉鸡采食量、平均日增质量及饲料转化效率, 而冷应激增加肉鸡采食量和死亡率, 降低肉鸡机体细胞免疫性能, 引起肉仔鸡腹水症和疾病发病率的增加^[2]。肠道菌群作为机体的重要组成部分, 参与家禽的生长发育、消化吸收、营养免疫、生物拮抗及其各种功能和结构的发生、发展及衰退的全过程^[3-4]。其中, 回肠是吸收营养物质的主要部位, 以兼性和微嗜氧性细菌为主, 以乳酸杆菌科最为丰富^[5]。研究发现: 环境温度是影响家禽肠道菌群的重要因素之一, 随着环境温度的改变, 家禽肠道正常菌群也会受到影响^[6]。WANG 等^[7]发现: 高温显著影响肉鸡回肠菌群的 α 和 β 多样性, 主要增加回肠微生物的物种丰富度; BURKHOLDER 等^[8]使用变性梯度凝胶电泳法发现: 高温下肉鸡肠道微生物群落结构发生变化。SHI 等^[9]发现: 热应激导致盲肠厚壁菌门的丰度增

加, 拟杆菌门的丰度降低。CHEVALIER 等^[10]研究发现: 小鼠长期暴露于寒冷环境 (6 °C) 会明显改变肠道中细菌的组成。然而, 目前研究多集中在短期环境温度变化 (急性冷、热应激) 对肉鸡肠道微生物组成的影响, 而长期的相对环境温度变化对肉鸡肠道微生物的影响则鲜见报道。因此, 本试验通过研究长期相对高温和相对低温环境对肉鸡回肠微生物多样性的影响, 以期对环境温度通过肠道微生物影响肉鸡健康提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验动物饲养与管理

1.1.1 试验设计

300 只 1 日龄健康艾维茵肉仔鸡 (湖南顺成养鸡专业合作社) 随机分为 3 组, 每组 100 只, NRC 无抗日粮两阶段饲喂至 42 d, 以北京畜禽育种公司推荐的 AV500 肉鸡饲养管理手册的温度控制参数为对照, 分为高温组 (HI 组)、对照组 (CI 组) 和低温组 (LI 组), 各组的初始温度分别为 36.5、33.5 和 30.5 °C, 温度随日龄平行递减。与

对照组相比,高、低温组每天温差均为 3 ℃,至 42 d 各组分别降至 22、19 和 16 ℃,其他饲养条件一致。各组实际控制温度变化见表 1。

1.1.2 饲养管理

试验在云南省畜牧兽医科学院畜禽环境研究所家禽实验基地进行,鸡舍为 7.20 m×3.50 m×3.50 m,共 3 栋,稻壳垫料地面平养,每栋鸡舍均为自动控温和通风,并配有 4 个槽式给料器和 4 个自动供水器,饲养过程中光照时间管理为:第 1 天为 24 h 光照;第 2~8 天为 23~18 h 光照;第 9~21 天为 12 h 光照;第 22~35 天为 18 h 光照;第 36~42 天为 18~23 h,当体质量<160 g (1~8 d) 时,光照强度为 30~60 lx;当体质量≥160 g (9~42 d) 时,光照强度为 5~10 lx。相对湿度管理为:第 1~7 天为 30%~50%,第 8~21 天为 40%~60%,第 22~42 天为 50%~70%。肉仔鸡按常规管理,自由采食、自由饮水。

1.2 试验方法

1.2.1 样品采集

饲养至第 42 天,随机选取肉鸡 36 只(12 只/组)屠宰。迅速采集回肠食糜,冻存管液氮保存,用于微生物总 DNA 提取和 PCR 扩增。

1.2.2 回肠微生物总 DNA 的提取和 PCR 扩增

每只鸡取回肠食糜样本(100±1) mg,采用 QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit 方法提取细菌

总 DNA。用核酸浓度检测仪检测 DNA 浓度后,于-80 ℃ 保存。

1.3 生物信息学分析

1.3.1 OTU 聚类

在 97% 相似度下利用 Usearch 序列分析软件对 Clean Reads 进行 OTU 聚类分析,根据每个回肠食糜样品中聚类获得的 OTU 在该样品的丰度,计算出 3 组间共有和特有的 OTU 数量。

1.3.2 α 多样性分析

α 多样性包括 Chao1、Observed species、PD-whole tree、Shannon 和 Simpson 指数,利用 QIIME^[11-12]软件计算样品的 α 多样性指数的值,并作出相应的稀释曲线。根据 1 组 *n* 值(一般为 1 组小于总序列数的等差数列)与其相对应的 α 多样性指数的期望值作出曲线,并作出各样品 α 多样性指数的数据统计表^[13]。

1.3.3 β 多样性分析

β 多样性是用来比较 1 对样品在物种多样性方面存在的差异大小。unifrac 是通过利用系统进化的信息来比较样品间的物种群落差异,分为加权 unifrac (weighted unifrac) 与非加权 unifrac (unweighted unifrac) 两种;其中,加权 unifrac 考虑了序列的丰度,非加权 unifrac 不考虑序列丰度。MRPP 组间差异分析是用于分析组间微生物群落结构的差异是否显著的一种分

