

## 高、低营养水平饲料对环江香猪结肠菌群结构及代谢物的影响

姬玉娇<sup>1</sup> 祝倩<sup>1</sup> 耿梅梅<sup>1</sup> 陈闻<sup>1</sup> 印遇龙<sup>1</sup> 孔祥峰<sup>1,2\*</sup>

(1. 中国科学院亚热带农业生态研究所 亚热带农业生态过程重点实验室 湖南 长沙 410125)

(2. 中国科学院环江喀斯特生态系统观测研究站 香猪研究中心 广西 环江 547100)

**摘要:**【目的】研究两种饲料对环江香猪结肠内容物菌群结构及其代谢物的影响。【方法】选用 33.5±8.1 kg 的环江香猪 10 头, 随机分为两组, 每组 5 头猪, 单栏饲养, 分别饲喂高营养水平饲料(粗蛋白质含量为 13.11%, 消化能为 14.73 MJ/kg)和低营养水平饲料(粗蛋白质含量为 9.77%, 消化能为 12.24 MJ/kg)。饲喂 75 d 后屠宰, 每组选 3 头猪采集结肠内容物提取细菌总 DNA, PCR 扩增获得 16S rRNA 基因 V4 标签片段, 用于 MiSeq 高通量测序, 基于 QIIME 平台比较结肠内容物菌群结构多样性; 每组取 5 头猪的结肠内容物, 利用气相色谱和液相色谱分析其中短链脂肪酸、氨氮、生物胺、吲哚和粪臭素的含量。【结果】硬壁菌门、拟杆菌门、螺旋体门和软壁菌门细菌为环江香猪结肠内容物中的优势菌门; 饲料组成不影响环江香猪结肠内容物菌群结构的多样性, 高营养水平饲料组结肠内容物中广古细菌含量显著低于、瘤胃球菌属和假丁酸弧菌属细菌含量显著高于低营养水平饲料组; 高营养水平饲料组环江香猪结肠内容物中乙酸和丙酸含量显著低于、氨氮和尸胺含量显著高于低营养水平饲料组。【结论】硬壁菌门、拟杆菌门、螺旋体门和软壁菌门细菌为环江香猪结肠内容物中的优势菌门, 短期饲喂高营养水平饲料可改变环江香猪结肠中的部分微生物含量及其代谢特性。

**关键词:** 环江香猪, 饲料组成, 结肠, 菌群, 代谢产物

**Foundation item:** “Western Light” Key Program for Talent Cultivation from Chinese Academy of Sciences; National Nature Science Foundation of China (No. 31270044); Key Technologies Research and Development Program of China (No. 2012BAC17B0102)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-731-84619763; E-mail: nnkxf@isa.ac.cn

**Received:** August 05, 2015; **Accepted:** November 13, 2015; **Published online** (www.cnki.net): December 16, 2015

**基金项目:** 中国科学院“西部之光”人才培养计划重点项目; 国家自然科学基金项目(No. 31270044); 国家科技支撑计划项目(No. 2012BAC17B0102)

**\*通讯作者:** Tel: 86-731-84619763; E-mail: nnkxf@isa.ac.cn

**收稿日期:** 2015-08-05; **接受日期:** 2015-11-13; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2015-12-16

## Effect of diets with high- or low-level nutrient on colonic microbial community structure and metabolites in Huanjiang mini-pigs

JI Yu-Jiao<sup>1</sup> ZHU Qian<sup>1</sup> GENG Mei-Mei<sup>1</sup> CHEN Wen<sup>1</sup> YIN Yu-Long<sup>1</sup>  
KONG Xiang-Feng<sup>1,2\*</sup>

(1. Key Laboratory of Agro-ecological Processes in Subtropical Region, Institute of Subtropical Agriculture, Chinese Academy of Sciences, Changsha, Hunan 410125, China)

(2. Research Center of Mini-Pig, Huanjiang Observation and Research Station for Karst Ecosystems Chinese Academy of Sciences, Huanjiang, Guangxi 547100, China)

**Abstract:** [Objective] We studied the effect of two diets on colonic microbial community structure and metabolites in Huanjiang mini-pigs. [Methods] Ten Huanjiang mini-pigs (initial body weight  $33.5 \pm 8.1$  kg) were randomly assigned into 2 groups with 5 pigs each, of which one group was fed with a diet with high-level nutrient (crude protein 13.11%, digestible energy 14.73 MJ/kg), and the other with low-level nutrient (crude protein 9.77%, digestible energy 12.24 MJ/kg). After 75 d, all animals were killed and the samples of colonic content were collected. Total bacterial DNA of three samples of pigs per group was extracted, and used to amplify PCR for 16S rRNA gene V4 tag fragment and sequence using high-throughput MiSeq technique. Based on the QIIME platform, the microbial community diversity in colonic content was compared. The contents of short-chain fatty acid, ammonia, bioamine, indole, and skatole in colonic contents from five pigs per group were also analyzed using gas chromatography or liquid chromatography. [Results] Firmicutes, Bacteroidetes, Spirochaetes, and Tenericutes were the dominant phyla in colonic content of Huanjiang mini-pigs; dietary nutrient components did not affect the microbial community diversity in colonic content of Huanjiang mini-pigs. The relative abundance of Euryarchaeota was lower in colonic content of pigs fed diet with high-level nutrient, whereas *Ruminococcus* and *Pseudobutyrvibrio* were higher than those fed diet with the low-level nutrient. The contents of acetate and propionate were lower in colonic content of pigs fed diet with high-level nutrient, but ammonia and cadaverine were higher than those fed diet with the low-level nutrient. [Conclusion] Firmicutes, Bacteroidetes, Spirochaetes, and Tenericutes were the dominant phyla in colonic content of Huanjiang mini-pigs; diet with high-level nutrient in short feeding-period altered the contents of several colonic bacteria and their metabolic properties.

**Keywords:** Huanjiang mini-pig, Dietary components, Colon, Microbial community, Metabolites

动物后肠中含有 1 000 多种微生物, 每克肠道内容物中含有约  $10^{12}$  个微生物细胞。这些微生物可直接影响或通过其代谢产物间接影响宿主的肠道结构、功能和发育<sup>[1]</sup>, 因此有学者将肠道微生物菌群称为“微生物器官”。研究认为, 摄入食物的数量、结构和种类会通过影响宿主的肠道菌群而改变其肠道功能<sup>[2]</sup>。宿主的基因型、年龄和生存环境也是决定肠道菌群结构的重要因素<sup>[3]</sup>。例如, 幼龄动物肠道菌群的个体差异较大, 而成年动物肠道菌群可长期处于非常稳定的状态<sup>[4]</sup>。由于传统的微生物学研究方法具有一定的局限性, 研究结果不能反映整个肠道微生物群落的完整信息。近年来发展起来的

核酸测序技术, 具备通量高、准确度高、成本低等优点, 能够更加全面、准确地反映肠道菌群的结构与组成, 已成为研究肠道微生物的主要技术手段<sup>[5]</sup>。

我国地方品种猪资源丰富, 且具有适应能力强、耐粗饲、肉质好等特征。由于动物肠道微生态对其生长发育、生理代谢和健康维持发挥着重要作用<sup>[1,6]</sup>, 推测地方品种猪具备的上述优良性状可能与其肠道微生态密切相关。结肠是动物胃肠道中微生物含量最多的部位。在小肠中未被消化的抗性淀粉、非淀粉多糖和寡糖等碳水化合物以及食物蛋白质残渣和小肠分泌的黏液、酶类等物质, 在结肠微生物作用下可被发酵分解为短链脂肪酸、氨、生物

胺等代谢产物,其中有些代谢产物可作为能源物质被宿主利用,而有些代谢产物会影响宿主代谢功能与机体健康<sup>[1]</sup>。可见,饮食是影响动物胃肠道微生物组成和代谢的主要因素之一。目前,一些地方品种猪的优势性状出现明显退化,这可能与群体规模变小、营养供给不合理、饲养方式发生改变等因素有关<sup>[7]</sup>。为了探讨饲料营养水平与地方品种猪耐粗饲性状的联系,本文利用 Illumina MiSeq 高通量测序、气相色谱和液相色谱等技术,测定高、低两种营养水平饲料对我国优良地方小型猪—环江香猪结肠菌群结构多样性及其代谢产物的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物、分组与饲养管理

动物试验在中国科学院环江喀斯特生态系统

观测研究站环江香猪实验基地开展。选取 10 头 6–7 月龄的环江香猪,体重为  $33.5 \pm 8.1$  kg,随机分为 2 个饲料处理组,每组 5 头,单栏饲养,分别饲喂高营养水平饲料(粗蛋白质含量为 13.11%,消化能为 14.73 MJ/kg)和低营养水平饲料(粗蛋白质含量为 9.77%,消化能为 12.24 MJ/kg)。饲料配方与营养水平见表 1。每日饲喂 2 次(08:30 和 17:00),每头环江香猪的日饲喂量为其初始体重的 2.5%,饲养 75 d 后屠宰试验猪,取其结肠前段和结肠后段内容物,−80 °C 保存备用。

### 1.2 结肠内容物细菌总 DNA

每个处理组取 3 头试验猪的结肠内容物样品,采用 QIAamp DNA Stool Mini Kit (德国 QIAGEN 公司)提取微生物总 DNA,利用 NanoDrop<sup>®</sup> ND1000

表 1 两种饲料的组成与营养水平(风干样为基础, %)  
Table 1 The components and nutrient level of the two experiment diets (air-dry basis, %)

成分 Ingredients	高营养水平饲料 High nutrient level diet	低营养水平饲料 Low nutrient level diet	营养水平 <sup>b</sup> Nutrient level <sup>b</sup>	高营养水平饲料 High nutrient level diet	低营养水平饲料 Low nutrient level diet
玉米 Corn	58.20	57.20	消化能 DE (MJ/kg)	14.73	12.24
豆粕 Soybean meal	11.00	0.00	粗蛋白 CP	13.11	9.77
麦麸 Wheat bran	11.50	11.00	粗纤维 CF	4.56	6.86
米糠 Rice bran	4.00	13.00	粗脂肪 EE	9.34	5.00
苜蓿草粉 Alfalfa meal	3.00	14.00	钙 Ca	0.62	0.58
赖氨酸 Lys	0.88	0.88	总磷 TP	0.52	0.44
蛋氨酸 Met	0.27	0.27	赖氨酸 Lys	1.11	0.83
苏氨酸 Thr	0.33	0.33	蛋氨酸 + 胱氨酸 Met+Cys	0.65	0.52
色氨酸 Try	0.08	0.08			
大豆油 Soybean oil	7.50	0.00			
磷酸氢钙 Dicalcium phosphate	1.15	1.15			
石粉 Limestone	0.79	0.79			
食盐 Salt	0.30	0.30			
预混料 Premix <sup>a</sup>	1.00	1.00			

注: <sup>a</sup>: 预混料为每千克饲料提供: VA 12 040 IU, VD<sub>3</sub> 2 112 IU, VE 29.7 IU, VK<sub>3</sub> 2.8 mg, VB<sub>1</sub> 1.2 mg, VB<sub>2</sub> 7.1 mg, VB<sub>6</sub> 1.3 mg, VB<sub>12</sub> 0.03 mg, 烟酸 42.9 mg, 泛酸 21.6 mg, 叶酸 0.44 mg, 生物素 0.12 mg, 胆碱 320 mg, Fe 80 mg, Cu 40 mg, Zn 140 mg, Mn 52 mg, I 0.56 mg, Co 1.4 mg, Se 0.33 mg; <sup>b</sup>: 消化能、钙和总磷为计算值,其余为实测值。

Note: <sup>a</sup>: The premix provides the following per kg of diet: VA 12 040 IU, VD<sub>3</sub> 2 112 IU, VE 29.7 IU, VK<sub>3</sub> 2.8 mg, VB<sub>1</sub> 1.2 mg, VB<sub>2</sub> 7.1 mg, VB<sub>6</sub> 1.3 mg, VB<sub>12</sub> 0.03 mg, nicotinic acid 42.9 mg, pantothenic acid 21.6 mg, folic acid 0.44 mg, biotin 0.12 mg, choline 320 mg, Fe 80 mg, Cu 40 mg, Zn 140 mg, Mn 52 mg, I 0.56 mg, Co 1.4 mg, Se 0.33 mg; <sup>b</sup>: Digestive energy, Ca, and TP were calculated values, and others were measured values.