表 1 鸡舍实际温度变化

Tab. 1 Change of temperature in chicken breeding

分组 group	日龄/d age													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HI	36.5	36.0	35.5	35.0	34.5	34.0	33.5	33.0	32.5	32.5	32.0	32.0	31.5	31.0
CI	33.5	33.0	32.5	32.0	31.5	31.0	30.5	30.0	29.5	29.5	29.0	29.0	28.5	28.0
LI	30.5	30.0	29.5	29.0	28.5	28.0	27.5	27.0	26.5	26.5	26.0	26.0	25.5	25.0
分组 group	日龄/d age													
	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
HI	31.0	30.5	30.5	30.0	30.0	29.5	29.0	29.0	28.5	28.0	28.0	27.5	27.5	27.0
CI	28.0	27.5	27.5	27.0	27.0	26.5	26.0	26.0	25.5	25.0	25.0	24.5	24.5	24.0
LI	25.0	24.5	24.5	24.0	24.0	23.5	23.0	23.0	22.5	22.0	22.0	21.5	21.5	21.0
分组 group	日龄/d age													
	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
HI	27.0	26.5	26.0	26.0	25.5	25.0	25.0	24.5	24.0	24.0	23.5	23.0	22.5	22.0
CI	24.0	23.5	23.0	23.0	22.5	22.0	22.0	21.5	21.0	21.0	20.5	20.0	19.5	19.0
LI	21.0	20.5	20.0	20.0	19.5	19.0	19.0	18.5	18.0	18.0	17.5	17.0	16.5	16.0

注: 低于1 ℃加热器开启, 通风机关闭; 高于0.5 ℃加热器关闭, 通风机开启。

Note: The heater below 1 ℃ is turned on, the fan is closed; above 0.5 ℃, the heater is turned off and the fan is turned on.

析方法^[14]。相似性 Anosim 分析是一种非参数检验, 用来检验组间 (两组或多组) 的差异是否显著大于组内差异, 从而判断分组是否有意义^[15]。

1.3.4 物种丰度与分类统计

从各个 OTU 中挑选出丰度最高的 1 条序列, 作为该 OTU 的代表序列; 将该代表序列与已知物种的 16S 数据库 (RDP, <http://rdp.cme.msu.edu>) 进行比对, 从而对每个 OTU 进行物种归类。根据物种注释情况, 统计每个样品注释到各分类水平 (门、纲、目、科和属) 上的序列数量。根据物种注释结果, 分别在各分类水平上对各个样品作物种 profiling 相应的柱状图。

1.3.5 LDA Effect Size 分析

LDA Effect Size (LEfSe) 分析^[16]采用线性判别分析估算每个组分 (物种) 丰度对差异效果影响的大小, 找出对样品划分产生显著性差异影响的群落或物种。

1.3.6 功能注释与差异表达分析

(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 京都基因和基因组百科全书, <http://www.genome.jp/kegg> 是基因组破译方面的公共数据库^[17]。该数据库是系统分析基因功能、联系基因组信息和功能信息的大型知识库。利用 16S rRNA 基因和参考序列数据库, 应用 PICRUSt 软件预测微生物群落功能^[18]。

1.4 数据统计与分析

试验数据采用 Excel 2019 进行整理, 使用 SPSS 22.0 软件, 对测序数据 α 多样性和微生物区系丰度进行单因素方差分析, 并用 Duncan 氏法进行多重比较。试验结果以“平均值 $\pm$ 标准差”表示。对于厚壁菌门/拟杆菌门 (F/B) 的比值, 根据厚壁菌门和拟杆菌门在各组每个生物学个体中的相对丰度进行统计分析。

为评估优势属与 KEGG 途径之间的相关性, 在 GraphPad Prism 7.0 中执行 Spearman 分析^[19], $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义 ($n=12$)。

2 结果与分析

2.1 OTU 聚类分析

如图 1 所示: HI、CI 和 LI 组分别获得 968、968 和 1241 个 OTU; 3 组共有的 OTU 数量为 543 个, 其占比分别为 56.10%、56.10% 和 43.76%; 各组特有的 OTU 数量分别为 192、

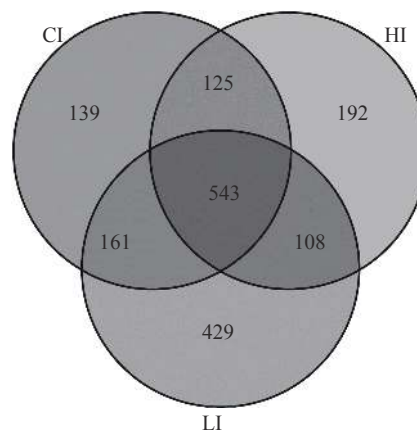


图 1 组间 OTU 分布 Venn 图

Fig. 1 Venn diagram of OTU distribution between groups

139 和 429 个, 各占 19.83%、14.36% 和 34.57%。

2.2 α 多样性分析

如表 2 所示: 与 CI 组相比, HI 组 Observed species、Shannon 和 Simpson 指数显著升高, LI 组 Shannon 和 Simpson 指数显著升高 ($P < 0.05$)。

2.3 β 多样性分析

如表 3 和图 2 所示: 基于 UniFrac 分析利用系统进化的信息比较组间的物种群落差异, 在考虑物种丰度的情况下, $A=0.096$, $\delta_e=0.46 > \delta_o=0.42$, $R=0.188$, $P=0.001$, 组间微生物群落结构差异显著; 在不考虑物种丰度的情况下, $A=0.041$, $\delta_e=0.62 > \delta_o=0.60$, $R=0.163$, $P=0.002$, 组间微生物群落结构差异显著。这表明组间差异显著大于组内差异, 分组有意义。

2.4 回肠食糜微生物物种丰度与分类统计

如表 4 所示: 与 CI 组相比, HI 组厚壁菌门和蓝细菌/叶绿体的相对丰度分别增加 29.47% 和 0.81%, F/B 的比值增加 7.8%, 拟杆菌门的相对丰度降低 27.82% ($P < 0.05$); LI 组厚壁菌门的相对丰度增加 11.16%, F/B 的比值降低 0.11% ($P > 0.05$)。