(NanoDrop Technologies Inc., DE, USA)测定其浓度(mg/L)和纯度( $OD_{260}/OD_{280}$ )。取适量的 DNA 样品于离心管中,使用无菌水稀释至 1 mg/L 备用。

### 1.3 16S rRNA基因V4区的PCR扩增及测序

利用稀释后的总 DNA 作为模板,使用细菌通用引物 P1 (515F): 5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3'和 P2 (806R): 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAA-3',对 16S rRNA 基因 V4 区域片段进行 PCR 扩增。扩增体系(30  $\mu$ L): 2 $\times$ Master Mix (NEB, 美国) 12.5  $\mu$ L, 引物(2  $\mu$ mol/L)各 3  $\mu$ L, 牛血清白蛋白(10 mg/L) 0.25  $\mu$ L, 模板 10  $\mu$ L, dd H<sub>2</sub>O 配至 30  $\mu$ L。扩增条件: 98  $^{\circ}$ C 1 min; 98  $^{\circ}$ C 10 s, 50  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 5 min; 4  $^{\circ}$ C 保存。反应结束后将全部反应产物用 2%琼脂糖凝胶电泳进行检测,使用 Gene JET (Thermo Scientific 公司)胶回收试剂盒回收产物。将纯化后的 16S rRNA 基因 V4 区的 PCR 产物送至北京诺禾致源生物信息科技有限公司,利用 Illumina MiSeq 平台进行测序。

### 1.4 结肠代谢产物的测定

每个处理组取 5 头试验猪的结肠内容物样品,冷冻干燥后,采用气相色谱测定其中乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸和异戊酸的含量,前处理参考耿梅梅等<sup>[8]</sup>所述的方法。用 UV-160A 紫外分光光度计(日本岛津)在 550 nm 波长处测定氨氮的含量<sup>[9]</sup>。吲哚和粪臭素含量测定参考姬玉娇<sup>[10]</sup>的方法,生物胺含量测定参考许丽卫等<sup>[11]</sup>的方法,均用高效液相色谱检测。

### 1.5 生物信息学与差异显著性分析

测序得到的 PE reads 首先根据 Overlap 关系进行拼接,同时对序列质量进行质控和过滤,利用 Uparse 软件(v7.0.1001)在 97%相似度下聚类,得到 OTU 代表性序列,并利用 RDP Classifier (version 2.2, <http://sourceforge.net/projects/rdp-classifier/>)<sup>[12]</sup> 与 GreenGene 数据库(<http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi>)<sup>[13]</sup>进行物种注释分析(设定阈值为 0.8–1.0),赋予每条序列物种单元分类。基于样品测序产生的 OTU 的结果,通过 QIIME 软件

alpha\_diversity.py 命令分析样本的 Alpha 多样性指数,即 OTU、ACE、Chao1、Shannon 和 Simpson 指数。在门和属两个分类水平上统计样本的物种丰度,并进行聚类分析。

使用 SAS 8.2 GLM procedure 程序进行双因子分析(Factorial anova),使用 Duncan's multiple range test 程序进行菌群 Alpha 多样性分析;在门和属水平上分析菌群的组成,并对存在差异的属与代谢产物进行 Spearman 相关性分析,定义  $R$  绝对值 $\geq 0.5$ 时存在相关性。以  $P < 0.05$  为显著性差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 两种饲料对结肠内容物微生物序列丰度和多样性的影响

对 12 个结肠内容物微生物样品测序共产生 503 398 条序列,每个样品平均产生 41 950 条,用于 OTU 划分的序列数共 475 059 条,平均每个样品 39 588 条。4 个组的稀疏曲线显示,在 $< 3\ 155$ 条序列时,检测出的物种数量(可反映 OTU 数量)随序列数增加而迅速增加,在约 9 445 条序列时检测出的物种数量缓慢增加,之后趋于平台期(图 1)。

序列比对结果表明,在 97% (即种)水平上进行 OTU 划分,共检出 785 个不同种系型(包括界、门、纲、目、科、属和种)。Alpha 多样性分析结果表明,近端结肠内容物中微生物 OTU 数量少于远端结肠。从趋势上来看,两种饲料组环江香猪远端结肠比近端结肠有较高的菌群结构多样性。但无论是饲料组间还是肠段间,OTU、Chao1、Shannon 和 Simpson 指数均无显著性差异( $P > 0.05$ ,表 2)。

### 2.2 饲料组成对环江香猪结肠内容物门水平菌群结构的影响

采用 RDP 和 BLAST 同源性序列比对聚类相结合的方法,将所有的序列鉴定为 39 个门。统计任一样品中相对含量 $\geq 0.1\%$ 的 12 个门的相对丰度,发现硬壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、螺旋体门(Spirochaetes)和软壁菌门(Tenericutes)细菌的含量最高,属于优势菌门;变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、疣

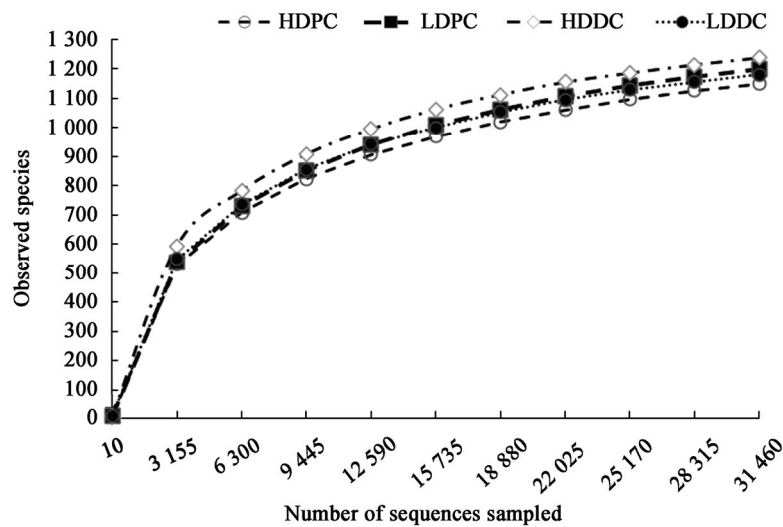


图 1 环江香猪结肠内容物细菌的稀疏曲线

Figure 1 Rarefaction curve of bacteria in colonic content of Huanjiang mini-pigs

注：HD：高营养水平饲料；LD：低营养水平饲料；PC：近端结肠；DC：远端结肠。n=3，下同。  
Note: HD: High nutrient-level diet; LD: Low nutrient-level diet; PC: Proximal colonic content; DC: Distal colonic content. n=3, the same as belows.

表 2 环江香猪结肠内容物微生物 OTU 数量及 Alpha 多样性  
Table 2 OTU number and alpha diversity of microbes of colonic content in Huanjiang mini-pigs

项目 Items	高营养水平饲料 HD		低营养水平饲料 LD		SEM	P 值 P values		
	近端结肠 PC	远端结肠 DC	近端结肠 PC	远端结肠 DC		饲料 Diet	部位 Location	饲料×部位 Diet×Location
OTUs	1 250	1 333	1 362	1 341	6.769	0.469	0.706	0.533
Chao1	1 293	1 362	1 357	1 326	6.466	0.856	0.796	0.508
Shannon	7.110	7.799	7.026	7.456	0.482	0.610	0.201	0.756
Simpson	0.960	0.981	0.936	0.969	0.116	0.424	0.295	0.773
ACE	1 311	1 373	1 374	1 329	6.385	0.902	0.907	0.472

微 菌 门 (Verrucomicrobia)、广 古 细 菌 门 (Euryarchaeota)、纤维杆菌门(Fibrobacteres)、蓝细菌门(Cyanobacteria)、脱铁杆菌门(Deferribacteres)和浮霉菌门(Planctomycetes)细菌的含量较低(表 3)。广古细菌门是鉴定到的唯一一个古细菌门，各样品中细菌的平均含量为 0.23%，其分布范围为 0.01%–0.54%。高营养水平饲料组结肠内容物中广古细菌门细菌含量显著低于低营养水平饲料组 ( $P<0.05$ )。

在饲喂两种饲料条件下，近端结肠和远端结肠

内容物中分布的细菌具有相似性，即远端结肠内容物中拟杆菌门、螺旋体门、软壁菌门和变形菌门的相对含量均高于近端结肠，而硬壁菌门和纤维杆菌门细菌的相对含量均低于近端结肠( $P>0.05$ )。高营养水平饲料组硬壁菌门、软壁菌门、放线菌门和纤维杆菌门等细菌的相对丰度低于低营养水平饲料组( $P>0.05$ )。

2.3 饲料组成对环江香猪结肠内容物属水平菌群结构的影响

对 12 个结肠内容物样品所得到的细菌 OTU 进

表 3 环江香猪结肠内容物中门水平上的细菌相对丰度  
Table 3 Bacteria relative abundance on phylum level of colonic content in Huanjiang mini-pigs

项目 Items	高营养水平饲料 HD		低营养水平饲料 LD		SEM	P 值 P values		
	近端结肠 PC (%)	远端结肠 DC (%)	近端结肠 PC (%)	远端结肠 DC (%)		饲料 Diet	部位 Location	饲料×部位 Diet×Location
Firmicutes	59.15	50.16	72.56	61.06	0.184	0.072	0.119	0.836
Bacteroidetes	29.41	34.25	15.65	26.18	0.190	0.119	0.253	0.660
Spirochaetes	7.59	9.63	5.23	6.58	0.114	0.266	0.476	0.882
Tenericutes	1.08	1.64	2.20	2.60	0.052	0.054	0.327	0.858
Proteobacteria	1.19	1.98	1.33	1.58	0.050	0.786	0.268	0.559
Actinobacteria	0.35	0.48	0.95	0.70	0.041	0.189	0.859	0.528
Other bacteria	0.48	0.73	0.64	0.49	0.027	0.770	0.727	0.150
Verrucomicrobia	0.49	0.60	0.54	0.13	0.045	0.564	0.676	0.465
Euryarchaeota	0.07	0.07	0.45	0.37	0.027	0.024	0.724	0.755
Fibrobacteres	0.15	0.10	0.28	0.20	0.020	0.133	0.351	0.848
Cyanobacteria	0.03	0.31	0.07	0.05	0.028	0.429	0.350	0.292
Deferribacteres	0.02	0.05	0.03	0.02	0.011	0.541	0.606	0.326
Planctomycetes	0.00	0.00	0.07	0.03	0.013	0.169	0.538	0.517
Unclassified bacteria	0.00	0.00	0.00	0.02	0.007	0.463	0.281	0.538