如表 5 所示: 与 CI 组相比, HI 组乳酸菌属和曲霉菌属的相对丰度分别增加 31.87% 和 1.59%; LI 组梭菌属 *XI* 和志贺氏大肠杆菌属的丰度分别降低 28.7% 和 9.98%, 贪噬菌属和短波单胞菌属的相对丰度分别增加 3.69% 和 2.08% ($P < 0.05$)。

2.5 组间回肠食糜微生物显著性差异分析

如图 3 所示: 在门水平, LI 组中疣微菌门和螺旋体门显著富集; HI 组中厚壁菌门、蓝细菌/叶绿体显著富集。在纲水平, 疣微菌纲等 2 个纲在 LI 组中显著富集; 杆菌纲等 4 个纲在 HI 组中

表 2 α 多样性分析
Tab. 2 α diversity analysis

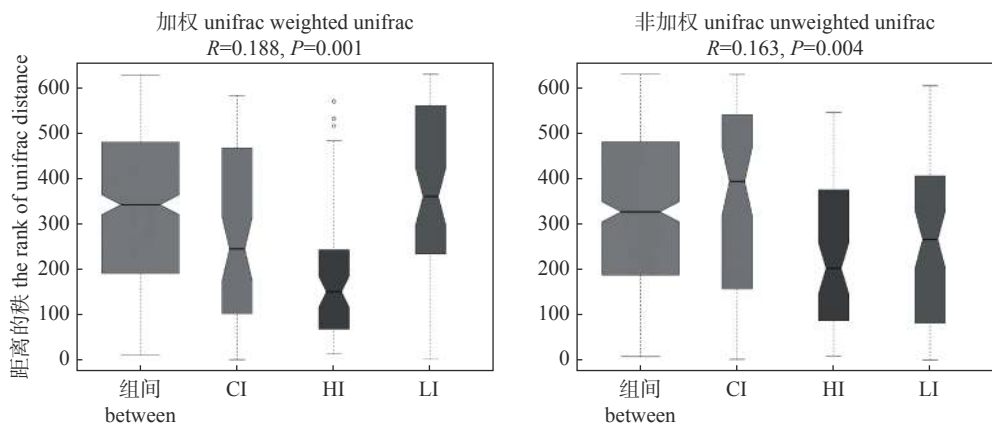
指标 index	CI	HI	LI
Chao1 指数 Chao1 index	326.76±125.72 a	472.92±124.48 a	473.15±140.20 a
观测物种 Observed species	261.60±104.63 b	417.80±108.71 a	396.20±111.20 ab
PD-whole tree 指数 PD-whole tree index	20.22±7.51 a	29.20±6.41 a	27.72±9.15 a
Shannon 指数 Shannon index	3.26±0.71 b	5.40±1.01 a	5.61±0.52 a
Simpson 指数 Simpson index	0.72±0.10 b	0.92±0.05 a	0.96±0.01 a

注：同行数据标不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)；下同。
Notes: For peer data, different letters indicate significant difference ($P<0.05$); the same as below.

表 3 物种 MRPP 组间差异分析
Tab. 3 Analysis of differences between species MRPP groups

β 多样性 β diversity	A	δ_o	δ_e	P 值 P -value
加权 unifrac weighted unifrac	0.096	0.42	0.46	0.001
非加权 unifrac unweighted unifrac	0.041	0.60	0.62	0.002

注： A . 统计量； δ_o . 观测值； δ_e . 期望值； P . P 值。
Note: A . statistic data; δ_o . observed; δ_e . expectd; P . P -value.



注：组间相对于其他每个分组秩较高时，表示组间差异>组内差异。 R 介于 $(-1, 1)$ 之间， $R>0$ ，说明组间差异显著； $R<0$ ，说明组内差异>组间差异。统计分析的可信度用 P 表示， $P<0.05$ 表示统计具有显著性。

Note: When the rank of between group is higher than that of other groups, the difference between groups is greater than that within groups. R is between $(-1, 1)$, $R>0$, which means that there is a significant difference between groups, and $R<0$, which means that the difference within groups is greater than that between groups. The credibility of statistical analysis is expressed by P , $P<0.05$ means that the statistics are significant.

图 2 回肠微生物 16S rRNA 样品的组间 Anosim 相似性指数分析图
Fig. 2 Analysis of Anosim similarity index between groups of ileum microbe 16S rRNA

表 4 肉鸡回肠微生物门水平组成及差异分析
Tab. 4 Composition and difference analysis of ileum microbial at phylum levels in broilers

门 phylum	CI	HI	LI
厚壁菌门 Firmicutes	39.70±5.10 b	69.17±7.33 a	50.86±7.30 ab
拟杆菌门 Bacteroidetes	44.92±9.21 a	17.10±5.31 b	35.25±1.54 ab
厚壁菌门/拟杆菌门 Firmicutes/Bacteroidetes (F/B)	1.59±0.61 b	9.39±3.40 a	1.48±0.23 b
变形菌门 Proteobacteria	14.58±6.65	10.18±3.64	10.33±6.03
放线菌门 Actinobacteria	0.58±0.22	2.36±0.77	1.49±1.12
疣微菌门 Verrucomicrobia	0.00±0.00	0.08±0.05	1.12±0.62
蓝细菌/叶绿体 Cyanobacteria/Chloroplast	0.01±0.00 b	0.82±0.45 a	0.01±0.01 b

表5 肉鸡回肠微生物属水平组成及差异分析

Tab. 5 Composition and difference analysis of ileum microbial at genus levels in broilers

属 genus	CI	HI	LI
乳酸杆菌属 <i>Lactobacillus</i>	4.51±1.60 b	36.38±13.90 a	2.60±0.76 b
梭菌属 <i>XI Clostridium XI</i>	30.22±10.41 a	22.90±10.46 ab	1.52±0.49 b
潘多拉菌属 <i>Pandoraea</i>	5.02±4.23 b	2.35±2.35 b	31.73±10.39 a
志贺氏大肠杆菌属 <i>Escherichia/Shigella</i>	10.47±2.45 a	6.89±3.10 ab	0.49±0.11 b
枯草杆菌属 <i>Turicibacter</i>	0.08±0.03 b	1.67±0.58 a	0.02±0.01 b
贪噬菌属 <i>Variovorax</i>	0.06±0.04 b	0±0 b	3.75±1.43 a
短波单胞菌属 <i>Brevundimonas</i>	0.04±0.02 b	0.07±0.05 b	2.12±0.80 a

显著富集。在目水平, 疣微菌目等3个目在LI组中显著富集; 乳杆菌目等5个目在HI组中显著富集。在科水平, CI组中消化链球菌科显著富集; 伯克氏菌科等6个科在LI组中显著富集; 乳酸杆菌科等18个科在HI组中显著富集。在属水平, 梭菌属 *XI* 等3个属在CI组中显著富集; 潘多拉菌属等16个属在LI组中显著富集; 乳酸菌属等23个属在HI组中显著富集。

2.6 回肠食糜微生物功能注释及组间差异分析

如图4所示: CI组在L3层级显著富集到的信号通路为转录机制。LI组在L3层级显著富集到的信号通路分别为乙醛酸和二羧酸代谢、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成、氧化磷酸化、萘降解、C5支化二元酸代谢、过氧化物酶体、脂质生物合成蛋白质、蛋白质折叠和相关加工、PPAR信号通路、多环芳烃降解、生物素代谢、脂肪细胞因子信号通路、细胞分裂。HI组在L3层级显著富集到的信号通路分别为DNA修复和重组蛋白、磷酸转移酶系统PTS、嘌呤代谢、复制重组与修复蛋白、核糖体生物合成、染色体、氨基酰基tRNA的生物合成、光合作用的蛋白质、光合作用、丙酮酸代谢、碱基切除修复、四环素的生物合成、RNA聚合酶、D-丙氨酸代谢、霍乱弧菌致病循环、结核病、核黄素代谢和二甲苯降解。

2.7 回肠差异微生物组成与代谢通路关联分析

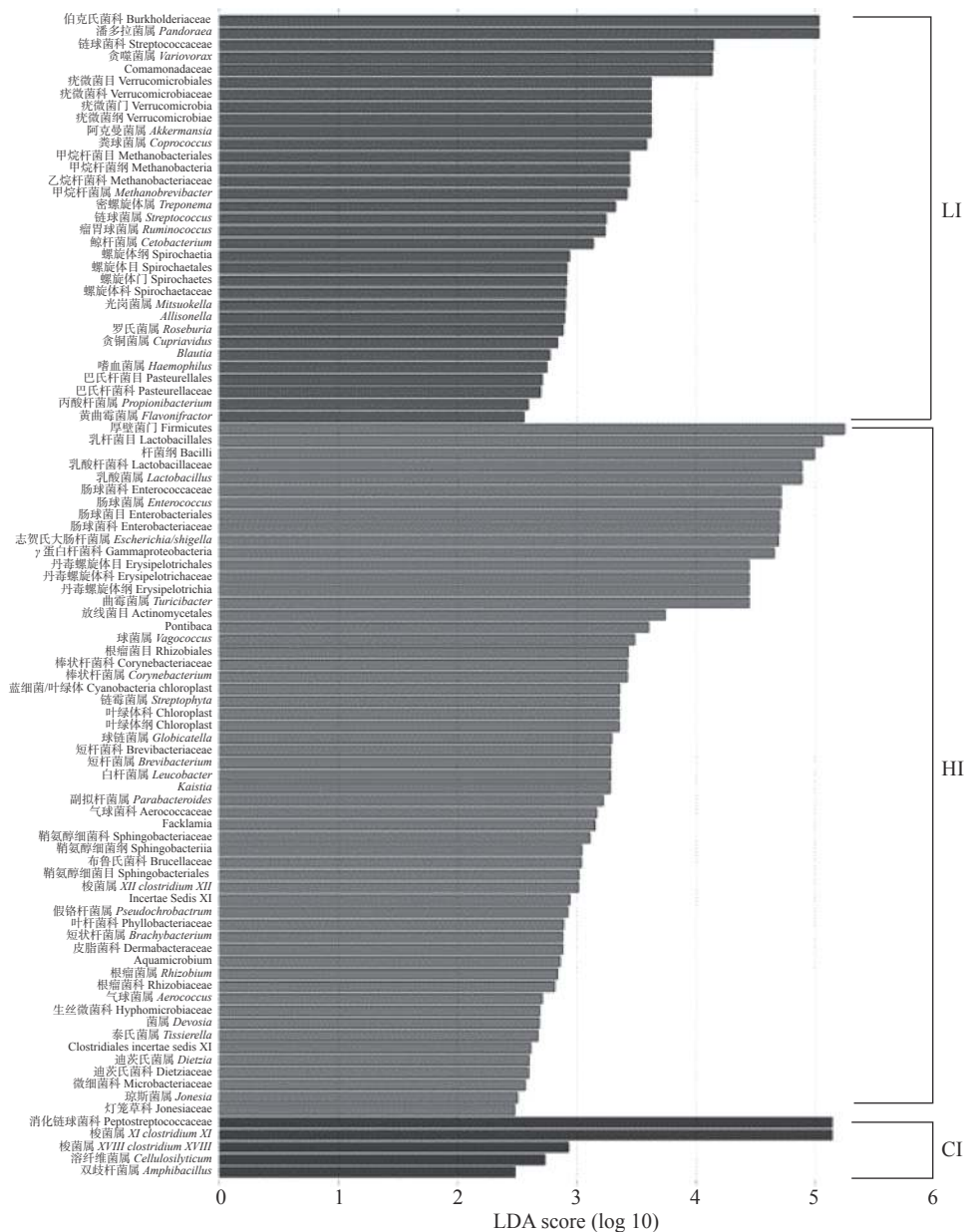
如图5所示: CI组梭状芽孢杆菌 *XVIII* 与转录机制通路呈正相关 ($r=0.47$, $P=0.0039$)。HI组乳酸菌属与磷酸转移酶系统 ($r=0.50$, $P=0.0018$)、复制重组与修复蛋白 ($r=0.38$, $P=0.021$)、四环素的生物合成 ($r=0.33$, $P=0.047$)、RNA聚合酶 ($r=0.44$, $P=0.0072$)、D-丙氨酸代谢 ($r=0.60$, $P=0.0001$)、霍乱弧菌致病循环 ($r=0.37$, $P=0.028$)、