行物种注释, 共检测出 344 个属; 对所有样品含量之和相对丰度≥0.5%的属进行了统计, 共 41 个属(表 4)。高营养水平饲料组瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)和假丁酸弧菌属(*Pseudobutyrvibrio*)细菌相对含量显著高于、未分类属细菌相对含量显著低于低营养水平饲料组( $P<0.05$ )。从不同部位的结肠内容物细菌属水平来看, 远端结肠内容物中脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)、颤螺菌属(*Oscillospira*)、瘤胃球菌属、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)和棒状杆菌属(*Corynebacterium*)细菌的含量显著高于近端结肠( $P<0.05$ )。所有测定样品中密螺旋体属(*Treponema*) (5.05%–26.70%)、乳酸菌属(*Lactobacillus*) (4.44%–12.72%)、瘤胃球菌属(*Ruminococcus*) (4.47%–7.20%)、梭菌属(*Clostridium*) (3.64%–5.05%)、葡萄球菌属(*Turicibacter*) (1.84%–3.98%)、普氏菌属(*Prevotella*) (1.59%–3.67%)和颤螺旋菌属(1.85%–4.77%)细菌的相对含量较高, 为环江香猪结肠内容物中的优势菌属。

2.4 两种饲料对环江香猪结肠内容物中代谢产物的影响

由表 5 可见, 高营养水平饲料组结肠内容物中乙酸和丙酸的含量均显著低于低营养水平饲料组( $P<0.05$ ), SCFA 总量低于、而支链脂肪酸(BCFA)含量高于低营养水平饲料组( $P>0.05$ )。

由表 6 可见, 高营养水平饲料组结肠内容物中氨氮和尸胺含量显著高于低营养水平饲料组( $P<0.05$ ), 近端结肠和远端结肠内容物中吲哚和总生物胺含量也高于低营养水平饲料组( $P>0.05$ ); 高营养水平饲料组近端结肠内容物中粪臭素含量最低, 但与其他组间无显著差异( $P>0.05$ )。

2.5 属水平差异细菌与差异代谢物的相关性

由表 7 可见, 乙酸含量分别与瘤胃球菌属和颤螺菌属细菌的相对含量呈极显著正相关( $P<0.01$ ); 丙酸含量与瘤胃球菌属、颤螺菌属和葡萄球菌属细菌的相对含量呈显著正相关( $P<0.05$ ), 与拟杆菌属细菌的相对含量呈显著负相关( $P<0.05$ ); 氨氮和尸

表4 环江香猪结肠内容物中属水平上的细菌相对丰度  
Table 4 Bacteria relative abundance on genus level in colonic content of Huanjiang mini-pigs

门水平 Phylum level	属水平 Genus level	高营养水平饲料 HD		低营养水平饲料 LD		SEM	P 值 P values		
		近端结肠	远端结肠	近端结肠	远端结肠		饲料	部位	饲料×部位
		PC (%)	DC (%)	PC (%)	DC (%)		Diet	Location	Diet×Location
Verrucomicrobia	<i>Akkermansia</i>	0.02	0.01	0.27	0.01	0.03	0.373	0.329	0.362
Tenericutes	<i>Anaeroplasm</i>	0.13	0.18	0.21	0.16	0.02	0.720	0.973	0.490
Spirochaetes	<i>Treponema</i>	7.56	5.05	9.62	26.7	0.26	0.256	0.459	0.905
Proteobacteria	<i>Acinetobacter</i>	0.01	0.01	0.12	0.04	0.02	0.227	0.477	0.466
	<i>Anaerovibrio</i>	0.17	0.27	0.25	0.20	0.02	0.977	0.623	0.179
	<i>Campylobacter</i>	0.09	0.03	0.14	0.04	0.02	0.544	0.181	0.741
	<i>Clostridium</i>	4.69	4.15	5.05	3.63	0.07	0.918	0.240	0.583
	<i>Coprococcus</i>	0.31	0.44	0.52	0.31	0.03	0.746	0.739	0.190
	<i>Desulfovibrio</i>	0.11	0.41	0.31	0.48	0.02	0.210	0.037	0.504
	<i>Dorea</i>	0.11	0.15	0.06	0.09	0.01	0.059	0.175	0.914
	<i>Lactobacillus</i>	10.49	12.72	4.44	6.93	0.13	0.084	0.455	0.966
	<i>Megasphaera</i>	0.11	0.38	0.27	0.06	0.03	0.589	0.829	0.108
	<i>Oscillospira</i>	2.29	4.76	1.85	4.63	0.07	0.765	0.021	0.872
	<i>p-75-a5</i>	0.26	0.42	0.40	0.52	0.02	0.274	0.208	0.840
	<i>Phascolarctobacterium</i>	0.34	0.29	0.42	0.30	0.03	0.789	0.599	0.854
	<i>Pseudomonas</i>	0.05	0.04	0.09	0.03	0.01	0.414	0.071	0.266
	<i>rc4-4</i>	0.08	0.11	0.09	0.08	0.01	0.826	0.770	0.493
	<i>Roseburia</i>	1.70	0.98	1.55	0.92	0.04	0.742	0.055	0.880
	<i>Ruminococcus</i>	5.48	7.20	4.47	6.63	0.07	0.397	0.058	0.812
	<i>[Ruminococcus]</i> <sup>1</sup>	0.16	0.22	0.13	0.16	0.01	0.028	0.028	0.286
	<i>Staphylococcus</i>	0.08	0.13	0.08	0.13	0.01	1.000	0.034	0.959
	<i>Sutterella</i>	0.30	0.23	0.23	0.21	0.03	0.713	0.736	0.846
	<i>Turicibacter</i>	3.98	1.83	3.81	2.16	0.08	0.948	0.137	0.833
	<i>Veillonella</i>	0.12	0.14	0.12	0.08	0.01	0.342	0.807	0.342
Firmicutes	<i>Anaerotruncus</i>	0.04	0.08	0.03	0.04	0.01	0.309	0.351	0.626
	<i>Dehalobacterium</i>	0.03	0.07	0.02	0.04	0.01	0.375	0.181	0.692
	<i>Facklamia</i>	0.09	0.04	0.06	0.07	0.01	0.924	0.529	0.368
	<i>Faecalibacterium</i>	0.05	0.05	0.09	0.09	0.01	0.157	0.927	0.956
	<i>Lachnospira</i>	0.07	0.06	0.07	0.10	0.01	0.462	0.742	0.423
	<i>Mitsuokella</i>	0.02	0.13	0.06	0.02	0.01	0.279	0.251	0.023
	<i>Pediococcus</i>	0.08	0.04	0.05	0.03	0.01	0.503	0.367	0.789
	<i>Pseudobutyrvibrio</i>	0.06	0.12	0.04	0.03	0.01	0.030	0.334	0.181
Bacteroidetes	<i>CF231</i>	1.34	0.47	0.54	0.48	0.05	0.413	0.340	0.403
	<i>Prevotella</i>	3.61	1.60	3.66	3.52	0.06	0.138	0.110	0.157
	<i>Parabacteroides</i>	0.87	0.71	1.00	0.74	0.03	0.653	0.265	0.775
Actinobacteria	<i>Bacteroides</i>	0.95	0.39	0.87	0.46	0.03	0.978	0.015	0.641
	<i>Bifidobacterium</i>	0.27	0.83	0.32	0.54	0.04	0.675	0.199	0.546
	<i>Corynebacterium</i>	0.02	0.07	0.03	0.09	0.01	0.408	0.036	0.754
	<i>Paludibacter</i>	1.05	0.41	0.64	0.50	0.05	0.711	0.382	0.565
	<i>[Prevotella]</i> <sup>2</sup>	0.74	0.29	0.70	0.52	0.04	0.673	0.180	0.556
	<i>YRC22</i>	0.60	0.42	0.38	0.46	0.03	0.468	0.682	0.296
Unclassified bacteria		20.22	17.73	29.33	24.81	0.13	0.021	0.249	0.727
Other bacteria (<0.5%)		31.28	31.79	32.17	33.10	0.14	0.765	0.844	0.955