二甲苯降解 ($r=0.47$, $P=0.0037$) 通路呈正相关。肠球菌与磷酸转移酶系统 ($r=0.63$, $P<0.001$)、复制重组与修复蛋白 ($r=0.38$, $P=0.023$)、霍乱弧菌致病循环 ($r=0.42$, $P=0.011$) 通路呈正相关。志贺氏大肠杆菌属与复制重组与修复蛋白 ($r=0.38$, $P=0.023$)、四环素的生物合成 ($r=0.36$, $P=0.047$)、霍乱弧菌致病循环 ($r=0.41$, $P=0.028$) 呈正相关。LI组富集的乙醛酸和二羧酸代谢等12个信号通路与潘多拉菌属等16个差异属呈正相关 ($P<0.05$)。

3 讨论

环境温度是影响家禽生产的一个重要因素, 急性、慢性热应激均会使肉鸡肠道菌群发生改变。WANG等^[20]报道对肉鸡进行热应激处理(温控组 $21\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、高温组 $31\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$)发现: 高温显著影响回肠微生物区系的 α 多样性(Chao1, $P=0.002$; PD-whole tree, $P=0.002$), 表明高温增加了回肠微生物区系的物种丰富度。ZHU等^[21]通过DGGE图谱分析表明: 饲养温度变化对肉鸡盲肠微生物的组成有显著影响。本研究结果显示: 高温显著增加了Shannon和Simpson指数, 因此推测长期相对高温环境增加了回肠肠道菌群的多多样性。

鸡肠道中主要以厚壁菌门为主, 其次为变形菌门、拟杆菌门和放线菌门^[22]。据报道, 热应激($38\text{ }^{\circ}\text{C}$)对肠道菌群影响较为明显, 肠道菌群改变可导致肠道的消化吸收功能发生改变^[23]。与CI组相比, 长期相对高温环境使肉鸡厚壁菌门增加。这与之前的研究结果一致, 即较高的环境温度增加了厚壁菌门的丰度^[20]。厚壁菌门是小鼠和人类肠道微生物中最大的群体^[24], 且产生的内孢子能抵抗恶劣环境^[25]。拟杆菌门对胃肠道的正常发育有影响, 可以降解蛋白质和碳水化合物^[26]。



注：仅显示满足 LDA 显著阈值>2 的物种。
Note: Only species meeting an LDA significant threshold>2 are shown.

图 3 CI、HI 和 LI 组回肠微生物 LDA 值分布柱状图
Fig. 3 LDA value distribution map of CI, HI and LI groups ileum microbiota

与 CI 组相比，HI 组厚壁菌门/拟杆菌门的比值增加，LI 组厚壁菌门/拟杆菌门的比值降低。研究发现：厚壁菌门/拟杆菌门比值的增强与人的脂肪沉积和体质量下降负相关^[27-28]。据报道，厚壁菌门的增加和回肠变形菌门的降低有益于肠道健康，有助于提高肉鸡的生长性能^[29]。因此，厚壁菌门在长期相对高温环境饲养条件下相对丰度的增加可能有助于肉鸡适应环境应激。

乳酸杆菌是人类和其他哺乳动物微生物群

的重要组成部分，存在于呼吸道、胃肠道和生殖道^[30]，可以通过利用碳水化合物产生乳酸。乳酸杆菌可以改善宿主胃肠道功能，降低肠道 pH，恢复宿主肠道菌群平衡，抑制病原菌的生长，还能定植于肠黏膜形成黏膜屏障，保护肠道健康^[31]。乳酸杆菌也可以改善鸡肠道微生物区系，提高有益菌数量，与肠道病原菌竞争定植位点，平衡肠道微生物生态区系^[32-33]。志贺氏菌属是引起细菌性痢疾的病原菌^[34]，志贺氏大肠杆菌属的相对