注: <sup>1</sup>、<sup>2</sup>: *[Ruminococcus]*与 *Ruminococcus*, *Prevotella* 与 *[Prevotella]*分别属于相同的门不同的科。

Note: <sup>1</sup>, <sup>2</sup>: *[Ruminococcus]* and *Ruminococcus* are belong to the same phylum and different families, as well as *Prevotella* and *[Prevotella]*.

表 5 环江香猪结肠内容物中短链脂肪酸的含量  
Table 5 The amount of short-chain fatty acids in colonic content of Huanjiang mini-pigs

项目 Items	高营养水平饲料 HD		低营养水平饲料 LD		SEM	P 值 P values		
	近端结肠 PC (mg/g)	远端结肠 DC (mg/g)	近端结肠 PC (mg/g)	远端结肠 DC (mg/g)		饲料 Diet	部位 Location	饲料×部位 Diet×Location
Acetate	4.71	4.73	7.67	5.24	0.643	0.042	0.131	0.127
Propionate	1.63	1.88	2.60	2.03	0.364	0.041	0.500	0.109
Butyrate	0.95	1.09	1.14	0.92	0.389	0.980	0.894	0.519
Isobutyrate	0.21	0.31	0.17	0.19	0.194	0.269	0.401	0.569
Valerate	0.35	0.39	0.27	0.23	0.263	0.349	0.977	0.727
Isovalerate	0.22	0.33	0.16	0.19	0.196	0.167	0.343	0.606
Total SCFA	8.08	8.73	12.01	8.80	0.809	0.116	0.291	0.128
A/P	2.91	2.52	2.92	2.68	0.385	0.727	0.252	0.777
Total BCFA	0.44	0.63	0.33	0.38	0.274	0.207	0.465	0.583

注: n=5; A/P: 乙酸/丙酸. 下同.  
Note: n=5; A/P: Acetate/ Propionate. The same as belows.

表 6 环江香猪结肠内容物中含氮代谢物的含量  
Table 6 The amount of nitrogen-containing metabolites in colonic content of Huanjiang mini-pigs

项目 Items	高营养水平饲料 HD		低营养水平饲料 LD		SEM	P 值 P values		
	近端结肠 PC (μg/g)	远端结肠 DC (μg/g)	近端结肠 PC (μg/g)	远端结肠 DC (μg/g)		饲料 Diet	部位 Location	饲料×部位 Diet×Location
NH <sub>3</sub> -N (mg/g)	17.44	14.83	12.75	14.07	0.790	0.036	0.570	0.106
Indole	9.12	8.83	7.83	7.47	0.335	0.074	0.649	0.959
Skatole	2.42	4.37	3.03	3.23	0.338	0.691	0.118	0.196
Trytamine	0.51	0.75	1.41	0.52	0.519	0.489	0.509	0.264
Phenylethylamine	1.15	1.24	1.84	1.76	0.461	0.141	0.988	0.817
Putrescine	5.60	2.83	4.92	4.81	1.002	0.717	0.433	0.467
Cadaverine	1.87	2.07	1.19	1.09	0.390	0.014	0.862	0.591
1,7-Heptyl diamine	0.48	0.79	1.15	0.46	0.330	0.395	0.344	0.031
Tyramine	0.86	2.20	2.02	1.93	0.645	0.552	0.411	0.346
Spermidine	12.75	13.02	14.93	8.63	1.160	0.649	0.231	0.196
Spermine	5.47	4.18	3.71	1.79	0.778	0.083	0.166	0.771
Total bioamine	28.68	31.17	27.08	20.99	1.710	0.733	0.280	0.424

表 7 结肠内容物细菌多样性与代谢产物的相关性  
Table 7 Correlation coefficients between colonic bacterial community and metabolites

Items	<i>Ruminococcus</i>	<i>Pseudobutyrvibrio</i>	<i>Desulfovibrio</i>	<i>Oscillospira</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Corynebacterium</i>
NH <sub>3</sub> -N	-0.46	-0.28	-0.40	-0.34	-0.41	-0.46	-0.39
Acetate	0.83**	0.21	0.41	0.64**	0.46	-0.48	-0.10
Propionate	0.62*	0.39	0.52	0.59*	0.69*	-0.63*	0.11
Cadaverine	0.41	0.37	-0.22	-0.12	-0.21	0.15	-0.20

Note: \*\*: P<0.01; \*: P<0.05.



胺含量与任一测定菌的相对含量均无相关性 ( $P>0.05$ )。

### 3 讨论

本研究发现,在 97% (即种)水平上进行细菌 OTU 划分,从 31 460 条序列中共检测出 2 597 个 OTU;两种饲料对结肠内容物中细菌 OTU 数量和 Alpha 多样性的影响不大,可能是因为本研究中的饲养时间较短,或者高营养水平饲料对环江香猪来说营养水平仍不够高。硬壁菌门和拟杆菌门为环江香猪结肠内容物中的优势菌门。Lu 等<sup>[14]</sup>研究也发现,硬壁菌门是仔猪结肠内的优势菌门;Edward 等<sup>[15]</sup>也报道,杜洛克断奶仔猪粪便中硬壁菌门细菌的含量最高,其次是拟杆菌门细菌。在改变饲料营养水平条件下也未能改变它们的优势地位,可见它们在结肠中占据重要地位。硬壁菌门和拟杆菌门都具有降解多糖、促进机体能量吸收的作用。与低营养水平饲料组相比,高营养水平饲料组环江香猪结肠中的硬壁菌门、软壁菌门、放线菌门和纤维杆菌门等细菌的相对丰度降低,但差异不显著,可能与本研究测定样品的重复数较少有关。在属水平上,密螺旋体属、乳酸菌属、瘤胃球菌属、梭菌属、葡萄球菌属、普氏菌属和颤螺菌属细菌为环江香猪结肠内容物中的优势菌属。Lamendella 等的研究也发现,普氏菌属是猪肠道中的优势菌属<sup>[16]</sup>。Mackie 研究发现,颤螺菌属是较难培养的厌氧菌,常见于草食动物肠道中<sup>[17]</sup>,而在环江香猪结肠内容物中颤螺菌属为优势菌属,这与其耐粗饲有很大关系。

甲烷菌属于广古细菌门,可利用其他微生物厌氧发酵产生的氢气和氨气作为底物合成甲烷,从而减少肠道中气体的累积,维持后肠的厌氧环境,对维持肠道微生物区系的稳定、营养物质的消化利用和肠道健康均具有重要作用<sup>[18]</sup>。瘤胃球菌属、颤螺菌属和假丁酸弧菌属细菌均是硬壁菌门中能够分解纤维的菌属<sup>[19]</sup>。拟杆菌属细菌也是肠道中非纤维植物成分的主要降解菌,梭菌属细菌也具有一定的纤维素分解能力。普氏菌属中拥有高活性的半纤维

素分解菌<sup>[20]</sup>,并且对植物非纤维多糖和蛋白质的降解均具有至关重要的作用<sup>[15]</sup>。环江香猪结肠内存在的优势菌多具有纤维素和半纤维素分解能力,这与其具有较强的耐粗饲能力有关。另外,饲喂低营养水平饲料时,环江香猪结肠内容物中广古细菌门细菌的比例较高,瘤胃球菌属和假丁酸弧菌属细菌的比例较低,与饲料中的纤维素、蛋白质等营养素的含量高低有关。

结肠是猪后肠中最为发达的肠段,以微生物消化为主,可将前端消化道不能消化的糖类、纤维素、半纤维素以及含氮类物质分解发酵为 SCFA、氨、生物胺、吲哚和酚类等物质<sup>[21]</sup>。测定肠道中上述代谢产物的含量和组成比例,可反映微生物的发酵能力和发酵模式。SCFA 尤其是丁酸是结肠粘膜上皮细胞的主要能源物质,可以维持肠粘膜上皮细胞结构的完整性,并促进大肠的生长<sup>[22]</sup>。在本研究中,饲喂低营养水平饲料时,结肠中乙酸和丙酸含量显著增加,是因为低营养水平饲料中高含量的粗纤维促进了微生物的发酵,这对宿主健康有益。研究证明,随着摄入蛋白质的增加,微生物对尿素的降解和氨基酸的脱氨基等作用相应增加,导致肠道内容物中氨的浓度升高<sup>[23]</sup>,过量的氨会降低结肠细胞的呼吸作用,甚至产生毒性作用。尸胺是由大肠杆菌、尸杆菌等微生物中的 L-赖氨酸脱羧酶将赖氨酸脱 CO<sub>2</sub> 生成<sup>[24]</sup>。本研究发现,饲喂高营养水平饲料时,结肠中氨氮与尸胺的含量较高,是因为高营养水平饲料中含有较高水平的蛋白质和赖氨酸。

本研究相关性分析发现,环江香猪结肠中瘤胃球菌属和颤螺菌属细菌的相对含量与乙酸含量呈显著正相关,这是因为这两种细菌均具有较强的纤维素分解能力,能够生成乙酸。瘤胃球菌属、颤螺菌属和葡萄球菌属细菌相对含量的增加,也能够提高丙酸的含量,因为瘤胃球菌属和颤螺菌属细菌在降解纤维时也会生成少量丙酸,葡萄球菌属与脱硫弧菌属和颤螺菌属细菌相互促进,提高了丙酸含量。拟杆菌属细菌主要降解胃肠道内的非纤维植物成分,与颤螺菌属细菌存在着一定的拮抗关系,因