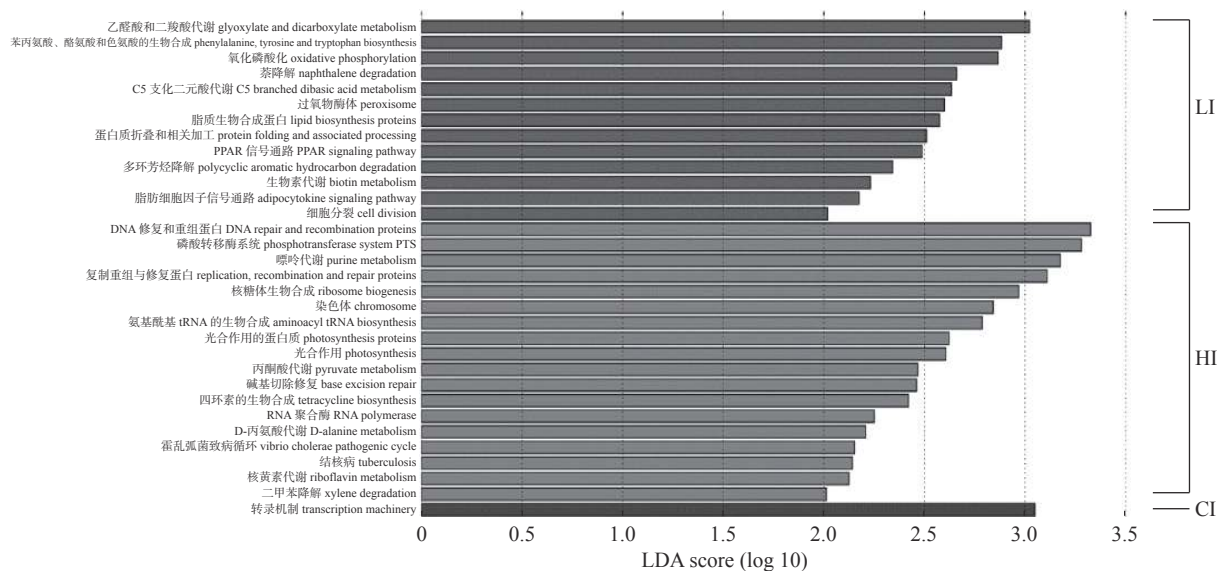


图4 HI、CI和LI组在L3层级(LDA>2)富集信号通路的KEGG分析

Fig. 4 KEGG analysis of enriched signal pathways in the HI, CI and LI groups at L3 hierarchy (LDA>2)

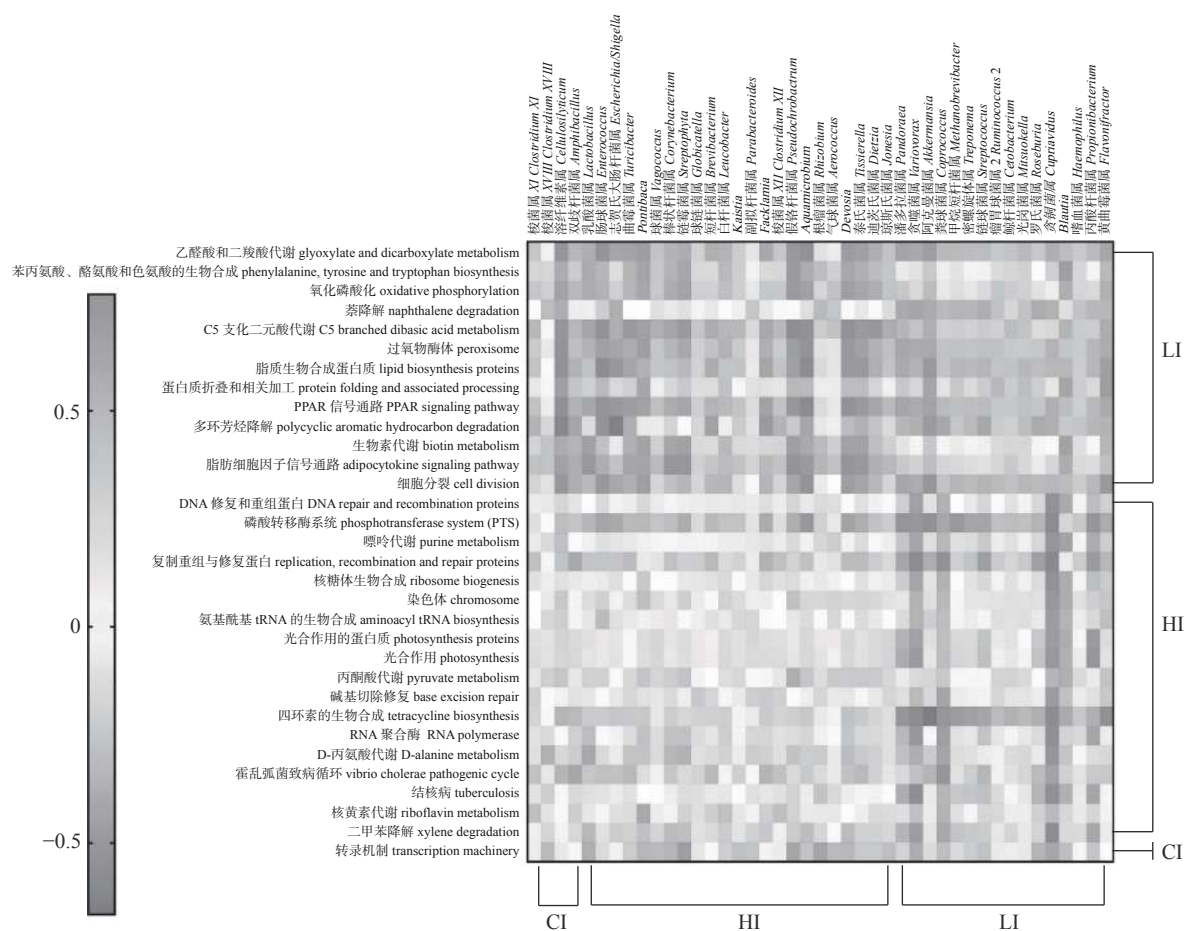
注: 白色表示正相关, 黑色表示负相关; $P < 0.05$ 。Note: White indicates positive correlation and black indicates negative correlation; $P < 0.05$.

图5 微生物变化与通路相关性的热图分析

Fig. 5 Heatmap analysis of the correlation between microbial changes and pathways

丰度降低可以促进肠道健康^[35]。本研究结果显示：高温使肉鸡回肠乳酸杆菌属的丰度显著增加，大肠杆菌属的丰度显著降低，原因可能是高温能影响肉鸡回肠微生物优势菌群的组成，降低环境温度应激对肉鸡的危害。因此，长期相对高温饲养环境下乳酸杆菌的增加、志贺氏大肠杆菌属的降低可能有助于平衡肠道微生物，促进肉鸡健康生长。

曲霉菌属属于厚壁菌门，具有生物转化和生物降解作用^[36]。本研究结果显示：HI 组曲霉菌属显著增加。因此，长期相对高温环境饲养肉鸡，可能会增加肉鸡对有害物质的降解，促进肉鸡健康生长。潘多拉菌属是一种革兰氏阴性致病菌，属于变形杆菌的 β 亚类，参与抗外源性生物降解^[37]，已证明能够产生奥西林酶，该酶增加了对阿霉素和碳青霉烯的耐药性^[38]。贪噬菌属属于丛枝藻科和 β -变形杆菌^[39]，是一种普遍存在的 β 蛋白细菌，参与植物的生长促进和外源物质的降解^[40]。本研究结果显示：LI 组潘多拉菌属和贪噬菌属显著增加。因此，长期相对低温环境饲养肉鸡，可能会增加有害菌的生长，不利于肉鸡健康生长。

磷酸转移酶系统 (phosphotransferase system, PTS) 最初在大肠杆菌 (*E. coli*) 中被发现，后来在许多其他细菌中被发现，是一种催化碳水化合物吸收和转化为磷酸酯的转运系统^[41]。本研究，HI 组乳酸菌属与 PTS 通路呈正相关。因此，在长期相对高温环境下，可能通过乳酸菌属影响磷酸转移酶系统 PTS 通路。乙醛酸和二羧酸代谢是碳水化合物代谢的关键环节，它使细胞获得能量，并以高能分子的形式暂时储存释放的能量，参与脂肪酸代谢^[42]。苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成是胃食管癌潜在的生物标记物^[43]。本研究中，LI 组潘多拉菌属与乙醛酸和二羧酸代谢通路呈正相关。因此，在长期相对低温环境下可能通过 *Pandora* 影响代谢通路。

4 结论

长期相对高温使肉鸡回肠微生物多样性增加，厚壁菌门和乳酸杆菌属增加，拟杆菌门降低，嘌呤代谢和 D-丙氨酸代谢等相关信号通路显著富集；长期相对低温使肉鸡回肠微生物多样性

增加，梭状芽孢杆菌 XI、志贺氏大肠杆菌属降低，苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成、脂类生物合成蛋白质等相关信号通路显著富集。

[参考文献]

- [1] 郑麦青, 赵桂苹, 李鹏, 等. 我国肉鸡养殖规模化发展现状调研分析[J]. 中国家禽, 2014, 36(16): 2. DOI: 10.16372/j.issn.1004-6364.2014.16.004.
- [2] 李绍钰, 魏凤仙, 徐彬, 等. 环境应激对肉鸡的影响研究进展[C]//中国畜牧兽医学动物营养学会第七届中国饲料营养学术研讨会, 2014.
- [3] LIU F, YIN J, DU M, et al. Heat-stress-induced damage to porcine small intestinal epithelium associated with downregulation of epithelial growth factor signaling[J]. Journal of Animal Science, 2009, 87(6): 1941. DOI: 10.2527/jas.2008-1624.
- [4] QUINTEIRO-FILHO W M, RODRIGUES M V, RIBEIRO A, et al. Acute heat stress impairs performance parameters and induces mild intestinal enteritis in broiler chickens: role of acute hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation[J]. Journal of Animal Science, 2012, 90(6): 1986. DOI: 10.2527/jas.2011-3949.
- [5] WEI S, MORRISON M, YU Z. Bacterial census of poultry intestinal microbiome[J]. Poultry Science, 2013, 92(3): 671. DOI: 10.3382/ps.2012-02822.
- [6] 彭赛赛, 王雪敏, 张敏红, 等. 持续偏热环境对肉鸡盲肠菌群多样性的影响[J]. 中国农业科学, 2016, 49(1): 186. DOI: 10.3864/j.issn.0578-1752.2016.01.017.
- [7] WANG Q, GARRITY G M, TIEDJE J M, et al. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(16): 5261. DOI: 10.1128/AEM.00062-07.
- [8] BURKHOLDER K M, THOMPSON K L, EINSTEIN M E, et al. Influence of stressors on normal intestinal microbiota, intestinal morphology, and susceptibility to *Salmonella enteritidis* colonization in broilers[J]. Poultry Science, 2008, 87(9): 1734. DOI: 10.3382/ps.2008-00107.
- [9] SHI D, BAI L, QU Q, et al. Impact of gut microbiota structure in heat-stressed broilers[J]. Poultry Science, 2019, 98(6): 2405. DOI: 10.3382/ps/pez026.
- [10] CHEVALIER C, STOJANOVIC O, COLIN D J, et al. Gut microbiota orchestrates energy homeostasis during cold[J]. Cell, 2015, 163(6): 1360. DOI: 10.1016/j.cell.2015.11.004.
- [11] CAPORASO J G, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. Nature Methods, 2010, 7(5): 335. DOI: 10.1038/nmeth.f.303.
- [12] KEMP P F, ALLER J Y. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 47(2): 161. DOI: 10.1016/S0168-6496(03)00257-5.
- [13] YU Z, YANG J, LIU L, et al. Bacterioplankton community shifts associated with epipelagic and mesopela-