此可间接影响结肠中丙酸的含量。

综上所述,硬壁菌门、拟杆菌门、螺旋体门和软壁菌门细菌为环江香猪结肠内容物中的优势菌门,短期饲喂高营养水平饲料可改变环江香猪结肠中的部分微生物含量及其代谢特性。

## 参考文献

- [1] Nicholson JK, Holmes E, Wilson ID. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(5): 431-438
- [2] Karen PS, Silvia WG, Paul OS, et al. The influence of diet on the gut microbiota[J]. *Pharmacological Research*, 2013, 69(1): 52-60
- [3] Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography[J]. *Nature*, 2012, 486(7402): 222-227
- [4] Claesson MJ, Cusack S, O'Sullivan O, et al. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(S1): 4586-4591
- [5] Li XM, Yang LJ, Huo GC. Illumina technology research the difference of intestinal flora in infants with different feed fashion[J]. *Food Science and Technology*, 2012, 37(9): 319-324
- [6] Zhao LP, Shen J. Whole-body systems approaches for gut microbiota-targeted, preventive healthcare[J]. *Journal of Biotechnology*, 2010, 149(3): 183-190
- [7] Chen QS, Liu XH, Yang HJ, et al. Protection present situation and the suggestion about Chinese local pig resources[J]. *China Swine Industry*, 2012(1): 19-22 (in Chinese)  
陈清深, 刘小红, 杨红杰, 等. 中国地方猪资源保护现状与建议[J]. *中国猪业*, 2012(1): 19-22
- [8] Geng MM, Xu LW, Yuan HZ, et al. A determination method based on gas chromatography for analysis of short-chain fatty acids in colonic contents of piglet[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2015, 15(6): 1010-1014 (in Chinese)  
耿梅梅, 许丽卫, 袁红朝, 等. 气相色谱法测定猪结肠内容物中短链脂肪酸含量[J]. *现代生物医学进展*, 2015, 15(6): 1010-1014
- [9] Zhou XL, Kong XF, Lian GQ, et al. Dietary supplementation with soybean oligosaccharides increases short-chain fatty acids but decreases protein-derived catabolites in the intestinal luminal content of weaned Huanjing mini-piglets[J]. *Nutrition Research*, 2014, 34(9): 780-788
- [10] Ji YJ. Evaluating nutritional value of three kinds of insects[D]. Nanchang: Master's Thesis of Nanchang University, 2013 (in Chinese)  
姬玉娇. 三种昆虫的营养价值评价[D]. 南昌: 南昌大学硕士学位论文, 2013
- [11] Xu LW, Geng MM, Zhang LP, et al. Determination of bioamines in colonic contents of piglets by pre-column derivatization RP-HPLC[J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2014, 36(1): 78-83 (in Chinese)  
许丽卫, 耿梅梅, 张丽萍, 等. 柱前衍生-反相高效液相色谱法测定仔猪结肠内容物生物胺含量[J]. *营养学报*, 2014, 36(1): 78-83
- [12] Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, et al. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(16): 5261-5267
- [13] de Santis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(7): 5069-5072
- [14] Lu XM, Lu PZ, Zhang H. Bacterial communities in manures of piglets and adult pigs bred with different feeds revealed by 16S rDNA 454 pyrosequencing[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(6): 2657-2665
- [15] Edward ABP, Jong PC, Marilen PB, et al. Characterization of the fecal microbial communities of Duroc pigs using 16S rRNA gene pyrosequencing[J]. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2015, 28(4): 584-591
- [16] Lamendella R, Domingo JWS, Ghosh S, et al. Comparative fecal metagenomics unveils unique functional capacity of the swine gut[J]. *BMC Microbiology*, 2011, 11: 103
- [17] Mackie RI, Aminov RI, Hu WP, et al. Ecology of uncultivated *Oscillospira* species in the rumen of cattle, sheep, and reindeer as assessed by microscopy and molecular approaches[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(11): 6808-6815
- [18] Ge T, Mu CL, Zhu WY. Methanogen and human gut health—a review[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2015, 55(6): 661-666 (in Chinese)  
葛婷, 慕春龙, 朱伟云. 人肠道产甲烷菌与肠道健康[J]. *微生物学报*, 2015, 55(6): 661-666
- [19] Hou YJ, Xu J, Su YJ, et al. Effects of different dairy ration which has different roughage sources but with same concentration of NFC and FNDF on ruminal fermentation, digestibility and microbial protein synthesis *in vitro*[J]. *China Dairy Cattle*, 2013(1): 1-6 (in Chinese)  
候玉洁, 徐俊, 苏衍菁, 等. 体外法研究 FNDF、NFC 浓度相同的不同粗饲料来源日粮对瘤胃发酵、纤维消化和微生物蛋白合成的影响[J]. *中国奶牛*, 2013(1): 1-6
- [20] Matsui H, Ogata K, Tajima K, et al. Phenotypic characterization of polysaccharidases produced by four *Prevotella* type strains[J]. *Current Microbiology*, 2000, 41(1): 45-49
- [21] Kong XF. The research progress of colonic microbial nitrogen metabolism and body health[J]. *Feed and Animal Husbandry: New Feed*, 2013(4): 10-17 (in Chinese)  
孔祥峰. 结肠微生物氮代谢与机体健康研究进展[J]. *饲料与畜牧: 新饲料*, 2013(4): 10-17
- [22] Segain JP, Raingeard de la Blétière D, Boureille A, et al. Butyrate inhibits inflammatory responses through NF kappa B inhibition: implications for Crohn S disease[J]. *Gut*, 2000, 47(3): 397-403
- [23] Blachier F, Mariotti F, Huneau JF, et al. Effects of amino acid-derived luminal metabolites on the colonic epithelium and physiopathological consequences[J]. *Amino Acids*, 2007, 33(4): 547-562
- [24] Takatsuka Y, Yamaguchi Y, Ono M, et al. Gene cloning and molecular characterization of lysine decarboxylase from *selenomonas ruminantium* delineate its evolutionary relationship to ornithine decarboxylase from eukaryotes[J]. *Journal of Baeteriology*, 2000, 182(23): 6732-6741