- gic waters in the Southern Ocean[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 12897. DOI: [10.1038/srep12897](https://doi.org/10.1038/srep12897).
- [14] MIELKE P W, BERRY K J. Permutation methods[M]. Springer New York, 2001.
- [15] SICKLE J V. Using mean similarity dendrograms to evaluate classifications[J]. Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics, 1997, 2(4): 370. DOI: [10.2307/1400509](https://doi.org/10.2307/1400509).
- [16] SEGATA N, IZARD J, WALDRON L, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation[J]. Genome Biology, 2011, 12(6): R60. DOI: [10.1186/gb-2011-12-6-r60](https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60).
- [17] KANEHISAM, SATO Y, FURUMICHIM, et al. New approach for understanding genome variations in KEGG[J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47(D1): D590. DOI: [10.1093/nar/gky962](https://doi.org/10.1093/nar/gky962).
- [18] LANGILLE M G, ZANEVELD J, CAPORASO J G, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences[J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(9): 814. DOI: [10.1038/nbt.2676](https://doi.org/10.1038/nbt.2676).
- [19] MITTEER D R, GREER B D, FISHER W W, et al. Teaching behavior technicians to create publication-quality, single-case design graphs in graphpad prism 7[J]. Journal of Applied Behavior Analysis, 2018, 51(4): 998. DOI: [10.1002/jaba.483](https://doi.org/10.1002/jaba.483).
- [20] WANG X J, FENG J H, ZHANG M H, et al. Effects of high ambient temperature on the community structure and composition of ileal microbiome of broilers[J]. Poultry Science, 2018, 97(6): 2153. DOI: [10.3382/ps/pey032](https://doi.org/10.3382/ps/pey032).
- [21] ZHU X Y, ZHONG T, PANDYA Y, et al. 16S rRNA-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chickens[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(1): 124. DOI: [10.1128/aem.68.1.124-137.2002](https://doi.org/10.1128/aem.68.1.124-137.2002).
- [22] GONG J, SI W, FORSTER R J, et al. 16S rRNA gene-based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts: from crops to ceca[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2007, 59(1): 147. DOI: [10.1111/j.1574-6941.2006.00193.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00193.x).
- [23] 李永洙, 陈常秀, YONG Q C. 热应激对蛋鸡肠道菌群结构、碱性磷酸酶活性及氨基酸转运载体mRNA表达丰度的影响[J]. 中国农业科学, 2013(20): 4378. DOI: [10.3864/j.issn.0578-1752.2013.20.022](https://doi.org/10.3864/j.issn.0578-1752.2013.20.022).
- [24] LEY R E, PETERSON D A, GORDON J I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine[J]. Cell, 2006, 124(4): 837. DOI: [10.1016/j.cell.2006.02.017](https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.017).
- [25] FILIPPIDOU S, WUNDERLIN T, JUNIER T, et al. A combination of extreme environmental conditions favor the prevalence of endospore-forming firmicutes[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1707. DOI: [10.3389/fmicb.2016.01707](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01707).
- [26] THOMAS F, HEHEMANN J H, REBUFFET E, et al. Environmental and gut bacteroidetes: the food connection[J]. Frontiers in Microbiology, 2011, 2: 93. DOI: [10.3389/fmicb.2011.00093](https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00093).
- [27] TURNBAUGH P J, HAMADY M, YATSUNENKO T, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins[J]. Nature, 2009, 457(7228): 480. DOI: [10.1038/nature07540](https://doi.org/10.1038/nature07540).
- [28] MARIAT D, FIRMESSE O, LEVENEZ F, et al. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age[J]. BMC Microbiology, 2009, 9: 123. DOI: [10.1186/1471-2180-9-123](https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-123).
- [29] 陈秀琴, 黄梅清, 郑敏, 等. 动物肠道菌群与病原微生物感染关系的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46(2): 628. DOI: [10.16431/j.cnki.1671-7236.2019.02.035](https://doi.org/10.16431/j.cnki.1671-7236.2019.02.035).
- [30] O'CALLAGHAN J, O'TOOLE P W. Lactobacillus: host-microbe relationships[J]. Current Topics in Microbiology and Immunology, 2013, 358: 119. DOI: [10.1007/82_2011_187](https://doi.org/10.1007/82_2011_187).
- [31] AHMED Z, VOHRA M S, KHAN M N, et al. Antimicrobial role of *Lactobacillus* species as potential probiotics against enteropathogenic bacteria in chickens[J]. Journal of Infection in Developing Countries, 2019, 13(2): 130. DOI: [10.3855/jidc.10542](https://doi.org/10.3855/jidc.10542).
- [32] MOUNTZOURIS K C, TSIRTSIKOS P, KALAMARA E, et al. Evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* strains in promoting broiler performance and modulating cecal microflora composition and metabolic activities[J]. Poultry Science, 2007, 86(2): 309. DOI: [10.1093/ps/86.2.309](https://doi.org/10.1093/ps/86.2.309).
- [33] BAI S P, WU A M, DING X M, et al. Effects of probiotic-supplemented diets on growth performance and intestinal immune characteristics of broiler chickens[J]. Poultry Science, 2013, 92(3): 663. DOI: [10.3382/ps.2012-02813](https://doi.org/10.3382/ps.2012-02813).
- [34] ZHANG H, WANG R, BAO H. Phage inactivation of foodborne Shigella on ready-to-eat spiced chicken[J]. Poultry Science, 2013, 92(1): 211. DOI: [10.3382/ps.2011-02037](https://doi.org/10.3382/ps.2011-02037).
- [35] LI Z, WANG W W, LIU D, et al. Effects of *Lactobacillus acidophilus* on gut microbiota composition in broilers challenged with *Clostridium perfringens*[J]. PLoS One, 2017, 12(11): e0188634. DOI: [10.1371/journal.pone.0188634](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188634).
- [36] CLARK A, MACH N. Exercise-induced stress behavior, gut-microbiota-brain axis and diet: a systematic review for athletes[J]. Journal of the International Society of Sports Nutrition, 2016, 13: 43. DOI: [10.1186/s12970-016-0155-6](https://doi.org/10.1186/s12970-016-0155-6).
- [37] PEETERS C, DE CANCK E, CNOCKAERT M, et al. Comparative genomics of pandoraea, a genus enriched in xenobiotic biodegradation and metabolism[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2556. DOI: [10.3389/fmicb.2019.02556](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02556).